

Aspergillus fumigatus in bermmaaisel, blad en andere organische reststromen

Auteurs:

Sijmen Schoustra, Bram de Rooij en Bas Zwaan

Laboratorium voor Erfelijkheidslcer, Wageningen University & Research



Wageningen, 31 augustus 2023

Voorwoord

Aspergillus fumigatus groeit van nature uitbundig op dood plantenmateriaal. Eerdere onderzoeken hebben aangetoond dat na sensitieve stammen ook azool-resistente stammen van deze schimmel aanwezig kunnen zijn in bewaarhoppen van reststromen met bollen- en groenafval. Ook in andere reststromen van land- en tuinbouw zijn azool-resistente *A. fumigatus* aangetroffen.

Op verzoek van het ministerie van Infrastructuur en Waterstaat (IenW) is door Laboratorium van Erfelijkheidsleer (Wageningen Universiteit & Research) onderzoek gedaan naar de totale hoeveelheid en fractie azoolresistente *A. fumigatus* die aanwezig is in reststromen die gebruikt worden binnen het Kennisprogramma Circulair Terreinbeheer KCT. Op een aantal locaties in Nederland zijn hiertoe ingangsmaterialen en producten bemonsterd van pilots die deelnemen aan het kennisprogramma. Deze monsters zijn vervolgens gebruikt voor de bepaling van aantallen schimmels en fractie resistentie daarvan.

In dit rapport worden de onderzoeksresultaten beschreven van de bemonsterde pilot locaties. Eurofins en pilothouders hebben hun medewerking verleend aan de bemonstering en onderzoekers van WUR hebben de analyses uitgevoerd en het rapport geschreven.

We bedanken alle meewerkende organisaties binnen en buiten het Kennisprogramma Circulair Terreinbeheer voor de medewerking.

Inhoudsopgave

Voorwoord	2
Samenvatting	4
1. Inleiding	6
Kennisprogramma Circulair Terreinbeheer.....	6
<i>Aspergillus fumigatus</i> binnen Kennisprogramma Circulair Terreinbeheer	6
Doel van dit onderzoek	8
KADER: Bewerkingsmethoden van bermmaaisel en blad	10
2. Opzet en methoden van dit onderzoek	12
Selectiecriteria onderzochte pilots	12
Experimentele analyse methoden	13
Monstername	13
Bepaling van totale hoeveelheid <i>A. fumigatus</i> , fractie resistentie en genetisch resistentie mechanisme	13
Bepaling van concentratie azolen in ingangsmateriaal.....	14
3. Resultaten en duiding	15
Totale hoeveelheid <i>A. fumigatus</i> – per bewerkingsmethode.....	15
Totale hoeveelheid <i>A. fumigatus</i> – per soort materiaal.....	16
Fractie resistente <i>A. fumigatus</i> – per bewerkingsmethode.....	17
Fractie resistente <i>A. fumigatus</i> – per soort materiaal.....	19
Concentratie azolen	20
Genetisch resistentie mechanisme	21
4. Conclusies en aanbevelingen	22
5. Literatuurlijst.....	23
Bijlage 1. Geteste pilots: Bokashi A	25
Bijlage 2. Geteste pilots: Bokashi B	28
Bijlage 3. Geteste pilots: Bioterra, Rechtstreeks en Compost-O	29
Bijlage 4. Technische replica dataset.....	31
Bijlage 5. Genetische analyse van de promotor regio van het <i>cyp51A</i> gen.	41

Samenvatting

Achtergrond. *Aspergillus fumigatus* is een schimmel die van nature voorkomt in dood plantenmateriaal en die daarnaast infecties kan veroorzaken bij patiënten met specifieke aandoeningen. Wanneer patiënten worden geïnfecteerd met *A. fumigatus* die resistent is tegen azolen wordt de behandeling ernstig bemoeilijkt. Recent onderzoek heeft uitgewezen dat het gebruik van azolen in niet-medische toepassingen leidt tot een toename van azoolresistente *A. fumigatus* op verschillende plekken in het milieu, in zogenaamde hotspots. Het is de vraag of de praktijk van circulair terreinbeheer waar maaisel en blad wordt verzameld om te worden bewerkt tot organische bodemverbeteraar zo'n hotspot is. Het maaisel en blad kan namelijk in aanraking zijn geweest of behandeld zijn met azolen en zou (hoge) fracties azoolresistente *A. fumigatus* kunnen bevatten.

Doel en opzet. Het concrete doel van dit onderzoek is om eventuele risico's van resistentieontwikkeling in *A. fumigatus* in de diverse groenreststromen (maaisel en blad) die verwerkt worden bij de pilots van het kennisprogramma Circulair Terreinbeheer te inventariseren en in kaart te brengen. Indien mogelijk gebruiken we de resultaten om adviezen te formuleren om mogelijke risico's te voorkómen en/of significant te verlagen. Hierbij is gekeken naar de eventuele effecten die bewerkingsmethoden zoals Bokashi en compost-O hebben op de aanwezigheid, groei en resistentieontwikkeling van *A. fumigatus*. Dit geldt zowel in het materiaal voor bewerking als in het product na bewerking. In totaal zijn elf locaties (pilots van Circulair Terreinbeheer) bemonsterd.

We hebben monsters geanalyseerd op de totale hoeveelheid aanwezige *A. fumigatus*; de fractie azoolresistente *A. fumigatus*; de hoeveelheid azolen en hun residuen; en een toetsing of het genetische mechanisme van resistentie gelijk is aan het medische resistentiemechanisme (*cyp51*) gevonden in patiënten.

Resultaten. De resultaten laten zien dat de totale hoeveelheid aanwezige *A. fumigatus* in maaisel en blad tussen 10 duizend en 10 miljoen sporen per gram materiaal ligt – dit is gelijk aan andere soorten materiaal zoals bollenmateriaal en gft en zoals verwacht omdat het bemonsterde dode plantenmateriaal de natuurlijke habitat is voor deze schimmel. Er is variatie in aantallen *A. fumigatus* na bewerking ten opzichte van voor bewerking; variërend van een lichte toename van een factor 4 tot een afname in sommige gevallen tot een factor 50 of meer lager.

De fractie *A. fumigatus* die resistent is tegen azolen ligt tussen 0 en 3 %, ongeacht of de monsters zijn genomen voor of na bewerking en ongeacht het soort materiaal of specifieke locatie waar bewerking plaatsvindt. Deze fractie resistente sporen is gelijk aan het achtergrondniveau van resistentie gevonden in representatieve luchtmetingen in West-Europa – dit geeft aan dat maaisel en blad bemonsterd in deze studie geen verhoogde aantallen azoolresistente *A. fumigatus* hebben in vergelijking met het achtergrondniveau. En daarmee dat dit materiaal geen additioneel risico vormt voor het verspreiden van azoolresistente *A. fumigatus*.

De hoeveelheid azolen en hun residuen lag voor vier van de elf locaties rond de detectielimiet van 0,01 mg/kg en voor de andere locaties daaronder. Voor de bemonsterde locaties hebben we geen verband gevonden tussen aanwezigheid van azolen en een verhoogde fractie azoolresistentie in *A. fumigatus*.

Genetische analyse van een selectie van gevonden resistente *A. fumigatus* laat zien dat resistentie van *A. fumigatus* in blad en maaisel hetzelfde genetische mechanisme heeft als in resistente *A. fumigatus* gevonden in patiënten. Dit bevestigt eerder onderzoek dat liet zien dat azoolresistentie in het milieu en in patiënten hetzelfde genetische mechanisme heeft.

Conclusie. De belangrijkste conclusie van dit onderzoek is dat de gevonden fractie azoolresistente *Aspergillus fumigatus* in het onderzochte materiaal op het achtergrondniveau van azoolresistente *A. fumigatus* ligt zoals gemeten in luchtmonsters in West Europa. Hiermee kan gesteld worden dat gebruik van het onderzochte materiaal (bermmaaisel en blad gebruikt bij onderzochte pilots en al dan niet bewerkt tot bodemverbeteraar) geen additioneel risico vormt op de verspreiding van azoolresistente *A. fumigatus*. De manier van bewerking en mate van afdoding van *A. fumigatus* hebben geen effect op de fractie resistentie. Er zijn op basis van dit onderzoek geen aanvullende maatregelen nodig in de bewerking van bermmaaisel en blad. De gevonden concentraties azolen en hun residuen in het materiaal liggen laag en veroorzaken in vergelijking met materiaal waar geen azolen zijn gedetecteerd geen verhoogde fracties azoolresistente schimmel.

1. Inleiding

Kennisprogramma Circulair Terreinbeheer

Het Kennisprogramma Circulair Terreinbeheer (KCT) onderzoekt de (eventuele) bewerking en daaropvolgende benutting van maaisel en blad als bodemverbeteraar ter bevordering van de kwaliteit en gezondheid van de bodem (*Claassen en Spijker 2022; Romkens et al. 2020*).

Essentieel voor een gezonde bodem is het organische stofgehalte. Organische stof in de bodem kan ertoe bijdragen dat de bodem een hoger watervasthoudend vermogen heeft, en kan (als voedingsbron voor het bodemleven) ook het vermogen van de bodem om ziekten te weren vergroten. Een gezond bodemleven is namelijk veel veerkrachtiger en sterker dan een uitgeput bodemleven.

Eén van de manieren om het bodemleven te stimuleren is door organische stof toe te voegen aan de bodem. Het KCT onderzoekt mogelijkheden van het toepassen van maaisel en blad, afkomstig van o.a. bermen, watergangen, bergingen en dijken als bron van onder meer koolstof en nutriënten. Leveranciers van deze materialen zijn bijvoorbeeld gemeenten, waterschappen en natuurorganisaties. In plaats van afvoeren is het doel dat lokale agrariërs gebruik van dit materiaal zouden kunnen maken als bodemverbeteraar (*Elferink et al. 2022; Romkens et al. 2020*). Door middel van praktijkproeven (pilots) wordt nu lokaal onderzoek gedaan naar de mogelijkheid om dit maaisel verantwoord te kunnen gaan gebruiken als bodemverbeteraar in de landbouw. Hierbij is het van belang in kaart te brengen of de aanwezigheid van resistente *Aspergillus fumigatus* mogelijk een risico vormt van de toepasbaarheid van dit plantenmateriaal, al dan niet na verschillende manieren van bewerking.

Aspergillus fumigatus binnen Kennisprogramma Circulair

Terreinbeheer

Aspergilli vormen een geslacht van veel voorkomende schimmels binnen de zogenaamde Ascomyceten (zakjeszwammen), die leven van dood of vervallen organisch materiaal. Zo ook de alom aanwezige schimmel *Aspergillus fumigatus*. Doordat schimmels zoals *A. fumigatus* in staat zijn complexe organische materialen af te breken, vervullen zij een belangrijke ecologische rol en zijn ze van groot belang voor de koolstof- en stikstofkringloop in de natuur. Doordat *A. fumigatus* veel voorkomt in het milieu, beperkt de aanwezigheid van deze schimmel zich niet alleen tot bijvoorbeeld dood plantenmateriaal in het bos. *A. fumigatus* wordt ook veelvuldig teruggevonden in organische reststromen afkomstig van de landbouw, bloembollenteelt, hout- en groenverwerking (*Leendertse et al. 2021; Zhang et al. 2022*).

Daarnaast staat *A. fumigatus* echter ook bekend als een beruchte opportunistische ziekteverwekkende schimmel voor mensen met specifieke aandoeningen aan de longen. De *A. fumigatus* sporen die aanwezig zijn in de lucht kunnen in met name mensen met

een verzwakt immuunsysteem potentieel dodelijke luchtweginfecties (*Aspergillose*) veroorzaken (Latgé 1999; Schoustra et al. 2019). Ondanks de relatieve zeldzaamheid van deze infecties is adequate behandeling met antischimmelmiddelen noodzakelijk. De medicijnen die hiervoor gebruikt worden behoren tot de zogenaamde medische triazolen.

Azolen-bevattende bestrijdingsmiddelen worden veelvuldig gebruikt om landbouwgewassen te beschermen tegen schimmels, zoals *Fusarium* en *Botrytis*. Daarnaast worden azolen-bevattende middelen ook toegepast bij de verduurzaming van hout. Dit kan leiden tot verspreiding van azolen naar maaisel en gevallen blad in gebieden waar het verduurzaamde hout is toegepast (zoals in bermen, watergangen en groenvoorziening). Ondanks het feit dat *A. fumigatus* geen schimmel is die landbouwgewassen infecteert en dus geen direct doelwit is van de toegepaste azolen-bevattende bestrijdingsmiddelen, kan *A. fumigatus* op deze manier wel blootgesteld worden aan azolen. Het gevaar hiervan is selectie voor resistentie tegen azolen, ook bij relatief lage concentraties (Schoustra et al. 2019; Schoustra 2022).

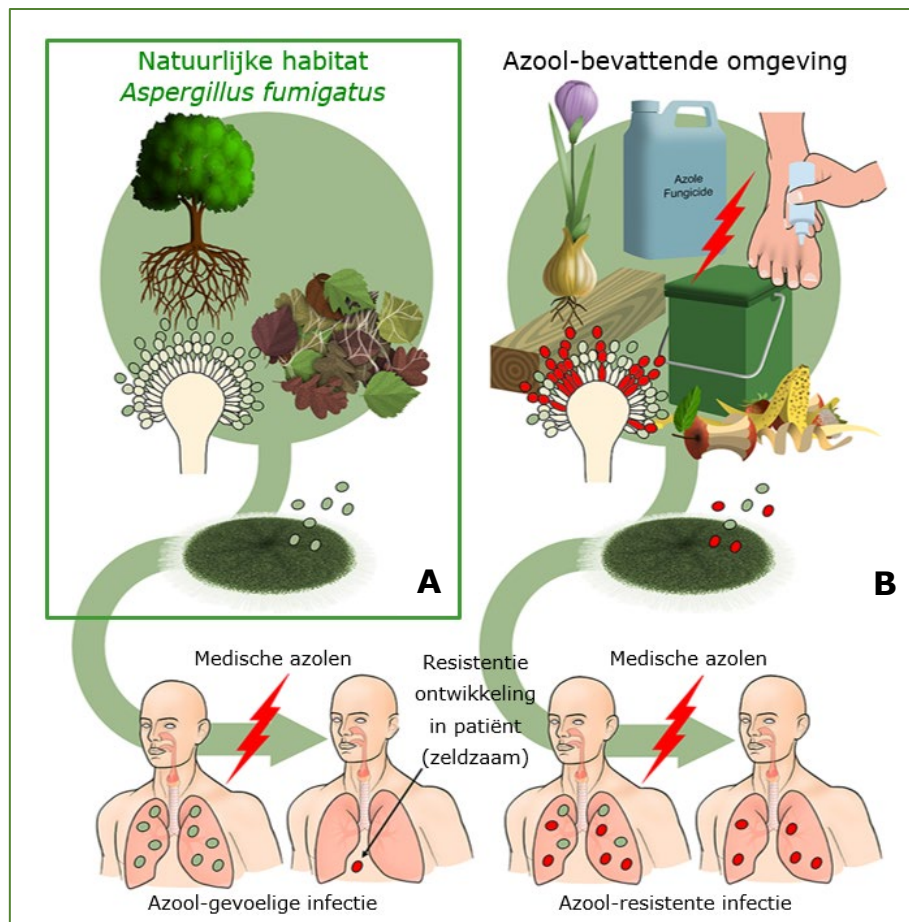
Een succesvolle behandeling met medische triazolen wordt steeds moeilijker doordat er azool-resistentieontwikkeling plaatsvindt in *A. fumigatus*. Deze resistentieontwikkeling wordt veroorzaakt door blootstelling aan azolen in de natuurlijke habitat van *A. fumigatus*. In o.a. de land- en tuinbouw en houtverduurzaming wordt namelijk veelvuldig gebruikt gemaakt van azool-bevattende antischimmelmiddelen. Deze azolen lijken chemisch sterk op de medische triazolen die gebruikt worden voor de behandeling van schimmelinfecties. Op deze manier zorgt azool-resistentieontwikkeling van *A. fumigatus* in de natuurlijke habitat voor een kruisresistentieontwikkeling tegen medische triazolen (Figuur 1).

Uit eerder onderzoek blijkt bijvoorbeeld dat blootstelling aan azolen die in het milieu aanwezig zijn een bron van resistentieontwikkeling vormen tegen medische triazolen in *A. fumigatus* (Figuur 1). De resistentiemutaties in het zogenaamde *cyp51*-gen van *A. fumigatus* die gevonden worden in het milieu worden dan ook teruggevonden in patiënten die geïnfecteerd zijn met *A. fumigatus*. Wanneer *A. fumigatus* in dit soort bronnen in grote aantallen voorkomt in aanwezigheid van azolen en er gedurende langere tijd groei kan optreden spreken we van zogenaamde "hotspots" voor resistentieontwikkeling. Enkele voorbeelden van bekende hotspots zijn afval uit de bloembollenteelt, restanten van houtverduurzaming, afval van uienteelt en fruitteelt en andere groene reststromen (Leendertse et al. 2021; Schoustra et al. 2019; Schoustra 2022; Zhang et al. 2022).

Het KCT onderzoekt de voor- en nadelen van het gebruik van reststromen zoals groenresten van infrastructuur (m.n. afkomstig van wegbermen), natuur en groenvoorziening als bodemverbeteraar na lokale bewerkingsmethoden zoals fermenteren en (verschillende vormen van) compostering (zie kader). Aangezien *A. fumigatus* veel voorkomt in dood plantenmateriaal, is de verwachting dat *A. fumigatus* ook hier veelvuldig zal voorkomen in organische groenresten zoals blad en maaisel afkomstig van bermen, sloten en andere bronnen. Wanneer deze reststromen ook blootgesteld zijn aan azolen kan dit bijdragen aan resistentieontwikkeling en daarmee de verspreiding van azoolresistente *A. fumigatus*. De bron van de azolen kan overigens

komen wellicht indirect vanuit materiaal van een andere toepassing, zoals van naastgelegen landbouw percelen waardoor het materiaal hoge of lage concentraties van deze azolen kan bevatten) Het is daarom van belang om de diverse indicatoren voor azoolresistentieontwikkeling in *A. fumigatus* en dus de potentie van een eventuele hotspot voor deze reststromen in kaart te brengen.

Indicatoren voor een hotspot voor ontwikkeling van azoolresistentie en vermeerdering en verspreiding van deze resistentie in *Aspergillus fumigatus* zijn de aanwezigheid van azolen en hun residuen, een temperatuur tussen 10 en 50 graden, een middelmatige vochtigheid van het materiaal.



Figuur 1. Resistentieontwikkeling in *A. fumigatus*. **(A)** De natuurlijke habitat van de veel voorkomende schimmel *A. fumigatus* is dood plantenmateriaal. *A. fumigatus* is een sterk sporulerende schimmel en de sporen worden verspreid door de wind. Als mens ademen we dagelijks sporen in en normaalgesproken levert dit geen gezondheidsproblemen op. In mensen met een sterk verzwakt immuunsysteem kan dit echter leiden tot ernstige luchtweginfecties (Aspergillose) die in het ziekenhuis behandeld moeten worden met medische triazolen (o.a. itraconazool en voriconazool). **(B)** Wanneer *A. fumigatus* in de omgeving blootgesteld wordt aan azolen (o.a. land- en tuinbouw fungiciden, houtverduurzamingsmiddelen) vindt er azool-resistentieontwikkeling plaats in *A. fumigatus*. Wanneer resistente sporen een azool-resistente luchtweginfectie veroorzaken in mensen met een sterk verzwakt immuunsysteem, is deze nog maar slecht te behandelen met bestaande medische triazolen.

Doel van dit onderzoek

Het doel van dit onderzoek is om de mate van resistentieontwikkeling in *A. fumigatus* in de diverse groenreststromen die relevant zijn binnen het kennisprogramma circulair

terreinbeheer te inventariseren en in kaart te brengen. Daarnaast is het doel (indien relevant) om adviezen te formuleren om mogelijke risico's te voorkómen en/of significant te verlagen. Hierbij wordt gekeken naar de eventuele effecten die bewerkingsmethoden die worden toegepast binnen circulair terreinbeheer (zoals Bokashi) hebben op de aanwezigheid, groei en resistentieontwikkeling van *A. fumigatus*. Hiertoe werden zowel voor (ingangsmateriaal) als na (product) bewerking monsters verzameld. Deze monsters werden geanalyseerd op:

- De totale hoeveelheid aanwezige *A. fumigatus*;
- De fractie azool-resistente *A. fumigatus*;
- De hoeveelheid azolen en hun residuen;
- Genetische analyse van een selectie resistente typen voor toetsing aan medisch resistentiemechanisme (*cyp51*).

KADER: Bewerkingsmethoden van bermmaaisel en blad

In dit onderzoek wordt onderzocht of bewerkingsmethoden van bermmaaisel en bladafval invloed hebben op de totale hoeveelheid aanwezige *A. fumigatus* en de fractie azool-resistente *A. fumigatus* in het product na bewerking. Binnen het Kennisprogramma Circulair terreinbeheer gaat het met name om bokashi. Hieronder staat het bewerkingsproces van bokashi en uitgewerkt.

Bokashi

Bokashi is het Japanse woord voor "goed gefermenteerd organisch materiaal" dat teruggegeven wordt aan de bodem. Bokashi wordt gemaakt met behulp van zogenaamde *effectieve micro-organismen* en is ontwikkeld in Japan door Prof. Dr. Teruo Higa. Ondanks het feit dat bokashi in de afgelopen 35 jaar algemeen bekend is geworden in meer dan 150 landen, is het maken van bokashi in Nederland nog maar relatief korte tijd in opmars.

Het maken van bokashi

Bokashi wordt gemaakt door een aantal toevoegingen zoals effectieve micro-organismen en kalk door vers organisch materiaal te mengen en dit minimaal 8 weken te laten fermenteren. Diverse reststromen zoals (drijf)mest, graskuil, aardappelreststromen, riet, bladeren, houtsnippers en reststromen uit openbaar groen dienen daarbij als bron van organisch materiaal. In het kader van KCT wordt echter uitsluitend maaisel en/of blad gebruikt, soms aangevuld met riet of houtsnippers.

Fermentatie is een anaeroob proces waarbij organisch materiaal met behulp van micro-organismen omgezet wordt. Om Bokashi te kunnen maken, worden hulpstoffen toegevoegd aan het ingangsmateriaal. Alle pilots die onderzocht zijn tijdens dit project werken volgens gedocumenteerde richtlijnen en een vaststaand procedé van ofwel Agriton (Bokashi A) of Bij de Oorsprong (Bokashi B).

Bokashi A

Het Agriton recept maakt gebruik van een aantal hulpstoffen, te weten Edasil kleimineralen, Aegir zeeschelpkalk en EM Microferm. De functies van deze hulpstoffen wordt beschreven in Tabel 1.

Tabel 1. Agriton bokashi hulpstoffen en veronderstelde effecten (Bron: Agriton).

Hulpstof	Veronderstelde effecten
EM Microferm	Microferm faciliteert fermentatie. Het bevat een optimaal mengsel van bacteriën, schimmels en gisten (Effectieve Micro-organismen). Stimuleert de omzetting van biomassa waardoor organisch materiaal beter benut kan worden. Verhoogt het natuurlijk microbiële evenwicht en de biodiversiteit.
Aegir zeeschelpkalk	Zeeschelpkalk voorkomt pH schommelingen en zorgt voor een stabiele pH.
Edasil klei mineralen	Kleimineralen binden vocht en belangrijke mineralen en andere nutriënten die tijdens het fermentatieproces vrijkomen.

Agriton recept voor bokashi:

1 ton organisch materiaal + 12 kg edasil kleimineralen + 12 kg aegir zeeschelpkalk + 2 l EM Microferm

Alle producten worden vervolgens met elkaar gemengd en voor minimaal 8 weken luchtdicht afgesloten met plastic.

Bokashi B

Het recept van *Bij de Oorsprong* maakt gebruik van de volgende hulpstoffen: BB Bodem (micro-organismen), eMB starter (micro-organismen) en oergesteentegranulaat.

Bij de Oorsprong recept voor bokashi:

1 ton organisch materiaal + 2 l BB Bodem + 0,2 l eMB starter + 10 kg oergesteentegranulaat

Na menging van alle producten met het organisch materiaal wordt de hoop gemaakt en luchtdicht afgedekt met landbouwplastic. De hoop moet vervolgens minimaal 8 weken afgedekt blijven liggen voordat het eindproduct gebruikt kan worden.

Het verschil tussen composteren en Bokashi

Er zijn enkele belangrijke verschillen tussen composteren en fermentatie dat ten grondslag ligt aan het maken van Bokashi. Fermentatie is een anaeroob proces, waarbij temperaturen in de

bokashihoop liggen tussen 35 en 40 °C. Composteren is een aerob proces waarbij temperaturen oplopen tot 55 a 65 °C. Terwijl bij bokashi toevoegingen aan het ingangsmateriaal nodig zijn, is dat bij composteren niet het geval.

Voorafgaand aan de fermentatie worden de ingangsmaterialen gemengd met de hulpstoffen. Vervolgens wordt er een hoop (ook wel kuilbult genoemd) van gemaakt en luchtdicht afgesloten met plastic en/of compost. Bij composteren wordt een composthoop gemaakt die vervolgens regelmatig moet worden omgezet gedurende de lichtijd. De productietijd voor het maken van bokashi en meest gebruikte composteermethoden bedraagt rond 8 weken.

Overige producten gebruikt door pilots

Naast bokashi gemaakt volgens een van de twee formele procedés, of compost, maakt een aantal pilots nog andere producten, te weten compost-O en Bioterra. Ook gebruikt een aantal pilots onbewerkt maaisel dat als zodanig over de percelen verspreid wordt.

Compost-O

Compost-O is een natuurlijk mineralenmengsel. Dit mengsel wordt toegevoegd om de groei van micro-organismen en daarmee de omzetting van organisch gebonden stikstof in ammonium-gebonden stikstof te stimuleren.

Compost-O wordt in een dosering van 1 liter per 10 m³ materiaal toegevoegd. De hopen hoeven tijdens de lichtijd niet omgezet te worden. In dit onderzoek betreft dit pilot Pilot 5A Bokashi en Maaisel Compost-O Leeuwarden.

Bioterra

Bioterra wordt omschreven als een vloeibare organische meststof die aan maaisel wordt toegediend. Anders dan bokashi wordt het mengsel van maaisel en bioterra niet afgedekt en vindt er dus ook geen fermentatie (of volledige compostering) plaats.

Onbewerkt maaisel

Naast producten als bokashi, compost en bewerkt maaisel is in dit onderzoek ook gekeken naar de praktijk waarbij maaisel en/of blad rechtstreeks aan de bodem wordt toegediend zonder verdere voorberking.

2. Opzet en methoden van dit onderzoek

Selectiecriteria onderzochte pilots

Vanuit het Kennisprogramma Circulair Terreinbeheer zijn er rond 55 pilots waar verschillende methoden van bewerking en hergebruik van reststromen wordt getoetst in de praktijk. Voor dit onderzoek is een selectie gemaakt van elf pilots die meedoen aan het onderzoek rond *Aspergillus fumigatus*. Deze elf pilots zijn representatief voor de range aan het gebruikte ingangsmateriaal (bermmaaisel en blad) en producten (bokashi, compost-O, bioterra, onbewerkt maaisel) voor het gehele kennisprogramma.

Voor dit onderzoek waren de belangrijkste criteria:

- Locatie
- Bewerkingsmethode
- Soort materiaal

Selectie van welke pilots meededen aan dit onderzoek staat hieronder verder uitgewerkt.

Locatie

Voor een zo compleet mogelijk landelijk beeld is gekozen voor een spreiding van de pilots door heel Nederland. De verdeling van de pilot locaties is weergegeven in Figuur 2A.



Keuze van ingangsmateriaal

Tijdens dit onderzoek zijn drie verschillende ingangsmaterialen onderzocht voor de diverse bewerkingsmethoden. Dit betreft maaisel, blad en een combinatie van maaisel en blad als bron van ingangsmateriaal (Figuur 2B).

Bewerkingsmethoden

In dit onderzoek is gekeken naar de mogelijke effecten van verschillende bewerkingsmethoden op de aanwezigheid van *A. fumigatus* en de fractie resistente schimmel in het materiaal zowel voor als na bewerking (Figuur 2B). Hiertoe zijn pilots geselecteerd die materiaal verwerken tot Bokashi (A of B), Bioterra, Compost-O of onbewerkt rechtstreeks uitrijden over het land (zie ook KADER).

Experimentele analyse methoden

Monstername

Eurofins was verantwoordelijk voor de monstername van alle betrokken pilots. Er werden op twee momenten gedurende het proces monsters genomen. De eerste bemonstering betrof het ingangsmateriaal. Dit is het verse materiaal waarmee de onderzochte pilot hopen zijn opgebouwd (maaisel, blad of een combinatie van maaisel en blad) voordat compostering of verdere bewerking plaatsvond. De tweede bemonstering betrof het eindproduct. De in deze studie onderzochte eindproducten verzameld nadat bewerking (Bokashi, bioterra of compost-O) had plaatsgevonden, maar voordat het uitgereden wordt over het land. Ook het materiaal dat onbewerkt op het land werd gebracht werd bemonsterd.

De bemonstering is uitgevoerd volgens de standaard protocollen van Eurofins, waarbij steeds 5-10 liter monster werd verzameld op 30-50 cm diepte vanaf de top van de hoop ingangsmateriaal of product.

Van elk aangeleverd monster werden in het laboratorium voor Erfelijkheidslcer (WUR) drie biologische replicamonsters genomen dat wil zeggen drie aparte submonsters uit de aangeleverde monsterzak. Deze biologische replica's werden vervolgens onderzocht door van elke biologische replica vijf technische replicamonsters te nemen, deze te analyseren op de totale hoeveelheid *A. fumigatus* en fractie resistentie in het materiaal. Op basis van deze vijf technische replica's werd een gemiddelde waarde bepaald voor elke biologische replica.

Bepaling van totale hoeveelheid *A. fumigatus*, fractie resistentie en genetisch resistentie mechanisme

Voor elke technische replica werd het vastgestelde protocol voor groeibepaling van *A. fumigatus* gevolgd. Hiertoe werd telkens drie gram monster afgewogen en gebruikt voor het maken van een sporensuspensie van het materiaal in 30 ml 0,05% zoutoplossing.

Verdunningen van de verkregen oplossingen zijn op Flamingo-medium gebracht om zo de aantallen sporen van *Aspergillus fumigatus* te tellen (Zhang et al. 2021). Dit selectieve medium is een geoptimaliseerde versie van Dichloran Rose Bengal Chlooramfenicol (DRBC) agar en verhindert de groei van andere schimmels en bacteriën. Dit maakt het mogelijk om direct eenvoudig het aantal kolonie vormende eenheden (CFU) te kunnen tellen na kweek.

Flamingo-medium zonder toevoeging van azolen werd gebruikt voor het bepalen van de totale hoeveelheid *A. fumigatus* in het materiaal. Om de fractie resistentie te bepalen werd respectievelijk 6 mg/l tebuconazool, 4 mg/l itraconazool of 4 mg/l voriconazool toegevoegd aan het Flamingo-medium. Deze drie azolen zijn indicatief voor azoolresistentie (Zhang et al 2021) hier groeien dus alleen azoolresistente *A. fumigatus* uit. Door de groei op medium zonder en met azolen te vergelijken is de fractie resistente *A. fumigatus* bepaald.

Alle monsters werden gedurende drie dagen gekweekt bij 48 °C. Dit zijn selectieve groeiomstandigheden voor *A. fumigatus*. Na drie dagen werd het aantal kolonies geteld en het aantal kolonievormende eenheden per gram (CFU/g) materiaal berekend volgens onderstaande formule:

$$CFU/g = nCFU \times 200 \times \text{verdunningsfactor}$$

De detectielimiet van de gekozen meetmethode was 100 CFU/g.

Van representatieve monsters zijn in totaal 47 resistente *A. fumigatus* sporen geïsoleerd van groeimedium met azolen. Van deze is de tandem repeat regio (verlenging van het DNA) in de promotor van het cyp51A gen via PCR geamplificeerd. Een verlenging in de promotor van 34 of 46 baseparen is indicatief van het resistentiemechanisme voor azoolresistentie in *A. fumigatus* dat in patiënten wordt aangetroffen. Een verlenging van het DNA is te detecteren na PCR amplificatie, DNA geamplificeerd van een verlengde promotor is dan langer. Op een agarose gel kan de lengte van het DNA zichtbaar gemaakt worden en deze is gebruikt om hier te bepalen wat de lengte is van de tandem repeat.

Bepaling van concentratie azolen in ingangsmateriaal

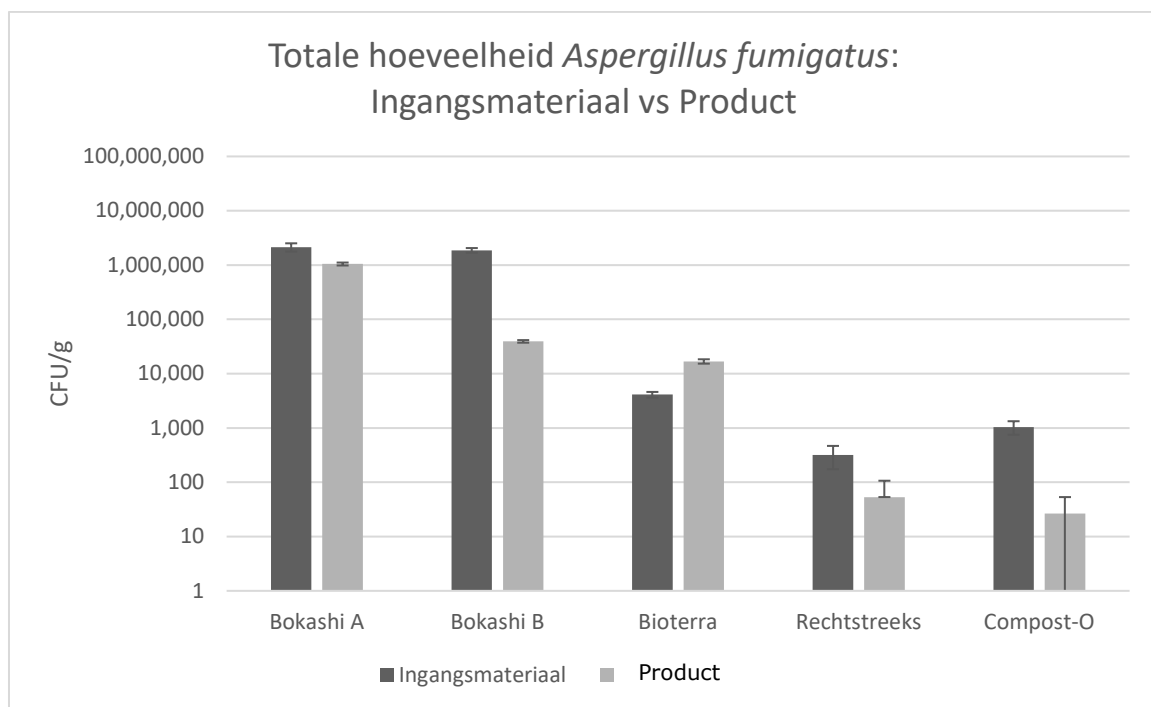
De aanwezigheid en concentratie van azolen in het ingangsmateriaal gebruikt voor de schimmelmetingen van alle pilots is onderzocht door Eurofins. De gebruikte meetmethoden waren GC-MS en LC-MS met een standaard detectielimiet van 0,01 mg/kg op basis van droge stof.

3. Resultaten en duiding

Totale hoeveelheid *A. fumigatus* – per bewerkingsmethode

Figuur 3 geeft de resultaten weer van de totale hoeveelheid *A. fumigatus* (CFU/g), hier weergegeven als de gemiddelde waarde van alle technische replica's per bewerkingsmethode. Deze totale hoeveelheid omvat zowel azoosensitieve als eventueel aanwezige azoolresistente *A. fumigatus*. Per bewerkingsmethode is een vergelijking gemaakt tussen de totale hoeveelheid *A. fumigatus* in het ingangsmateriaal (donkergrijs, dit is het materiaal voordat het wordt bewerkt) en het product (lichtgrijs, dit is het materiaal na bewerking).

Op de x-as staan de verschillende bewerkingsmethoden. De y-as geeft de hoeveelheid *A. fumigatus* weer, gemeten in kolonievormende eenheden per gram materiaal (CFU/g). Vanwege de grote spreiding in de resultaten is gekozen voor weergave op een logaritmische schaal. De grafiek geeft ook foutenbalken weer die de statistische standaardfout van het gemiddelde laat zien.



Figuur 3. Het totale aantal *A. fumigatus* (CFU/g) per bewerkingsmethode. Een vergelijking tussen het ingangsmateriaal (donkergrijs) en product (lichtgrijs). De totale hoeveelheid *A. fumigatus* is zoals verwacht. Het betreft immers materiaal uit de natuurlijke habitat van deze schimmel.

Duiding. *A. fumigatus* is een van nature veel voorkomende schimmel die leeft op dood plantenmateriaal. De totale hoeveelheid *A. fumigatus* is zoals verwacht voor dit type materiaal (maaisel en blad) en is ongeveer gelijk aan waarden gevonden in ander dood plantenmateriaal (Schoustra et al 2022). De resultaten van tellingen in het product laten daarnaast zien dat de verschillende bewerkingsmethoden niet zorgen voor een sterke daling of stijging van het totale aantal *A. fumigatus* na bewerking van het ingangsmateriaal. Bioterra (pilot 47) is hierop een uitzondering, waarbij een lichte

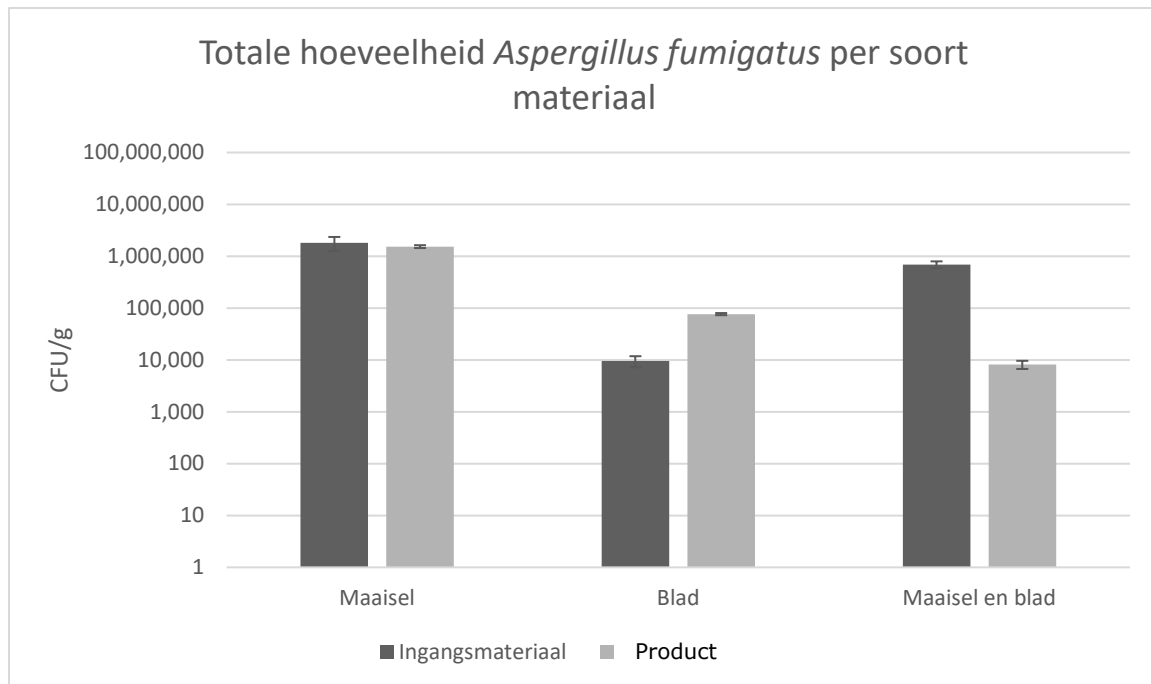
stijging in het totale aantal *A. fumigatus* is te zien. Bij alle andere bewerkingsmethoden (Bokashi A en B, rechtstreeks en compost-O) is in het product sprake van een 10- tot 100-voudige reductie in het totale aantal *A. fumigatus* na bewerking ten opzichten van aantallen in het ingangsmateriaal. Gegevens van ander onderzoek met plantenmateriaal uit de bollensector heeft laten zien dat compostering van materiaal met temperaturen van meer dan 60 graden resulteert in een bijna gehele afdoding van *Aspergillus fumigatus*, tot een miljoenvoudige reductie direct na composteren (Schoustra et al 2019). Dit wijkt af van de metingen in de onderhavige studie waar wij bij de hier onderzochte bewerkingsmethode wel een duidelijke overleving van *A. fumigatus* vinden.

Het moment van monstername van het materiaal na bewerking (het product) was niet gestandaardiseerd direct na bewerking. Voor sommige monsters heeft de monstername pas enkele dagen (tot weken) plaatsgevonden nadat het bewerkingsproces was afgerond. Deze monstername sluit aan bij de gangbare praktijk dat na het maken van bokashi, compost-O of bioterra het product nog enige tijd opgeslagen wordt voordat het wordt toegepast. Het is mogelijk dat direct na bewerking de aantallen *A. fumigatus* lager waren en dat overgebleven *A. fumigatus* vervolgens weer is uitgegroeid. Ook kunnen er verschillende batches product na bewerking zijn gecombineerd. Het laat zien dat ook bij mogelijke uitgroei van *A. fumigatus* na bewerking de gevonden fractie resistentie rond 0 tot 3% niet verandert.

Tijdens de analyse van alle pilotmaterialen lag de hoeveelheid *A. fumigatus* beneden de detectielimiet voor betrouwbare metingen. Deze metingen zijn derhalve niet meegenomen in de beschrijving van de resultaten. Deze tellingen zijn wel te vinden in Tabel 5 waar alle experimentele data staan vermeld (Bijlage 4).

Totale hoeveelheid *A. fumigatus* – per soort materiaal

Om de verschillende soorten ingangsmateriaal te vergelijken is de gemiddelde waarde van alle technische replica's per soort materiaal bepaald. Figuur 4 illustreert de gevonden resultaten. Er is een vergelijking gemaakt tussen de totale hoeveelheid *A. fumigatus* in het ingangsmateriaal (donkergrijs) en het product na bewerking (lichtgrijs).



Figuur 4. Het totale aantal *A. fumigatus* (CFU/g) per soort materiaal. Een vergelijking tussen maaisel, blad en een combinatie van maaisel en blad in het ingangsmateriaal (donkergrijs) en product (lichtgrijs).

Duiding. Figuur 4 bevestigt dat *A. fumigatus* een alom aanwezige schimmel is op dood plantenmateriaal. Verder laten de resultaten zien dat de totale hoeveelheid *A. fumigatus* in blad een factor 10 tot 100 keer lager ligt dan in maaisel.

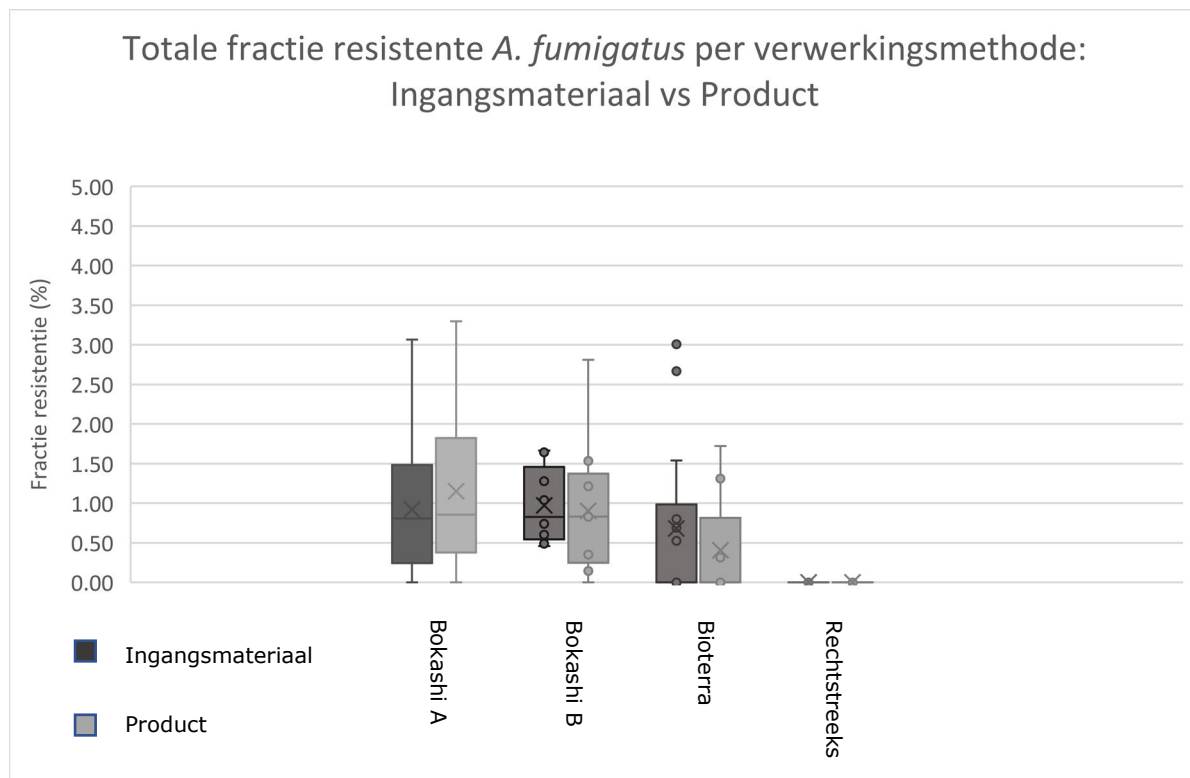
Bij de monsternamen van het product is het exacte moment van monsternamen niet gestandaardiseerd. De monsternamen vonden plaats op enig moment nadat het bewerkingsproces was afgerond. Hierbij weten we niet exact welke aantallen *A. fumigatus* direct na bewerking aanwezig waren voordat het materiaal weer werd gebruikt voor een toepassing. We hebben door deze monsternamen derhalve inzicht in de aantallen *A. fumigatus* na bewerking, gecombineerd met mogelijke nieuwe uitgroei en herbesmetting – voordat het materiaal gebruikt wordt voor toepassingen als bodemverbetering. In dit licht zijn de gevonden resultaten zeer bruikbaar. Daarnaast laat het zien dat ook bewerkt materiaal behoort tot de natuurlijke habitat van deze schimmel.

Fractie resistente *A. fumigatus* – per bewerkingsmethode

De fractie resistente *A. fumigatus* in het ingangsmateriaal en product van de verschillende bewerkingsmethoden is bepaald door de monsters te analyseren op het selectieve Flamingo-medium met- en zonder toevoeging van azolen. Resistentie is bepaald voor drie verschillende azolen (tebuconazool, itraconazool en voriconazool). Tebuconazool is een fungicide die wordt gebruikt in de landbouw- en tuinbouw en houtverduurzaming. Itraconazool en voriconazool zijn antimycotica die worden voorgeschreven aan patiënten met schimmelinfecties zoals *Aspergillose*.

In Figuur 5 wordt de totale fractie resistente *A. fumigatus* in het ingangsmateriaal (donkergrijs) vergeleken met de totale fractie resistentie in het product na bewerking (lichtgrijs). Figuur 5 geeft de resultaten weer in een boxplot. Dit is een visuele weergave van de statistische 5-getallen-samenvatting van de data verdeling. Deze samenvatting

bestaat uit het minimum, het eerste kwartiel, de mediaan, het derde kwartiel en het maximum. De resultaten zijn een weergave van de totale gemiddelde waarde van alle technische replica's (tebuconazool, itraconazool en voriconazool bij elkaar) per bewerkingsmethode. Uitschieters van het gemiddelde zijn zichtbaar als losse punten in de grafiek.



Figuur 5. Totale fractie resistente *A. fumigatus* in % per bewerkingsmethode in ingangsmateriaal. Een vergelijking tussen het ingangsmateriaal en het product na bewerking. De fractie resistente *A. fumigatus* is laag (0-3%). Dit is onafhankelijk van de gekozen bewerkingsmethode en is blijvend laag na bewerking.

Duiding. De resultaten laten zien dat de totale fractie resistente *A. fumigatus* laag is (0-3%) en niet significant verschillend is voor de gekozen bewerkingsmethoden. De detectielimiet voor % resistentie ligt rond 0.3%. Deze detectielimiet is variabel en hangt van de absolute aantallen *A. fumigatus* af. Hogere aantallen *A. fumigatus* geven een lagere detectielimiet voor resistentie tot 0.01%. Bij het rechtstreeks opgebrachte materiaal was de detectielimiet rond 0.3%.. De fractie resistentie blijft onverminderd laag na bewerking in het product (zie Figuur 5). Er vindt dus geen selectieve vermeerdering plaats van resistente typen gedurende bewerking en/of na mogelijke herbesmetting van *A. fumigatus* uit de omgeving nadat bewerking heeft plaatsgevonden..

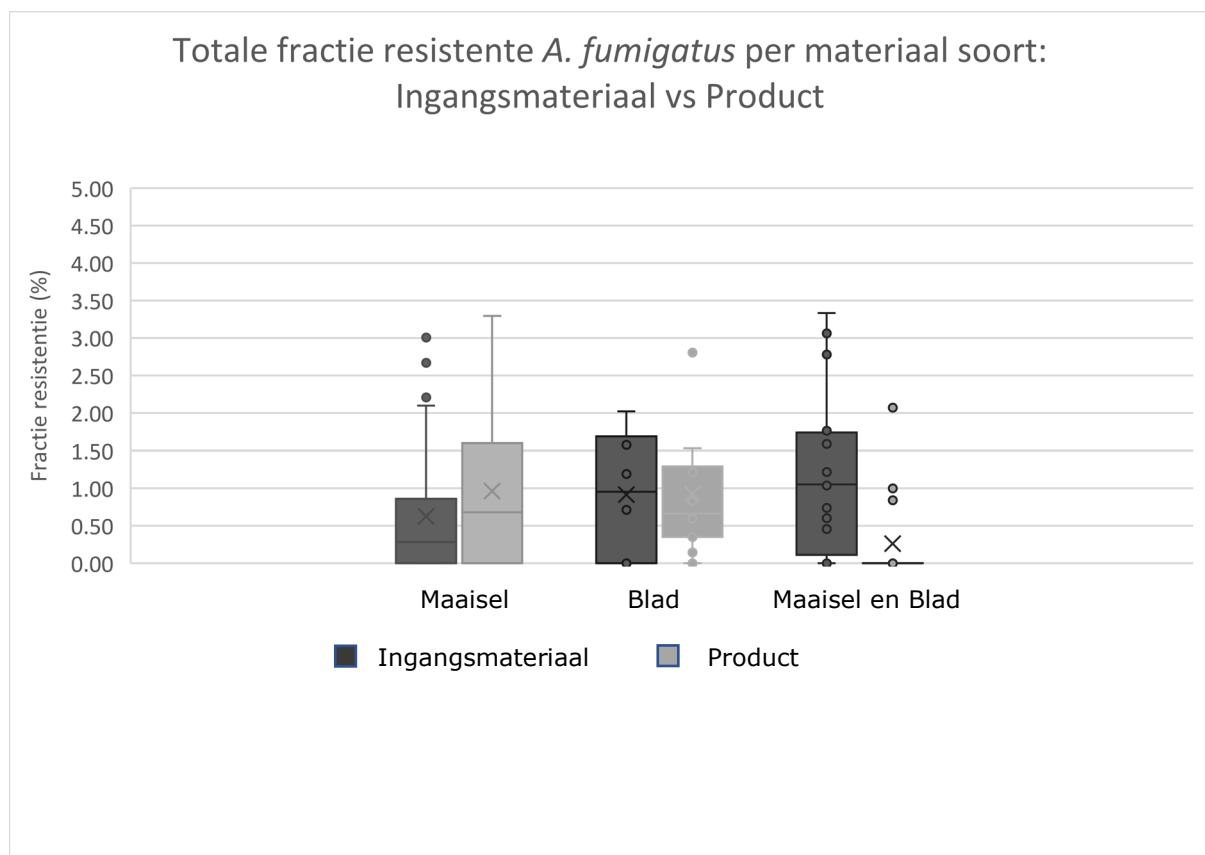
De gevonden resistentiefractie van 3% of lager zijn in lijn met achtergrondwaarden die recent zijn gemeten bij luchtmetingen in Nederland en West-Europa. Gedurende November-December 2022 is een internationale pilotstudie uitgevoerd waarbij een nieuwe meetmethode om triazool resistentiefracties bij *A. fumigatus* sporen in de buitenlucht te schatten, is getest. Bij deze studie zijn in elf verschillende regio's in negen landen verspreid over West-Europa luchtmetingen gedaan. Deze metingen zijn rond

woningen gedaan en expliciet niet in de directe nabijheid van industriële plantenhopen of andere potentiële hotspots om zo de achtergrondresistentie te bepalen. Bij de analyse van de monsters zijn de resistentiefracties bepaald tegen de medische azolen itraconazool en voriconazool. In Nederland zijn op vier verschillende plekken in midden-Nederland met Wageningen als centraal punt luchtmetingen gedaan. Op basis van 332 geteste sporen is de resistentiefractie tegen itraconazool geschat op 0.033 ± 0.0098 (SE) en op basis van 315 geteste sporen is resistentiefractie tegen voriconazool geschat op 0.044 ± 0.012 (SE). De volledige studie zal komende maanden ingediend worden voor wetenschappelijke publicatie.

Deze lage waarden duiden erop dat het hier niet gaat om een zogenaamde "hotspot" voor resistentieontwikkeling of vermeerdering. Dit in tegenstelling tot de bekende hotspots voor *A. fumigatus*, zoals bloembollenafval, waarbij waarden van 50 tot meestal rond 80-100% resistentie gevonden worden.

Fractie resistente *A. fumigatus* – per soort materiaal

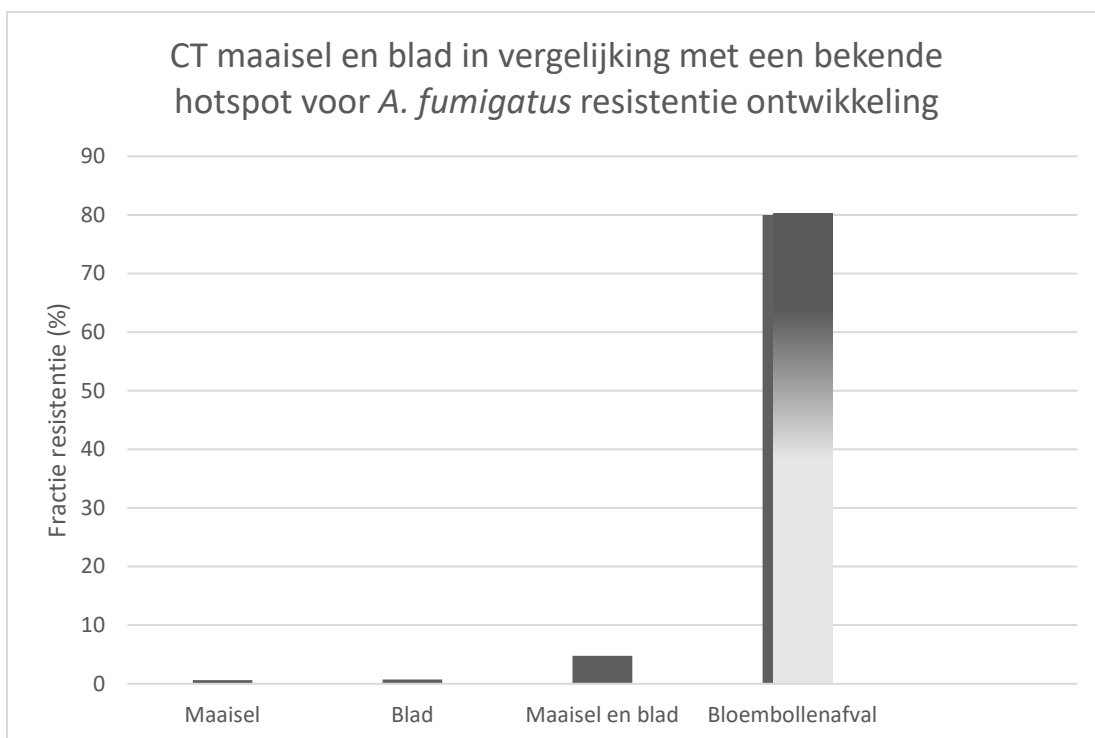
De totale fractie resistente *A. fumigatus* per soort materiaal is op dezelfde wijze bepaald als voor de verschillende bewerkingsmethoden (zie 3.3).



Figuur 6. Totale fractie resistente *A. fumigatus* per soort materiaal. Een vergelijking tussen het ingangsmateriaal en product van maaisel, blad en een combinatie van maaisel en blad.

Duiding. Figuur 6 laat zien dat de totale fractie resistentie niet significant verschillend is voor de verschillende materialen (0-3%) en dat de fractie resistentie in de producten onveranderd blijven na bewerking. Deze resultaten laten zien dat de gekozen bewerkingsmethoden en soorten materiaal geen effect hebben op de fractie resistente *A. fumigatus*.

Bij bloembollenafval ligt de gevonden fractie resistentie in de meeste gevallen tussen de 50 en 80 procent (in Figuur 7 aangegeven met kleurgradiënt). In dit perspectief kan op basis van de resultaten van dit onderzoek gesteld worden dat maaisel en blad bemonsterd voor deze studie geen hotspot is voor resistentieontwikkeling in de geteste materialen binnen circulair terreinbeheer.



Figuur 7. Vergelijking tussen gebruikte zijstromen binnen circulair terreinbeheer en die in bloembollenafval. Deze laatste is een bekende hotspot voor *A. fumigatus* resistentieontwikkeling.

Concentratie azolen

Op vier van de elf pilots zijn azolen en hun residuen aangetroffen in het ingangsmateriaal; deze waarden lagen, steeds rond de limietdetectielimiet (0.01 mg/kg). Alle waarden staan in Tabel 16 in het supplement bij dit rapport. Deze lage waarden zouden kunnen suggereren dat azolen gebruikt elders in de omgeving van waar de ingangsmaterialen vandaan komen leidt tot aanwezigheid van azolen in maaisel en blad, al is dit niet formeel getoetst.

Duiding. In eerdere onderzoeken is gevonden dat de fractie *A. fumigatus* die resistent is tegen azolen afhankelijk kan zijn van de aanwezigheid van azolen en hun residuen in het materiaal (Schoustra et al 2019), ook in lage concentraties van rond 0.01 mg/kg. De in deze studie gemeten fractie resistente *A. fumigatus* was laag (tussen 0 en 3%) bij alle

pilots. Omdat er in de monsters bovendien weinig variatie gevonden is voor de fractie resistentie zijn er geen correlaties te maken met concentratie azolen als verklarende variabele. Eurofins heeft de azoolconcentraties bepaald voor alle ingangsmaterialen van de geteste pilots in dit onderzoek. De gebruikte meetmethoden GC-MS en LC-MS zijn daarbij beiden uitgevoerd met een detectielimiet van 0,01 mg/kg. Omdat alle gevonden waarden voor azolen in de ingangsmaterialen rond de detectielimiet lagen is het resultaat zeker informatief echter niet zeer precies te interpreteren.

De azoolmetingen zijn verricht aan dezelfde monsters die zijn gebruikt voor de schimmelmetingen – deze zijn weergegeven in Tabel 16. Buiten het onderzoek beschreven in dit rapport zijn op vele andere pilots ook azoolmetingen verricht. Om een beeld te krijgen hoe representatief de gevonden concentraties zijn voor materiaal dat gebruikt wordt bij andere pilot locaties van het Kennisprogramma circulair terreinbeheer, hebben we ook de data voor bepalingen van chemische residuen (inclusief azolen) bij deze andere pilots gekeken (Spijker et al 2022). Op 5 pilots 72 onderzochte pilots zijn azolen aangetroffen in 1 of meerdere monsters. Concentraties van deze azolen lagen steeds rond de detectielimiet van 0.01 mg/kg. Dit suggereert dat azolen niet alom aanwezig zijn in het materiaal dat gebruikt wordt bij circulair terreinbeheer en als aanwezig in lage concentraties van 0.01 mg/kg of daaronder. Hiermee kunnen de waarnemingen over gevonden hoeveelheden azolen en (resistente) schimmel gedaan aan monsters voor dit onderzoek als representatief worden beschouwd voor pilots van circulair terreinbeheer.

De bevinding in ander onderzoek dat in materiaal anders dan bermmaaisel en blad soms hogere concentraties azolen en ook hogere fracties resistente *A. fumigatus* worden gevonden, noodt tot voorzichtigheid bij het eventueel mengen van ander dergelijk ander materiaal binnen de praktijk van circulair terreinbeheer.

Genetisch resistentie mechanisme

Vanuit de monsteranalyse voor de fractie azoolresistente *A. fumigatus* zijn in totaal 47 individuele sporen (genotypen) geïsoleerd, die dus resistent zijn tegen azolen.

In isolaten van *A. fumigatus* uit patiënten blijkt dat het genetische mechanisme voor resistentie gebaseerd is op mutaties in het *cyp51A* gen. In dat gen heeft de promotor regio een verlengde hoeveelheid herhalingen van repetitief DNA (tandem repeats) alsmede enkele puntmutaties. In ons onderzoeken hebben we getoetst of isolaten uit bermmaaisel en blad ook deze herhalingen van repetitief DNA hebben.

Resultaten laten zien dat alle 47 onderzochte resistente isolaten deze herhalingen hebben. Bijlage 5 bevat alle gegevens van de onderzochte isolaten.

Duiding. Dit resultaat laat zien dat de in bermmaaisel en blad gevonden resistentie in *A. fumigatus* veroorzaakt wordt door hetzelfde genetische mechanisme als azoolresistentie gevonden in *A. fumigatus* geïsoleerd uit patiënten.

4. Conclusies en aanbevelingen

Aspergillus fumigatus is een schimmel die van nature groeit in dood plantenmateriaal.. Azolen die gebruikt worden in allerlei niet-medische toepassingen kunnen resistentie veroorzaken of vermeerderen in *Aspergillus fumigatus* die hieraan is blootgesteld – deze resistentie kan behandeling van patiënten ernstig belemmeren. Het concrete doel van dit onderzoek is om eventuele risico's van resistentie en vermeerdering in *A. fumigatus* in de diverse groenreststromen die relevant zijn binnen het Kennisprogramma Circulair Terreinbeheer te inventariseren en in kaart te brengen en adviezen te formuleren om mogelijke risico's te voorkómen en/of significant te verlagen.

De resultaten laten zien dat de totale hoeveelheid aanwezige *A. fumigatus* in maaisel en blad tussen 10 duizend en 10 miljoen sporen per gram ligt. Na bewerking liggen de totale aantallen schimmel op vier maal hoger tot een factor 100 lager dan voor bewerking. De fractie schimmel die resistent is tegen azolen hangt niet wezenlijk af van soort materiaal onderzocht in deze studie (bermmaaisel en blad) noch van bewerkingsmethode en ligt rond 0 en 3%. De fractie resistentie is hiermee gelijk aan het achtergrondniveau van resistentie gevonden in recente representatieve luchtmetingen in West-Europa. De hoeveelheid azolen en hun residuen lag voor vier van de elf locaties rond de detectielimiet van 0,01 mg/kg en voor de andere locaties daaronder. Voor de bemonsterde locaties hebben we mede daarom geen verband gevonden tussen aanwezigheid van azolen en een verhoogde fractie azoolresistentie in *A. fumigatus*. Genetische analyse van een selectie van gevonden resistente *A. fumigatus* laat zien dat resistentie van *A. fumigatus* in blad en maaisel hetzelfde genetische mechanisme heeft als resistente *A. fumigatus* gevonden in patiënten.

De belangrijkste bevinding van dit onderzoek is dat de gevonden fractie azoolresistente *Aspergillus fumigatus* in het onderzocht materiaal op het achtergrondniveau van azoolresistente *A. fumigatus* zoals gemeten in luchtmonsters in West Europa ligt. Dit betekent dat gebruik van het onderzochte materiaal (bermmaaisel en blad) geen additioneel risico vormt op de verspreiding van azoolresistente *A. fumigatus*. Aangezien de resistentiefractie laag is (op achtergrondniveau), en de resistentiefractie afhankelijk van verschillende manieren van bewerking niet verandert, draagt ook de manier van bewerking en mate van afdoding van *A. fumigatus* tijdens bewerking niet bij aan de verspreiding van azoolresistente *A. fumigatus*.

Aanbevelingen. Vermenging met andere reststromen (dus anders dan bermmaaisel en blad) is nu geen praktijk bij circulair terreinbeheer. In het huidige onderzoek hebben we geen aanwijzingen gevonden dat er ergens in de keten van bewerking van maaisel en of blad reststromen zijn met hoge concentraties azolen, gebaseerd op azoolmetingen in 72 pilots. Vermenging met reststromen buiten maaisel en blad is onwenselijk tijdens verder opschalen van het hergebruik van organisch materiaal voor circulair terreinbeheer omdat

dergelijke vermenging een mogelijk risico vormt op verspreiding van azoolresistente *A. fumigatus*.

5. Literatuurlijst

Claassen, L., Spijker, J.H. (2022). PPS-voorstel: Kennisprogramma Circulair Terreinbeheer. Aanvraagnummer LWV22094.

Elferink, E.V., Eweg, R., Weerman, E.J., Bakker, R., van de Mortel, J.E. (2022). Projectvoorstel Praktijkkennis voor Voedsel en Groen: Thematische vraagstukken, indieningsronde juni 2022. Nationaal Regieorgaan Praktijkgericht Onderzoek SIA.

Jansen, L., Santos Couta Silva, M., Schoustra, S., Kager, H., Zwaan, B. (2023). Het effect van het natmaken van tulpenafval op de groei en verspreiding van *Aspergillus fumigatus* en de toepasbaarheid in de praktijk.

Jansen, L., Santos Couta Silva, M., Schoustra, S. de Rooij, B., Kager, H., Zwaan, B. (2022). Het effect van verschillende bewaaromstandigheden van bollenafval op de groei en verspreiding van *A. fumigatus* en de toepasbaarheid in de praktijk.

Latgé, J. P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical microbiology reviews*, 12(2), 310- 350.

Romkens, P.F.A.M, Rietra, R.P.J.J., Spijker, J.H. (2020). Aanzet Kennisprogramma Circulair Terreinbeheer: landbouwkundig relevante eigenschappen van maaisel, bokashi en compost. Wageningen, Wageningen Environmental Research, Rapport 3006.

Schoustra, S. (2022). Bijlage: achtergrond en opzet van het onderzoek “*Aspergillus fumigatus* in bermafval en andere organische reststromen”.

Schoustra, S. E., Zhang, J., Zwaan, B. J., Debets, A. J. M., Verweij, P. E., Buijtenhuijs, D., & Rietveld, A. G. (2019). New insights in the development of azole-resistance in *Aspergillus fumigatus* RIVM Letter report 2018-0131. Utrecht: RIVM.

Schoustra, S. E., Debets, A. J. M., Rijs, A. J., Zhang, J., Snelders, E., Leendertse, P. C., Verweij, P. E. (2019). Environmental Hotspots for Azole Resistance Selection of *Aspergillus fumigatus*, the Netherlands. *Emerging Infectious Disease journal*, 25(7). doi:10.3201/eid2507.181625

Spijker, J.M. et al. Kennisprogramma Circulair Terreinbeheer Jaarrapportage 2022. Rapport 3263, ISSN 1566-7197. Wageningen University and Research.

Verweij, P. E. (2017). Azole-resistance selection in *Aspergillus fumigatus* Report on research commissioned by Netherlands Ministries of Health and of Agriculture. Utrecht: Radboudumc, Wageningen University, CLM, RIVM.

Zhang, J., de Rooij, B., Zwaan, B., Schoustra, S. (2022). *Cy51A* genotyping in azole-resistant *A. fumigatus* isolated from environmental samples such as onions, strawberries, and wood chippings.

Zhang, J., de Rooij, B., Leendertse, P., van Beek, J., Gommer, R., Zwaan, B., Schoustra, S. (2022). Environmental Surveillance of *Aspergillus fumigatus* in Dutch environmental and agricultural crops.

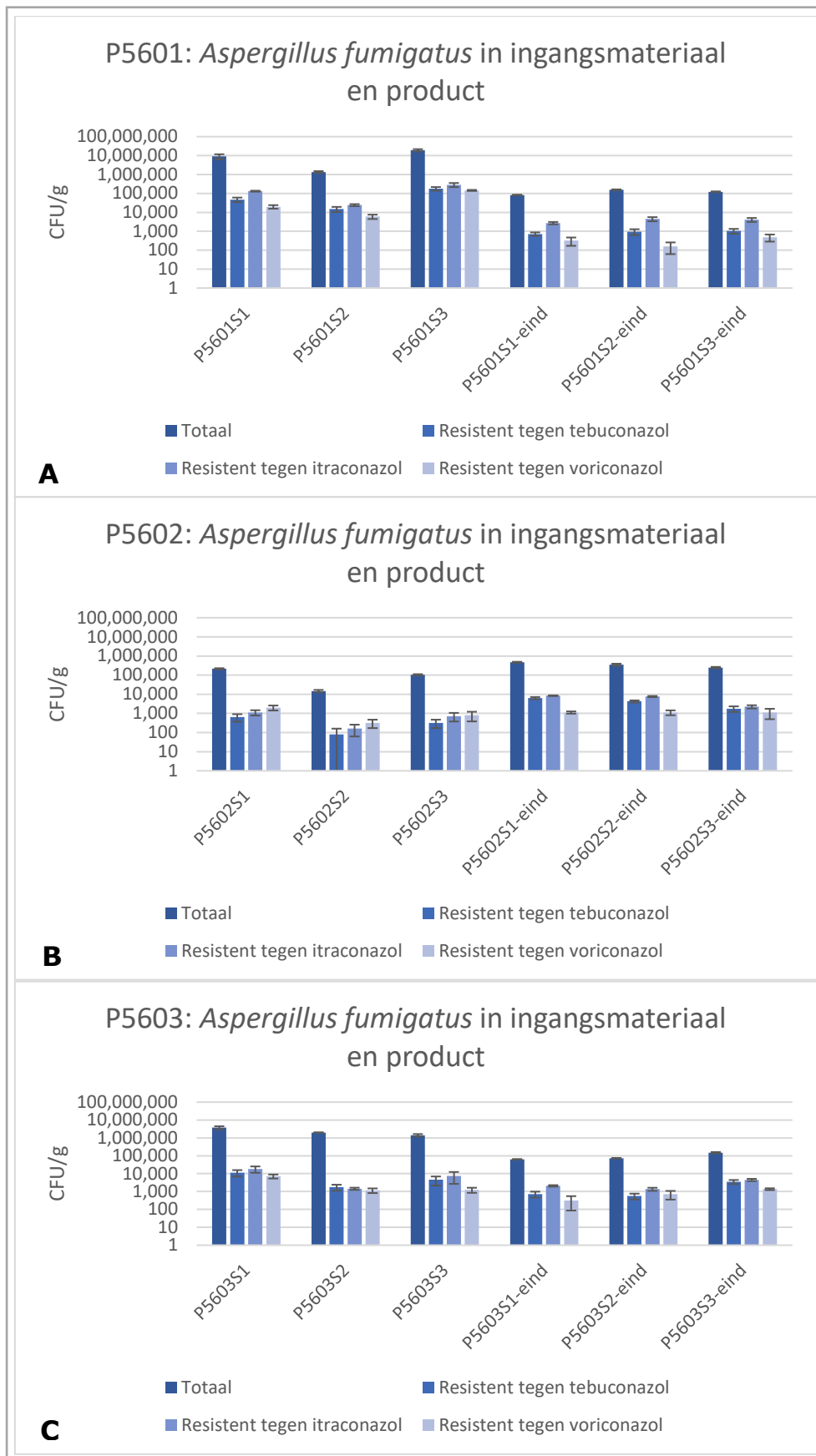
Zhang, J., Debets, A. J., Verweij, P. E., & Schoustra, S. E. (2021). Selective Flamingo Medium for the Isolation of *Aspergillus fumigatus*. *Microorganisms*, 9(6), 1155.

Zhang, J., Lopez Jimenez, L., Snelders, E., Debets, A. J., Rietveld, A. G., Zwaan, B. J., Schoustra, S. E. (2021). Dynamics of *Aspergillus fumigatus* in azole fungicide-containing plant waste in the Netherlands (2016–2017). *Applied and environmental microbiology*, 87(2), e02295-20.

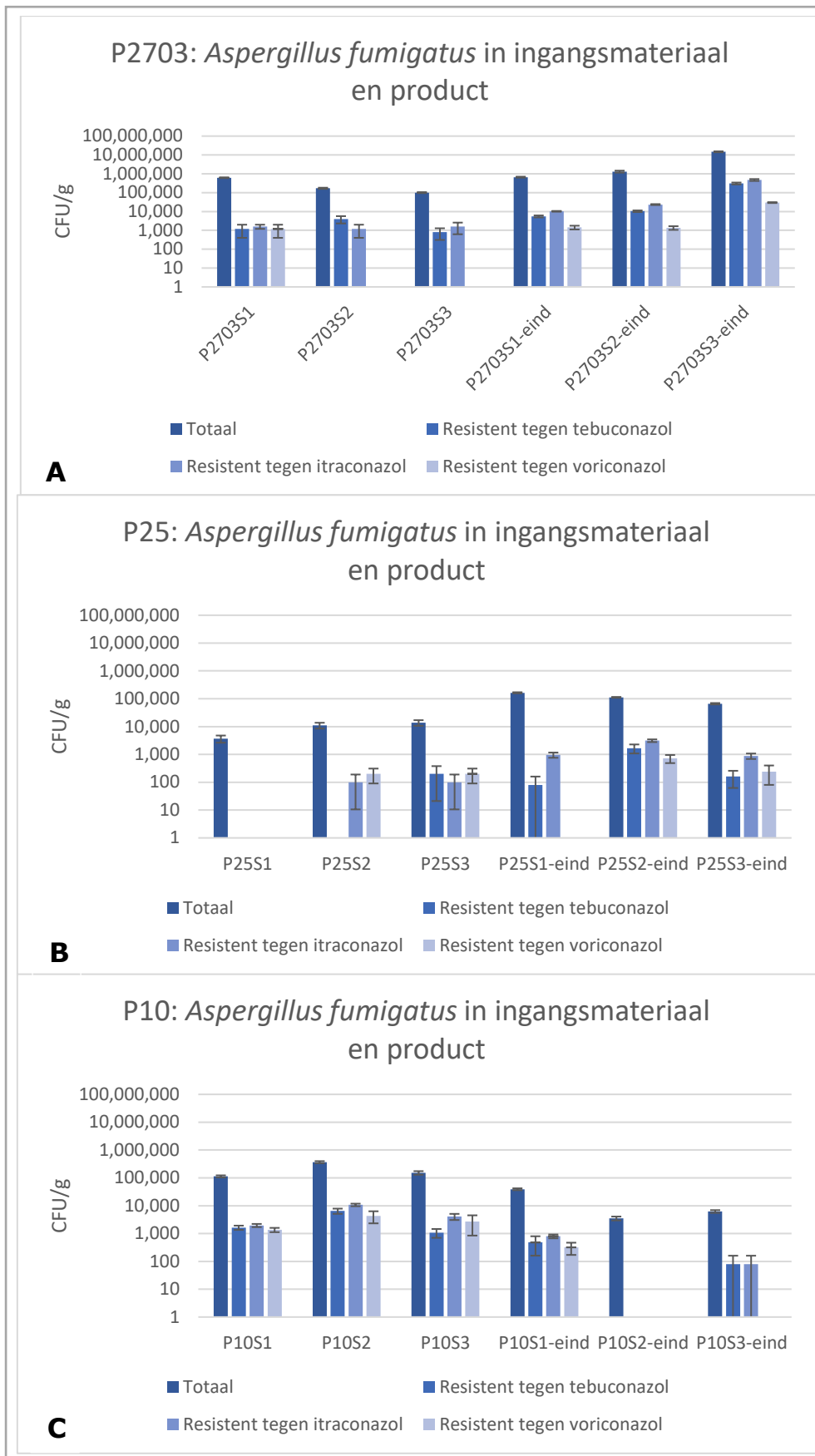
Bijlage 1. Geteste pilots: Bokashi A

Tabel 2. Overzicht van alle geteste pilots met het bewerkingsproces Bokashi A. De tabel geeft een overzicht van alle gemiddelde waarden per biologische replica en de bijbehorende standaardfout van het gemiddelde (SE). TEB = tebuconazool, ITR = itraconazool, VOR = voriconazool, -eind = product na bewerking.

Bokashi A			Totaal (CFU/g)		TEB Resistent (CFU/g)		ITR Resistent (CFU/g)		VOR Resistent (CFU/g)		Fractie resistentie TEB (%)		Fractie resistentie ITR (%)		Fractie resistentie VOR (%)	
Materiaal	Pilot nr.	Monster	Gemiddelde	SE	Gemiddelde	SE	Gemiddelde	SE	Gemiddelde	SE	Gemiddelde	SE	Gemiddelde	SE	Gemiddelde	SE
Maaisel	2703	P2703S1	619.200	28.895	1.200	799	1.600	399	1.200	799	0,20	0,14	0,26	0,07	0,18	0,11
		P2703S2	170.800	12.154	4.000	1.670	1.200	799	0	0	2,21	0,84	0,69	0,46	0,00	0,00
		P2703S3	100.800	5.597	800	489	1.600	978	0	0	0,71	0,43	1,51	0,93	0,00	0,00
		P2703S1-eind	664.000	38.610	5.520	661	10.240	448	1.440	324	0,84	0,09	1,56	0,09	0,23	0,06
		P2703S2-eind	1.312.000	157.786	10.400	1.018	23.360	1.334	1.360	299	0,81	0,04	1,94	0,35	0,10	0,02
		P2703S3-eind	14.752.000	828.618	308.000	35.490	472.000	54.163	29.760	1.590	2,14	0,33	3,18	0,26	0,20	0,01
	5601	P5601S1	9.060.000	2.660.954	47.800	12.398	131.600	7.613	19.800	4.216	0,86	0,42	2,10	0,63	0,34	0,16
		P5601S2	1.340.000	159.719	15.000	4.442	24.200	3.001	6.000	1.546	1,25	0,39	1,89	0,26	0,47	0,11
		P5601S3	19.140.000	2.669.180	177.800	38.950	285.000	69.119	144.400	9.158	1,19	0,53	1,89	0,86	0,83	0,15
		P5601S1-eind	82.080	3.597	720	149	2.720	387	320	149	0,87	0,16	3,29	0,39	0,38	0,17
		P5601S2-eind	155.360	8.308	960	324	4.480	1.096	160	98	0,59	0,19	3,06	0,87	0,11	0,07
		P5601S3-eind	122.240	5.604	1.040	299	4.080	957	480	196	0,82	0,23	3,28	0,68	0,42	0,17
	5602	P5602S1	215.200	14.012	640	271	1.120	343	2.000	579	0,28	0,12	0,51	0,17	0,88	0,24
		P5602S2	14.800	2.056	80	80	160	98	320	149	0,80	0,80	1,24	0,76	2,10	0,87
		P5602S3	104.400	7.292	320	149	720	343	800	419	0,33	0,17	0,72	0,36	0,83	0,44
		P5602S1-eind	470.400	26.617	6.320	860	8.400	334	1.120	149	1,33	0,14	1,82	0,16	0,24	0,04
		P5602S2-eind	350.400	43.386	4.240	530	7.600	550	1.120	319	1,26	0,15	2,34	0,40	0,36	0,13
		P5602S3-eind	248.160	20.976	1.760	573	2.240	430	1.120	624	0,77	0,26	0,95	0,21	0,46	0,26
	5603	P5603S1	3.740.000	716.264	11.360	4.422	18.280	7.074	7.160	1.811	0,74	0,58	1,05	0,75	0,18	0,03
		P5603S2	1.976.000	79.710	1.760	651	1.440	204	1.160	336	0,09	0,04	0,07	0,01	0,06	0,02
		P5603S3	1.412.000	222.911	4.560	2.404	7.560	4.880	1.240	391	0,27	0,09	0,42	0,19	0,10	0,04
P5603S1-eind		63.280	1.207	720	265	2.080	196	320	233	1,15	0,42	3,30	0,34	0,50	0,37	
P5603S2-eind		72.720	2.671	560	204	1.360	271	720	366	0,79	0,28	1,83	0,33	0,99	0,50	
P5603S3-eind		149.440	12.488	3.520	905	4.480	649	1.360	160	2,43	0,68	3,12	0,56	0,94	0,14	
Blad	25	P25S1	3.700	1.064	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		P25S2	11.100	2.605	0	0	100	89	200	110	0,00	0,00	1,19	1,06	2,02	1,14
		P25S3	13.800	3.158	200	179	100	89	200	110	1,32	1,18	0,71	0,64	1,58	0,87
		P25S1-eind	163.680	7.335	80	80	960	204	0	0	0,05	0,05	0,60	0,14	0,00	0,00
		P25S2-eind	112.000	3.918	1.680	598	3.120	343	720	233	1,56	0,57	2,82	0,37	0,66	0,22
		P25S3-eind	66.080	3.891	160	98	880	196	240	160	0,28	0,17	1,29	0,25	0,39	0,28
Maaisel; Blad	10	P10S1	113.360	9.838	1.640	285	1.960	256	1.360	240	1,47	0,28	1,76	0,27	1,22	0,22
		P10S2	367.800	31.666	6.480	1.374	10.720	1.125	4.320	1.994	1,80	0,44	3,06	0,49	1,07	0,38
		P10S3	152.000	22.312	1.080	377	4.080	1.013	2.680	1.834	0,81	0,32	2,78	0,52	1,59	0,96
		P10S1-eind	39.120	3.052	480	319	800	126	320	149	1,12	0,77	2,07	0,30	0,84	0,38
		P10S2-eind	3.520	556	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		P10S3-eind	6.240	698	80	80	80	80	0	0	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00



Figuur 9. Overzicht van totale hoeveelheid *A. fumigatus* en resistente fractie (CFU/g) in ingangsmateriaal en product. **(A)** Pilot 5601 Bokashi Zuid Limburg: Voerendaal. **(B)** Pilot 5602 Bokashi Zuid Limburg: St. Joost. **(C)** Pilot 5603 Bokashi Zuid Limburg: Spaubeek.

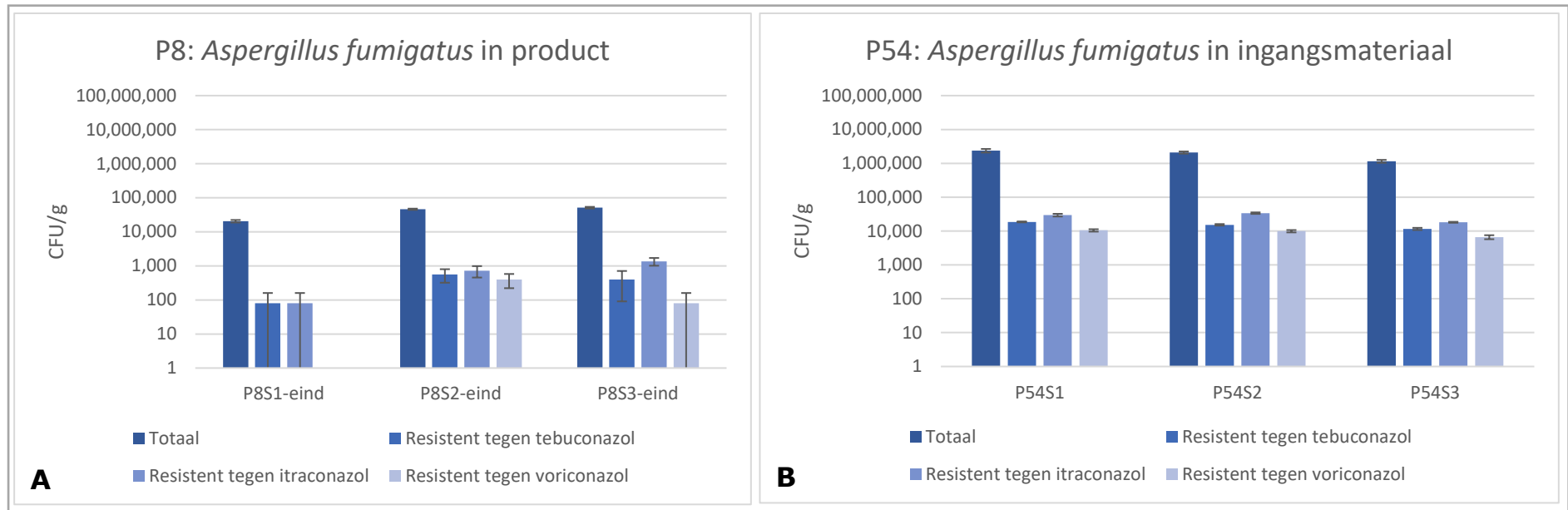


Figuur 10. Overzicht van totale hoeveelheid *A. fumigatus* en resistente fractie (CFU/g) in ingangsmateriaal en product. **(A)** Pilot 2703 Bokashi Midden Limburg: Maasbree. **(B)** Pilot 2502 Bokashi Noord Limburg: Weert. **(C)** Pilot 10 Bokashi Bronckhorst.

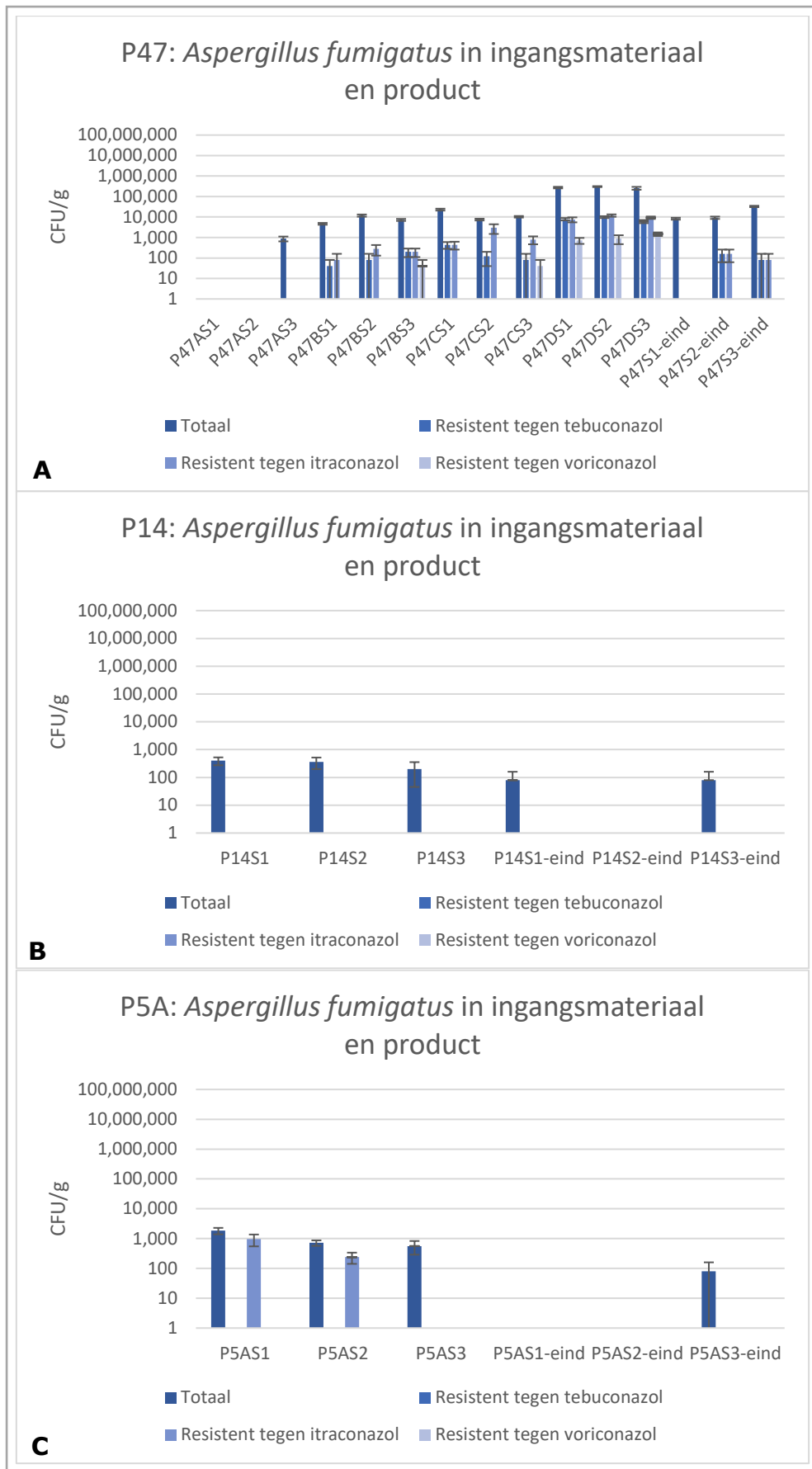
Bijlage 2. Geteste pilots: Bokashi B

Tabel 3. Overzicht van alle geteste pilots met het bewerkingsproces Bokashi B. De tabel geeft een overzicht van alle gemiddelde waarden per biologische replica en de bijbehorende standaardfout van het gemiddelde (SE). TEB = tebuconazool, ITR = itraconazool, VOR = voriconazool, -eind = product na bewerking.

Bokashi B			Totaal (CFU/g)		TEB Resistent (CFU/g)		ITR Resistent (CFU/g)		VOR Resistent (CFU/g)		Fractie resistentie TEB (%)		Fractie resistentie ITR (%)		Fractie resistentie VOR (%)	
Materiaal	Pilot nr.	Monster	Gemiddelde	SE	Gemiddelde	SE	Gemiddelde	SE	Gemiddelde	SE	Gemiddelde	SE	Gemiddelde	SE	Gemiddelde	SE
Blad	8	P8S1-eind	20.560	1.748	80	80	80	80	0	0	0,35	0,35	0,35	0,35	0,00	0,00
		P8S2-eind	46.080	1.912	560	240	720	265	400	179	1,21	0,51	1,53	0,54	0,90	0,40
		P8S3-eind	51.280	2.816	400	309	1.360	348	80	80	0,83	0,67	2,81	0,85	0,14	0,14
Maaisel; Blad	54	P54S1	2.372.000	285.756	18.640	587	29.600	2.682	10.480	851	0,83	0,09	1,28	0,09	0,46	0,05
		P54S2	2.088.000	152.127	15.280	803	33.840	1.757	9.920	793	0,74	0,05	1,66	0,16	0,49	0,05
		P54S3	1.152.000	111.982	11.600	847	18.160	587	6.640	898	1,04	0,11	1,64	0,19	0,60	0,11



Figuur 11. Overzicht van totale hoeveelheid *A. fumigatus* en resistente fractie (CFU/g) in ingangsmateriaal en product. **(A)** Pilot 8 Bokashi Apeldoorn. **(B)** Pilot 54 Bokashi Havengebied.



Figuur 12. Overzicht van totale hoeveelheid *A. fumigatus* en resistente fractie (CFU/g) in ingangsmateriaal en product. **(A)** Pilot 47 Maaisel Bioterra IMAB Vechtstromen. **(B)** Pilot 14 Maaisel rechtstreeks Putten. **(C)** Pilot 5A Bokashi en Maaisel Compost-O Leeuwarden.

Bijlage 4. Technische replica dataset

In deze bijlage volgt een reeks tabellen met hierin een dataset van alle technische replica's (CFU/g) die in dit onderzoek zijn gebruikt.

Tabel 5. Dataset technische replica's ingangsmateriaal en product Pilot 5A. Per biologische replica zijn vijf technische replica's geanalyseerd. Hiervan zijn gemiddelde waarden en standaardfouten bepaald. -eind = product.

Monster	Datum experiment	Monster beschrijving	Totaal (cfu/g)	TEB Resistent (cfu/g)	ITR Resistent (cfu/g)	VOR Resistent (cfu/g)	TEB Resistent %	ITR Resistent %	VOR Resistent %
P5AS1	20-3-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	2.400	0	1.600	0	0,00	66,67	0,00
P5AS1	20-3-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	400	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P5AS1	20-3-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	2.800	0	1.200	0	0,00	42,86	0,00
P5AS1	20-3-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	2.400	0	0	400	0,00	0,00	16,67
P5AS1	20-3-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	1.200	0	2.000	0	0,00	166,67	0,00
P5AS1	GEMIDDELDE WAARDEN		1.840	0	960	80	0,00	55,24	3,33
	STANDARD ERROR		448	0	411	80	0,00	30,61	3,33
P5AS2	20-3-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	400	0	400	0	0,00	100,00	0,00
P5AS2	20-3-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	1.200	0	400	0	0,00	33,33	0,00
P5AS2	20-3-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	800	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P5AS2	20-3-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	400	0	400	0	0,00	100,00	0,00
P5AS2	20-3-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	800	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P5AS2	GEMIDDELDE WAARDEN		720	0	240	0	0,00	46,67	0,00
	STANDARD ERROR		149	0	98	0	0,00	22,57	0,00
P5AS3	20-3-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	1.200	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P5AS3	20-3-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P5AS3	20-3-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	400	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P5AS3	20-3-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P5AS3	20-3-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	1.200	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P5AS3	GEMIDDELDE WAARDEN		560	0	0	0	0,00	0,00	0,00
	STANDARD ERROR		271	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P5AS1-eind	15-5-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	0	0	0	0	0	0	0
P5AS1-eind	15-5-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	0	0	0	0	0	0	0
P5AS1-eind	15-5-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	0	0	0	0	0	0	0
P5AS1-eind	15-5-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	0	0	0	0	0	0	0
P5AS1-eind	15-5-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	0	0	0	0	0	0	0
P5AS1-eind	GEMIDDELDE WAARDEN		0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
	STANDARD ERROR		0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P5AS2-eind	15-5-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	0	0	0	0	0	0	0
P5AS2-eind	15-5-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	0	0	0	0	0	0	0
P5AS2-eind	15-5-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	0	0	0	0	0	0	0
P5AS2-eind	15-5-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	0	0	0	0	0	0	0
P5AS2-eind	15-5-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	0	0	0	0	0	0	0
P5AS2-eind	GEMIDDELDE WAARDEN		0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
	STANDARD ERROR		0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P5AS3-eind	15-5-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	0	0	0	0	0	0	0
P5AS3-eind	15-5-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	400	0	0	0	0	0	0
P5AS3-eind	15-5-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	0	0	0	0	0	0	0
P5AS3-eind	15-5-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	0	0	0	0	0	0	0
P5AS3-eind	15-5-2023	Bokashi & Maaisel Compost-O Leeuwarden	0	0	0	0	0	0	0
P5AS3-eind	GEMIDDELDE WAARDEN		80	0	0	0	0,00	0,00	0,00
	STANDARD ERROR		80	0	0	0	0,00	0,00	0,00

Tabel 6. Dataset technische replica's product Pilot 8. Per biologische replica zijn vijf technische replica's geanalyseerd. Hiervan zijn gemiddelde waarden en standaardfouten bepaald. -eind = product.

Monster	Datum experiment	Monster beschrijving	Totaal (cfu/g)	TEB Resistent (cfu/g)	ITR Resistent (cfu/g)	VOR Resistent (cfu/g)	TEB Resistent %	ITR Resistent %	VOR Resistent %
P8S1-eind	15-5-2023	Bokashi Apeldoorn	20.000	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P8S1-eind	15-5-2023	Bokashi Apeldoorn	24.800	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P8S1-eind	15-5-2023	Bokashi Apeldoorn	14.400	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P8S1-eind	15-5-2023	Bokashi Apeldoorn	22.800	400	400	0	1,75	1,75	0,00
P8S1-eind	15-5-2023	Bokashi Apeldoorn	20.800	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P8S1-eind		GEMIDDELTE WAARDEN	20.560	80	80	0	0,35	0,35	0,00
		STANDARD ERROR	1.748	80	80	0	0,35	0,35	0,00
P8S2-eind	15-5-2023	Bokashi Apeldoorn	40.800	800	800	800	1,96	1,96	1,96
P8S2-eind	15-5-2023	Bokashi Apeldoorn	50.000	0	1.600	0	0,00	3,20	0,00
P8S2-eind	15-5-2023	Bokashi Apeldoorn	47.200	800	800	0	1,69	1,69	0,00
P8S2-eind	15-5-2023	Bokashi Apeldoorn	50.000	1.200	400	800	2,40	0,80	1,60
P8S2-eind	15-5-2023	Bokashi Apeldoorn	42.400	0	0	400	0,00	0,00	0,94
P8S2-eind		GEMIDDELTE WAARDEN	46.080	560	720	400	1,21	1,53	0,90
		STANDARD ERROR	1.912	240	265	179	0,51	0,54	0,40
P8S3-eind	15-5-2023	Bokashi Apeldoorn	54.400	0	800	0	0,00	1,47	0,00
P8S3-eind	15-5-2023	Bokashi Apeldoorn	42.800	0	2.400	0	0,00	5,61	0,00
P8S3-eind	15-5-2023	Bokashi Apeldoorn	57.200	400	1.600	0	0,70	2,80	0,00
P8S3-eind	15-5-2023	Bokashi Apeldoorn	46.400	1.600	1.600	0	3,45	3,45	0,00
P8S3-eind	15-5-2023	Bokashi Apeldoorn	55.600	0	400	400	0,00	0,72	0,72
P8S3-eind		GEMIDDELTE WAARDEN	51.280	400	1.360	80	0,83	2,81	0,14
		STANDARD ERROR	2.816	309	348	80	0,67	0,85	0,14

Tabel 7. Dataset technische replica's ingangsmateriaal en product Pilot 10. Per biologische replica zijn vijf technische replica's geanalyseerd. Hiervan zijn gemiddelde waarden en standaardfouten bepaald. -eind = product.

Monster	Datum experiment	Monster beschrijving	Totaal (cfu/g)	TEB Resistent (cfu/g)	ITR Resistent (cfu/g)	VOR Resistent (cfu/g)	TEB Resistent %	ITR Resistent %	VOR Resistent %
P10S1	22-11-2022	Maaisel, vers	148.000	2.000	2.000	2.000	1,35	1,35	1,35
P10S1	1-12-2022	Maaisel, vers	94.800	1.800	2.600	1.600	1,90	2,74	1,69
P10S1	6-2-2023	Maaisel, vers	98.000	800	1.200	1.600	0,82	1,22	1,63
P10S1	6-2-2023	Maaisel, vers	104.000	2.400	1.600	800	2,31	1,54	0,77
P10S1	6-2-2023	Maaisel, vers	122.000	1.200	2.400	800	0,98	1,97	0,66
P10S1		GEMIDDELTE WAARDEN	113.360	1.640	1.960	1.360	1,47	1,76	1,22
		STANDARD ERROR	9.838	285	256	240	0,28	0,27	0,22
P10S2	22-11-2022	Maaisel, vers	488.000	8.000	8.000	12.000	1,64	1,64	2,46
P10S2	1-12-2022	Maaisel, vers	317.000	11.200	11.200	1.600	3,53	3,53	0,50
P10S2	6-2-2023	Maaisel, vers	340.000	4.400	12.000	4.400	1,29	3,53	1,29
P10S2	6-2-2023	Maaisel, vers	374.000	4.800	8.400	1.200	1,28	2,25	0,32
P10S2	6-2-2023	Maaisel, vers	320.000	4.000	14.000	2.400	1,25	4,38	0,75
P10S2		GEMIDDELTE WAARDEN	367.800	6.480	10.720	4.320	1,80	3,06	1,07
		STANDARD ERROR	31.666	1.374	1.125	1.994	0,44	0,49	0,38
P10S3	22-11-2022	Maaisel, vers	186.000	0	8.000	10.000	0,00	4,30	5,38
P10S3	1-12-2022	Maaisel, vers	112.000	2.200	2.800	1.400	1,96	2,50	1,25
P10S3	6-2-2023	Maaisel, vers	150.000	800	4.000	800	0,53	2,67	0,53
P10S3	6-2-2023	Maaisel, vers	96.000	800	3.200	400	0,83	3,33	0,42
P10S3	6-2-2023	Maaisel, vers	216.000	1.600	2.400	800	0,74	1,11	0,37
P10S3		GEMIDDELTE WAARDEN	152.000	1.080	4.080	2.680	0,81	2,78	1,59
		STANDARD ERROR	22.312	377	1.013	1.834	0,32	0,52	0,96
P10S1-eind	15-5-2023	Bokashi A	40.800	1.600	400	800	3,92	0,98	1,96
P10S1-eind	15-5-2023	Bokashi A	43.200	0	800	400	0,00	1,85	0,93
P10S1-eind	15-5-2023	Bokashi A	47.200	800	1.200	0	1,69	2,54	0,00
P10S1-eind	15-5-2023	Bokashi A	30.400	0	800	400	0,00	2,63	1,32
P10S1-eind	15-5-2023	Bokashi A	34.000	0	800	0	0,00	2,35	0,00
P10S1-eind		GEMIDDELTE WAARDEN	39.120	480	800	320	1,12	2,07	0,84
		STANDARD ERROR	3.052	319	126	149	0,77	0,30	0,38
P10S2-eind	15-5-2023	Bokashi A	5.200	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P10S2-eind	15-5-2023	Bokashi A	2.400	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P10S2-eind	15-5-2023	Bokashi A	3.200	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P10S2-eind	15-5-2023	Bokashi A	2.400	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P10S2-eind	15-5-2023	Bokashi A	4.400	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P10S2-eind		GEMIDDELTE WAARDEN	3.520	0	0	0	0,00	0,00	0,00
		STANDARD ERROR	556	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P10S3-eind	15-5-2023	Bokashi A	4.400	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P10S3-eind	15-5-2023	Bokashi A	6.800	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P10S3-eind	15-5-2023	Bokashi A	7.200	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P10S3-eind	15-5-2023	Bokashi A	8.000	400	400	0	5,00	5,00	0,00
P10S3-eind	15-5-2023	Bokashi A	4.800	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P10S3-eind		GEMIDDELTE WAARDEN	6.240	80	80	0	1,00	1,00	0,00
		STANDARD ERROR	698	80	80	0	1,00	1,00	0,00

Tabel 8. Dataset technische replica's ingangsmateriaal en product Pilot 14. Per biologische replica zijn vijf technische replica's geanalyseerd. Hiervan zijn gemiddelde waarden en standaardfouten bepaald. -eind = product.

Monster	Datum experiment	Monster beschrijving	Totaal (cfu/g)	TEB Resistent (cfu/g)	ITR Resistent (cfu/g)	VOR Resistent (cfu/g)	TEB Resistent %	ITR Resistent %	VOR Resistent %
P14S1	16-12-2022	Maaisel rechtstreeks Putten	800	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S1	6-2-2023	Maaisel rechtstreeks Putten	400	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S1	6-2-2023	Maaisel rechtstreeks Putten	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S1	6-2-2023	Maaisel rechtstreeks Putten	400	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S1	6-2-2023	Maaisel rechtstreeks Putten	400	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S1		GEMIDDELDE WAARDEN	400	0	0	0	0,00	0,00	0,00
		STANDARD ERROR	126	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S2	16-12-2022	Maaisel rechtstreeks Putten	600	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S2	6-2-2023	Maaisel rechtstreeks Putten	400	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S2	6-2-2023	Maaisel rechtstreeks Putten	800	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S2	6-2-2023	Maaisel rechtstreeks Putten	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S2	6-2-2023	Maaisel rechtstreeks Putten	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S2		GEMIDDELDE WAARDEN	360	0	0	0	0,00	0,00	0,00
		STANDARD ERROR	160	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S3	16-12-2022	Maaisel rechtstreeks Putten	200	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S3	6-2-2023	Maaisel rechtstreeks Putten	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S3	6-2-2023	Maaisel rechtstreeks Putten	800	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S3	6-2-2023	Maaisel rechtstreeks Putten	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S3	6-2-2023	Maaisel rechtstreeks Putten	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S3		GEMIDDELDE WAARDEN	200	0	0	0	0,00	0,00	0,00
		STANDARD ERROR	155	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S1-eind	16-6-2023	Maaisel rechtstreeks Putten	400	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S1-eind	16-6-2023	Maaisel rechtstreeks Putten	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S1-eind	16-6-2023	Maaisel rechtstreeks Putten	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S1-eind	16-6-2023	Maaisel rechtstreeks Putten	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S1-eind	16-6-2023	Maaisel rechtstreeks Putten	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
		GEMIDDELDE WAARDEN	80	0	0	0	0,00	0,00	0,00
		STANDARD ERROR	80	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S2-eind	16-6-2023	Maaisel rechtstreeks Putten	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S2-eind	16-6-2023	Maaisel rechtstreeks Putten	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S2-eind	16-6-2023	Maaisel rechtstreeks Putten	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S2-eind	16-6-2023	Maaisel rechtstreeks Putten	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S2-eind	16-6-2023	Maaisel rechtstreeks Putten	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
		GEMIDDELDE WAARDEN	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
		STANDARD ERROR	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S3-eind	16-6-2023	Maaisel rechtstreeks Putten	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S3-eind	16-6-2023	Maaisel rechtstreeks Putten	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S3-eind	16-6-2023	Maaisel rechtstreeks Putten	400	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S3-eind	16-6-2023	Maaisel rechtstreeks Putten	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P14S3-eind	16-6-2023	Maaisel rechtstreeks Putten	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
		GEMIDDELDE WAARDEN	80	0	0	0	0,00	0,00	0,00
		STANDARD ERROR	80	0	0	0	0,00	0,00	0,00

Tabel 9. Dataset technische replica's ingangsmateriaal en product Pilot 25. Per biologische replica zijn vijf technische replica's geanalyseerd. Hiervan zijn gemiddelde waarden en standaardfouten bepaald. -eind = product.

Monster	Datum experiment	Monster beschrijving	Totaal (cfu/g)	TEB Resistent (cfu/g)	ITR Resistent (cfu/g)	VOR Resistent (cfu/g)	TEB Resistent %	ITR Resistent %	VOR Resistent %
P25S1	14-2-2023	Bokashi Noord Limburg	5.200	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P25S1	14-2-2023	Bokashi Noord Limburg	4.800	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P25S1	14-2-2023	Bokashi Noord Limburg	2.800	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P25S1	14-2-2023	Bokashi Noord Limburg	2.000	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P25S1		GEMIDDELDE WAARDEN	3.700	0	0	0	0,00	0,00	0,00
		STANDARD ERROR	772	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P25S2	14-2-2023	Bokashi Noord Limburg	12.400	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P25S2	14-2-2023	Bokashi Noord Limburg	12.000	0	0	400	0,00	0,00	3,33
P25S2	14-2-2023	Bokashi Noord Limburg	11.600	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P25S2	14-2-2023	Bokashi Noord Limburg	8.400	0	400	400	0,00	4,76	4,76
P25S2		GEMIDDELDE WAARDEN	11.100	0	100	200	0,00	1,19	2,02
		STANDARD ERROR	915	0	100	115	0,00	1,19	1,20
P25S3	14-2-2023	Bokashi Noord Limburg	15.200	800	0	0	5,26	0,00	0,00
P25S3	14-2-2023	Bokashi Noord Limburg	14.400	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P25S3	14-2-2023	Bokashi Noord Limburg	14.000	0	400	400	0,00	2,86	2,86
P25S3	14-2-2023	Bokashi Noord Limburg	11.600	0	0	400	0,00	0,00	3,45
P25S3		GEMIDDELDE WAARDEN	13.800	200	100	200	1,32	0,71	1,58
		STANDARD ERROR	775	200	100	115	1,32	0,71	0,92
P2502S1-eind	15-5-2023	Bokashi Noord Limburg	192.000	0	800	0	0,00	0,42	0,00
P2502S1-eind	15-5-2023	Bokashi Noord Limburg	161.600	0	400	0	0,00	0,25	0,00
P2502S1-eind	15-5-2023	Bokashi Noord Limburg	156.800	0	1.600	0	0,00	1,02	0,00
P2502S1-eind	15-5-2023	Bokashi Noord Limburg	149.600	0	1.200	0	0,00	0,80	0,00
P2502S1-eind	15-5-2023	Bokashi Noord Limburg	158.400	400	800	0	0,25	0,51	0,00
P2502S1-eind		GEMIDDELDE WAARDEN	163.680	80	960	0	0,05	0,60	0,00
		STANDARD ERROR	7.335	80	204	0	0,05	0,14	0,00
P2502S2-eind	15-5-2023	Bokashi Noord Limburg	100.800	2.000	4.000	1.200	1,98	3,97	1,19
P2502S2-eind	15-5-2023	Bokashi Noord Limburg	105.600	3.600	3.200	800	3,41	3,03	0,76
P2502S2-eind	15-5-2023	Bokashi Noord Limburg	122.800	400	3.600	400	0,33	2,93	0,33
P2502S2-eind	15-5-2023	Bokashi Noord Limburg	116.400	2.000	2.000	0	1,72	1,72	0,00
P2502S2-eind	15-5-2023	Bokashi Noord Limburg	114.400	400	2.800	1.200	0,35	2,45	1,05
P2502S2-eind		GEMIDDELDE WAARDEN	112.000	1.680	3.120	720	1,56	2,82	0,66
		STANDARD ERROR	3.918	598	343	233	0,57	0,37	0,22
P2502S3-eind	15-5-2023	Bokashi Noord Limburg	70.800	0	1.200	400	0,00	1,69	0,56
P2502S3-eind	15-5-2023	Bokashi Noord Limburg	64.800	0	1.200	0	0,00	1,85	0,00
P2502S3-eind	15-5-2023	Bokashi Noord Limburg	78.400	0	1.200	0	0,00	1,53	0,00
P2502S3-eind	15-5-2023	Bokashi Noord Limburg	59.600	400	400	0	0,67	0,67	0,00
P2502S3-eind	15-5-2023	Bokashi Noord Limburg	56.800	400	400	800	0,70	0,70	1,41
P2502S3-eind		GEMIDDELDE WAARDEN	66.080	160	880	240	0,28	1,29	0,39
		STANDARD ERROR	3.891	98	196	160	0,17	0,25	0,28

Tabel 10. Dataset technische replica's ingangsmateriaal en product Pilot 2703. Per biologische replica zijn vijf technische replica's geanalyseerd. Hiervan zijn gemiddelde waarden en standaardfouten bepaald. -eind = product.

Monster	Datum experiment	Monster beschrijving	Totaal (cfu/g)	TEB Resistent (cfu/g)	ITR Resistent (cfu/g)	VOR Resistent (cfu/g)	TEB Resistent %	ITR Resistent %	VOR Resistent %
P27S1	16-6-2023	Bokashi Midden Limburg	596.000	0	2.000	0	0,00	0,34	0,00
P27S1	16-6-2023	Bokashi Midden Limburg	734.000	0	2.000	4.000	0,00	0,27	0,54
P27S1	16-6-2023	Bokashi Midden Limburg	578.000	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P27S1	16-6-2023	Bokashi Midden Limburg	588.000	4.000	2.000	0	0,68	0,34	0,00
P27S1	16-6-2023	Bokashi Midden Limburg	600.000	2.000	2.000	2.000	0,33	0,33	0,33
P27S1		GEMIDDELDE WAARDEN	619.200	1.200	1.600	1.200	0,20	0,26	0,18
		STANDARD ERROR	28.895	799	399	799	0,14	0,07	0,11
P27S2	16-6-2023	Bokashi Midden Limburg	138.000	2.000	0	0	1,45	0,00	0,00
P27S2	16-6-2023	Bokashi Midden Limburg	170.000	0	2.000	0	0,00	1,18	0,00
P27S2	16-6-2023	Bokashi Midden Limburg	158.000	2.000	0	0	1,27	0,00	0,00
P27S2	16-6-2023	Bokashi Midden Limburg	176.000	8.000	4.000	0	4,55	2,27	0,00
P27S2	16-6-2023	Bokashi Midden Limburg	212.000	8.000	0	0	3,77	0,00	0,00
P27S2		GEMIDDELDE WAARDEN	170.800	4.000	1.200	0	2,21	0,69	0,00
		STANDARD ERROR	12.154	1.670	799	0	0,84	0,46	0,00
P27S3	16-6-2023	Bokashi Midden Limburg	94.000	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P27S3	16-6-2023	Bokashi Midden Limburg	112.000	2.000	4.000	0	1,79	3,57	0,00
P27S3	16-6-2023	Bokashi Midden Limburg	114.000	2.000	0	0	1,75	0,00	0,00
P27S3	16-6-2023	Bokashi Midden Limburg	100.000	0	4.000	0	0,00	4,00	0,00
P27S3	16-6-2023	Bokashi Midden Limburg	84.000	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P27S3		GEMIDDELDE WAARDEN	100.800	800	1.600	0	0,71	1,51	0,00
		STANDARD ERROR	5.597	489	978	0	0,43	0,93	0,00
P2703S1-eind	15-5-2023	Bokashi Midden Limburg	760.000	4.000	11.600	800	0,53	1,53	0,11
P2703S1-eind	15-5-2023	Bokashi Midden Limburg	540.000	4.400	10.400	2.400	0,81	1,93	0,44
P2703S1-eind	15-5-2023	Bokashi Midden Limburg	720.000	6.400	10.400	2.000	0,89	1,44	0,28
P2703S1-eind	15-5-2023	Bokashi Midden Limburg	620.000	5.200	8.800	1.200	0,84	1,42	0,19
P2703S1-eind	15-5-2023	Bokashi Midden Limburg	680.000	7.600	10.000	800	1,12	1,47	0,12
P2703S1-eind		GEMIDDELDE WAARDEN	664.000	5.520	10.240	1.440	0,84	1,56	0,23
		STANDARD ERROR	38.610	661	448	324	0,09	0,09	0,06
P2703S2-eind	15-5-2023	Bokashi Midden Limburg	760.000	6.400	25.200	800	0,84	3,32	0,11
P2703S2-eind	15-5-2023	Bokashi Midden Limburg	1.680.000	12.000	22.400	1.600	0,71	1,33	0,10
P2703S2-eind	15-5-2023	Bokashi Midden Limburg	1.420.000	11.600	21.200	1.200	0,82	1,49	0,08
P2703S2-eind	15-5-2023	Bokashi Midden Limburg	1.200.000	11.200	20.400	800	0,93	1,70	0,07
P2703S2-eind	15-5-2023	Bokashi Midden Limburg	1.500.000	10.800	27.600	2.400	0,72	1,84	0,16
P2703S2-eind		GEMIDDELDE WAARDEN	1.312.000	10.400	23.360	1.360	0,81	1,94	0,10
		STANDARD ERROR	157.786	1.018	1.334	299	0,04	0,35	0,02
P2703S3-eind	15-5-2023	Bokashi Midden Limburg	13.200.000	260.000	400.000	32.800	1,97	3,03	0,25
P2703S3-eind	15-5-2023	Bokashi Midden Limburg	17.280.000	240.000	660.000	27.600	1,39	3,82	0,16
P2703S3-eind	15-5-2023	Bokashi Midden Limburg	16.160.000	280.000	460.000	33.200	1,73	2,85	0,21
P2703S3-eind	15-5-2023	Bokashi Midden Limburg	13.280.000	440.000	500.000	24.800	3,31	3,77	0,19
P2703S3-eind	15-5-2023	Bokashi Midden Limburg	13.840.000	320.000	340.000	30.400	2,31	2,46	0,22
P2703S3-eind		GEMIDDELDE WAARDEN	14.752.000	308.000	472.000	29.760	2,14	3,18	0,20
		STANDARD ERROR	828.618	35.490	54.163	1.590	0,33	0,26	0,01

Tabel 12. Dataset technische replica's ingangsmateriaal en product Pilot 54. Per biologische replica zijn vijf technische replica's geanalyseerd. Hiervan zijn gemiddelde waarden en standaardfouten bepaald. -eind = product.

Monster	Datum experiment	Monster beschrijving	Totaal (cfu/g)	TEB Resistent (cfu/g)	ITR Resistent (cfu/g)	VOR Resistent (cfu/g)	TEB Resistent %	ITR Resistent %	VOR Resistent %
P54S1	31-1-2023	Bokashi Rotterdam Havengebied	2.620.000	18.800	27.200	10.000	0,72	1,04	0,38
P54S1	6-2-2023	Bokashi Rotterdam Havengebied	1.620.000	17.600	21.200	7.600	1,09	1,31	0,47
P54S1	6-2-2023	Bokashi Rotterdam Havengebied	3.280.000	18.400	35.600	10.800	0,56	1,09	0,33
P54S1	6-2-2023	Bokashi Rotterdam Havengebied	1.940.000	17.600	28.800	11.200	0,91	1,48	0,58
P54S1	6-2-2023	Bokashi Rotterdam Havengebied	2.400.000	20.800	35.200	12.800	0,87	1,47	0,53
P54S1		GEMIDDELTE WAARDEN	2.372.000	18.640	29.600	10.480	0,83	1,28	0,46
		STANDARD ERROR	285.756	587	2.682	851	0,09	0,09	0,05
P54S2	31-1-2023	Bokashi Rotterdam Havengebied	1.860.000	16.800	34.400	10.400	0,90	1,85	0,56
P54S2	6-2-2023	Bokashi Rotterdam Havengebied	2.080.000	16.000	38.800	12.800	0,77	1,87	0,62
P54S2	6-2-2023	Bokashi Rotterdam Havengebied	2.100.000	14.000	28.800	9.200	0,67	1,37	0,44
P54S2	6-2-2023	Bokashi Rotterdam Havengebied	1.760.000	12.800	36.000	8.800	0,73	2,05	0,50
P54S2	6-2-2023	Bokashi Rotterdam Havengebied	2.640.000	16.800	31.200	8.400	0,64	1,18	0,32
P54S2		GEMIDDELTE WAARDEN	2.088.000	15.280	33.840	9.920	0,74	1,66	0,49
		STANDARD ERROR	152.127	803	1.757	793	0,05	0,16	0,05
P54S3	31-1-2023	Bokashi Rotterdam Havengebied	1.240.000	11.600	16.800	4.000	0,94	1,35	0,32
P54S3	6-2-2023	Bokashi Rotterdam Havengebied	1.500.000	12.800	19.600	9.200	0,85	1,31	0,61
P54S3	6-2-2023	Bokashi Rotterdam Havengebied	1.040.000	14.000	16.800	6.000	1,35	1,62	0,58
P54S3	6-2-2023	Bokashi Rotterdam Havengebied	1.160.000	9.200	18.400	6.000	0,79	1,59	0,52
P54S3	6-2-2023	Bokashi Rotterdam Havengebied	820.000	10.400	19.200	8.000	1,27	2,34	0,98
P54S3		GEMIDDELTE WAARDEN	1.152.000	11.600	18.160	6.640	1,04	1,64	0,60
		STANDARD ERROR	111.982	847	587	898	0,11	0,19	0,11

Tabel 13. Dataset technische replica's ingangsmateriaal en product Pilot 5601. Per biologische replica zijn vijf technische replica's geanalyseerd. Hiervan zijn gemiddelde waarden en standaardfouten bepaald. -eind = product.

Monster	Datum experiment	Monster beschrijving	Totaal (cfu/g)	TEB Resistent (cfu/g)	ITR Resistent (cfu/g)	VOR Resistent (cfu/g)	TEB Resistent %	ITR Resistent %	VOR Resistent %
P5601S1	16-12-2022	Maaisel uit Voerendaal 22-11-2022	3.900.000	97.000	118.000	13.000	2,49	3,03	0,33
P5601S1	13-2-2023	Maaisel uit Voerendaal 22-11-2022	3.800.000	34.000	156.000	36.000	0,89	4,11	0,95
P5601S1	13-2-2023	Maaisel uit Voerendaal 22-11-2022	9.600.000	32.000	114.000	14.000	0,33	1,19	0,15
P5601S1	13-2-2023	Maaisel uit Voerendaal 22-11-2022	18.400.000	42.000	130.000	16.000	0,23	0,71	0,09
P5601S1	13-2-2023	Maaisel uit Voerendaal 22-11-2022	9.600.000	34.000	140.000	20.000	0,35	1,46	0,21
P5601S1		GEMIDDELTE WAARDEN	9.060.000	47.800	131.600	19.800	0,86	2,10	0,34
		STANDARD ERROR	2.660.954	12.398	7.613	4.216	0,42	0,63	0,16
P5601S2	16-12-2022	Maaisel uit Voerendaal 22-11-2022	1.300.000	27.000	31.000	6.000	2,08	2,38	0,46
P5601S2	13-2-2023	Maaisel uit Voerendaal 22-11-2022	1.800.000	6.000	20.000	4.000	0,33	1,11	0,22
P5601S2	13-2-2023	Maaisel uit Voerendaal 22-11-2022	1.400.000	22.000	32.000	4.000	1,57	2,29	0,29
P5601S2	13-2-2023	Maaisel uit Voerendaal 22-11-2022	800.000	16.000	18.000	4.000	2,00	2,25	0,50
P5601S2	13-2-2023	Maaisel uit Voerendaal 22-11-2022	1.400.000	4.000	20.000	12.000	0,29	1,43	0,86
P5601S2		GEMIDDELTE WAARDEN	1.340.000	15.000	24.200	6.000	1,25	1,89	0,47
		STANDARD ERROR	159.719	4.442	3.001	1.546	0,39	0,26	0,11
P5601S3	16-12-2022	Maaisel uit Voerendaal 22-11-2022	9.900.000	325.000	521.000	142.000	3,28	5,26	1,43
P5601S3	13-2-2023	Maaisel uit Voerendaal 22-11-2022	16.800.000	134.000	126.000	114.000	0,80	0,75	0,68
P5601S3	13-2-2023	Maaisel uit Voerendaal 22-11-2022	21.600.000	116.000	208.000	142.000	0,54	0,96	0,66
P5601S3	13-2-2023	Maaisel uit Voerendaal 22-11-2022	22.200.000	190.000	352.000	154.000	0,86	1,59	0,69
P5601S3	13-2-2023	Maaisel uit Voerendaal 22-11-2022	25.200.000	124.000	218.000	170.000	0,49	0,87	0,67
P5601S3		GEMIDDELTE WAARDEN	19.140.000	177.800	285.000	144.400	1,19	1,89	0,83
		STANDARD ERROR	2.669.180	38.950	69.119	9.158	0,53	0,86	0,15
P5601S1-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: Voerendaal	72.000	400	2.000	0	0,56	2,78	0,00
P5601S1-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: Voerendaal	87.200	800	2.000	400	0,92	2,29	0,46
P5601S1-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: Voerendaal	74.800	800	2.400	400	1,07	3,21	0,53
P5601S1-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: Voerendaal	89.600	1.200	3.200	0	1,34	3,57	0,00
P5601S1-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: Voerendaal	86.800	400	4.000	800	0,46	4,61	0,92
P5601S1-eind		GEMIDDELTE WAARDEN	82.080	720	2.720	320	0,87	3,29	0,38
		STANDARD ERROR	3.597	149	387	149	0,16	0,39	0,17
P5601S2-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: Voerendaal	164.000	1.600	4.000	400	0,98	2,44	0,24
P5601S2-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: Voerendaal	143.200	0	7.600	0	0,00	5,31	0,00
P5601S2-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: Voerendaal	172.000	1.200	2.000	0	0,70	1,16	0,00
P5601S2-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: Voerendaal	128.800	400	6.400	400	0,31	4,97	0,31
P5601S2-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: Voerendaal	168.800	1.600	2.400	0	0,95	1,42	0,00
P5601S2-eind		GEMIDDELTE WAARDEN	155.360	960	4.480	160	0,59	3,06	0,11
		STANDARD ERROR	8.308	324	1.096	98	0,19	0,87	0,07
P5601S3-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: Voerendaal	128.000	800	6.800	0	0,63	5,31	0,00
P5601S3-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: Voerendaal	133.600	1.600	6.000	0	1,20	4,49	0,00
P5601S3-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: Voerendaal	132.000	1.600	2.400	800	1,21	1,82	0,61
P5601S3-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: Voerendaal	111.200	1.200	2.800	800	1,08	2,52	0,72
P5601S3-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: Voerendaal	106.400	0	2.400	800	0,00	2,26	0,75
P5601S3-eind		GEMIDDELTE WAARDEN	122.240	1.040	4.080	480	0,82	3,28	0,42
		STANDARD ERROR	5.604	299	957	196	0,23	0,68	0,17

Tabel 14. Dataset technische replica's ingangsmateriaal en product Pilot 5602. Per biologische replica zijn vijf technische replica's geanalyseerd. Hiervan zijn gemiddelde waarden en standaardfouten bepaald. -eind = product.

Monster	Datum experiment	Monster beschrijving	Totaal (cfu/g)	TEB Resistent (cfu/g)	ITR Resistent (cfu/g)	VOR Resistent (cfu/g)	TEB Resistent %	ITR Resistent %	VOR Resistent %
P5602S1	16-12-2022	Maaisel uit St. Joost 22-11-2022	172.000	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P5602S1	27-1-2023	Maaisel uit St. Joost 22-11-2022	194.000	400	2.000	2.000	0,21	1,03	1,03
P5602S1	13-2-2023	Maaisel uit St. Joost 22-11-2022	244.000	800	800	3.600	0,33	0,33	1,48
P5602S1	13-2-2023	Maaisel uit St. Joost 22-11-2022	224.000	1.600	1.600	2.400	0,71	0,71	1,07
P5602S1	13-2-2023	Maaisel uit St. Joost 22-11-2022	242.000	400	1.200	2.000	0,17	0,50	0,83
P5602S1		GEMIDDELDE WAARDEN	215.200	640	1.120	2.000	0,28	0,51	0,88
		STANDARD ERROR	14.012	271	343	579	0,12	0,17	0,24
P5602S2	16-12-2022	Maaisel uit St. Joost 22-11-2022	16.000	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P5602S2	27-1-2023	Maaisel uit St. Joost 22-11-2022	10.000	400	0	400	4,00	0,00	4,00
P5602S2	13-2-2023	Maaisel uit St. Joost 22-11-2022	14.000	0	400	400	0,00	2,86	2,86
P5602S2	13-2-2023	Maaisel uit St. Joost 22-11-2022	22.000	0	0	800	0,00	0,00	3,64
P5602S2	13-2-2023	Maaisel uit St. Joost 22-11-2022	12.000	0	400	0	0,00	3,33	0,00
P5602S2		GEMIDDELDE WAARDEN	14.800	80	160	320	0,80	1,24	2,10
		STANDARD ERROR	2.056	80	98	149	0,80	0,76	0,87
P5602S3	16-12-2022	Maaisel uit St. Joost 22-11-2022	122.000	0	0	0	0,00	0,00	0,00
P5602S3	27-1-2023	Maaisel uit St. Joost 22-11-2022	96.000	400	2.000	2.400	0,42	2,08	2,50
P5602S3	13-2-2023	Maaisel uit St. Joost 22-11-2022	122.000	400	800	400	0,33	0,66	0,33
P5602S3	13-2-2023	Maaisel uit St. Joost 22-11-2022	94.000	0	400	400	0,00	0,43	0,43
P5602S3	13-2-2023	Maaisel uit St. Joost 22-11-2022	88.000	800	400	800	0,91	0,45	0,91
P5602S3		GEMIDDELDE WAARDEN	104.400	320	720	800	0,33	0,72	0,83
		STANDARD ERROR	7.292	149	343	419	0,17	0,36	0,44
P5602S1-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: St. Joost	416.000	5.200	9.600	800	1,25	2,31	0,19
P5602S1-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: St. Joost	428.000	3.600	8.400	1.600	0,84	1,96	0,37
P5602S1-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: St. Joost	562.000	8.400	8.000	800	1,49	1,42	0,14
P5602S1-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: St. Joost	496.000	6.800	7.600	1.200	1,37	1,53	0,24
P5602S1-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: St. Joost	450.000	7.600	8.400	1.200	1,69	1,87	0,27
P5602S1-eind		GEMIDDELDE WAARDEN	470.400	6.320	8.400	1.120	1,33	1,82	0,24
		STANDARD ERROR	26.617	860	334	149	0,14	0,16	0,04
P5602S2-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: St. Joost	390.000	3.200	7.600	400	0,82	1,95	0,10
P5602S2-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: St. Joost	450.000	4.800	9.600	2.000	1,07	2,13	0,44
P5602S2-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: St. Joost	194.000	3.200	7.600	1.600	1,65	3,92	0,82
P5602S2-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: St. Joost	330.000	4.000	6.800	400	1,21	2,06	0,12
P5602S2-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: St. Joost	388.000	6.000	6.400	1.200	1,55	1,65	0,31
P5602S2-eind		GEMIDDELDE WAARDEN	350.400	4.240	7.600	1.120	1,26	2,34	0,36
		STANDARD ERROR	43.386	530	550	319	0,15	0,40	0,13
P5602S3-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: St. Joost	308.000	0	1.200	800	0,00	0,39	0,26
P5602S3-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: St. Joost	240.800	3.200	3.600	3.600	1,33	1,50	1,50
P5602S3-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: St. Joost	284.000	1.600	2.000	400	0,56	0,70	0,14
P5602S3-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: St. Joost	201.600	2.800	1.600	400	1,39	0,79	0,20
P5602S3-eind	15-5-2023	Bokashi Zuid Limburg: St. Joost	206.400	1.200	2.800	400	0,58	1,36	0,19
P5602S3-eind		GEMIDDELDE WAARDEN	248.160	1.760	2.240	1.120	0,77	0,95	0,46
		STANDARD ERROR	20.976	573	430	624	0,26	0,21	0,26

Tabel 15. Dataset technische replica's ingangsmateriaal en product Pilot 5603. Per biologische replica zijn vijf technische replica's geanalyseerd. Hiervan zijn gemiddelde waarden en standaardfouten bepaald. -eind = product.

Monster	Datum experiment	Monster beschrijving	Totaal (cfu/g)	TEB Resistent (cfu/g)	ITR Resistent (cfu/g)	VOR Resistent (cfu/g)	TEB Resistent %	ITR Resistent %	VOR Resistent %
P5603S1	16-12-2022	Maaisel uit Spaubeek 22-11-2022	920.000	28.000	37.000	1.000	3,04	4,02	0,11
P5603S1	27-1-2023	Maaisel uit Spaubeek 22-11-2022	4.280.000	2.000	34.000	5.200	0,05	0,79	0,12
P5603S1	13-2-2023	Maaisel uit Spaubeek 22-11-2022	4.100.000	6.400	4.400	10.000	0,16	0,11	0,24
P5603S1	13-2-2023	Maaisel uit Spaubeek 22-11-2022	4.900.000	9.600	9.200	8.800	0,20	0,19	0,18
P5603S1	13-2-2023	Maaisel uit Spaubeek 22-11-2022	4.500.000	10.800	6.800	10.800	0,24	0,15	0,24
P5603S1	GEMIDDELTE WAARDEN		3.740.000	11.360	18.280	7.160	0,74	1,05	0,18
	STANDARD ERROR		716.264	4.422	7.074	1.811	0,58	0,75	0,03
P5603S2	16-12-2022	Maaisel uit Spaubeek 22-11-2022	1.820.000	4.000	2.000	1.000	0,22	0,11	0,05
P5603S2	27-1-2023	Maaisel uit Spaubeek 22-11-2022	2.280.000	0	1.600	800	0,00	0,07	0,04
P5603S2	13-2-2023	Maaisel uit Spaubeek 22-11-2022	1.940.000	1.600	800	2.400	0,08	0,04	0,12
P5603S2	13-2-2023	Maaisel uit Spaubeek 22-11-2022	1.960.000	2.000	1.600	1.200	0,10	0,08	0,06
P5603S2	13-2-2023	Maaisel uit Spaubeek 22-11-2022	1.880.000	1.200	1.200	400	0,06	0,06	0,02
P5603S2	GEMIDDELTE WAARDEN		1.976.000	1.760	1.440	1.160	0,09	0,07	0,06
	STANDARD ERROR		79.710	651	204	336	0,04	0,01	0,02
P5603S3	16-12-2022	Maaisel uit Spaubeek 22-11-2022	2.300.000	14.000	27.000	1.000	0,61	1,17	0,04
P5603S3	27-1-2023	Maaisel uit Spaubeek 22-11-2022	1.120.000	2.000	4.000	0	0,18	0,36	0,00
P5603S3	13-2-2023	Maaisel uit Spaubeek 22-11-2022	1.160.000	4.000	2.800	2.400	0,34	0,24	0,21
P5603S3	13-2-2023	Maaisel uit Spaubeek 22-11-2022	1.220.000	1.600	800	1.200	0,13	0,07	0,10
P5603S3	13-2-2023	Maaisel uit Spaubeek 22-11-2022	1.260.000	1.200	3.200	1.600	0,10	0,25	0,13
P5603S3	GEMIDDELTE WAARDEN		1.412.000	4.560	7.560	1.240	0,27	0,42	0,10
	STANDARD ERROR		222.911	2.404	4.880	391	0,09	0,19	0,04
P5603S1-eind	16-6-2023	Bokashi Zuid Limburg: Spaubeek	60.400	800	1.600	0	1,32	2,65	0,00
P5603S1-eind	16-6-2023	Bokashi Zuid Limburg: Spaubeek	66.800	400	2.000	400	0,60	2,99	0,60
P5603S1-eind	16-6-2023	Bokashi Zuid Limburg: Spaubeek	64.800	0	2.000	0	0,00	3,09	0,00
P5603S1-eind	16-6-2023	Bokashi Zuid Limburg: Spaubeek	63.600	1.600	2.000	1.200	2,52	3,14	1,89
P5603S1-eind	16-6-2023	Bokashi Zuid Limburg: Spaubeek	60.800	800	2.800	0	1,32	4,61	0,00
P5603S1-eind	GEMIDDELTE WAARDEN		63.280	720	2.080	320	1,15	3,30	0,50
	STANDARD ERROR		1.207	265	196	233	0,42	0,34	0,37
P5603S2-eind	16-6-2023	Bokashi Zuid Limburg: Spaubeek	72.000	1.200	1.600	0	1,67	2,22	0,00
P5603S2-eind	16-6-2023	Bokashi Zuid Limburg: Spaubeek	70.800	400	1.600	400	0,56	2,26	0,56
P5603S2-eind	16-6-2023	Bokashi Zuid Limburg: Spaubeek	72.400	800	1.200	0	1,10	1,66	0,00
P5603S2-eind	16-6-2023	Bokashi Zuid Limburg: Spaubeek	82.400	0	2.000	1.600	0,00	2,43	1,94
P5603S2-eind	16-6-2023	Bokashi Zuid Limburg: Spaubeek	66.000	400	400	1.600	0,61	0,61	2,42
P5603S2-eind	GEMIDDELTE WAARDEN		72.720	560	1.360	720	0,79	1,83	0,99
	STANDARD ERROR		2.671	204	271	366	0,28	0,33	0,50
P5603S3-eind	16-6-2023	Bokashi Zuid Limburg: Spaubeek	199.200	2.800	3.200	1.200	1,41	1,61	0,60
P5603S3-eind	16-6-2023	Bokashi Zuid Limburg: Spaubeek	136.800	4.800	3.200	2.000	3,51	2,34	1,46
P5603S3-eind	16-6-2023	Bokashi Zuid Limburg: Spaubeek	140.400	6.400	6.400	1.200	4,56	4,56	0,85
P5603S3-eind	16-6-2023	Bokashi Zuid Limburg: Spaubeek	138.400	1.600	4.000	1.200	1,16	2,89	0,87
P5603S3-eind	16-6-2023	Bokashi Zuid Limburg: Spaubeek	132.400	2.000	5.600	1.200	1,51	4,23	0,91
P5603S3-eind	GEMIDDELTE WAARDEN		149.440	3.520	4.480	1.360	2,43	3,12	0,94
	STANDARD ERROR		12.488	905	649	160	0,68	0,56	0,14

Tabel 16. Metingen van azoolconcentraties uitgevoerd bij alle pilots. Detectielimiet was 0.01 mg/kg. Als er geen waarneming staat, betekent dit dat de concentratie van de betreffende stof onder de detectielimiet lag.

	Pilot 5A		Pilot 10A		Pilot 14		Pilot 2502		Pilot 27		Pilot 38		Pilot 47		Pilot 54		Pilot 5601		Pilot 5602		Pilot 5603	
Bromuconazool (mg/kg)	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01														
Difenoconazool (mg/kg)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01														
Fenarimol (mg/kg)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01														
Imazail (mg/kg)		0.01		0.01		0.01		0.01														
Metconazool (mg/kg)		0.02		0.02		0.02		0.02														
Prochloraz (mg/kg)		0.01		0.01		0.01		0.01														
Propiconazool (mg/kg)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01														
Prothioconazool-diesthio (mg/kg)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01														
Tebuconazool (mg/kg)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01														
Totaal azolen (mg/kg)	0.07	0.10	0.07	0.10	0.07	0.10	0.07	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Bijlage 5. Genetische analyse van de promotor regio van het cyp51A gen.

Onderstaande gel foto's laten zien hoe lang het stuk DNA is in de promotor regio van het cyp51A gen ten opzichte van een referentie. Een verlengd DNA in deze regio is indicatief voor resistentie door veranderingen in het cyp51A gen. Resistentie in *A. fumigatus* geïsoleerd uit patiënten wordt ook gekarakteriseerd door verlengingen in deze promotor regio. De resultaten hieronder laten zien dat er inderdaad verlengingen zijn, met 34 ofwel met 46 baseparen, de bekende TR34 en TR46 mutanten. Dit laat zien dat in de resistente stammen die geïsoleerd zijn gedurende dit onderzoek hetzelfde genetische mechanisme voor resistentie is gevonden als in patiënten. In de gelfotos is dit te zien aan de bandjes op de gel; deze wijken allen af van het wildtype (WT) en zijn gelijk aan ofwel TR34 ofwel TR46.

Gelfoto's van 47 PCR reacties, elk van een resistente *Aspergillus fumigatus* geïsoleerd tijdens dit onderzoek.

