



Aan
lezer

Van
Marca Schrap/Gerard Stroomberg
Datum
19 december 2007
Onderwerp
Rapportage pilot antibiotica screeningstest

Doorkiesnummer
0320-298668
Bijlage(n)
-

Antibiotica screening in Oppervlaktewater en afvalwater
Resultaten van een pilot van oppervlaktewater in het Maasstroomgebied.
Gerard Stroomberg, Marca schrap; RWS WD, 2007.

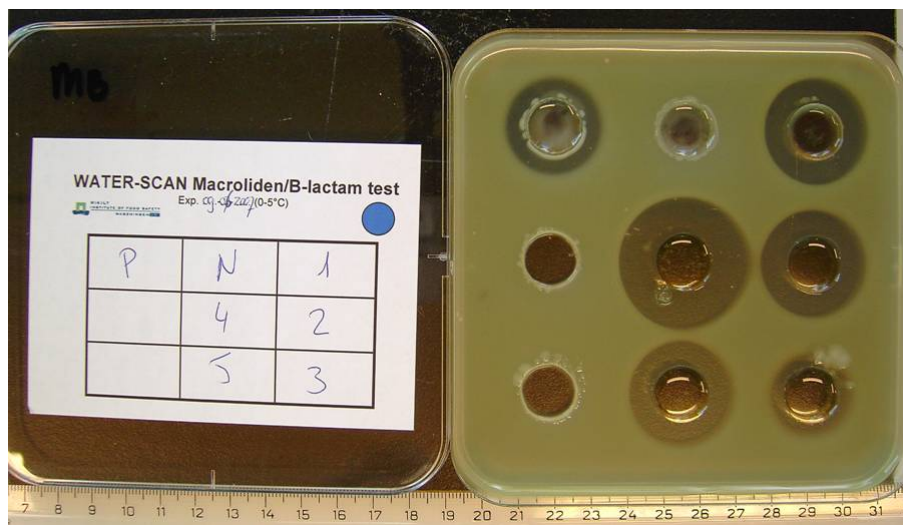
Principe van de antibiotica screeningstest voor oppervlaktewater en afvalwater
(zie ook Stroomberg et al, 2006)

Antibiotica hebben als primaire functie bacteriële infecties tegen te gaan door de betreffende bacterie te doden dan wel de groei ervan te remmen. Dit gegeven is gebruikt om een test te ontwikkelen voor het aantonen van antibiotica op basis van hun dodende/groeiremmende werking.

Bacteriën worden uitgeplaat in een petrischaal op een groeimedium (agar) en vervolgens in contact gebracht met een extract van het te meten monster. Het extract wordt in een uitsparing in de agar gebracht, de aanwezige antibiotica diffunderen in de agar en remmen daar de groei. De groeiremming wordt na 24 uur incuberen visueel/fotografisch vastgesteld. Op plaatsen waar geen groei plaats heeft gevonden blijft de agar helder, de rest van de agar wordt troebel.

Rijkswaterstaat Waterdienst
Postadres Postbus 17, 8200 AA Lelystad
Bezoekadres Zuiderwagenplein 2, 8224 AD Lelystad

Telefoon 0320 29 84 11
Fax 0320 24 92 18
E-mail info.waterdienst@rws.nl
Internet www.rijkswaterstaat.nl



Figuur 1: Voorbeeld van een antibioticascreening (Macroliden/B-Lactam) met 5 monsters (1-5), een positieve (P) en een negatieve (N) controle. Twee uitsparingen (linksonder en linksmiddelen) zijn niet gebruikt.

Er wordt gewerkt met meerdere bacteriestammen die gevoelig zijn voor specifieke antibiotica klassen (Tetracyclines, Quinolonen, Sulfanomiden, Macroliden/B-Lactam en Aminoglycosiden). Daardoor is het mogelijk om naast het detecteren van de aanwezigheid van het antibioticum ook een uitspraak te doen over de betreffende klasse van antibiotica. De methode is semi-kwantitatief. De grootte van de ophelderingzone is slechts indicatief voor de hoeveelheid antibioticum, voor kwantificering is deze methode ongeschikt.

Werkwijze

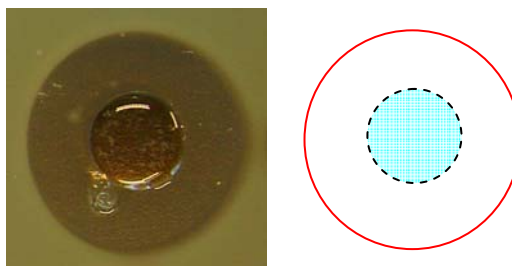
Per locatie is 3 x 1 liter water aangeleverd in groene flessen. Deze zijn middels vaste fase extractie (SPE) over Supelco ENVI-Chrom P geconcentreerd in 3 ml methanol [Concentratiefactor: 1000x]. Het methanol extract wordt verdund met medium alvorens het op de plaat wordt gebracht. Per uitsparing wordt 125 ul extract opgebracht wat overeenkomt met 125 ml oppervlaktewater. [NB: op de Sulfonamidenplaat wordt 175 ul extract opgebracht]. (zie ook RWS werkvoorschrift)

Het meetresultaat wordt op twee manieren worden weergegeven; schematisch en semi-kwantitatief. In het eerste geval wordt de remmingszone weergegeven zoals in figuur 2. De centrale cirkel geeft de uitsparing in de agar weer en maakt het mogelijk om remmingszones van verschillende platen in één overzicht met elkaar te vergelijken.

Bij de semi-kwantitatieve methode wordt het oppervlak van de remmingzone berekend en in een grafiek weergegeven. Hierdoor wordt het mogelijk om de totale antibiotica druk op een locatie te evalueren. Een nadeel van deze methode is dat de groei van de remmingzone niet evenredig is met de hoeveelheid antibiotica. Alleen bij lage concentraties/kleine zones bestaat er een



correlatie. Bij hoge concentraties wordt de remmingzone begrensd door de diffusiesnelheid van het antibioticum.



Figuur 2: Voorbeeld positief resultaat en de bijbehorende schematische weergave.

In bijlage 1 is een overzicht gegeven van de individuele antibiotica die met een bepaalde plaat kan worden waargenomen en de indicatieve aantoonbaarheidsgrenzen.

Bemonstering

Tussen mei en juli 2007 zijn 16 locaties in de Maas en zijrivieren bemonsterd door verschillende waterbeheerders. Deze oppervlaktewatermonsters zijn op het laboratorium van RWS in Lelystad gescreend op de aanwezigheid van antibioticum.

Resultaten

In figuur 3 is een schematisch overzicht gegeven van de waargenomen remmingzones in ieder monster in relatie tot de verschillende antibioticaklassen. Uitgaande van het aantal positieve waarnemingen worden Macroliden/B-Lactam het vaakst aangetroffen (op 13 van de 16 locaties), gevolgd door Tetracyclinen (8 van 16), Aminoglycosiden (7 van 16), Sulfonamiden (2 van 16). Quinolonen werden op géén dan de geteste locaties aangetroffen (0 van 16). Het feit dat op de Quinolonen plaat geen remming wordt aangetroffen sluit een aanwezigheid van een algemeen werkend bactericide (bijv. Triclosan) uit. Het veelvuldig voorkomen van Macroliden/B-Lactam is in lijn met eerdere waarnemingen in de grote rivieren en met name in de Maas bij Eijsden. Dit kan mede worden ingegeven door het feit dat deze antibioticaklasse relatief veel individuele stoffen ($n = 24$) omvat. In het geval van de Maas bij Eijsden uit eerder onderzoek bleek het vaak om Tylosine en Lincomycine te gaan. Hoewel Tetracyclinen relatief vaak worden aangetroffen zijn de gemeten remmingzones over het algemeen maar net waarneembaar. De Sulfonamiden blijken slechts op twee locaties (D en E) sterk vertegenwoordigd. Het is aannemelijk dat het voorkomen van deze stoffen sterk gerelateerd is aan specifieke toepassingen op deze locaties.

De locaties D en E scoren ook het hoogst als het gaat om het aantal aangetroffen antibioticaklassen (4 uit 5). Drie locaties (A, B en I) tonen de aanwezigheid van 3 antibioticaklassen, drie locaties (C, F en G) 2



antibioticaklassen, zeven locaties (H en K t/m P) 1 antibioticaklasse en op één locatie (J) werden geen antibiotica aangetoond.

In figuur 4a zijn de respectievelijke zoneoppervlakten (in cm^2) cumulatief weergegeven per locatie. Zonder een directe kwantificering te doen kan er al een uitspraak worden gedaan de cumulatieve druk die door de aanwezige antibiotica wordt uitgeoefend. De locaties kunnen min of meer in 4 categorieën worden ingedeeld op basis van hun cumulatieve zone-oppervlakten:

- $> 10 \text{ cm}^2$: D, E, F en I
- $> 5 \text{ cm}^2$ en $< 10 \text{ cm}^2$: A en B
- $> 2,5 \text{ cm}^2$ en $< 5 \text{ cm}^2$: C, G, K, L, N en O
- $< 2,5 \text{ cm}^2$: H, J, M en P.

In figuur 4b is weergegeven in welke mate de individuele antibioticaklassen bijdragen aan de waargenomen druk. Zoals eerder waargenomen; Macroliden/B-Lactam leveren de grootste bijdrage aan de waargenomen remmingzones gevolgd door Aminoglycosiden. Quinolonen spelen duidelijk geen rol op de bemonsterde locaties.

Kwantificering van het resultaat is niet direct mogelijk om diverse redenen. De remmingzone neemt, boven een bepaalde concentratie, niet meer rechtevenredig toe met de toename van de concentratie. Hogere concentraties boven de kritische grens leiden dan niet meer tot grotere remmingzones. Daarnaast zijn loopt de gevoeligheid van de plaat voor bepaalde antibiotica erg uiteen. Het meest in het oog springende voorbeeld is de Aminoglycosiden plaat waar de aantoonbaarheidsgrens voor Gentamicine op 3,75 ng absoluut ligt en die voor Spectomicine op 2500 ng. Om toch enig gevoel te krijgen voor de waargenomen concentraties is ervoor gekozen om een concentratie schatting uit te voeren op basis van de mediaan van de aantoonbaarheidsgrens (absoluut) van ieder plaat, zie tabel 1. Deze hoeveelheid is omgerekend naar de concentratie in het monster.

Tabel 1: Mediaan aantoonbaarheidsgrenzen in oppervlaktewater per antibioticaklasse.

<u>Klasse</u>	<u>Med. A.G.</u>
Tetracyclines	70 ng/l
Quinolonen	100 ng/l
Sulfonamiden	140 ng/l
Macroliden	100 ng/l
Aminoglycosiden	50 ng/l

Aangenomen wordt dat de kleinst waarneembare remmingszone overeenkomt met deze aantoonbaarheidsgrens. In dit geval is dat de zone rond extract "M" op de Tetracycline plaat met $0,28 \text{ cm}^2$. Door het remmingzone-oppervlak te delen door $0,28 \text{ cm}^2$ en vervolgens te vermenigvuldigen met de concentratie van de mediaan aantoonbaarheidsgrens kan een geschatte concentratie worden berekend. Het resultaat is weergegeven in tabel 2.



Tabel 2: Overzicht van geschatte antibiotica concentraties in de monsters uit het Maasstroomgebied in ug/l.

Monster	Tetracyclinen	Quinolonen	Sulfonamiden	Macroliden/B-Lactam	Aminoglycosiden
A	0.10	<AG	<AG	1.50	0.24
B	0.10	<AG	<AG	1.72	0.35
C	<AG	<AG	<AG	0.63	0.17
D	0.30	<AG	1.82	2.68	0.73
E	0.09	<AG	2.14	1.42	0.28
F	<AG	<AG	<AG	2.54	0.72
G	0.15	<AG	<AG	1.19	<AG
H	0.12	<AG	<AG	<AG	<AG
I	0.23	<AG	<AG	2.47	0.57
J	<AG	<AG	<AG	<AG	<AG
K	<AG	<AG	<AG	0.98	<AG
L	<AG	<AG	<AG	1.20	<AG
M	0.07	<AG	<AG	<AG	<AG
N	<AG	<AG	<AG	1.03	<AG
O	<AG	<AG	<AG	1.60	<AG
P	<AG	<AG	<AG	0.43	<AG

Wel moet duidelijk worden gesteld dat het aldus verkregen resultaat slechts indicatieve waarde heeft. De werkelijke concentratie hangt in sterke mate af van het betreffende antibioticum en wordt onderschat zodra kritische concentratie wordt overschreden.

Conclusies/aanbeveling:

De monsters D, E, F en I bevatten de meeste antibiotica. Voor deze monsters kan een nader onderzoek (LC-MS/MS) naar de concentratie en de identificatie van het individuele antibioticum aanbevolen worden. Een eerste stap hiervoor kan worden gezet door extracten met hoge concentraties antibiotica uit te fractioneren en de individuele (90) fracties te testen. De specifieke retentietijd in het chromatografische systeem kan leiden tot een identificatie van het betreffende antibioticum of in ieder geval het aantal mogelijke kandidaten sterk reduceren. Voor het monster J is geen nader onderzoek nodig, en H, M en P ook niet direct.

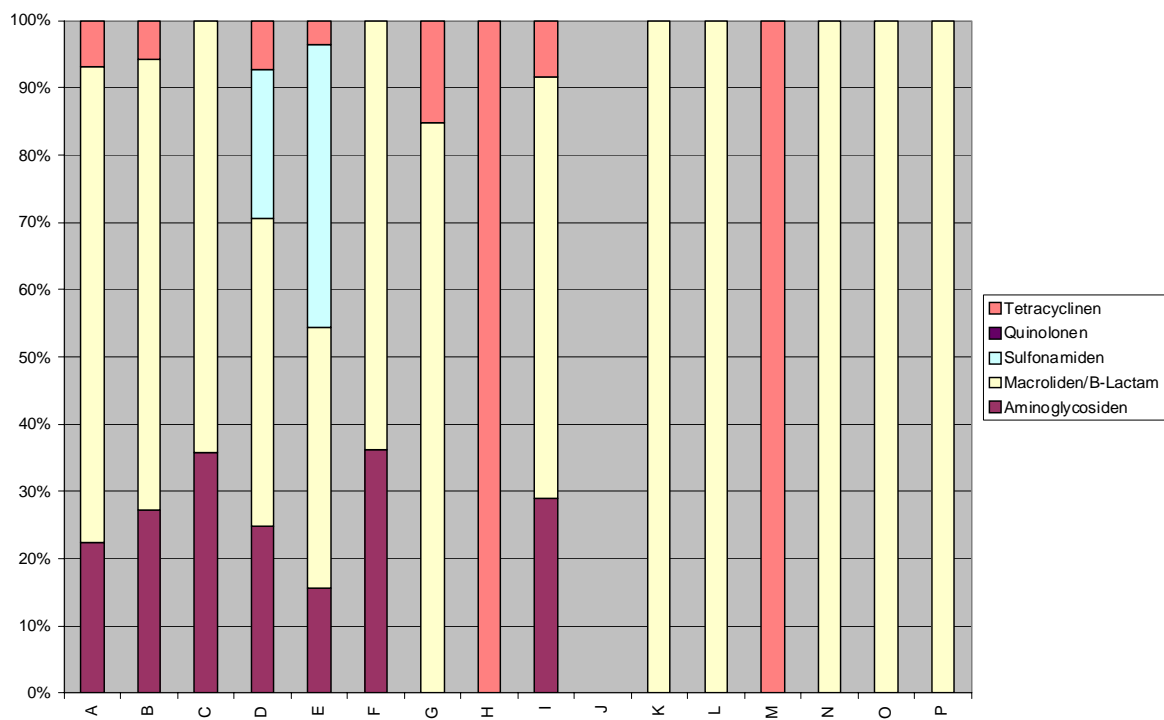
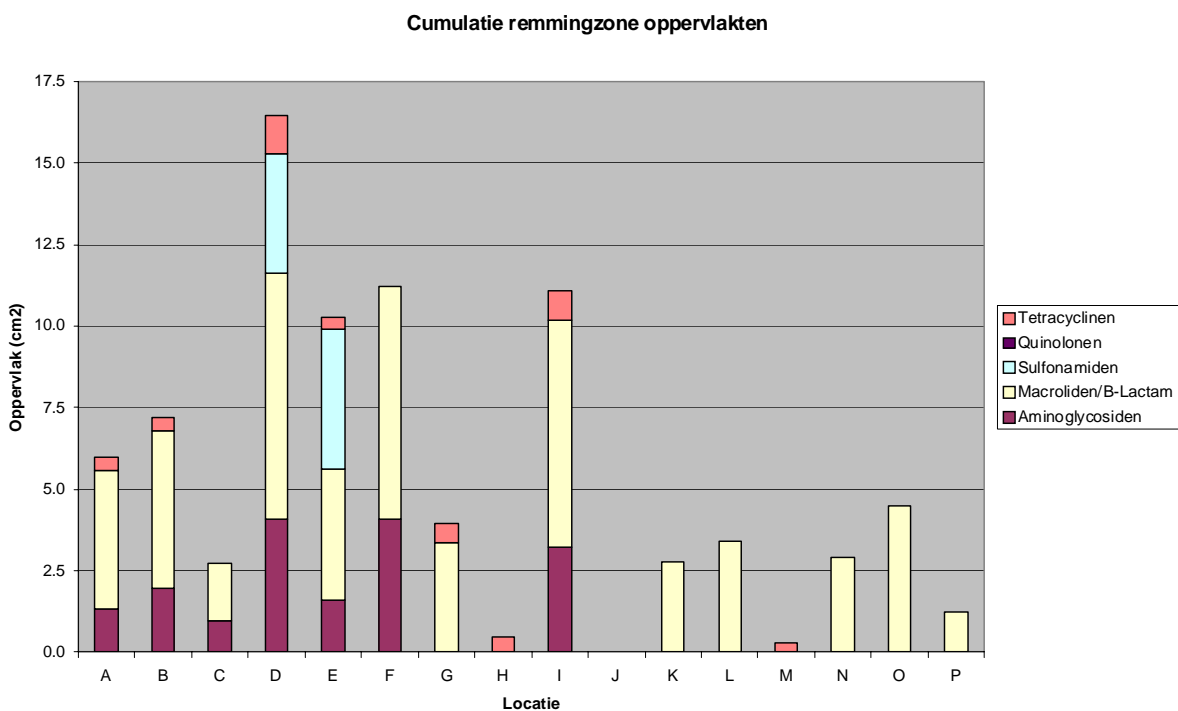


Figuur 3: Schematisch overzicht van remmingzones gerelateerd aan antibioticaklasse voor locaties in het Maasstroomgebied.

	Tetracyclinen	Quinolonen	Sulfonamiden	Macroliden/ β Lactam	Amino- glucosiden
A					
B					
C					
D					
E					
F					
G					
H					
I					
J					
K					
L					
M					
N					
O					
P					



Figuur 4: a) Cumulatie van remmingzone oppervlakten (cm²) als maat voor totale antibiotica druk, b) Relatieve bijdrage (%) van iedere antibioticaklasse aan de totale druk.





Referenties

RWS werkvoorschrift 'Antibiotica Screening in Oppervlakte- en afvalwater' nr 8140-5-420, 29 mei 2007.

Stroomberg Gerard, Serge Rotteveel, Arno Bouter, Jordan Tiesnitsch en Joan Staeb, Antibiotica in oppervlakte-en afvalwater. RIZA werkdocument 2006.084X, 18 april 2006.



Bijlage 1: Overzicht antibiotica en indicatieve aantoonbaarheidsgrenzen in de Antibiotica plaattest

Plaat	Stofgroep/Plaat	Stof	Indicatieve aantoonbaarheidsgrens	
			In water (µg/l)	Absoluut (ng) ^a
Tetracyclines	Tetracyclines	Oxytetracycline	50	12,5
Tetracyclines	Tetracyclines	Doxycycline	20	5
Tetracyclines	Tetracyclines	Chloortetracycline	10	2,5
Tetracyclines	Tetracyclines	Tetracycline	50	12,5
Quinolonen	Quinolonen	Ciprofloxacin	20	5
Quinolonen	Quinolonen	Flumequine	100	25
Quinolonen	Quinolonen	Enrofloxacin	20	5
Quinolonen	Quinolonen	Danofloxacin	50	12,5
Quinolonen	Quinolonen	Marbofloxacin	20	5
Quinolonen	Quinolonen	Oxolinezuur	50	12,5
Quinolonen	Quinolonen	Sarafloxacin	50	12,5
Quinolonen	Quinolonen	Difloxacin	100	25
Macroliden	Cephalosporines	Cefquinome	200	50
Macroliden	Cephalosporines	Cefapirin	200	50
Macroliden	Cephalosporines	Cefalexine	1500	375
Macroliden	Cephalosporines	Ceftiofur	200	50
Macroliden	Cephalosporines	Cefacetril	25	6,25
Macroliden	Cephalosporines	Cefalonium	-	-
Macroliden	Cephalosporines	Cefazolin	-	-
Macroliden	Cephalosporines	Cefoperazone	-	-
Macroliden	Penicillines	Amoxicilline	50	12,5
Macroliden	Penicillines	Cloxacilline	1000	250
Macroliden	Penicillines	Dicloxacilline	1000	250
Macroliden	Penicillines	Oxacilline	200	50
Macroliden	Penicillines	Ampicilline	25	6,25
Macroliden	Penicillines	Penicilline	25	6,25
Macroliden	Penicillines	Nafcilline	50	12,5
Macroliden	Penicillines	Penethamaat	25	6,25
Macroliden	Macroliden	Tylosine	100	25
Macroliden	Macroliden	Lincomycine	50	12,5
Macroliden	Macroliden	Tilmicosin	10	2,5
Macroliden	Macroliden	Erythromycine	5	1,25
Macroliden	Macroliden	Spiramycine	50	12,5
Macroliden	Macroliden	Pirlimycine	25	6,25
Macroliden	Macroliden	Oleandomycine	50	12,5
Macroliden	Macroliden	Valnemuline	100	25
Aminoglycosiden	Aminoglycosiden	Spectinomycine	10000	2500
Aminoglycosiden	Aminoglycosiden	Neomycine	25	6,25
Aminoglycosiden	Aminoglycosiden	Kanamycine	50	12,5
Aminoglycosiden	Aminoglycosiden	Gentamicin	15	3,75



Aminoglycosiden	Aminoglycosiden	Aminosidine	25	6,25
Aminoglycosiden	Aminoglycosiden	Dihydrostreptomycine	25	6,25
Aminoglycosiden	Aminoglycosiden	Apramycine	100	25
Sulfonamiden	Sulfonamiden	Sulfadoxine	100	35
Sulfonamiden	Sulfonamiden	Sulfadiazine	100	35
Sulfonamiden	Sulfonamiden	Sulfamethoxazole	50	17,5
Sulfonamiden	Sulfonamiden	Sulfadimethoxine	50	17,5
Sulfonamiden	Sulfonamiden	Sulfamethazine	100	35
Sulfonamiden	Dapsone	Dapsone	1	0,35
Sulfonamiden	Di-amino-pirimidinen	Baquiloprim	25	8,75
Sulfonamiden	Di-amino-pirimidinen	Trimethoprim	10	3,5

^a 250 µl van een oplossing op het niveau van de aantoonbaarheidsgrens komt overeen met deze absolute hoeveelheid antibioticum. N.B.: op de Sulfonamiden-plaat wordt 350 µl opgebracht, de absolute aantoonbaarheidsgrens is daarom hoger.