

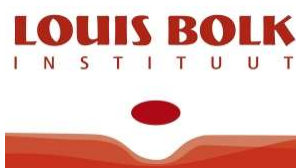
Alternatieve maatregelen tegen Leverbot

Onderzoeksrapport



Figuur 1: Koeien Beelden van het leverbot onderzoek

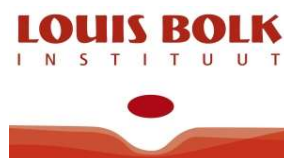
Opdrachtgever: PPP Agro Advies
Naam: Erwin Haveman
Opleiding: Dier- en Veehouderij
Datum: 18 december 2015
Plaats: Zegveld
Onderwijseenheid: Stage jaar 3
Versie: 1



Bestrijdingsmethode tegen leverbot

Onderzoeksverantwoording

Opdrachtgever: PPP Agro Advies
Naam: Erwin Haveman
Opleiding: Dier- en Veehouderij
Onderwijseenheid: Stage jaar 3
Plaats: Zegveld
Datum: 18 december 2015
Adres: Oude Meije 18
3474 KM Zegveld
Begeleider: S. Groot, Hogeschool InHolland Delft
Versie: 1



Samenvatting

De aanleiding voor het onderzoek naar de leverbot is de toenemende infecties van leverbot onder andere bij runderen, schapen en paarden in Nederland. Daarnaast is er vanuit de praktijk een grote vraag naar nieuwe bestrijdingsmethoden tegen de leverbot(slak) omdat er op het moment weinig alternatieven zijn om de leverbot te bestrijden.

Via literatuuronderzoek is gezocht naar informatie over de leverbot en de leverbotslak. Leverbotinfecties worden over het hele land verspreid gevonden bij landbouwhuisdieren. De cyclus van de leverbot is complex en kent twee gastheren waaronder de landbouwhuisdieren en de leverbotslak. In Nederland is de meest voorkomende tussengastheer de *Galba Truncatula*, die zorgt voor een piek in het aantal eieren op het land in de periode juni-juli en november-december. De *Galba Truncatula* komt voornamelijk voor op grond die het hele jaar lang vochtig is en waarbij in het land poeltjes, met stilstaand schoon water voorkomen, voor de groei van de algen die de slakken eten.

De schade van een leverbot infectie wordt geschat tussen de €5000 en €10.000 euro op een gemiddeld melkveebedrijf van 60 koeien. Bij een infectie wordt onderscheidt gemaakt tussen klinische, subklinische en chronische infecties. De schade is verder een lagere melkgift met wisselende samenstelling en verminderde groei.

In de praktijk zijn een aantal methoden om de leverbot te bestrijden. Een aantal middelen zijn toegestaan bij melkvee voor de tweede helft van de dracht, daarna mag er geen middel gebruikt worden tenzij de cascadereregeling wordt toegepast. Verder zijn er nog methoden zoals: beperkt weiden of opstallen in het najaar, verbeteren van de afwatering, greppels frezen en als laatste het gebruik van loopeenden.

Tijdens dit onderzoek is geprobeerde de slakken met stoom, hete lucht of straling de leverbotslakken te doden. Stoom heeft een lage indringingswaarde maar geen blijvende schade op het bodemleven. De hete lucht heeft geen schade voor het bodemleven. Straling zorgt voor veel schade voor alles wat leeft in het land omdat de celwanden barsten van plantaardige en dierlijke cellen.

De proeven die zijn gedaan zijn een bestrijding met stoom, hete lucht en straling. De resultaten van deze proeven waren allemaal niet normaal verdeeld. Er is geen verschil tussen het aantal levende slakken na stomen op 25 graden Celsius en 55 graden Celsius gedurende 1 minuut.

De behandeling van slakken met hete lucht voor 1 minuut, met temperaturen van 25 graden Celsius en 55 graden Celsius is niet effectief genoeg. Praktische gezien alle slakken blijven leven.

Slakken bestralen in de magnetron heeft wel effect, langer dan een halve minuut bestralen in een magnetron heeft het effect dat 100% van de slakken sterft.

Als vierde proef is onderzocht hoe diep een leverbotslak in de bagger kruipt bij verschillende temperaturen. Het resultaat was dat de slakken bij temperaturen van 5°C, 10°C, 15°C en 20°C zich allemaal bevonden bovenop de bagger of in de eerste centimeter bagger zitten. Temperatuur heeft geen invloed op de diepte van de slak in dit onderzoek.

Als laatste is onderzocht wat de infectiegraad was van het weiland van het KTC. Er is geen infectieuze slak gevonden in de maanden september, oktober en november.

Tijdens dit pioniersonderzoek zijn veel discussiepunten naar voren gekomen, er is veel onduidelijkheid over de leverbotslak en of de informatie die nu in de praktijk circuleert wel klopt. De schade van een infectie is niet duidelijk in kaart gebracht net als onder welke omstandigheden de leverbotslak voorkomt. Ook is het effect van de huidige maatregelen tegen leverbotinfecties zoals karteren, greppels frezen en tijdig opstallen waarschijnlijk niet groot genoeg om het aantal infecties te verminderen.

Kennis die is opgedaan over de leverbot en de leverbotslak is wellicht niet voldoende. Tijdens het onderzoek is gebleken dat er nog veel onbekend is over de complexiteit van de cyclus van de leverbot en hoe we deze kunnen vinden en bestrijden.

De belangrijkste conclusies die uit dit onderzoek getrokken kunnen worden zijn als volgt. Het bestrijden van de leverbotslakken met stoom en hete lucht is niet efficiënt genoeg. Het doden van de slakken met straling zou mogelijk kunnen mits er meer onderzoek wordt gedaan naar de ontwikkeling van een dergelijk apparaat in de praktijk.

De huidige maatregelen dragen waarschijnlijk te weinig bij aan het reduceren van het aantal infecties van de leverbot bij landbouwhuisdieren. Tevens zijn er te weinig alternatieven bekend en ontwikkeld waar onder andere melkveehouders op kunnen aangrijpen.

Na uitvoering van de proeven en het opstellen van de conclusies is het belang groot van meer onderzoek naar de leverbot(slak). Zo is weinig bekend over het de cyclus van de leverbotslak. Er is meer onderzoek nodig om de ontbrekende kennis boven water te krijgen om zo alternatieve bestrijdingsmethoden op te kunnen stellen.

Daarnaast is het nodig om te bekijken of het verlagen van de grondwaterstand effect heeft op de mate van infectie van een weiland. De grondwaterstand is de laatste jaren gedaald en niet gestegen en toch komen er meer infecties voor (b)lijkt.

Tevens is de kennis die melkveehouders hebben omtrent leverbot relatief laag. De huidige methoden zoals greppels frezen heeft misschien te weinig zichtbare effecten omdat de meeste veehouders niet weten dat deze maatregel kan werken. Er moet meer informatie worden verspreid naar melkveehouders toe.

Inhoud

Samenvatting.....	3
1. Inleiding.....	7
2. Literatuur.....	8
2.1 De leverbot en de leverbotslak	8
2.1.1 Levenscyclus van de leverbot.....	8
2.1.2 Spreiding van de leverbot in Nederland.....	9
2.1.3 De leverbotslak(ken).....	10
2.1.4 Ontwikkeling van de leverbotslak(en).....	11
2.1.5 Leefomgeving van de leverbotslak.....	12
2.2 De mogelijke schade van een leverbotinfectie	13
2.3 Huidige methoden die leverbot bestrijden	15
2.3.1 Symptomen leverbotinfectie.....	15
2.3.2 Maatregelen leverbotinfectie.....	15
2.4 Werking van stoom	17
2.4.1 Stomen van gronden	17
2.4.2 Risicofactoren van stomen	17
2.4.3 Effect op het bodemleven	17
2.5 Werking van de magnetron.....	18
2.5.1 Principe van een magnetron	18
2.5.2 Kooi van Faraday	18
3. Materiaal en Methoden	19
3.1 Vooronderzoek.....	19
3.2 Nieuwe methode.....	19
3.3 Materialen	19
3.4 Stoommeting.....	20
3.5 Temperatuurmeting	21
3.6 Stralingsmeting.....	22
3.7 Dieptemeting.....	22
3.8 Zuurbehandeling	23
3.9 Cyclusbepaling.....	24
3.10 Metingen	24
3.11 Infectiegraad.....	24
3.12 Verwerken van gegevens	25

3.13	Betrouwbaarheid.....	26
4.	Resultaten.....	27
4.1	Resultaten stoomproef.....	27
4.2	Resultaten temperatuurproef.....	28
4.3	Resultaten stralingsproef.....	29
4.4	Resultaten dieptemeting.....	30
4.5	Resultaten infectiegraad.....	33
4.6	Resultaten cyclus leverbotslak.....	34
5.	Discussie.....	35
6.	Conclusie.....	38
7.	Aanbevelingen.....	39
	Bibliografie.....	40
	Bijlage 1: Mogelijke leverbotslakken	
	Bijlage 2: Schema stoommeting	
	Bijlage 3: Schema temperatuurmeting	
	Bijlage 4: Schema stralingsmeting	
	Bijlage 5: Dieptemeting	
	Bijlage 6: Schema infectiegraad slakken	
	Bijlage 7: Resultaten stoommeting	
	Bijlage 8: Resultaten temperatuurmeting	
	Bijlage 9: Resultaten stralingsmeting	
	Bijlage 10: Resultaat dieptemeting	
	Bijlage 11: Resultaat infectiegraad slakken	
	Bijlage 12: Foto's onderzoek leverbot	

1. Inleiding

Het derde jaar, van de opleiding Dier- en Veehouderij bij Hogeschool InHolland te Delft, begint met twee blokken stage. Gedurende deze twee blokken wordt een onderzoek uitgevoerd voor een externe opdrachtgever. Dit onderzoek wordt uitgevoerd voor het adviesbureau PPP Agro Advies in Zegveld. De rol van PPP Agro Advies is om melkveehouders in Nederland een passend advies te geven voor de problemen die in de praktijk naar voren komen. Daarnaast is het belangrijk om als adviesbureau kennis te vergaren door het doen van onderzoek.

De aanleiding voor dit onderzoek is een efficiëntere bestrijdingsmethode tegen de leverbot en het verminderen van het aantal infecties in Nederland. In toenemende mate worden runderen, schapen, paarden en geiten geïnfecteerd met leverbot terwijl er steeds minder effectieve behandelmethoden zijn in Nederland. In Nederland zijn minder middelen beschikbaar, de levenscyclus is moeilijk te doorbreken en er zijn nog veel vraagtekens over leverbot en leverbotslakken. Daarnaast is niet duidelijk wat de exacte schade van de leverbot in Nederland is, wel is duidelijk dat steeds meer bedrijven worden getroffen. Zo is niet duidelijk becijferd wat een besmetting een melkveehouder kost per dier per jaar. Ten tweede is veel informatie over de leverbotslak nog niet bekend zoals hoe diep de leverbotslak de grond in kruipt en waar de leverbotslakken veel te vinden zijn en onder welke omstandigheden (Neijenhuis, Verkaik, Verwer, Smolders, & Wagenaar, 2014) (Gezondheidsdienst voor Dieren, 2015).

De hoofdvraag voor dit onderzoek luidt als volgt: *Hoe kan de schade door leverbot bij melkvee in Nederland worden verminderd?*

De deelvragen van dit onderzoek zijn als volgt geformuleerd:

- 1) *Hoe verloopt de levenscyclus van de leverbot en de Leverbotslak?*
- 2) *Wat is de mogelijke schade van leverbot bij melkvee en bij welke dieren komt de infectie het vaakst voor?*
- 3) *Welke methoden kunnen worden gebruikt bij de bestrijding van de leverbotslak?*
- 4) *Wat houdt de nieuwe bestrijdingsmethode in?*

In hoofdstuk 2 is een korte beschrijving gegeven van de cyclus van de leverbot. In dit hoofdstuk wordt dieper ingegaan op de soorten leverbotslakken, de rol die de slak in de cyclus speelt en onder welke omstandigheden de slak leeft.

Ten tweede staan in hoofdstuk 2 de gegevens en literatuur die bekend is met betrekking tot de schade die een leverbotinfectie met zich mee brengt. Er is onderscheid gemaakt tussen de soort besmetting en de kosten die voortkomen uit infecties.

Als laatste zijn in dat hoofdstuk de verschillende methoden die nog gebruikt mogen/kunnen worden om leverbot te bestrijden of behandelen. Hierbij is een deling gemaakt tussen de medicijnen die legaal zijn en bedrijfsspecifieke behandelmethoden.

De materialen en methoden die zijn gebruikt voor het experimenteel onderzoek zijn opgenomen in hoofdstuk 3 genaamd Materiaal en Methoden.

Daaropvolgend worden de resultaten van het experimenteel onderzoek weergegeven in hoofdstuk 4. Er zijn een aantal proeven gedaan; de stoomproef met de leverbotslakken, de hete lucht proef met de slakken, de stralingsproef met de slakken, de dieptemeting met de leverbotslakken en de bepaling van de infectiegraad van de weilanden.

Bij de uitvoering van het onderzoek zijn discussiepunten naar voren gekomen die staan vermeld in hoofdstuk 5. Daarna volgt de conclusie in hoofdstuk 6 en de aanbevelingen zijn in hoofdstuk 7 opgenomen. Ten slotte is de literatuurlijst opgenomen na hoofdstuk 8.

2. Literatuur

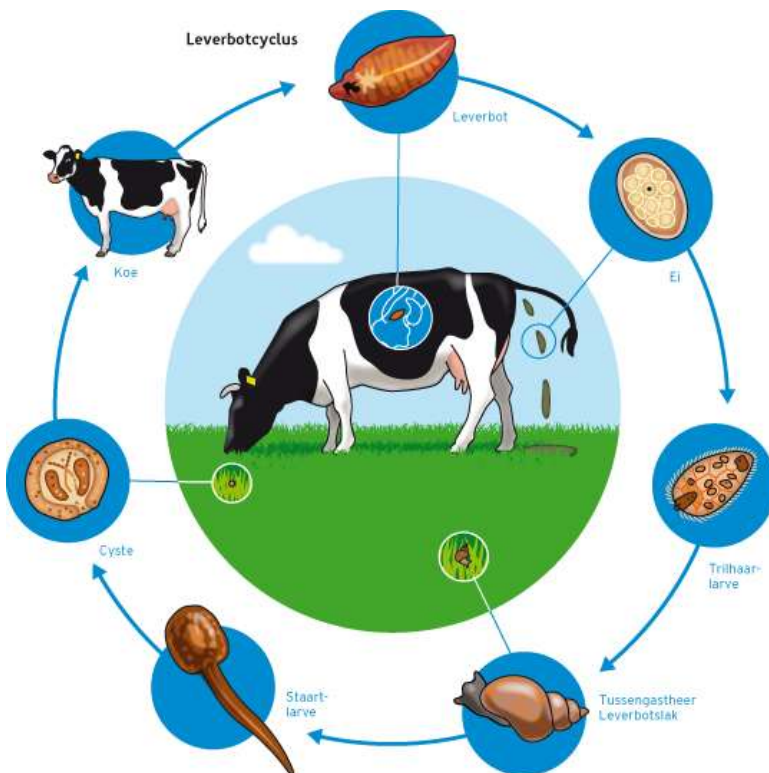
Hoofdstuk 2 staat in het teken van de literatuur die al bekend is, en nodig is, voor dit onderzoek met betrekking tot onder andere de leverbot en leverbotslak. De informatie die in dit hoofdstuk is opgenomen is de basis voor het uitvoeren van het experimenteel onderzoek. In dit hoofdstuk komt onder andere aan bod hoe de cyclus van de leverbot en leverbotslak verloopt. Verder staat beschreven wat de schade is bij melkvee wat geïnfecteerd is en wat de gevolgen zijn. Tenslotte is aangegeven wat de werking is van stoom en wat het effect is op de biodiversiteit.

2.1 De leverbot en de leverbotslak

In dit hoofdstuk wordt een korte beschrijving gegeven van de cyclus van de leverbot. De reden hiervoor is dat er al tal van documenten beschikbaar zijn over de leverbot. Wel worden onderwerpen meegenomen als weersinvloeden en geografische spreiding. Naast de cyclus van de leverbot wordt wel uitgebreid stilgestaan bij de cyclus van de leverbotslak. Hierover is in Nederland nog relatief weinig bekend maar in het buitenland veel meer.

2.1.1 Levenscyclus van de leverbot

De leverbot kent een complexe levenscyclus. Toch komt de leverbot steeds vaker voor in Nederland. Deze parasiet leeft in runderen, schapen, geiten, hazen en reeën en in sommige gevallen in mensen. Leverbot, Latijnse naam ook wel *Fasciola Hepatica*, leeft in de galgangen van de lever van de eindgastheer. Deze parasiet heeft twee gastheren nodig om de levenscyclus te kunnen voltooien. Gemiddeld is de leverbot 2 tot 4 centimeter groot. De cyclus van leverbot begint in dit hoofdstuk bij de opname. In figuur 2 is de cyclus weergegeven (Bossaert, 2009) (Dierenhospitaal Visdonk, z.j.) (Het schaap, 2013) (Neijenhuis, Verkaik, Verwer, Smolders, & Wagenaar, 2014).



Figuur 2: schematische weergaven van de cyclus van de leverbot voor een herkauwer (Asselt, 2015)

De opname van de leverbot begint in de weideperiode, voornamelijk in het najaar. Aan de grashalmen zitten de cysten vastgeplakt en ingekapseld. Tijdens het vreten nemen de herkauwers het gras met de cysten op. Deze cysten worden met het gras getransporteerd naar de pens waar deze het kapsel verliest. De leverbotlarve gaat dan verder door het lichaam tot deze de darmwand bereikt. Deze larven vreten zich een weg door de darmwand en de weefsels heen om zo bij de lever te komen. Er zijn twee wegen voor de botten. De eerste weg is door de darmwand en de poortader naar de lever. Ten tweede kan de larve zich letterlijk een weg vreten door de buikholte en door het leverkapsel. Dit duurt gemiddeld 3-4 dagen.

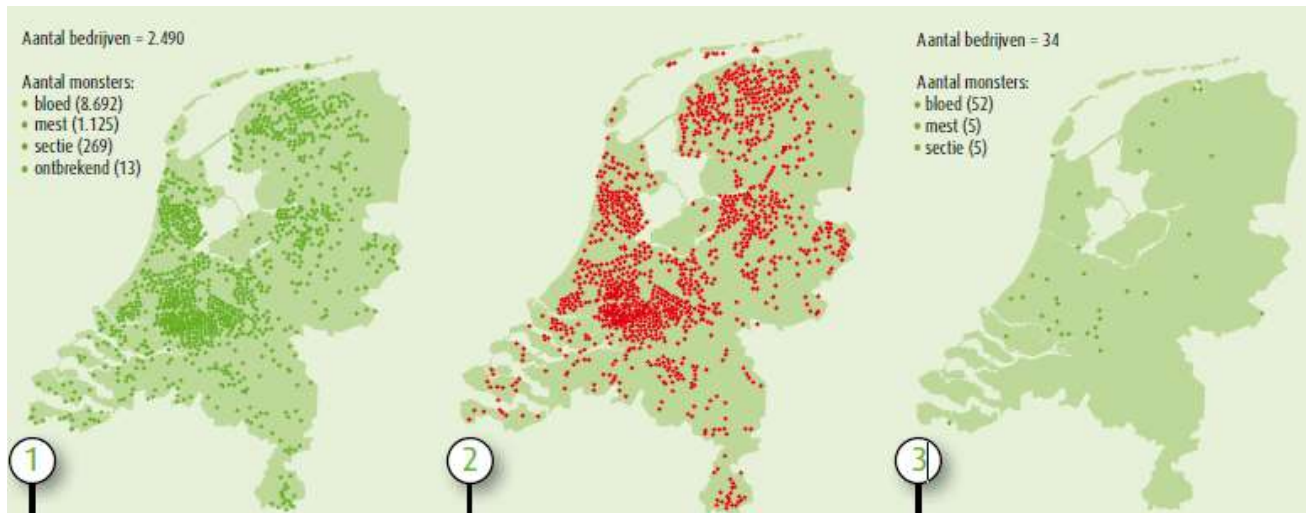
In de lever verblijven de larven enkele weken. Na 6 weken hebben de botten de galgangen bereikt. Na 6 weken in de galgangen te hebben verbleven zijn de jonge botten volwassen geworden. In deze galgangen gaan de volwassen botten eitjes produceren, gemiddeld 4000-7000 eitjes per dag. Er zijn indicaties dat deze botten tot wel 10 jaar lang eitjes kunnen produceren, in ieder geval bij schapen. Het is in de huidige veehouderijsectoren niet onderzocht of dat klopt aangezien een herkauwer zoals een koe geen 10 jaar lang leeft in de houderijssystemen. Tevens is er ook geen onderzoek geweest data aangeeft hoe lang de leverbotten in een koe leven.

Nadat de eitjes zijn uitgestoten door de volwassen leverbotten komen deze via de galgangen in de mest terecht. Uit deze mest, die direct op weiland is uitgepoept door het vee, komen trilhaarlarven (miracidium). Dit duurt, afhankelijk van het weer tussen de 3 weken en een aantal maanden. In droogte overleven de trilhaarlarven maximaal 3 weken terwijl in natte omstandigheden de larven zelf 6 maanden kunnen overleven. Deze trilhaarlarven gaan op zoek naar de geschikte tussengastheer. In Nederland is dit voornamelijk de zoetwaterslak *Galba truncatula*. Over de slak is meer informatie te vinden in paragraaf 2.1.3. De optimale temperatuur voor de trilhaarlarven om de slak binnen te dringen is tussen de 15 en 26°. De larve dringt de slak binnen waar deze vermenigvuldigen tot staartlarven (cercaria). In twee tot drie maanden is er een zeer groot aantal staartlarven geproduceerd. Eén slak kan tot wel 600 staartlarven produceren per jaar.

Nadat de staartlarven zijn volgroeid kruipen deze uit de slak. Dit wordt ook wel 'shedden' genoemd. De staartlarven kruipen, indien de omstandigheden gunstig zijn, over het weiland en kapselen zich weer in aan grashalmen. Op het moment van inkapselen is de cyclus gesloten en kan een aantal nieuw dieren worden geïnfecteerd (Bossart, 2009) (Dierenhospitaal Visdonk, z.j.) (Het schaap, 2013) (Neijenhuis, Verkaik, Verwer, Smolders, & Wagenaar, 2014).

2.1.2 Spreiding van de leverbot in Nederland

Algemeen werd in Nederland aangenomen dat de leverbot alleen in Noord- en Zuid Holland voorkomt en in Friesland en Groningen. De reden hiervoor was dat de *Galba truncatula*, de tussengastheer van de leverbot in Nederland, vochtige omstandigheden nodig hebben. Deze vochtige omstandigheden zouden veelal in de veenkolonien te vinden zijn. Sinds 2008 volgt de Gezondheidsdienst voor Dieren de verspreiding van de leverbot. De Gezondheidsdienst voor Dieren doet onderzoek voor melkveehouders omdat de veehouder problemen ervaart en wil weten wat de oorsprong is (Dierenhospitaal Visdonk, z.j.) (Rotgers, 2015).



Figuur 3: Geografische spreiding van de leverbot in Nederland op basis van mest en bloedmonster en sectie door de Gezondheidsdienst voor Dieren (Rotgers, 2015).

De leverbotinfectie kan inmiddels worden onderzocht door te kijken naar de tankmelk op antistoffen. Ten tweede kan er onderzoek worden gedaan naar het aantal eitjes in de mest van de dieren en of het eitjes van de leverbot zijn. Dit kan vanaf 8-12 weken na de infectie. In niet alle gevallen benut, ook sectie op kadavers. Als laatste wordt veelal nog een bloedmonster genomen. Met het nemen van een monster kan middels een titer worden aangetoond dat er een miniem aantal antistoffen aanwezig is in het bloed.

In overzichtskaart 1 in figuur 3 is te zien waar in de periode 2008-2014 leverbot infecties zijn aangetoond met de vier bovengenoemde methoden. Overzichtskaart 2 geeft aan welke bedrijven, die volgens de tankmelkuitslagen, besmet zijn met leverbot. De derde overzichtskaart geeft aan hoeveel van de onderzochte bedrijven in het derde kwartaal van 2014 besmet zijn, dit zijn er 34 (Rotgers, 2015).

Er zijn verschillende argumenten waarom de leverbotinfecties niet alleen plaats vinden in de veengebieden en delen van Friesland, Drenthe en Groningen. Eén van de argumenten is dat er meer wordt gedaan aan bodembeheer en de grondwaterstanden worden verhoogd. Zolang er maar vochtige omstandigheden zijn blijft de leverbot (slak) actief. Tevens wordt er meer waterberging gecreëerd in Nederland zoals overstroomgebieden. Het derde argument is dat de gemiddelde temperatuur in Nederland is gestegen waardoor de leverbot langer actief blijft. De leverbot (slak) heeft een temperatuur nodig van minimaal 10 graden Celsius. Is het kouder dan stopt de ontwikkeling en voortplanting maar wordt het weer warmer dan gaat de ontwikkeling verder. Indien de temperatuur boven de 25 graden Celsius komt dan stopt de ontwikkeling definitief. Tevens is de vochtigheid een beperkende factor. Als het warm en vochtig is ontwikkeld de larve en de slak zich sneller. Droogte is zeer slecht voor de ontwikkeling, zeker de combinatie warmte en droogte. Er zijn geen specifieke cijfers met betrekking tot het noemen van droog of nat weer. De reden voor het grijze gebied van de weersomstandigheden is dat er nog geen duidelijkheid is vanuit verschillende onderzoeken. Tevens is er nog weinig onderzoek gedaan naar de exacte weersomstandigheden (Luijmes, 2014) (Rotgers, 2015).

2.1.3 De leverbot (slak)

De cyclus van de leverbot is, zoals eerder genoemd, complex. Eén van de redenen daarvoor is dat de leverbot niet kan overleven zonder de aanwezigheid van de leverbot slak. In Nederland wordt vrijwel alleen de *Galba truncatula* aangedragen als tussengastheer van de leverbot. Deze slak is een zoetwater longslak afkomstig van de familie van de poelsslakken, namelijk Lymnaeidae.

Door verschillende onderzoeken in het buitenland is er bekend dat de *Galba Truncatula* niet de enige tussengastheer is. Onderzoek uit België en Luxemburg tonen aan dat er andere slakken soorten geïnfecteerd kunnen zijn. Naast de *Galba Truncatula* is tevens de *Radix Balthica* gastheer van de leverbotslak. Ook de ondersoort *Radix Labiata* kan worden gezien als een tussengastheer. Deze slak is tevens familie van de *Lymnaeidae* (Caron, Lasri, & Losson, 2007) (Hunuvo, et al., 2012) (Caron, Martens, Lempereur, Saegerman, & Losson, 2014).

Naast de *Radix Balthica* is er een onderzoek in Zweden gedaan naar de verschillende tussengastheren van de leverbot slak. Uit deze onderzoeken blijkt dat er meerdere tussengastheren zijn. Zo wordt de *Lymnaea Palustris*, *Lymnaea Stagnalis* en de *Lymnaea Fuscus* aangedragen als tussengastheer. De drie slakken behoren ook tot de *Lymnaeidae* familie net als de *Galba Truncatula*. Tussen deze slakken bestaat wel een verband van infectie. Als de soorten *L. Palustris*, *L. Stagnalis* en *L. Fuscus* evenveel voorkomen gaat de voorkeur van de leverbotlarven uit naar de *L. Palustris* (Copeman & Copland, z.j.) (Maskey, 2011) (Novobilský, Kasny, Beran, Rondelaud, & Höglund, 2013).

De bovengenoemde soorten kunnen dus wel degelijk gastheer zijn van de leverbotlarven. Toch is er een verklaring waarom de *Galba Truncatula* vaak als meest voorkomende gastheer wordt gezien. Deze soort komt vrijwel over de hele wereld voor waar leverbot leeft. Soorten die in België wel gastheer zijn hoeven in andere landen niet voor te komen. Het hangt af van de plaats en de weersomstandigheden welke soorten er voor komen. Tevens zijn er aanwijzingen dat alle slakken die behoren tot de *Lymnaeidae* familie gastheer zijn (Caron, Lasri, & Losson, 2007) (Copeman & Copland, z.j.) (Hunuvo, et al., 2012) (Maskey, 2011) (Pointier, Nova, Noya, & Theron, 2009) (Sanabria, et al., 2012) (Caron, Martens, Lempereur, Saegerman, & Losson, 2014).

In Nederland is ook veelvuldig onderzoek gedaan naar de verschillende soorten. Wel blijkt dat de *Galba Truncatula* in landen met een gematigd zeeklimaat de meest effectieve gastheer is. De levende larven die voortkomen uit andere soorten dan de *Galba Truncatula* zijn veel lager en minder effectief. Verwacht wordt dat de andere leverbotslakken geen invloed hebben op de mate van infectie in Nederland. De *Galba Truncatula* wordt verondersteld als de meest belangrijke in Nederland (Neijenhuis, Verkaik, Verwer, Smolders, & Wagenaar, 2014) (Moll, 2015).

2.1.4 Ontwikkeling van de leverbotslak(en)

De tussengastheer die het meeste voorkomt in Nederland, de *Galba Truncatula*, heeft een voorkeur voor mild zure gronden. Uit eerder onderzoek is gebleken dat er verschillende planten een indicator plant kan zijn voor het voorkomen van de leverbotslak. De planten Kropaar, Veldrus, Pitrus, Fioringras en Mannagras zijn indicator planten (Rondelaud, Hourdin, Vignoles, Dreyfuss, & Cabartet, 2011).

De bovengenoemde indicator planten van de *Galba Truncatula* hebben allemaal een belangrijke gemeenschappelijke deler. De planten groeien goed op vochtige gronden (Vandenbussche, Jollyn, Zwaenepoel, Vanhecke, & Hoffmann, 2012) (Philipsen, Eekeren, & Swormink, 2012).

Buiten de gemeenschappelijke deler dat de slak voorkomt op indicator planten die groeien op licht zure gronden is er nog een verband. De *Galba Truncatula* heeft een cyclus, die in meerdere landen is onderzocht, en vrijwel gelijk is. Vanaf het begin van de maand juli is er een piek in het aantal volwassen leverbotslakken. De piek loopt na de maand juli af tot eind september. Begin oktober tot eind december kan er opnieuw zo een piek voorkomen indien de weersomstandigheden dat toe laten. De piek in het aantal eieren van de leverbot op het land is vanaf begin juni tot eind juli. In november is er een nieuwe piek van leverbot eieren in het land tot aan eind december (Hourdin, Vignoles, Dreyfuss, & Rondelaud, 2006) (Charlier, et al., 2014) (Caron, Martens, Lempereur, Saegerman, & Losson, 2014) (Kaplan, 2015).

De slakken overleven gemiddeld 12-14 maanden in Nederland. De optimum temperatuur ligt rond de 18-27°C. Lagere temperatuur dan 10°C zorgt voor een stop op de groei van de leverbotslak in Nederland. Na 3-4 weken als de eitjes van slak zijn uitgekomen zijn deze jonge slakken geslachtsrijp. De hele cyclus van de leverbot van uit het eitje komen tot eitjes leggen duurt 5-6 maanden. Deze

periode duurt langer als de temperatuur onder de 10°C komt (Universiteit van Gent, z.j.) (Tromp, 2011) (De Gezondheidsdienst voor Dieren, 2012) (Brugse Ommeland en Meetjesland, 2013). Vanaf de maanden april en mei gaat het vee naar buiten zodat de eieren op het land komen wat de piek verklaart tussen mei en juni. De larven kruipen dan in de leverbotslak die volwassen is tussen juli en september. Deze larven ontwikkelen zich in 80 dagen, ongeveer 11 weken. Na deze weken komen de larven uit en kapselen zich in rond de maanden september tot november. Dit verklaart de hoge infectie druk van leverbot in het najaar. Daarnaast zijn de meeste leverbotslakken tussen de maanden juli tot november besmet (Manga-Gonzales, Gonzala-Lanza, & Othero-Merino, 1991) (Olusegun Adewole, 2010) (De Gezondheidsdienst voor Dieren, 2012) (Brugse Ommeland en Meetjesland, 2013).

2.1.5 Leefomgeving van de leverbotslak

De leverbotslakken zijn allen van de Lymnaeidae familie. Deze familie slakken wordt ook wel de familie van de poelslakken genoemd. Ze zijn voornamelijk te vinden in zoet zuurstofrijk water, zijn hermafrodit en worden gekenmerkt door zelfbevruchting. De slakken, genoemd in paragraaf 2.1.3, zijn over tal van plekken in de wereld te vinden. Wel is de plaats bepalend. De belangrijkste soorten in Europa komen bijvoorbeeld niet in Mexico als belangrijkste gastheer voor (Pointier, Nova, Noya, & Theron, 2009).

Er is verder wel een verband tussen alle slakkensoorten die tussengastheer kunnen zijn. Onderzoek toont aan dat de meeste slakken worden gevonden in greppels en licht moerasachtige grond. Wel is het belangrijk dat het stilstaand water is dat wordt opgewarmd door de zon. Hierdoor groeien de algen in het water goed wat het voedsel van de slak is. Voor de algengroei is zuurstofrijk water nodig waardoor het belangrijk is dat er af en toe water wordt ververs, het liefst met een regenbui (Hourdin, Vignoles, Dreyfuss, & Rondelaud, 2006) (Pointier, Nova, Noya, & Theron, 2009).

Naast vocht en algen is er nog een beperkende factor voor de voortgang van de cyclus van leverbot(slak). De leverbotslakken kunnen voortplanten en overleven als de temperatuur tussen de 10 en 25 graden Celsius is. De ideale temperatuur waarbij de slak zeer actief is en zeer goed voortplant is tussen 22 en 25 graden Celsius. Indien de temperatuur oploopt tot boven de 25 graden Celsius dan wordt het percentage slakken dat kan overleven verwaarloosbaar, bijna nul (Rapsch, et al., 2008) (Charlier, et al., 2014).

Voor de migratie van de trilhaarlarven naar de slakken toe is een optimale temperatuur nodig van 10 tot 25 graden Celsius. Belangrijker is om naast de migratie van de slak te beschrijven wanneer de trilhaarlarven uit het kapsel komen. Indien de temperatuur constant tussen 2 en 5 graden Celsius zou blijven dan overleven 10% van de cysten. Indien de temperatuur tussen de 12 en 14 graden Celsius dan overleven de cysten ongeveer 6 maanden. Bij een constante temperatuur van 20 graden Celsius ligt het percentage cysten dat overleefd ligt de 60%. Bij 25 graden Celsius is dit percentage gezakt tot 35%. De leverbotslak leeft tussen de 20 en 25 graden Celsius en de optimale temperatuur van de trilhaarlarven rond de 20 graden Celsius. Indien de temperatuur bij de cysten en de leverbotslakken boven de 25 graden Celsius komt dan dalen de overlevingskansen. De overlevingskansen van de cysten en de leverbotslak zijn dan verwaarloosbaar (Boray J. , 2007) (Rapsch, et al., 2008) (Charlier, et al., 2014).

2.2 De mogelijke schade van een leverbotinfectie

Het is belangrijk om te weten welke schade een leverbotinfectie met zich mee brengt. Daarbij zijn er verliezen qua melkopbrengst en groei maar ook hogere medische kosten of eventuele afvoer van dieren. Ook wordt er beschreven welke diergroepen op een bedrijf het grootste risico lopen om een leverbotinfectie op te lopen.

In Nederland zijn tevens al maatregelen en protocollen opgesteld. Vaak gaat een infectie van de leverbot gepaard met een salmonella infectie. De reden is dat het melkvee een zwakker immuunsysteem heeft door de infectie met leverbot. Door deze infectie neemt het aantal antistoffen in het bloed toe. Deze antistoffen zijn tevens te meten in de melk. De verschillende laboratoria in Nederland kunnen door middel van onderzoek aantonen of in het bloed, de mest of de melk antistoffen zitten. Als in de tankmelk veel antistoffen worden gevonden kan dat betekenen dat 20-100% van de dieren besmet is. Als er weinig antistoffen worden gevonden dan blijft het percentage besmette dieren rond 20%. De GD schat de kosten van een leverbotinfectie op een bedrijf met 60 koeien met weidegang rond de 4000-6000 euro per jaar (De Gezondheidsdienst voor Dieren, z.j.) (De Gezondheidsdienst voor Dieren, 2013)

De leverbotschade kan verschillen van acuut tot chronisch. Bij een kalf 8-9 maanden oud veroorzaken 140 leverbotten per kalf klinische verschijnselen. In tegenstelling tot ongeveer 50 leverbotten per kalf die de acute infectie veroorzaken. Bij een acute infectie is de schade omdat de jonge leverbotten migreren door de weefsels naar de lever toe. Deze infectie komt het vaakste voor in het najaar en de winter, in de maanden juli tot december. Bij een chronische infectie wordt de schade veroorzaakt door de volwassen leverbotten die vervellen in de galgangen. Door het ontvellen en de aanwezigheid van de leverbotten in de galgangen raken de galgangen verstopt of wordt de doorvoer verminderd. Deze infectie is te zien in het voorjaar tussen januari en april. Dan zijn de larven die zijn opgenomen volwassen geworden en gaan ze eitjes produceren die rond april en mei weer op het land terecht komen. In tabel 1 is dit schematisch weergegeven (Dobbs, 2013) (Armstrong, 2014) (Kaplan, 2015).

Tabel 1: Informatie over typen infectie en aantal leverbotten (Sustainable Control of Parasites, 2015) (Ballweber, 2014)

Type:	Tijd:	Aantal leverbotten:	EPG uitslag:
Acuut	Juli-December	+1000 onvolwassen botten	0
Subacuut	Oktober-Januari	500-1000	<100
Chronisch	Januari-April	200 volwassen botten	>100

De schade die te meten is aan het vee is allereerst een verminderde groei. Dit is ook mogelijk te meten als het dier geslacht wordt. Ernstige infecties lijden tot een lager karkasgewicht, lagere vleeskwiteit en minder lichaamsvet bij jongvee en melkvee. Dieren die op 640 dagen leeftijd geslacht zijn 15 kilogram aan levend gewicht lichter (Dargie, 1987) (Salcha, 1991) (Dobbs, 2013) (Skuce & Zadoks, 2013).

De kosten bedragen, omgerekend naar Nederland een verlies van ongeveer 50 euro per dier exclusief eventuele afvoerkosten voor afvoer van dode dieren (The Cattle Site, 2015) (Boerderij, 2015).

De melkopbrengsten kunnen naar schatting dalen tot wel 1 of soms 2 kilogram meetmelk per dag. De mate van verminderde melkproductie is afhankelijk van de hoogte van het aantal antilichamen in het bloed. Daarnaast neemt de tussenkalftijd toe met 20 tot 30 dagen (Dobbs, 2013) (Skuce & Zadoks, 2013) (Kaplan, 2015) (Irsik, Courtney, & Richey, 2015) (Boray J. , 2015).

Het vetpercentage in de melk vertoont ook schommeling. Uit onderzoek vanuit België is gebleken dat het gemiddelde vetpercentage met 0.06% daalt. Het percentage eiwit blijkt niet te dalen. Uit dit onderzoek blijkt dat de tussenkalftijd met 4.7 dagen toeneemt (Dargie, 1987) (Armstrong, 2014).

De verminderde groei is voornamelijk te zien bij vee jonger dan twee jaar. De verminderde groei houdt ook verband met de opname van gras. Indien een kalf besmet is wordt de opname van nutriënten uit gras verminderd. De verminderde opname en de directe schade van de leverbot zorgen voor de verminderde groei. De reden dat de groei opvalt bij jongere dieren is onder andere dat het jongvee hard groeit en de oudere dieren minder. Het valt dus minder op bij oudere dieren. Dieren die al een eerdere infectie hebben meegemaakt blijken meer immuun te zijn tegen de parasiet dan de jongere dieren die nog geen infectie hebben doorgemaakt. Ondanks dat zijn de dieren beter beschermd tegen een nieuwe infectie, de duur is maar kort. Na een aantal weken worden er geen antistoffen meer gemaakt door het lichaam (Dargie, 1987) (Farm Skills, 2014) (Kaplan, 2015).

Als laatste is er nog een verband tussen de gevoeligheid voor salmonella infectie door leverbot. Salmonella bacteriën komen voor in vervuilde mest, voer, water en via vervuilde kleding en werktuigen bijvoorbeeld. In Nederland komt een tweetal salmonella bacteriën veelvuldig voor, namelijk Salmonella Dublin en Salmonella Typhirium (Vaessen, Veling, Frankena, E.A.M., & Klunder, 2011) (De Gezondheidsdienst voor Dieren, 2013) (Stad & Land Dierenklinieken, 2015). Een salmonella infectie, bovenop een leverbot infectie, brengt tevens kosten met zich mee. Deze kosten worden geschat op ongeveer 4000-5000 euro op een bedrijf van 100 melkkoeien. Op ernstig besmette bedrijven loopt dit bedrag zelfs op tot boven de 10.000 euro (De Gezondheidsdienst voor Dieren, z.j.) (De Gezondheidsdienst voor Dieren, 2015) (Dierenartsenpraktijk landsmeer, 2015). Duidelijkheid over de relatie tussen een leverbotinfectie en een salmonella is dat een salmonella infectie vaker voorkomt bij dieren die een verminderde weerstand hebben. Tevens is bekend dat voornamelijk dieren van een leeftijd van 6 maanden oud tot 1 jaar veel besmettingen oplopen. Door de migratie van de leverbotten door de darmwand heen wordt lokaal de weerstand verminderd. Er is een doorgang vanuit de binnenkant van de darmen naar omliggende weefsels in de buik (Ferreira, 2012) (Al-Nakeeb & Habaska, 2013).

2.3 Huidige methoden die leverbot bestrijden

In Nederland zijn al veel methoden uitgetoetst om de leverbot te bestrijden. In het buitenland wordt hier ook meer werk van gemaakt. De toename van de leverbotinfecties is onder andere toe te schrijven aan het veranderde bodemgebruik en eventueel de klimaatveranderingen. De productiekosten nemen toe door een besmetting en door het verbod op het behandelen is er steeds meer aandacht gekomen voor nieuwe bestrijdingsmethoden.

2.3.1 Symptomen leverbotinfectie

Het is belangrijk om allereerst na te gaan of er een leverbotinfectie gaande is. Er zijn een aantal typische signalen van een leverbotinfectie bij melkvee en schapen. Zoals in paragraaf 2.2 is besproken is het te meten door een afname van de melkproductie, slechte groei en een ruig haarkleed. Tevens komt er oedeem voor. De reden hiervoor is dat de leverbotten in de lever voedingsstoffen zuiveren. De botten voeden zich vooral met het eiwit Albumine. Dit eiwit, dat de lever aanmaakt en normaal in het bloed zit, zorgt ervoor dat er niet teveel vocht uit de vaten kan lekken. Doordat de botten de Albumine gebruiken voor de groei daalt de Albumine waarde in het bloed. Het resultaat is dat er meer vocht uit de vaten lekt en ophoopt tussen de weefsels. Dit zorgt voor de vorming van oedeem (Foreman, 2014) (Rana, Roohi, & Khan, 2014).

2.3.2 Maatregelen leverbotinfectie

Voorheen was een gering scala aan anthelmintica in Nederland legaal te gebruiken om de leverbotinfectie te bestrijden.

In het jaar 2011 is er een nieuw middel op de markt gekomen. Het Noorse bedrijf Norbrook Laboratories zet dit medicijn af in Europa. Het middel, genaamd Closamectin, is een combinatie van de actieve stoffen Closantel en Ivermectine. Closantel is werkzaam tegen de leverbot. Het is verder niet bekend of dit middel werkt tegen alle stadia van de leverbot. Het middel is ook (nog) niet geregistreerd in Nederland. Dit middel is niet geschikt voor dieren die melk geven na de helft van de dracht van een vaars (Veeteeltvlees, 2011) (Norbrook, 2011).

Naast dit nieuwe middel is er voor schapen en lammeren wel een doeltreffend medicijn beschikbaar genaamd Flukiver Combi. Dit medicijn is doeltreffend tegen, alleen de stadia van de volwassen botten vanaf 8 weken oude, indien het juist wordt gedoseerd. Het mag uitsluitend op recept van de dierenarts geleverd worden (FIDIN Repertorium, 2015) (Diergeneeskundigcentrum, 2015).

Er zijn een aantal middelen die gebruikt mogen worden bij runderen. Deze middelen zijn Fasinex, Tribex, Endex, Flukiver, en Ivomec Plus. Deze middelen mogen alleen gebruikt worden bij runderen die melkgeven, niet voor humane consumptie. Het middel mag gebruikt worden voor de eerste helft van de dracht van een vaars, in de verdere droogstand mag het niet. De wachttijd voor vlees en melk bedragen 50 dagen. De enige twee middelen die in de EU zijn geregistreerd tegen alle stadia van de leverbot zijn Albex/Albendazol (op basis van Albendazol) en Zanil (op basis van Oxytoclozanide). Deze middelen komen uit de EU en mogen alleen gebruikt worden als de cascaderегeling in werking is gesteld. De wachttijd voor beide middelen bedragen respectievelijk 2,5 en 3 dagen voor vlees en melk (Neijenhuis, Verkaik, Verwer, Smolders, & Wagenaar, 2014) (FIDIN, 2015) (LTO Noord, 2015).

De reden dat er maar een aantal middelen beschikbaar is, vooral voor de melkveesector, tegen leverbotten is omdat de resistentie tegen de werkzame stof Triclabendazolen toeneemt. De middelen mogen worden gebruikt bij onder andere koeien en schapen mits deze zijn voorgeschreven door de dierenarts (Tromp, 2011). (FIDIN, 2015)

Het middel Zanil dat hierboven is beschreven mag uitsluitend worden gebruikt met een beroep, door de dierenarts, op artikel 22 van het Diergeneesmiddelen besluit. Dat houdt in dat de cascade regeling

wordt opgestart. Voorwaarden zijn wel dat de dierenarts een diagnose moet geven dat het daadwerkelijk om een ernstige leverbotinfectie gaat en dat dit is aangetoond door onderzoek (Tweede kamer der Staten Generaal, 2008-2009). Daarbij moet ook worden aangetoond dat de schade die het dier ondervindt zo ernstig is dat het niet behandelen in strijd is met de wet Dieren. Deze wet beschrijft dat een dier onder andere vrij moet zijn van leed, pijn en onnodig lijden. Jonge runderen voor de tweede helft van de lactatie mogen buiten de cascade regeling worden behandeld. Daarbij is het raadzaam om door middel van bijvoorbeeld bloed- en mestonderzoek een leverbotinfectie aan te tonen voordat er wordt behandeld. Het is niet verplicht om jongvee en runderen voor de helft van de eerste dracht te testen op leverbotinfecties voordat wordt behandeld. (Overheid.nl, 2015).

Naast de mogelijkheid om de leverbot te bestrijden met chemische middelen zijn er ook biologische middelen te gebruiken. In de Verenigde Staten is onderzoek gedaan naar het bestrijden van de leverbot met een schimmel, namelijk *Pochonia chlamydosporia*. Deze schimmel parasiteert de eitjes van de leverbotslak die vrijkomen in het lichaam van de herkauwer (Braga, et al., 2008) (Dias A. , et al., 2011) (Dias A. , Aruajo, Puppín, & Perboni, 2013).

Ten tweede wordt er verondersteld dat, uit Portugees onderzoek, het gebruik van citroenzuur, azijn, vloeibare zeep en kaliumpermanganaat alle cysten in het gras kunnen doden. Deze stoffen moeten nauwkeurig worden gemengd met water: citroenzuur (10ml/l), azijn(120 ml/l), vloeibare zeep (12 ml/l) of kaliumpermanganaat(24mg/l) (Martins dos Santos, 2012) (Rull & Bonsalle, 2014).

Verder zijn er nog globale maatregelen opgesteld. Beperkt weiden in het najaar of de dieren opstallen na augustus zodat de opname van cysten worden geminimaliseerd. Buiten omweiden kan het grondwaterpeil worden verlaagd, betere afwatering van het land met drainage en greppels frezen van de zomer (Pronk, Stokman, & Geus, 2014) (Andel, 2015) (Gezondheidsdienst voor Dieren, 2015).

Naast maatregelen is de sector ook op zoek naar alternatieven om de leverbot te bestrijden. Loopeenden worden gebruikt om de slakken te zoeken en op te eten. Deze eenden eten zeer effectief de slakjes weg door het water uit de greppel te filteren met hun snavel. Er zijn nog geen exacte cijfers bekend hoe goed de eenden hun werk doen. Van de loopeenden wordt niet verwacht dat deze heel Nederland vrij kunnen houden van leverbotslakken. Met de groei van de veehouderij is de kans groot dat veehouders niet de beschikbare kennis, middelen en mogelijkheden hebben om de loopeenden een kans te geven (Andel, 2013) (Andel, 2015).

2.4 Werking van stoom

Naast de informatie over de leverbot, de leverbotslak, de schade die wordt veroorzaakt en de methoden die gebruikt worden is het belangrijk meer inzicht te krijgen in de werking van stoom. De methode die wordt getest, en is uitgewerkt in het hoofdstuk Materiaal en Methoden, berust op de werking van stoom. Hiervoor is in dit hoofdstuk aanvullende informatie over de werking van stoom opgenomen.

2.4.1 Stomen van gronden

Stomen wordt in Nederland veelvuldig gebruikt in de tuinbouw en kassen om de grond te ontsmetten. De stoom wordt in de grond gebracht middels twee systemen. Ten eerste wordt stoom via stoombuizen de grond in geperst. De grond kan ook worden afgedekt met zeilen en dit zeilstomen zorgt dat de druk onder het zeil de stoom de grond in perst. Belangrijk bij het stomen is de grondsoort. Bij kleigronden, die diep zijn losgemaakt of gespit, dringt de stoom diep door waardoor de mate van ontsmetting groot is. Bij zand en zavel gronden is dit lastiger en zal eerder alleen de toplaag worden ontsmet. Bij veengronden, vanwege het vele vocht in de grond, is het resultaat het laagste van alle grondsoorten. De toplaag wordt wel verwarmd maar de efficiency is laag. Hoe meer klei er in de grond zit hoe minder stoom er nodig is voor hetzelfde resultaat qua ontsmetten. Om een laag van 30 centimeter grond te ontsmetten is alleen klei geschikt, andere grondsoorten laten zo een diepte niet toe om in te dringen met stoom van boven de grond (Lamers & Meijer, 2004) (Cuijpers, Bokhorst, Koopmans, Voogt, & Zoon, 2005) (Ludeking, Termorshuizen, Wubben, Wurff, Streminska, & Helm, 2012).

2.4.2 Risicofactoren van stomen

Zoals in paragraaf 2.4.1 is besproken hangt het resultaat van de stoombehandeling af met de hoeveelheid vocht die in de bodem zit. Indien er veel vocht tussen de gronddeeltjes zit dan wordt de lucht uit de grond verdreven. Stoom kan alleen de grond in door de lucht, die al aanwezig is in de grond, te verdringen. Indien er water tussen de deeltjes zit kan de stoom er simpelweg niet doorheen. Daarnaast condenseert het stoom in de grond. Dit water blijft in de grond en drijft zodanig ook de lucht uit de grond. Als de grond al relatief vrij nat is en water dat condenseert vanuit stoom komt ook in de grond neemt de mate van indringing af. Tevens kleven er nadelen aan stomen van gronden omdat nuttige organismen kunnen sterven. In paragraaf 2.4.3 wordt hier meer aandacht aan besteed (Lamers & Meijer, 2004) (Ludeking, Termorshuizen, Wubben, Wurff, Streminska, & Helm, 2012).

2.4.3 Effect op het bodemleven

Stoom heeft een negatieve werking op ziekmakende schimmels en bacteriën. Wel is daarvoor veelal een temperatuur nodig van 80°C. Niet alleen de ziekmakende schimmels gaan dood. In de kasgronden, omdat de stoomtechniek in de kassenteelt veel wordt gebruikt, is de mate van bodemleven niet helemaal gelijk aan die van grasland. Wel is bekend dat veel goede schimmels en bacteriën in de kasgronden de stoombehandeling niet overleven. Vooral de bacteriën die van invloed zijn op de mate van omzetting van ammonium in nitraat krijgen een zware klap. Deze bacteriën doen er langer over dan 62 dagen om terug te keren, terwijl de andere schimmels en bacteriën dan over het algemeen al terug zijn op het oude niveau. Herkolonisatie van het bodemleven komt voort uit de diepere grondlagen die niet behandeld zijn. Ondanks de herkolonisatie van de meeste schimmels en bacteriën in de grondlagen is de draagkracht nog laag. Het duurt langer dan een jaar voor de meso-

en macrofauna is hersteld (Vliet, Vlaar, & Leendertse, 2009) (Ludeking, Termorshuizen, Wubben, Wurff, Streminska, & Helm, 2012).

2.5 Werking van straling (magnetron principe)

De literatuur over stoom is gebruikt om meer informatie te verkrijgen of het stomen, indien het werkt, in de praktijk kan worden toegepast. Daarnaast is het belang groot om te zorgen dat de organismen in een land te behouden en alleen de slakken te doden. Naast het gebruik van stoom kan hete lucht hetzelfde effect hebben en dat is dan ook opgenomen in de proefopzet. Als laatste wordt er nog geprobeerd om slakken te doden met straling. Deze straling wordt in eerste instantie gevormd door de magnetron.

2.5.1 Principe van een magnetron

De magnetron wordt in veel huishoudens in Nederland gebruikt om voornamelijk voedsel op te warmen. In de magnetron worden verschillende magnetische en elektrische velden gecreëerd. Een speciale buis in de magnetron schiet elektronen door de magnetische en elektrische velden. Nadat de elektronen door de velden zijn gegaan worden er elektromagnetische stralen gevormd. Deze hebben een frequentie van 2.45 Megahertz. Deze golven van geladen elektronen schieten in feite als een soort stuiterballen door de magnetron (Ticheler, 2006) (McTaggart, 2011) (Vlot, 2013). Deze golven van elektronen worden door het voedsel in de magnetron geabsorbeerd. In het voedsel wordt, door de mate van absorptie, een ladingsverschil gegenereerd. Het ladingsverschil verzorgt tevens een wisselend elektromagnetisch veld. Bipolaire elementen waaronder water gaan onder invloed van het ladingsverschil en elektromagnetische veld trillen en bewegen (Delta, 1995). Dit trillen en bewegen veroorzaakt de warmte. Deze warmte blijft in het voedsel. Door deze warmte wordt het voedsel van binnenuit opgewarmd (Ticheler, 2006) (McTaggart, 2011) (Vlot, 2013). Dit is heel kort gezegd het principe van de werking van de magnetron. Verder details over de werking gaan in op kwantumfysica en worden niet van belang geacht in dit onderzoek.

2.5.2 Kooi van Faraday

De werking van de magnetron berust voornamelijk wel op een begrip genaamd de kooi van Faraday. Deze kooi zorgt ervoor dat de straling niet weg kan uit de magnetron. Indien er geen duidelijke kooi is dan wordt de straling verspreid door de lucht en wordt het voorwerp niet opgewarmd. Belangrijk is dus de kooi dicht te maken zodat er geen straling kan ontsnappen.

Het principe van de kooi van Faraday is relatief eenvoudig. In een metalen kooi of kubus wordt de straling behouden. Het metaal kaatst namelijk de straling elke keer af waardoor de elektronen in de metalen kooi blijven rond stuiteren. De magnetron heeft een glazen deur in zich van hittebestendig glas waarop dunne lijntjes, of een rooster, van metaal om zo de straling niet verloren te laten gaan. De straling gaat namelijk anders door het glas weg uit de magnetron (Natuurkundige thema's, z.j.) (Sergaent, 2005) (Ticheler, 2006).

3. Materiaal en Methoden

In het hoofdstuk Materiaal en Methoden wordt toegelicht hoe het onderzoek is uitgevoerd. Als eerste wordt er een korte toelichting gegeven op de methode die is uitgedacht. Daarna worden de verschillende benodigdheden en de onderzoeksopzetten besproken en uitgelegd. Er zijn namelijk meerdere proeven uitgevoerd om zo meerdere gegevens te verzamelen.

3.1 Vooronderzoek

Voor het uitvoeren van het experimentele onderzoek is eerst een literatuuronderzoek gestart. In het literatuuronderzoek is via Desk Research onderzocht welke informatie al bekend is over de leverbot en leverbotslak. De informatie die nog niet bekend was kan een reden zijn om het experimentele onderzoek uit te breiden of juist in te dammen. Het literatuuronderzoek was de basis voor het uit te voeren experiment. Aan het literatuuronderzoek zijn vooraf een aantal eisen gesteld. Voor het onderzoeken moeten 10 verschillende bronnen zijn gebruikt waarvan maximaal 50% van internet afkomstig zijn. Aanvullend moesten er 4 internationale bronnen worden geraadpleegd en 4 wetenschappelijke bronnen. De betrouwbaarheid van dit onderzoek wordt bepaald met de plagiaatscanner Euphorus, waarbij maximaal 10% plagiaat mocht voorkomen.

3.2 Nieuwe methode

De cirkel van de leverbotcyclus moet worden doorbroken. In de literatuur is gevonden dat de leverbotslak en de ingekapselde cysten in het gras sterven bij een temperatuur van 25 graden Celsius. De kans op overleven zou dan verwaarloosbaar zijn. Met oog op de praktijk moet de graszode behouden blijven maar moeten wel alle slakken en cysten in het gras behandeld worden. Door de zode te stomen, na afmaaien, wordt getracht de slak en de cysten te doden. Stoom komt vrijwel overal aan de bovenzijde van de graszoden. De infiltratiediepte in de grond is wellicht laag. Indien met stoom van boven de 25 graden Celsius de cysten en de slak gedood worden dan blijft de zode nog in tact. Het gras ondervindt wel hinder maar is bestand tegen hogere temperaturen. De proefopzet werd voornamelijk gekenmerkt door het verwarmen van de slakken en cysten in de veronderstelling ze op deze wijze te doden. Daarbij is naast stomen aandacht besteedt aan het behandelen met hete lucht en met straling puur om de slakken te doden.

3.3 Materialen

Hieronder zijn de verschillende materialen puntsgewijs opgesomd die nodig waren voor het uit te voeren onderzoek.

- Literatuuronderzoek;
- Computer;
- SPSS software;
- Klok/horloge;
- Pen\potlood;
- Papier;
- 350 (leverbot)slakken;
- Thermometer;
- Bakje met kokend water;
- Elektrisch fornuis;
- PVC buis;

- Tape;
- Vliegengaas;
- Pincet;
- 6 verzamel bakjes;
- 18 bakjes met bagger;
- Bagger;
- Zeefjes;
- Microscoop;
- Pincet;
- Petrischaaltjes;
- 4 grote bakken;
- 4 Dataloggers;
- 2 waxinelichtjes;
- Magnetron.

3.4 Stoommeting

Allereerst is onderzocht of de slakken inderdaad bij een bepaalde temperatuur met stoom dood zouden gaan. In figuur 3 is een tekening opgenomen die een beeld geeft van de onderzoeksopzet. Dit is een buis van PVC al dan niet doorzichtig of grijs antraciet. In deze buis worden drie sleuven uitgezaagd. Dit is aangegeven met de zwarte lijn. Door deze sleuven wordt een soort zeef geschoven zodat deze in de koker kan worden geplaatst. Deze is te zien in figuur 4. Onder de 3 sleuven zijn een tweetal ventilatiegaten gezaagd

Onder de koker wordt een waterkoker geplaatst. Deze zorgt dat de stoom wordt geproduceerd en via de buis naar boven wordt afgevoerd. De gewenste temperatuur in de bovenste sleuf(1) ligt rond 25 graden Celsius. Voor de tweede sleuf(2) wordt een temperatuur van 30 graden Celsius verwacht en in de onderste sleuf(3) 35 graden Celsius. Tijdens het meten van deze temperaturen werd een klep in de buis boven de ventilatiegaten gemonteerd, anders liep de temperatuur in de buis te hoog op. Als de klep werd weggehaald dan liep de temperatuur in sleuf 1 op tot 40 graden Celsius. Sleuf 2 en 3 haalden dan een temperatuur van 45 en 50 graden Celsius. De temperatuur is gemeten door een thermometer in de sleuf te steken.

In deze sleuf werd de zeef geschoven met daarop een vijftal slakken. Deze zeef is gedurende 1 minuut in de sleuf met stoom gehouden. Daarna is de zeef met slakken uit de sleuf gehaald en zijn de slakken bekeken onder de microscoop of ze nog in leven waren. Dit proces is drie keer herhaald per sleuf. Toen de metingen in sleuf 3 waren verricht werd de onderste sleuf afgeplakt met tape om te zorgen dat de stoom alleen door de bovenkant naar buiten kan. In tabel 2 is het meetschema weergegeven waarbij sleuf 1 de bovenste sleuf in de buis is. In bijlage 2 is het meetschema, dat niet is ingevuld, opgenomen om zo de gegevens tijdens het uitvoeren van de proef op te nemen.



Figuur 4: Stoombuis testopzet slakken stomen



Figuur 5: Zeef voor in de stoombuis om de behandeling op de slakken te testen

Tabel 2: Schema meetgegevens met de te verwachte temperatuur en aantal slakken

Sleuf	Temperatuur	Aantal slakken per meting	Aantal slakken na 3 metingen	Tijd
1	25°C	5	15	60 sec
2	30°C	5	15	60 sec
3	35°C	5	15	60 sec
4	40°C	5	15	60 sec
5	45°C	5	15	60 sec
6	50°C	5	15	60 sec

Totaal waren er voor deze proef 90 slakken nodig, waarbij het niet vooraf te bepalen was of deze geïnfecteerd zijn en of het de juiste slak was. De kans was aanwezig dat de slakjes konden beschadigen. Na de behandeling zijn de slakken apart in een potje gestopt met een beetje bagger. Per temperatuur schaal zijn er 3 potjes apart gezet met slakken, aangezien per temperatuur 3 metingen werden verricht. Om 13:00 is het stomen afgerond en een dag later werden om 13:00 de potjes bekeken om vast te stellen hoeveel slakken er leven. De potjes zijn 24 uur lang bewaard op kamer temperatuur omdat volgens de literatuur de slakken met 20 graden Celsius zeer actief zijn. Nadat na 24 uur was vastgesteld of de dieren nog leefden zijn ze onder de microscoop geplet. Zo kon worden gezien of de slak geïnfecteerd was en of de larve nog leefde of niet na het stomen. Er zijn geen grashalmen gevonden om in de stoombuis uit te proberen. De cysten zijn zeer lastig te vinden en daarbij zijn er veel criteria waardoor het lastig is om de cysten te vangen. De betrouwbaarheid van de proef is beschreven in paragraaf 3.11. In deze paragraaf is tevens de betrouwbaarheid aangegeven van de proeven die zijn beschreven in paragraaf 3.5, 3.6, 3.7 en 3,8.

In bijlage 12 zijn foto's opgenomen waarop de gebruikte proefopstelling op beeld staat. Deze proefopstelling is gebruikt voor de bovengenoemde stoomproef maar ook voor de temperatuurmeting die staat beschreven in paragraaf 3.5.

3.5 Temperatuurmeting

Naast de proef met stoom is de stoombuis nogmaals gebruikt. In de buis is een waxinelicht aangestoken in plaats van een bakje met kokend water. Op deze manier ging er geen stoom door de buis heen maar alleen maar droge warme lucht. Van tevoren werd gedacht dat deze droge warme lucht misschien een ander effect had dan de stoom. De proef is hetzelfde uitgevoerd zoals de stoomproef. In tabel 2 is een schema met meetgegevens voor de stoommeting opgenomen. Deze tabel is ook gebruikt voor de proef met het waxinelicht.

Per temperatuurschaal zijn 3 maal 5 slakken blootgesteld. De 5 slakken per meting zijn tevens in een potje apart gemonitord om te kijken of ze leefden of niet. Bij elkaar waren dat, net als voor de

stoommeting, 6 temperatuurschalen maal 3 potjes met elk 5 slakken. Resultaat was dan 18 potjes elk met 5 slakken, totaal 90 slakken na behandeling. Het resultaat is ook gedocumenteerd, namelijk in bijlage 3, genaamd de temperatuurmeting. De resultaten zijn opgenomen in hoofdstuk 4 de resultaten.

3.6 Stralingsmeting

De bedoeling is om de slakken in het weiland te doden. Daarbij moet een methode gebruikt worden die in de praktijk te realiseren is. De methode van stoom en/of hete lucht zouden kansrijk kunnen zijn. Deze twee methoden worden aangevuld met een derde methode. De derde optie is om de slakken met straling te doden. Daarbij wordt gebruik gemaakt van de magnetron. De magnetron warmt normaal voedsel op. Doordat door straling de moleculen gaan trillen levert deze wrijving de warmte op zodat het voedsel warmte opleverd.

De bedoeling is om de slakken te doden door ze van binnen te verwarmen en zo te doden. Daarbij worden 60 slakken uit het perceel op het KTC blootgesteld aan de straling. Er worden 3 maal 5 slakken, 10 seconden bloot gesteld aan de magnetron. Dit wordt gedaan op 10 seconden maar ook op 20 seconden, 30 seconden en 40 seconden.

Na de behandeling worden elke partij van 5 slakken in een bakje met bagger gestopt en de volgende dag bekeken of ze nog leven en hoeveel daarvan leven. Daarna worden deze bekeken onder de microscoop of het de Galba Truncatula slak is of dat het een ander soort is en of deze besmet zijn of niet.

In tabel 3 is opgenomen welke metingen er worden verricht. Daarbij is deze tabel opgenomen in bijlage 4. De details rondom deze methode zijn tevens vermeld bij de tabel in bijlage 4. De uitkomsten van deze meting zijn opgenomen in bijlage 9 en eht hoofdstuk resultaten, hoofdstuk 4.

Tabel 3: schema metingen voor stralingsmethoden

Tijd	Aantal slakken per meting	Totaal aantal slakken na 3 metingen
15 sec	5	15
30 sec	5	15
45 sec	5	15
60 sec	5	15

3.7 Dieptemeting

In Nederland was ook niet bekend hoe diep de leverbotslak zich terug kan trekken in het biotoop. Dit is ook onderzocht. Zeker als in de praktijk een machine wordt uitgetest is het belangrijk te weten hoe diep de slak in de bagger kruipt om zo te kunnen berekenen hoe effectief een machine zou kunnen zijn en zou moet kunnen infiltreren of verplaatsen.

Voor dit onderzoek zijn een viertal bakjes gevuld met 10 centimeter bagger uit het leverbot perceel van het KTC in Zegveld. In elke bak zijn 3 pollen gras uit het weiland gestopt. Deze vier bakjes met bagger en pollen zijn onder verschillende temperaturen gehouden. In tabel 4 is in een schema overzichtelijk weergegeven onder welke omstandigheden de proef is opgezet.

Tabel 4: Schema proefopzet dieptemeting van de leverbotslak

Bak:	Temperatuur:	Startdatum	Einddatum	Aantal slakken
1	5°C	19-11-15	26-11-15	15
2	10°C	19-11-15	26-11-15	15
3	15°C	19-11-15	26-11-15	15
4	20°C	19-11-15	26-11-15	15

In elke bak zat 10 centimeter bagger. Deze bagger is zeven dagen weg gezet bij de temperatuur die in het schema is vermeld. Bakje 1, waar het ongeveer 5°Celsius moest zijn, is in de koelkast bewaard. Bakje nummer 2 van 10°Celsius is in een tweede koelkast geplaatst. Voor het bakje met 15°Celsius is een onverwarmde ruimte in het kantoor van het KTC gebruikt, namelijk de badkamer boven het kantoor. Deze is waarschijnlijk constant 15°Celsius. Bakje 4 stond 7 dagen lang op kamertemperatuur bij een constante temperatuur van 20°Celsius weggestopt in de droogstoof. Al deze ruimten waren donker omdat in de praktijk bleek dat er minder slakken in het donker te vinden zijn en waarschijnlijk dan in de bagger zouden zitten.

De temperatuur van de bagger was in elk bakje gelijk. De bagger die in het bakje werd gestopt had bijvoorbeeld een temperatuur van 15° en dat was dan de uitgangssituatie voor alle bakjes op dag één. Per bak zijn drie aparte hokjes gemaakt en in dat laagje bagger ligt een 12 centimeter graspol uit het land waar de slakken vandaan zijn gekomen. In elk bakje met één pol gras zijn 5 slakken gelegd bovenop de bagger. Na 7 dagen is de bagger per laag van een centimeter dik uit het bakje geschept en gespoeld om te kijken hoe diep de slakken zich hebben terug getrokken. Aan de zijkant van de bak was elke laag van één centimeter gemarkeerd. Op het oog, via de lijnen op de bak, werd steeds een centimeter bagger verwijderd. Elke laag is daarna apart gespoeld om na te gaan hoe die de slakken zijn weggekropen. De slakken die zijn uitgespoeld zijn bewaard en later bekeken onder de microscoop.

In bijlage 5 is een schema opgenomen waarop de gegevens konden worden genoteerd tijdens de metingen. In bijlage 5 staan 3 schema's, elk goed voor één volledige meting. Aan het einde van de proef is 3 keer gemeten en zijn ook 3 schema's ingevuld. Buiten de metingen die zijn opgenomen in bijlage 5 bevonden zich in elk bakje 1 datalogger. Deze dataloggers hebben de temperatuur, bodemvocht, lichtintensiteit en voedingstoestand gemeten. Met deze data kon, zonder het bakje te openen, worden gemeten wat de temperatuur was. Met 1 datalogger kon een betrouwbaarder beeld worden geschetst dan vooraf en achteraf de temperatuur te meten. De datalogger per bakje zijn met elkaar worden vergeleken of er geen grote verschillen zijn. Voordat de proef begon zijn alle dataloggers twee dagen op het bureau gelegd en met deze gegevens is bepaald of de dataloggers allemaal geschikt zijn en dezelfde meetwaarden aangaven.

Zoals eerder vermeld in paragraaf 3.3 is de betrouwbaarheid van deze proef opgenomen in paragraaf 3.11.

3.8 Zuurbehandeling

Buiten de stoom om is er in de literatuur ook vermeld dat de cysten in het gras niet tegen een bepaalde concentratie zuur kunnen. Een oplossing van 10ml citroenzuur per liter water zou de cysten al kunnen doden. Ditzelfde effect is te behalen met 120ml azijnzuur per liter water. Er zijn helaas geen cysten gevonden. Deze cysten konden worden gevonden door drijvertjes te maken. Dit is als volgt uitgelegd in de alinea hieronder.

Cysten zijn te verzamelen en te oogsten door een soort drijvertjes te maken. Deze drijvertjes zijn te maken door een aantal grijze PVC buisjes met een doorsnede van 1,5 centimeter op een lengte te zagen van 10 centimeter. Daarmee kan een vierkant worden gemaakt van 10 bij 10 centimeter. Daarna moeten een tweetal buisjes worden ingesneden over de lengte van het buisje. Op deze manier kan een klemmetje worden gemaakt om over de buitenste buisjes van het drijvertje te klemmen. Over het vierkant wordt een strook cellofaantape van 10 centimeter geplakt en daarbij aan de buitenkanten vast geklemd met de klemmetjes. Het cellofaantape moet van goede kwaliteit zijn om bestand te zijn tegen water en vocht. Deze drijvertjes moeten in een weiland worden geplaatst waar veel leverbotslakken worden gevonden. Om de 2 weken moeten deze drijvertjes worden gecontroleerd onder de microscoop op afgezette cysten.

Deze behandeling was optioneel aangezien niet kon worden gezegd voordat het onderzoek begon of er genoeg cysten konden worden gevangen. Wel is de manier van maken van drijvertjes genoteerd en opgenomen in dit hoofdstuk. Reden hiervoor is dat er op internet geen duidelijke literatuur te vinden is over het maken van deze drijvertjes. Vanuit de praktijk is deze informatie verzameld en zodoende opgeschreven.

3.9 Cyclusbepaling

Tijdens het uitvoeren van de proef is een bevinding tot stand gekomen waarbij werd gezegd dat de slakken een dag en nachtritme hanteren. Het belang van dit ritme, in relatie tot de diepte die de slakken bereiken, is zeer groot in de praktijk. Om deze vraag te beantwoorden is er nog een proef opgesteld om na te gaan of de slakken een dag en nacht ritme hebben.

In een bak, dezelfde als die zijn gebruikt voor de dieptemeting, zijn 25 slakken gestopt bovenop een pol gras. Boven deze bak is een webcam gehangen, gekoppeld aan een laptop met harde schijf. Deze webcam maakt gedurende 24 uur opnamen van het gedrag van de slakken.

3.10 Metingen

Voor de proeven waren een aantal slakken nodig. Volgens de opzet waren er bij elkaar 265 slakken nodig, al dan niet geïnfecteerd. Deze slakken zijn verzameld in Plas-Dras gebieden. Getracht werd om de slakken allemaal van de percelen rond het KTC Zegveld te oogsten, dit is ook gelukt tijdens het uitvoeren van deze proef.

Voor de proefopzet zijn de slakken uit het bakje gehaald met een beetje bagger waarin ze verzameld zijn, daarna behandeld en toen 24 uur apart zijn gezet. De slakken die zijn gevonden op verschillende dagen zijn dezelfde dag nog behandeld. Na deze behandeling zijn na 24 uur de slakken onder de microscoop gehouden om te bepalen of het de juiste soort(en) waren. Indien het de juiste soort niet was, werd deze in een bakje gestopt, bij elkaar. Aan deze slakken werd verder geen aandacht besteed of ze geïnfecteerd waren of niet. De slakken die de naam *Galba truncatula* droegen zijn wel onderzocht op infectie.

Het zoeken van de slakken mocht ongeveer 5 werkdagen in beslag nemen voor alle proeven. Na genoeg slakken te hebben verzameld konden de proeven worden uitgevoerd. De slakken zijn in de ochtend om 10:30 verzameld en daarna direct behandeld. De proefopzet is gereed gemaakt voordat naar slakken wordt gezocht. In de maand oktober zijn de benodigde slakken gezocht en verzameld. Zoals eerder gezegd zijn de slakken 24 uur na het behandelen bekeken of ze leefden of dood waren. De slakken werden daarna, dood of levend, onderzocht op soort en infectie. Indien het de juiste soort is werd deze in het bakje gestopt. De overige slakken, die niet het juiste soort waren, zijn in een ander bakje gehouden en door de gootsteen gespoeld.

3.11 Infectiegraad

In de literatuur is niet opgenomen of een infectie is aan te tonen bij, of alleen levende slakken, of dode slakken, of levende en dode slakken. De slakken na de behandeling waren deels dood en deels levend. Onder de microscoop kon worden gezien of deze besmet waren maar misschien kan dat niet als de slakken al dood waren. Om de betrouwbaarheid van deze waarneming te verbeteren is in het veld gezocht naar 50 slakken van hetzelfde land. Er wordt veronderstelt dat alle slakken op dat veld onder dezelfde omstandigheden hebben geleefd of leven. Deze 50 slakken worden op dezelfde manier bekeken op soort en infectie, namelijk onder de microscoop, als de slakken die behandeld zijn. Van deze resultaten wordt een tabel gemaakt en ingevuld om zo te kunnen aantonen hoeveel procent van die 50 slakken zijn besmet. Als blijkt dat het percentage besmette slakken van die 50

slakken hoger is dan die van de proefopzet (stoom en temperatuur) kan er worden nagedacht of een infectie inderdaad alleen is aan te tonen bij dode leverbotslakken. De resultaten van deze meting zijn verwerkt in bijlage 12.

3.12 Verwerken van gegevens

De gegevens die verzameld zijn in het veld waren van groot belang om de stoommethode, hete lucht methode en stralingsmethode verder te kunnen ontwikkelen in de toekomst. De gegevens van de proeven zijn met het programma SPSS verwerkt. In dit programma werden de waarnemingen van de stoomproef en de dieptemeting meegenomen. Van de zuurbehandelingen zijn geen resultaten omdat deze proef niet is uitgevoerd.

Uit de ingevoerde gegevens in SPSS zijn de gemiddelden berekend. Zo werd het gemiddelde berekend van het aantal slakken dat is blijven leven na de behandeling in sleuf 1 van de stoombuis. Dit is ook gedaan voor de slakken die behandeld zijn in sleuf 2 en sleuf 3. Daarna is berekend of de gegevens normaal verdeeld waren met behulp van de Shapiro Wilk Test. Nadat berekend was dat de gegevens niet normaal verdeeld waren werd een andere test gebruikt om te berekenen waar de verschillen in uitkomsten zaten. Om deze verschillen aan te tonen is gebruik gemaakt van de K-Independent Samples test.

Allereerst is een nul hypothese opgesteld voor de Shapiro Wilk Test. De nulhypothese luidde als volgt: de gegevens zijn normaal verdeeld. Voor het uitvoeren van de K-Independent Samples test werd ook een nul hypothese opgesteld. De nulhypothese luidde als volgt: er is geen verschil tussen het aantal slakken die sterft en de temperatuur.

De bovenstaande methode om de gegevens te verwerken is gebruikt voor het verwerken van de gegevens van de stralingsmethoden. Daarbij is ook een nulhypothese opgesteld. Deze nulhypothese luidde als volgt: De gegevens zijn normaal verdeeld. De nulhypothese voor de K-independent Samples test is: er is geen verschil tussen de sterfte bij de slakken na behandeling en de duur van de behandeling.

De K-Independent Samples test is de enige toets die in dit geval gebruikt mag worden omdat, zoals hierboven gezegd, de variabele (temperatuur) niet normaal verdeeld is.

De test over hoe diep de slakken de modder in kruipen is tevens verwerkt in SPSS met de K Independent Samples test. Hiervoor werden ook een nulhypothese opgesteld. De nulhypothese voor de Shapiro Wilk Test was dat de gegevens normaal verdeeld waren. De nulhypothese voor de K-Independent Sample test was als volgt: er is geen verband tussen het aantal dode slakken en de verschillende behandelingen met stoom op verschillende temperaturen, de gegevens zijn .

Voor deze proef mocht de ANOVA test gebruikt worden. Bij de dieptemeting waren er namelijk 4 groepen om met elkaar te vergelijken. Elk van de 4 groepen is onder een andere temperatuur gehouden.

In tabel 5 is aangegeven welke toets bij welke proef wordt gebruikt om de gegevens te kunnen analyseren.

Tabel 5: Toetschema per proef

Proef:	Toets:
Stoombuis slakken	Non Parametic Test- K Independent Samples
Temperatuurmeting	Non Parametic Test- K Independent Samples
Stralingsmeting	Non Parametic Test- K Independent Samples
Dieptemeting	Non Parametic Test- K Independent Samples

De proef van de cyclusbepaling is niet verwerkt in SPSS. Hiervoor zijn geen resultaten die kunnen worden ingevoerd. De resultaten zijn vermeld in het hoofdstuk resultaten en zijn meegenomen in het advies dat is opgenomen in het hoofdstuk aanbevelingen.

3.13 Betrouwbaarheid

In paragrafen 3.4, 3.5, 3.6, 3.7 en 3.8 zijn verschillende aantallen slakken genoemd die zijn gebruikt bij de proeven. Deze aantallen zijn bepaald aan de hand van de praktische haalbaarheid. Het zoeken van slakken kostte relatief veel tijd en om genoeg slakken te verzamelen voor alle proeven is er een aantal vastgesteld. Vooraf kon niet worden bepaald hoe groot de steekproef moest wezen om een betrouwbaar beeld te geven. Hierdoor kon ook geen schatting worden gemaakt van de betrouwbaarheid van de proeven. Uit eerdere onderzoeken is niet bekend wat het gemiddelde aantal slakken is op een perceel en wat de standaarddeviatie is bij de verschillende proeven. Indien deze gegevens niet bekend zijn kan de steekproefgrootte worden berekend aan de hand van de grootte van de slakkenpopulatie. Deze gegevens waren ook niet bekend.

De betrouwbaarheid was, met het ontbreken van deze gegevens niet te berekenen.

4. Resultaten

In dit hoofdstuk zijn de resultaten opgenomen van de verschillende proeven die staan beschreven in hoofdstuk 3; Materiaal en Methoden. Zo zijn de resultaten opgenomen van de stoomproef, de temperatuurproef en de dieptemeting. De resultaten zijn verwerkt in SPSS en deze gegevens zijn in dit hoofdstuk opgenomen. De tabellen, met daarin alle gegevens, zijn weergegeven in de bijlagen. De betrouwbaarheid wordt, voor alle proeven, gesteld op 95 procent. De Alfa bedraagt daarbij 0.05 .

4.1 Resultaten stoomproef

Als eerste is de proef uitgevoerd waarbij de slakken zijn blootgesteld aan verschillende behandelingen met stoom. Er zijn verschillende temperatuurschalen gebruikt waaraan de slakken zijn blootgesteld. De resultaten zijn opgenomen in bijlage 7.

De eerste stap was om na te gaan of de resultaten normaal verdeeld waren. Dit is gedaan in SPSS met behulp van de Shapiro Wilk test. In figuur 6 is de uitvoer van de Shapiro Wilk test weergegeven.

Figuur 6: Uitvoer van de Shapiro Wilk test (test of Normality) om normale verdeling mee aan te tonen voor de stoomproef.

	Temperatuur	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
SlakkenD	22,5-27,5 graad	,750	3	,000
	27,6-32,5 graad	,750	3	,000
	37,6-42,5 graad	,750	3	,000
	42,6-47,5 graad	,964	3	,637
	47,6-52,5 graad	,750	3	,000

In figuur 6 is de uitvoer opgenomen van de Shapiro Wilk test om aan te kunnen tonen of de gegevens normaal verdeeld zijn. De nulhypothese was dat de gegevens geen verband met elkaar hebben en dus normaal verdeeld zouden zijn. Uit de laatste kolom van figuur 6 is te lezen dat de significantie voor elke temperatuurschaal onder de alfa van 0.05 ligt behalve voor de schaal van 42,6 tot 47,5 graden Celsius. Indien één van de temperatuurschalen een significantie heeft van onder de 0.05 dan mag al niet worden veronderstelt dat de gegevens normaal verdeelt zijn. Uit de uitvoer blijkt dat er dat de significantie, op één meting na, onder de alfa ligt en de nulhypothese moet worden verworpen. Er is geen verband tussen de gegevens en de resultaten zijn dus niet normaal verdeeld.. In dit geval mag de K Independent Samples test worden toegepast. In figuur 7 is de uitvoer van deze toets opgenomen.

Figuur 7: Uitvoer van de K-Independent Samples test voor de stoomproef

	SlakkenD
Chi-Square	6,235
df	5
Asymp. Sig.	,284

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Temperatuur

Zoals eerder vermeld is in figuur 7 de uitvoer van de K-Independent Samples test opgenomen. Deze test geeft aan of de temperatuurschalen verband met elkaar houden. De nulhypothese bij deze toets was dat er geen verband bestaat tussen de verschillende temperatuurschalen. De significantie bij deze toets bedraagt 0,284. Deze significantie is groter dan de alfa van 0,05 wat een indicatie geeft dat er geen verband is tussen de verschillende behandelingen.

Als laatste is er bekeken of de slakken behoorden tot de Galba Truncatula of niet en welke dan geïnfecteerd zouden zijn. Het resultaat hiervan is dat van de 90 slakken er 17 behoorden tot de Galba Truncatula. Al van deze Galba Truncatula slakken zijn bekeken op infectie, geen van de slakken was besmet met de leverbot.

4.2 Resultaten temperatuurproef

Naast het uitvoeren van de stoomproef is er een proef uitgevoerd met hete lucht. Deze resultaten zijn opgenomen in bijlage 8. Tevens is voor deze proef de Shapiro Wilk test uitgevoerd zoals ook is gedaan voor de stoomproef, te lezen in paragraaf 4.1. In figuur 8 is de uitvoer van deze toets opgenomen om aan te tonen of deze resultaten normaal verdeeld zijn.

Figuur 8: Uitvoer van de Shapiro Wilk test (test of Normality) om normale verdeling mee aan te tonen voor de temperatuurproef.

	Temperatuur	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
SlakkenD	27,6-32,5 graden	,750	3	,000
	32,6-37,5 graden	,750	3	,000
	37,6-42,5 graden	,750	3	,000
	42,6-47,5 graden	,750	3	,000
	47,6-52,5 graden	,750	3	,000

Figuur 8 geeft de uitvoer van de test. Net als in paragraaf 4.1 is deze toets gebruikt. De significantie van de verschillende temperaturen is bij al deze schalen 0.000. Deze waarden zijn allen lager dan de alfa van 0.05. Doordat deze waarden allemaal lager zijn is de nulhypothese verworpen. De NULHYPOTHESE hypothese was tevens dat er geen verband is tussen de resultaten van de proeven en deze normaal verdeeld zijn. Er kan dus niet worden gesproken van niet normaal verdeelde resultaten. Hierdoor is wederom de K-Independent Samples test toegepast.

Figuur 9: Uitvoer van de test van K-independent Samples voor de temperatuurproef

Test Statistics ^{a,b}	
	SlakkenD
Chi-Square	5,497
df	5
Asymp. Sig.	,358

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Temperatuur

De uitvoer van de K-independent Samples test voor de temperatuurproef is opgenomen in figuur 9. Deze toets is gebruikt om, net als voor de stoomproef, aan te kunnen tonen of er een verband is tussen de slakken behandelen met verschillende temperaturen en de sterfte onder de slakken. De

nulhypothese bij deze toets is dat er geen verband is tussen de resultaten. De significantie bedraagt 0,358 en ligt dus boven de alfa. De nulhypothese wordt bij deze aangenomen en dat geeft aan dat er geen verband is tussen de sterfte van de slakken in relatie tot de verschillende temperatuurschalen.

Tevens is van deze proef, net als in de stoomproef, bekeken welke slakken bij de lymnadeae hoorden en welke daarvan geïnfecteerd zijn. Hiervan was het resultaat dat 20 van de 90 slakken Galba Truncatula slakken waren. Deze waren geen van allen geïnfecteerd.

4.3 Resultaten stralingsproef

De laatste proef die is gedaan om de slakken te doden is de stralingsproef. Hierbij zijn steeds groepjes slakken aan verschillende tijden in de magnetron blootgesteld. De uitgebreide resultaten zijn opgenomen in bijlage 9.

De resultaten zijn ook ingevoerd in het programma SPSS net als de proeven met stoom en hete lucht. Voor de stralingsproef is ook eerst de Shapiro Wilk test uitgevoerd. Deze test heeft aangetoond dat, doordat één significantie lager is dan de alfa, de nulhypothese wordt verworpen. De nulhypothese was dat er geen verband was en de resultaten normaal verdeeld zouden zijn. Er is dus een alfa lager dan de significantie waardoor de nulhypothese wordt verworpen en de gegevens niet normaal verdeeld zijn. De significantie staat genoteerd in de uitvoer van de test welke is te zien in figuur 10.

Figuur 10: Uitvoer van de Shapiro Wilk test (test of Normality) om normale verdelingen mee aan te tonen voor de stralingsproef

	tijd	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
slakkenD	30 seconden	1,000	3	1,000
	45 seconden	,750	3	,000

In figuur 10 is te zien dat er maar 2 tijdsschalen zijn opgenomen in de test. Namelijk deze van 30 en 45 seconden. De schalen van 15 seconden en 60 seconden zijn niet opgenomen. De laatste twee genoemde schalen zijn constant volgens de toets. In bijlage 9 is te zien dat dit klopt. Bij de schaal van 15 seconden zijn steeds alle 5 de slakken blijven leven en zijn er geen dood gegaan. Bij de schaal van 60 seconden was dit andersom en bleef er geen enkele slak leven.

Figuur 11: Uitvoer van de test van de K Independent Samples voor de stralingsproef

Test Statistics ^{a,b}	
	slakkenD
Chi-Square	9,962
df	3
Asymp. Sig.	,019

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: tijd

Hierna is weer de K Independent Samples test uitgevoerd voor de stralingsproef. Deze is weergegeven in figuur 11. De NULHYPOTHESE hypothese was dat er geen verband is tussen de verschillende behandelingen. De significantie is berekend op 0.019. Dit is lager dan de alfa van 0.05. De NULHYPOTHESE hypothese wordt verworpen en er is wel een verband tussen de verschillende tijdschalen en het aantal dode slakken.

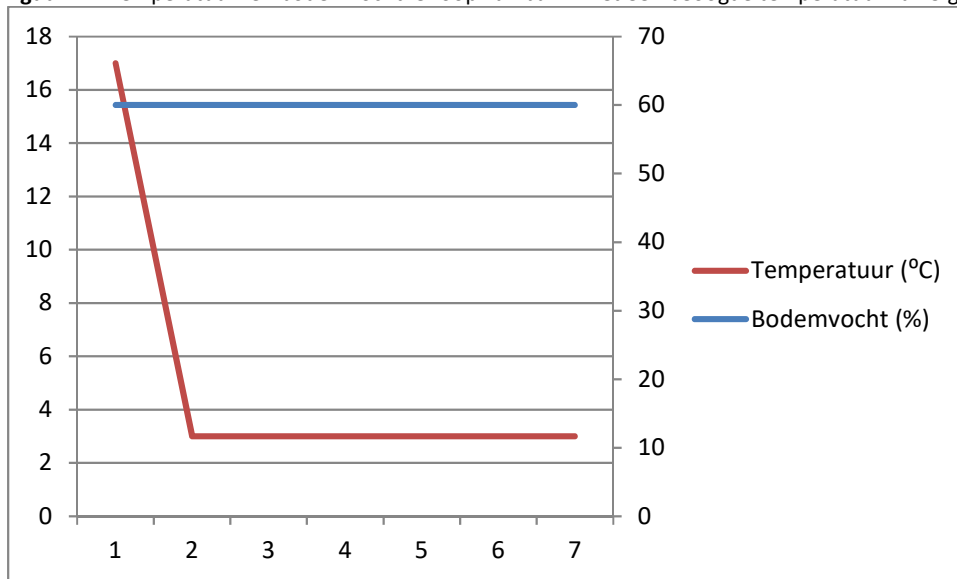
4.4 Resultaten dieptemeting

De dieptemeting is gestart op donderdag 19 november 2015 en afgerond op 26 november 2015. Deze proef had als doel om aan te tonen hoe diep de slakken in de bagger konden kruipen. De bakken zijn onder verschillende temperaturen weggezet in het donker. In deze bakken zat een laag veengrond met daarop een pol gras uit het veenland. De bakken zijn dus vrijwel gelijk opgezet, de enige variabele was de temperatuur waaronder de slakken zijn gehouden.

Met een datalogger is het bodemvocht en de temperatuur bijgehouden. Tevens is de lichtsterkte gemeten en genoteerd. Deze was bij alle bakken gelijk aan 1.3 LUX .

In de grafieken hieronder is aangegeven bij welke bak de betreffende grafiek hoort. Daarbij is op de linker schaal de temperatuur opgenomen. De rechter as geeft aan wat het percentage bodemvocht bedroeg. Onder elke grafiek is een korte toelichting gegeven op de manier waarop de gegevens geïnterpreteerd moeten worden.

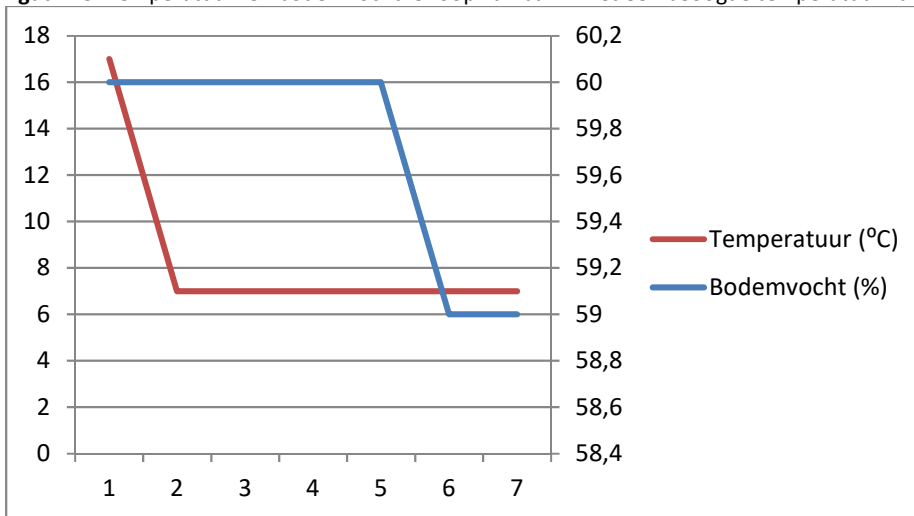
Figuur 12: Temperatuur- en bodemvochtverloop van bak 1 met een beoogde temperatuur van 5 graden Celsius



Bak 1 zou worden bewaard op een temperatuur van 5 graden Celsius. Deze bak is in een koelkast bewaard die op 5 graden Celsius zou worden afgesteld. De koelkast had een vrij grove schaalverdeling en na 24 uur bleek de temperatuur rond de 3 graden Celsius te zijn. Het bodemvocht is gelijk gebleven volgens de datalogger. De gegevens met betrekking tot de temperatuur en het bodemvocht zijn, uitgelezen vanuit de datalogger, weergegeven in figuur 12.

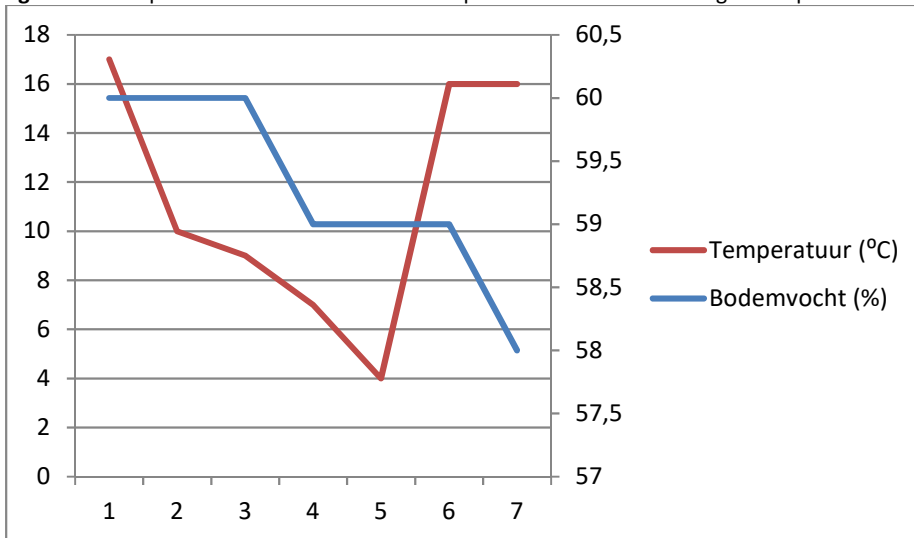
In figuur 13 is een grafiek opgenomen met gegevens over het bodemvocht en de temperatuur voor bak 2. Deze bak is bewaard bij een temperatuur van 10 graden Celsius in een andere koelkast dan waar bak 1 in stond. Deze koelkast is op de laagste stand gezet. De koelkast geeft een constante temperatuur vandaar dat voor deze bewaarmethode is gekozen. In de laagste stand was de temperatuur in de koelkast gemiddeld 7 graden Celsius. Het bodemvocht daalde tussen de 5^e en de 7^e dag van 60% naar 59%. De datalogger geeft geen decimalen aan waardoor het mogelijk is dat er voor de 5^e dag al een daling was in bodemvocht en na de 5^e dag de daling verder was dan 59%.

Figuur 13: Temperatuur- en bodemvochtverloop van bak 2 met een beoogde temperatuur van 10 graden Celsius



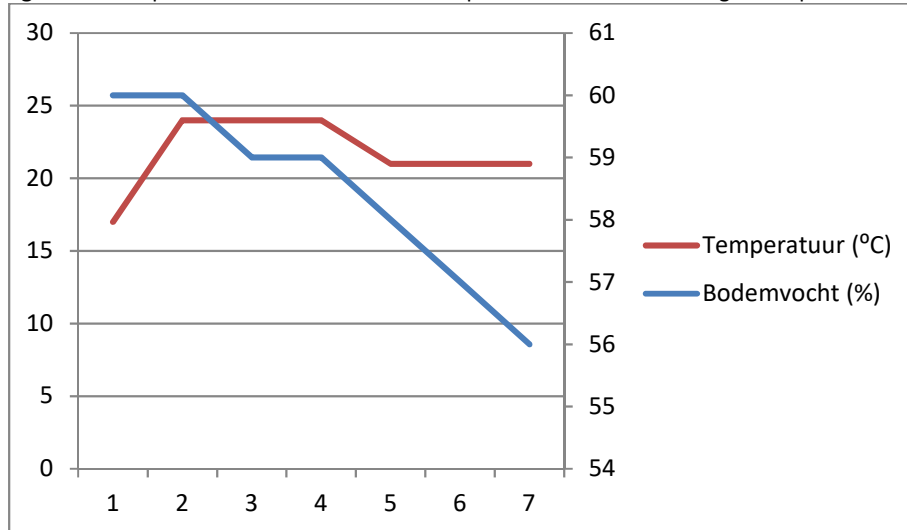
In figuur 14 is het verloop van het bodemvocht en de temperatuur weergegeven voor bak 3. Deze bak zou worden bewaard op 15 graden Celsius. Deze bak was gepositioneerd achter in de geïsoleerde proefveldruimte in het donker. Deze bak stond meer bloot aan de weersomstandigheden dan de bakken in de koelkast. De temperatuur voor deze bak is zeer wisselend verlopen. Een aantal nachten heeft het in het weekend buiten de ruimte gevoren en is de temperatuur gemiddeld gedaald. De bak is later in een onverwarmde ruimte in het kantoor geplaatst waardoor de temperatuur op 16 graden Celsius uit kwam. Het bodemvocht is in die periode gedaald met ongeveer 2 procent.

Figuur 14: Temperatuur- en bodemvochtverloop van bak 3 met een beoogde temperatuur van 15 graden Celsius



Bak 4 is in de droogstoof bewaard voor een week. Deze droogstoof is ingesteld op 20 graden Celsius. Na het weekend is gebleken dat er een kleine foutmarge zit in de temperatuurinstelling van de droogstoof waardoor de temperatuur 24 in plaats van 20 graden Celsius is geweest. Na een aantal dagen is de instelling verplaatst naar 15 graden Celsius en met de foutmarge erbij was de temperatuur in de droogstoof afgekoeld tot 21 graden Celsius. Het bodemvocht is in 7 dagen tijd gedaald van 60% naar 56%.

Figuur 15: Temperatuur- en bodemvochtverloop van bak 4 met een beoogde temperatuur van 20 graden Celsius



Het belangrijkste gegeven dat gemeten werd is de diepte die de slakken bij bepaalde temperaturen wisten te bereiken. Het resultaat van deze meting is opgenomen in bijlage 10. Tevens zijn de gegevens weergegeven in de tabellen hieronder, tabellen 6a -6c.

Tabel 6a: Aantal slakken per cm diepte voor de dieptemeting 1

Bak/diepte(cm)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabel 6b: Aantal slakken per cm diepte voor de dieptemeting 2

Bak/diepte(cm)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabel 6c: Aantal slakken per cm diepte voor de dieptemeting 3

Bak/diepte(cm)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

De tabellen 6a-6c geven aan op welke diepte de slakken zijn gevonden. Alle slakken in elke meting bevinden zich of bovenop de bagger, of in de eerste centimeter. De 0 in de tabel geeft aan dat de slak op de bagger bevindt of in de vegetatie. Alle bakken stonden in het donker, met dezelfde beginstand qua bodemvocht en proefopstelling. De enige variabele die is getoetst is de temperatuur. Elke bak is weggezet bij een verschillende temperatuur om na te gaan wat het effect is van temperatuur op de diepte die de slakken bereiken.

Deze gegevens zijn ingevoerd in SPSS net zoals met bovenstaande proeven is gedaan. De uitvoer van deze proeven staat hieronder opgenomen.

Figuur 15: Uitvoer van de Shapiro Wilk test (test of Normality) om normale verdelingen mee aan te tonen voor de dieptemeting

		Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
Diepte	5 Graden	,630	15	,000
	15 Graden	,413	15	,000
	20 Graden	,413	15	,000

De uitvoer van de test of Normality om de normale verdeling aan te tonen is weergegeven in figuur 15. Deze significanties zijn allemaal lager waardoor kan worden gesteld dat de gegevens niet normaal verdeeld zijn. De hypothese dat de gegevens normaal verdeeld zouden zijn is verworpen. Voor het aantonen van een verband tussen temperatuur en de diepte die een slak de bagger in kruipt is net als in de andere proeven de K independent Sample test gebruikt. Deze uitvoer is te zien in figuur 16.

Figuur 16: Uitvoer van de test van de K Independent Samples voor de dieptemeting

	Diepte
Chi-Square	18,057
df	3
Asymp. Sig.	,000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Temp

Figuur 16 toont aan dat de significantie 0.000 bedraagt voor de resultaten van de dieptemeting. Dit geeft dus aan dat de nulhypothese verworpen wordt. De nulhypothese was dat er geen verband was tussen de diepte die een slak in de bagger kruipt in relatie tot de temperatuur. Dit wordt aangetoond met de significantie van 0.000 omdat deze lager is dan de Alpha van 0.05. Het verband dat er is te trekken is dat de slakken bij een hoger temperatuur vaker aan de oppervlakte zit.

4.5 Resultaten infectiegraad

Na het doen van de proeven is onder de microscoop gekeken of het inderdaad ging om de Galba Truncatula. Daarnaast is geprobeerd aan te tonen of de slakken geïnfecteerd waren of niet en of deze larven nog leefden in een levende of dode slak. Na het doen van de proeven zijn geen geïnfecteerde slakken geconstateerd. Om te onderzoeken of de larven niet waren aan te tonen na het doen van de proeven zijn een 50 tal slakken uit het land geoogst. Deze slakken zijn, zonder het doen van proeven, onderzocht op infectie.

Het resultaat is opgenomen in bijlage 11. Daarbij is onderzocht of het de Galba Truncatula betreft of andere soorten. Het resultaat was dat 12 van de 50 slakken de leverbotslak Galba Truncatula was. Daarbij waren dan 38 van die 50 slakken het niet, dit waren andere soorten. Er is geen specifiek resultaat welke soorten slakken er verder zijn gevonden op de Galba Truncatula na. De infectiegraad is tevens bepaald. Het resultaat was dat er geen van alle slakken geïnfecteerd was.

Met deze informatie kan niet met zekerheid worden gezegd dat het weiland geen bron van infectie kan zijn. Het probleem is namelijk dat niet bekend is vanaf welke tijd de slakken geen larven meer in zich hebben. Misschien hebben de slakken nu geen larven meer in zich maar zijn deze al ingekapseld

aan het gras. In dit geval kan er worden veronderstelt dat er geen resultaat is om aan te tonen of een weiland besmet is.

4.6 Resultaten cyclus leverbotslak

Tijdens het uitvoeren van dit onderzoek is bijgehouden bij welke omstandigheden de slakken zijn te vinden en waar. Deze bevindingen zijn niet wetenschappelijk onderbouwd maar kunnen relevant zijn voor de praktijk en/of vervolgonderzoek.

Als eerste is bekend dat de leverbotslak in de maanden september tot oktober in het jaar 2015 veelvuldig zijn voorgekomen in het weiland van het KTC. De temperatuur gedurende deze maanden fluctueerde veel. Enige dagen was de temperatuur 20 graden Celsius en er waren dagen met een aantal graden boven het vriespunt met in de nachten vorst aan de grond. Ondanks deze fluctuaties waren de slakken elke dag te vinden. Tevens waren er dagen dat de zon veel warmte uitstraalde en dagen dat het winderig en koud was. Ook deze omstandigheden leken geen invloed te hebben op het voorkomen van de leverbotslak.

De plaats van het vinden van de slakken was elke dag vrijwel hetzelfde. De slakken waren boven op de graspollen te vinden aan het begin van de grashalmen. De leverbotslak houdt niet van alleen maar water en zoekt juist in deze maanden de droge plaatsen op. Het veen had stond op sommige plaatsen later in de maand oktober onder water en toen zijn er geen slakken meer gevonden. Het is mogelijk dat de slakken zijn weggespoeld.

Belangrijke bevinding tijdens het onderzoek was dat de slakken vaak in de ochtend in grotere getalen voorkomen dan in de middag van de dag. In de ochtend kruipen veel slakken de grashalmen in of bovenop de pollen die boven het water uit steken. Hoe later het in de middag is hoe minder goed de slakken te vinden waren aangezien deze zich dan helemaal terugtrokken tot in putjes en droge plekjes in de pollen.

4.7 Resultaten tankmelkonderzoek

Tijdens het onderzoek is een tankmelkmonster van de veestapel genomen. Dit tankmelkmonster is getest op antistoffen van leverbot. Het tankmelkmonster gaf aan dat de veestapel ernstig besmet is met leverbot. In 2015 heeft het vee op alle percelen van het KTC terrein gegraasd (Veterinair Laboratorium Groep, 2015).

5. Discussie

In dit hoofdstuk worden een aantal punten ter discussie gesteld. Voor dit onderzoek waren er te weinig soortgelijke onderzoeken waardoor er al een aantal punten niet duidelijk konden worden beschreven in het literatuuronderzoek. De proeven die zijn gedaan vallen onder een vorm van pioniersonderzoek. Vanwege deze reden en weinig soortgelijke onderzoeken zijn er steeds meer tegenstellingen of opmerkelijke resultaten boven water gekomen. Al deze tegenstellingen en discussiepunten zijn in dit hoofdstuk opgenomen.

In paragraaf 2.1.2 worden verschillende argumenten opgenoemd waarom de verspreiding van leverbot zelfs tot op de zandgronden in Limburg plaats vindt. Verschillende bronnen zoals het artikel in Landbouwtechniek en het rapport van de Wageningen Universiteit melden dat de verhoogde grondwaterstand in Nederland debet is aan het probleem (Bossaert, 2009) (Luijmes, 2014). Namens Alterra Wageningen zijn de veranderingen in de grondwaterstand vanaf het jaar 1950 tot 2000 gemonitord. Deze gegevens tonen aan dat de grondwaterstand in de zomer en in de winter gemiddeld zijn gedaald. Met deze gegevens is niet duidelijk aan te geven of de verspreiding van de leverbot direct samenhangt met de grondwaterstand (Ritsema, et al., 2012). Het is mogelijk dat na het jaar 2000 de grondwaterstanden degelijk zijn gestegen. Hierover zijn geen gegevens bekend dus kan er geen conclusie worden getrokken. Tevens wordt, in dezelfde paragraaf, een toelichting gegeven op het overzichtskaartje van het aantal leverbotbesmettingen in Nederland. Zo is een infectie aangetoond middels mestmonsters, bloedmonster, sectie op kadavers en tankmelkuitslag. De tankmelkuitslag zegt niet het juiste in alle gevallen. Indien er maar een aantal koeien besmet zijn en positief testen op dierniveau kan de tankmelk een negatieve uitslag laten zien. Dat kan dan doordat er maar een zeer klein deel van de melkgevende dieren zijn besmet en het aantal antilichamen zodanig wordt verdund in de melktank dat het niet meer is aan te tonen. Dit verschijnsel komt vaker voor, ook bij andere ziekten zoals Salmonella (Hofste, 2010) (Hage, 2013).

In paragraaf 2.1.3 is uitgelegd welke soorten slakken tussengastheer kunnen zijn van de leverbot. In tal van landen komen andere slakken voor die de belangrijkste gastheer zijn. Onderzoeken uit het buitenland tonen dit ook aan (Caron, Lasri, & Losson, 2007) (Caron, Martens, Lempereur, Saegerman, & Losson, 2014) (Copeman & Copland, z.j.) (Hunuvo, et al., 2012) (Novobilský, Kasny, Beran, Rondelaud, & Höglund, 2013). Kanttekening daarbij is dat in het lab vele betere resultaten zijn behaald dan in de praktijk. Het is in Nederland niet duidelijk in welke maten andere soorten dan de *Galba Truncatula* voorkomen en bijdragen aan de ontwikkeling van de leverbot. Er wordt verondersteld dat de *Galba Truncatula* de belangrijkste gastheer is in landen met een gematigd zeeklimaat (Neijenhuis, Verkaik, Verwer, Smolders, & Wagenaar, 2014) (Moll, 2015).

In paragraaf 2.2 worden verschillende onderzoeken aangehaald over de verliezen en kosten die een leverbot infectie met zich mee brengt. Uit Amerikaans onderzoek blijkt dat de tussenkalftijd gemiddeld met 20 dagen toeneemt (Dobbs, 2013) (Suce & Zadoks, 2013). Uit Vlaams onderzoek komt een toename van de tussenkalftijd van 4.7 dagen, afgerond vijf dagen en een daling van de vetpercentages in melk van gemiddeld 0.06% (Armstrong, 2014). Het verschil van 15 dagen is zeer groot. Er is geen redenen gegeven waarom de tussenkalftijd in het Amerikaanse onderzoek veel verschilt ten op zichten van het onderzoek dat in België is uitgevoerd. Tevens is niet terug gevonden in andere bronnen of het inderdaad klopt of de daling van het vetpercentage inderdaad 0.06% is en of dat komt door de leverbotinfectie.

Er worden verschillende methoden genoemd die bijdragen aan het verminderen van de kans op een leverbotinfectie. Dit staat beschreven in paragraaf 2.3. In verschillende onderzoeken wordt getracht

met loopeenden de leverbotslakken van het land te verwijderen. De onderzoekers zijn zeer positief over de gevonden resultaten. Deze conclusie is niet geheel aan te nemen omdat er geen exacte cijfers bekend zijn. De aanname dat grotere bedrijven geen toekomst zien in loopeenden kan ook niet worden bevestigd (Andel, 2013).

Daarnaast wordt in paragraaf twee beschreven dat onder andere citroenzuur en azijnzuur werkzaam tegen cysten in het gras (Martins dos Santos, 2012) (Rull & Bonsalle, 2014). Twee onderzoeken beweren dat de slagingskans met een behandeling van azijn 100% is tegen ingekapselde cysten. In een ander onderzoek wordt beweerd dat azijnzuur niet voldoende effect heeft tegen de cysten in het gras (Anses, 2011). Daarnaast is de optie kaliumpermanganaat niet milieuvriendelijk en kan in Nederland niet worden gebruikt als optie om de leverbot te bestrijden (Sigma, 2012).

Het hoofdstuk Materiaal en Methodes geeft een beschrijving hoe de proeven zijn uitgevoerd. Daarbij is in paragraaf 3.10 de betrouwbaarheid opgenomen. De betrouwbaarheid van de verschillende proeven kan niet worden berekend zoals staat uitgelegd in paragraaf 3.10. De aantallen slakken die worden gebruikt geven wellicht geen representatief beeld en zijn niet betrouwbaar genoeg. De literatuur geeft geen informatie waaruit de betrouwbaarheid uit kon worden afgeleid.

Bij het doen van de proeven zijn een aantal factoren van invloed geweest die ter discussie kunnen worden gesteld. Vanwege het in de praktijk zo moeilijk vinden van leverbotslakken (*Galba truncatula*), is uitgeweken naar het uitvoeren van proeven op andere soorten slakken. Wel was de eis dat het formaat hetzelfde was als de leverbotslak. Er is over verschillende slakkensoorten niet bekend of de ene soort beter warmte kan verdragen dan andere soorten. Het kan dus voorkomen dat de resultaten van nu geen representatief beeld geven van de effectiviteit van de warmte tegen de leverbotslak (*Galba truncatula*).

Daarnaast is tijdens het doen van de stoomproef en temperatuurproef de temperatuur gemeten met een thermometer. Deze meter stak door de sleuf heen. Het bleek dat tijdens het uitvoeren van de proef de temperatuur niet constant was. De onderzoeker heeft een gemiddelde genomen, dit is niet helemaal betrouwbaar. Het kan bijvoorbeeld zo zijn dat een serie slakken 30 graden Celsius maximaal mocht ondervinden. Het gemiddelde kan dat best zijn geweest maar pieken van bijvoorbeeld 32 graden Celsius konden ook voorkomen. Deze fluctuaties kunnen het effect van de behandeling hebben beïnvloed. Wel was de temperatuur met de temperatuurmeting constanter. Als laatste was er de invloed van de grootte van de slakken. Er werd, voor het oogsten van de slakken begon, een criterium gesteld dat de slakken ongeveer even groot moesten zijn als de leverbotslak. De leverbotslak (*Galba truncatula*) heeft een afmeting van ongeveer 1-7 mm. Tijdens de proef zijn slakken verzameld van 1 en sommige van 7 mm. De testgroep was niet homogeen qua formaat. Het effect van de stoom kan meer effect hebben gehad op de kleine slakken dan op de grotere slakken. Daarnaast bezitten verschillende groepen slakken wel een afdekplaatje en andere slakken dan weer niet. Hitte en stoom kunnen door dik afdekplaatje worden buitengehouden waarschijnlijk. Het effect op de slakken zonder afdekplaatje ten opzichte van slakken met afdekplaatje is niet aangetoond.

De proef waarbij de slakken werden blootgesteld aan de straling van de magnetron blijkt afdoende te werken. Discussiepunt daarbij is wel dat het principe van de magnetron niet gemakkelijk is toe te passen in de praktijk. Er moet in het land namelijk een kooi van Faraday gemaakt kunnen worden wat niet eenvoudig is. In de magnetron is het effect groot maar of deze methode voor grootschalig gebruik haalbaar is, is de vraag.

De laatste proef was de dieptemeting proef. Deze proef heeft volgens de statistiek aangetoond dat er een verband te vinden is tussen de diepte die een slak de bagger in kruipt en de temperatuur boven de grond. Volgens de statistiek is dit een verband. Hoe hoger de temperatuur hoe meer slakken boven de grond kruipen. Tijdens het meten van de diepte is elke keer een centimeter bagger van de pol afgesneden en uitgespoeld op de aanwezigheid van slakken. De nauwkeurigheid of de slak net boven de grond zat of net eronder luisterde heel nauw. In SPSS was de slak of een centimeter diep of

boven op de bagger waardoor het verband kon worden aangetoond. Als er op millimeters zou worden gekeken zou dit verband er misschien niet zijn. De diepte is niet nauwkeurig genoeg gemeten omdat de praktijk het niet toe laat met het formaat van de slak.

Na de uitvoeren van de proeven is elke slak bekeken onder de microscoop. Daarbij werd vastgesteld of het de *Galba Truncatula* was of niet. Na het determineren werd de slak geplet en bekeken onder de microscoop of er een eventuele larve van de leverbot te zien was. Tijdens het bekijken van de slakken bleek het lastig te zien of het de *Galba Truncatula* betrof of dat het andere soorten waren. Van slakken die het misschien niet waren is geen onderzoek gedaan naar een infectie van de slak. Misschien waren het wel slakken, niet onder de naam *Galba Truncatula*, waarbij geen bewijs dat andere slakken besmet kunnen wezen met leverbot omdat dit niet is onderzocht.

Daarnaast waren een aantal van de slakken, die gebruikt zijn tijdens de proef, dood toen deze werden bekeken onder de microscoop. Er is geen literatuur bekend over hoe lang de slakken zouden kunnen overleven onder laboratorium omstandigheden en of de larven in de slakken nog leven als de slak dood is en hoe lang dat dan is. De slakken die nog leefden toonden geen infectie aan en de slakken die nog leefden ook niet.

De proef over de infectiegraad van het grasland liet zien dat er geen van alle leverbotslakken besmet waren met een larve. In de resultaten is vermeld dat het mogelijk is dat er al wel besmettelijke cysten zouden zijn afgezet in het grasland.

Op de percelen die zijn onderzocht heeft in het jaar 2015 vee gelopen. Deze veestapel is onderzocht door middel van een tankmelkmonster op een leverbotinfectie. Dit tankmelkmonster gaf aan dat de veestapel ernstig besmet is met leverbot. Dit geeft aan dat er inderdaad een infectiebron is, namelijk het grasland waar ze dat jaar en het jaar daarvoor op gelopen hebben. Deze weilanden zijn onderzocht en gaven geen infectie aan. De mogelijkheid dat de cysten al zijn afgezet is mogelijk. De tweede mogelijkheid is dat er geen najaarsbesmetting maar juist een voorjaarsbesmetting voorkomt. Tot op heden wordt voornamelijk gesproken van een najaarsbesmetting maar door de relatief warme winters van de laatste jaren blijven veel ingekapselde cysten leven en worden van het voorjaar opgenomen door het vee. Dit zou kunnen verklaren waarom de slakken nu geen infectie aan tonen, indien dit in het voorjaar was onderzocht had dat het misschien wel uitgewezen.

6. Conclusie

Het hoofdstuk conclusie geeft overzichtelijk aan welke conclusies zijn getrokken tijdens dit onderzoek. Daarbij worden conclusies uit de literatuur getrokken maar ook uit de gegevens en resultaten die zijn gedaan tijdens het doen van de proeven. Deze conclusie geeft tevens een antwoord op de hoofdvraag dat de leidraad was voor het doen van dit onderzoek. Als laatste is nog een conclusie getrokken uit de verschillende discussiepunten die zijn opgesteld.

Als eerste is onderzocht hoe de levenscyclus van de leverbot en de leverbotslak eruit zien. De leverbot doorloopt een cyclus waarbij de leverboteieren in de mest op het land uitkomen. Deze veranderen in trilhaarlarven en infiltreren de leverbotslak, de *Galba Truncatula*. De staartlarven ontwikkeld een veelvoud aan staartlarven welke uit de slak kruipen en zich inkapselen aan grashalmen.

Ten tweede is onderzocht bij welke dieren de schade het meeste voorkomt en hoe groot deze schade is. De conclusie is dat schade bij alle diergroepen voorkomt, wel is er een verschil. Jongvee ondervindt schade in de zin van verminderde groei. Melkvee produceert door een infectie minder melk per dag en de samenstelling kan veranderen. Ook het melkvee groeit minder hard en de kans op *Salmonella* infecties nemen toe. De kosten worden geschat op 4000-5000 euro maar kan oplopen tot 10.000 euro.

Om infectie te bestrijden zijn een aantal methoden. De middelen Fasinex, Tribex, Endex, Flukiver en Ivomec plus mogen gebruikt worden in de eerste helft van de dracht. Via de cascadereregeling mag Albex of Zanyl gebruikt worden. Naast medicijnen zijn een betere afwatering van het land, gebruik van loopeenden, greppels in de zomer frezen en greppels afzetten voor vee een maatregel om infecties terug te dringen.

Voor het bestrijden van de leverbot zijn proeven gedaan met stoom, hete lucht en straling. Er is geen verband tussen het aantal dode slakken en de verschillende behandelingen met stoom en/of hete lucht. Behandelingen van stoom of hete lucht in schalen van 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C en 50°C blijken niet afdoende te werken. Er is wel een verband tussen het aantal dode slakken en de tijd van straling in een magnetron, bij een tijdsduur van 45 seconden zijn praktische alle slakken dood. De proef van de dieptemeting wees uit dat er geen verband was en naarmate de temperatuur hoger was er geen verschil was in het aantal slakken aan de bovenkant van de bagger.

Tijdens dit onderzoek zijn een aantal punten ter discussie komen te staan. De grondwaterstanden zijn tot het jaar 2000 niet gedaald terwijl het dalen van de grondwaterstanden een maatregel is tegen de leverbotinfectie. Daarnaast is het aantal infecties van leverbot in Nederland tot het jaar 2015 gestegen.

Een ander punt dat ter discussie staat is dat er nog te weinig kennis is over de leverbot. Zo is veel informatie niet bekend over de leverbotslak zoals het aantal per hectare, in welke tijd een infectie is aan te tonen bij de slakken en onder welke omstandigheden deze slakken te vinden zijn. Tevens is tijdens het doen van het onderzoek gebleken dat de maatregelen zoals loopeenden en karteren misschien niet genoeg bijdragen aan het voorkomen van infectie.

Het belangrijkste discussie punt is dat er voor de proeven verschillende soorten slakken zijn gebruikt die anatomisch gezien verschillend in elkaar zitten. Het effect van de behandeling kan verschillen door het gebruik van de verschillende slakkensoorten.

Als laatste kon niet nauwkeurig genoeg worden gemeten hoe diep de slak de bagger in zou kruipen. Er is een verband aangetoond maar niet wat er verwacht kon worden. De bedoeling was dat de slakken ook het diepste punt bereikten wat mogelijk was.

7. Aanbevelingen

Het hoofdstuk aanbevelingen volgt na de conclusies die in dit rapport zijn opgenomen na het uitvoeren van de onderzoeken. De aanbevelingen geven aan op welke onderzoeksvragen nog geen antwoord is gevonden. Daarnaast zijn er een aantal punten tijdens het uitvoeren ter discussie. De discussie punten zijn tegenstellingen die in het onderzoek naar voren zijn gekomen en eventueel ook verder onderzocht dienen te worden. Het (pioniers)onderzoek dat is uitgevoerd zorgden voor meer vragen omdat er nog veel onduidelijkheid is. De grootste vragen zijn opgenomen in dit hoofdstuk waarbij het belangrijk is om een antwoord op te vinden.

In het literatuuronderzoek is de reden gegeven dat de kans op leverbot toeneemt omdat de grondwaterstanden zijn verhoogd. Volgens documenten van Alterra zijn de grondwaterstanden tot het jaar 2000 zijn gedaald. Na het jaar 2000 zijn er geen gegevens bekend. Om bewijs te hebben, of inderdaad de toename van leverbot afhangt van verhoogde grondwaterstanden, moeten de gegevens van de laatste jaren over de grondwaterstand tegen het licht worden gehouden. Misschien is de leverbot problematiek niet aan de grondwaterstanden te wijten en worden in de praktijk veel kosten gemaakt terwijl de oorzaak niet aan wordt gepakt.

Na het uitvoeren van het onderzoek is de conclusie getrokken dat het stomen of het verhitten van de slakken met warme lucht niet genoeg effect heeft. Daarbij is dezelfde behandeling niet uitgetoetst op de cysten van de leverbot. In de literatuur is aangegeven dat de overlevingskansen van de slakken en de cysten boven de 25 graden Celsius nagenoeg 0 is. Uit de proeven is gebleken dat de slakken niet dood gaan bij een temperatuur van boven de 25 graden Celsius. In vervolg onderzoek is het belangrijk om deze behandelingen toe te passen op de cysten. Indien de cysten wel blijken dood te gaan bij 25 graden Celsius met stoom of hete lucht dan is de toepassing in de praktijk nog steeds te realiseren.

De stoommethoden blijken niet afdoende te werken. Tijdens het uitvoeren van het onderzoek zijn er een aantal nieuwe ideeën bedacht. Zo kan er worden onderzocht of de slakken en/of cysten dood gaan met CO₂ gas. In vervolgonderzoek naar de bestrijding van de leverbotslakken kunnen deze ideeën een basis vormen voor nieuwe bestrijding die daarbij ook in de praktijk relatief eenvoudig zijn te realiseren.

Voordat de proef begon was het ook de bedoeling om te kijken indien een slak geïnfecteerd was of deze na behandeling nog een levende larve of een dode larve in zich had. Dit kon niet worden onderzocht omdat geen van alle slakken geïnfecteerd waren.

Indien er een vervolg onderzoek komt met behandeling van stoom en/of hete lucht is het belangrijk om dit mee te nemen. Daarbij is het belangrijk een populatie slakken te nemen waarbij de kans groot is dat deze besmet zijn. Dit kan worden getoetst door weer 50 slakken eerst op infectie te bekijken zonder ze te behandelen.

Bij volgende proefopzetten kan er dan wel onderzoek worden gedaan of het klopt dat de slakken leven en de larven in de slak dood gaan. Indien dit zo is kan namelijk worden nagedacht om de bestrijding in de praktijk te testen. De slakken zouden dan blijven leven en de larven zouden dood gaan. Op deze manier zou de biodiversiteit minder worden aangetast dan als alle slakken zouden worden vernietigd.

Gedurende het uitvoeren van dit onderzoek zijn een aantal gesprekken gevoerd met melkveehouders, bedrijfsbegeleiders, adviseurs en derden die rond een veehouderij bedrijf actief zijn. De kennis omtrent leverbot en de maatregelen om infecties te voorkomen is onder veehouders relatief laag. Het is belangrijk om dit kennis niveau te verhogen en zo toch meer bestrijdingsmethoden grootschalig in de praktijk te kunnen testen. Meer kennisverspreiding van onderzoeksinstituten en adviesbureaus zou kunnen werken.

Bibliografie

- Al-Nakeeb, N., & Habaska, F. (2013). The relationship between Salmonella infection and liver fluke infestation in slaughter sheep. *Journal of Vet. Med. Sci*, vol. 12, no 2, pp 1-6.
- Andel, J. v. (2013). *Leverbot bestrijden met loopeenden*. Provincos schapen adviesgroep.
- Andel, J. v. (2015). *Biologische controle leverbotstek met loopeenden*. Provincos schapen adviesgroep.
- Anses. (2011). *Fasciola hepatica*. Frankrijk: French agency for food, environmental and occupational health & safety.
- Armstrong, D. (2014). *Liver fluke in cattle – costs and control*. Engeland: Pfizer Animal Health.
- Asselt, R. v. (2015). *René van Asselt Ontwerp en Illustratie*. Opgeroepen op september 7, 2015, van www.renevanasselt.nl: <http://www.renevanasselt.nl/>
- Ballweber, L. (2014). *Fasciola hepatica in Ruminants*. Opgeroepen op September 10, 2015, van [www.merckvetmanual.com](http://www.merckvetmanual.com/mvm/digestive_system/fluke_infections_in_ruminants/fasciola_hepatica_in_ruminants.html): http://www.merckvetmanual.com/mvm/digestive_system/fluke_infections_in_ruminants/fasciola_hepatica_in_ruminants.html
- Boerderij. (2015). Marktcijfers. *Boerderij*, pp 81.
- Boray, J. (2007). *Liver fluke disease in sheep and cattle*. NSW Department.
- Boray, J. (2015). *Fluke costs more than \$100 million. The FlukeKill programme increases production*. Virbac Animal Health.
- Bossaert, P. (2009, Januari 16). Leverbot bij herkauwers. *Landbouw&Techniek*, pp. pp16-17.
- Braga, F., Aruajo, J., Campos, A., Aruajo, J., Carvalho, R., Silva, A., et al. (2008). *In vitro evaluation of the action of the nematophagous fungi Duddingtonia flagrans, Monacrosporium sinense and Pochonia chlamydosporia on Fasciola hepatica eggs*. Sience Business Media B.V.
- Brugse Ommeland en Meetjesland. (2013). *Epidemiologie van leverbot*. Brugge: Meetjesland.
- Caron, Y., Lasri, S., & Losson, B. (2007). Fasciola hepatica: An assessment on the vectorial capacity of Radix labiata and R. balthica commonly found in Belgium. *Veterinary Parasitology*, pp 95-103.
- Caron, Y., Martens, K., Lempereur, L., Saegerman, C., & Losson, B. (2014). *New insight in lymnaeid snails (Mollusca, Gastropoda) as intermediate hosts of Fasciola hepatica (Trematoda, Digenea) in Belgium and Luxembourg*. Parasites & Vector.
- Charlier, J., Soenen, K., Roeck, E. D., Hantson, W., Dudcheyne, E., Coillie, F. V., et al. (2014). *Longitudinal study on the temporal and micro-spatial distribution of Galba truncatula in four farms in Belgium as a base for small-scale risk mapping of Fasciola hepatica*. Parasites & Vectors.
- Copeman, D., & Copland, R. (z.j.). *Importance and potential impact of liver fluke in cattle and buffalo*. Australia: Australian Government.

- Cuijpers, W., Bokhorst, J., Koopmans, C., Voogt, W., & Zoon, F. (2005). *Bodem en Bemesting*. Biokas.
- Dargie, J. (1987). The impact on production and mechanisms of pathogenesis of trematode infections in cattle and sheep. *International Journal of Parasitology*, vol 17, no 2, pp 453-463.
- De Gezondheidsdienst voor Dieren. (2012). *Leverbotcyclus*. Deventer: De Gezondheidsdienst voor Dieren.
- De Gezondheidsdienst voor Dieren. (2013). *Aanpak leverbot op melkveebedrijven met een salmonella-infectie*. Deventer: De Gezondheidsdienst voor Dieren.
- De Gezondheidsdienst voor Dieren. (2015). *Aanpak worminfecties weidegang*. Opgeroepen op Oktober 12, 2015, van www.gddiergezondheid.nl: <http://www.gddiergezondheid.nl/worminfecties>
- De Gezondheidsdienst voor Dieren. (2015). *Salmonella-aanpak*. Opgeroepen op Oktober 02, 2015, van www.gddiergezondheid.nl: <http://www.gddiergezondheid.nl/producten%20en%20diensten/producten/rundvee/salmonella-aanpak>
- De Gezondheidsdienst voor Dieren. (z.j.). *GD Tankmelk Leverbot*. Deventer: De Gezondheidsdienst voor Dieren.
- Delta. (1995, Oktober 15). Er is iets gek met water. *Onafhankelijk Universiteitsblad van de Technische Universiteit Delft*, 1, vol. 2, num. 31.
- Dias, A., Aruajo, J., Braga, F., Aruajo, J., Puppini, A., Fernandes, F., et al. (2011). *Biological control of Fasciola hepatica eggs with the Pochonia chlamydosporia fungus after passing through the cattle gastrointestinal tract*. Springer.
- Dias, A., Aruajo, J., Puppini, A., & Perboni, W. (2013). *Pochonia chlamydosporia in the biological control of Fasciola hepatica in cattle in Southeastern Brazil*. Berlijn: Springer.
- Dierenartsenpraktijk landsmeer. (2015). *Leverbot*. Opgeroepen op Oktober 02, 2015, van www.dierenartsenpraktijklandsmeer.nl: <http://www.dierenartsenpraktijklandsmeer.nl/landbouwhuisdieren/koeien/leverbot.html>
- Dierenhospitaal Visdonk. (z.j.). *Leverbot*. Visdonk: Dierenhospitaal Visdonk.
- Diergeneeskundigcentrum. (2015). *Leverbot*. Opgeroepen op September 10, 2015, van www.diergeneeskundigcentrum.nl: <http://www.diergeneeskundigcentrum.nl/wormen-bij-schaap-en-geit/leverbot>
- Dobbs, M. (2013). Challenges in fluke control. *Veterinary Times*, pp 1-3.
- Farm Skills. (2014). Liver fluke in cattle. *Parasitic Diseases*, pp 1-2.
- Ferreira, M. (2012). Liver fluke on the increase in South Africa. *Farmers Weekly*, pp 1-2.
- FIDIN. (2015). *Repertorium > QP Anti-parasitaire middelen > QP52 Anthelmintica > QP52B Anthelmintica tegen trematoden (leverbot)*. Opgeroepen op Oktober 12, 2015, van

www.FIDIn.nl: [http://www.fidin.nl/Repertorium/Repertorium/QP-Anti-parasitaire-middelen/QP52-Anthelmintica/QP52B-Anthelmintica-tegen-trematoden-\(leverbot\)](http://www.fidin.nl/Repertorium/Repertorium/QP-Anti-parasitaire-middelen/QP52-Anthelmintica/QP52B-Anthelmintica-tegen-trematoden-(leverbot))

FIDIN. (2015). *Triclabendazolen*. Den Haag: FIDIN.

FIDIN Repertorium. (2015). *Flukiver Combi*. Den Haag: FIDIN.

Foreman, J. (2014, Augustus). *Overview of Hepatic Disease in Large Animals*. Opgeroepen op September 21, 2015, van www.merckvetmanual.com:
http://www.merckvetmanual.com/mvm/digestive_system/hepatic_disease_in_large_animals/overview_of_hepatic_disease_in_large_animals.html

Gezondheidsdienst voor Dieren. (2015). *Veelgestelde vragen over leverbot*. Opgeroepen op september 10, 2015, van www.gddiergezondheid.nl:
<http://www.gddiergezondheid.nl/producten%20en%20diensten/producten/leverbot/veelgestelde-vragen-over-leverbot>

Hage, H. (2013). Resultaten GD Tankmelk IBR proefabonnement. *GD Veterinair*, pp 3.

Het schaap. (2013). *Op zoek naar leverbotlakken*. Het schaap.

Hofste, G. (2010). *Risicofactoren voor een langdurige salmonella antilichaam positieve tankmelk*. Utrecht: Gezondheidszorg Landbouwhuisdieren, Universiteit Utrecht.

Hourdin, P., Vignoles, P., Dreyfuss, G., & Rondelaud, D. (2006). *Galba truncatula (Gastropoda, Lymnaeidae): effects of daily waterlevel variations on the ecology and ethology of populations living upstream from a dam*. Limoges: Facultés de Pharmacie et de Médecine.

Hunuvo, K., Kasny, M., Hampl, V., Leontovyc, R., Kubena, A., Mikes, L., et al. (2012). Radix spp.: Identification of trematode intermediate hosts in the Czech Republic. *Acta Parasitologica*, vol 273, no 83, pp 57.

Irsik, M., Courtney, C., & Richey, E. (2015). *Liver fluke control in Beef Cattle*. Florida: University of Florida.

Kaplan, R. (2015). Fasciola hepatica: a review of the economic impact in cattle and considerations for control. *Veterinary Therapeutics*, pp 40-50.

Lamers, J., & Meijer, B. (2004). *Biologische grondontsmetting- Bestrijding van bodemziekten voor een gezonde bodem*. Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

LTO Noord. (2015). Bijeenkomst Leverbot. *Terugblik bijeenkomst Leverbot* (pp. 1-2). Nigtevecht: LTO Noord.

Ludeking, D., Termorshuizen, A., Wubben, J., Wurff, A. v., Streminska, M., & Helm, F. v. (2012). *Biologische grondontsmetting met Herbie ('Bodemresetten') als alternatief voor stomen*. Wageningen: Wageningen UR.

Luijmes, R. (2014). Besmetting leverbot neemt toe. *Nieuwe Oogst*, pp 1.

- Manga-Gonzales, Y., Gonzala-Lanza, C., & Othero-Merino, B. (1991). *Natural infection of Lymnaea Truncatula by the liver fluke Fasciola Hepatica in the Porma Basin, León, NW Spain*. Spanje: Journal of Helminthology.
- Martins dos Santos, T. (2012). *Genetic characterization of Portuguese Fasciola hepatica isolates*. Portugal: University Nova de Lisboa.
- Maskey, J. (2011). *Giant liver fluke in North Dakota moose*. Noord Dakota: Department of Biology.
- McTaggart, L. (2011). *Magnetrons*. Londen: Satellite House.
- Moll, L. (2015, september 9). Leverbotinfecties in Nederland. *Natuurkundige thema's*. (z.j.). Opgeroepen op Oktober 11, 2015, van www.wetenschapentechniek.com: http://wetenschapentechniek.wikispaces.com/Natuurkundige_themas
- Neijenhuis, F., Verkaik, J., Verwer, C., Smolders, G., & Wagenaar, J. (2014). *Integrale diergezondheid: Beheersing van de leverbot*. Wageningen: Wageningen UR Livestock Research.
- Norbrook. (2011). *Closamectin Pour On Solution for Cattle*. Opgeroepen op September 10, 2015, van www.norbrook.com: <http://www.norbrook.com/products/closamectin-pour-on-solution-for-cattle/>
- Novobilský, A., Kasny, M., Beran, L., Rondelaud, D., & Höglund, J. (2013). *Lymnaea palustris and Lymnaea fuscus are potential but uncommon intermediate hosts of Fasciola hepatica in Sweden*. Parasites & Vectors.
- Olusegun Adewole, S. (2010). Prevalence and Pathology of Fasciola Species in Slaughtered Cattle. *Journal of Life Sciences*, vol 4, no 6, pp 28-31.
- Overheid.nl. (2015). *Wet Dieren*. Den Haag: Rijksoverheid.
- Philipsen, B., Eekeren, N. V., & Swormink, B. V. (2012). *Grasland Signalen*. Zutphen: Roodbont Publishers.
- Pointier, J., Nova, O., Noya, B. A., & Theron, A. (2009). *Distribution of Lymnaeidae (Mollusca: Pulmonata), intermediate snail hosts of Fasciola hepatica in Venezuela*. Rio de Janeiro: University de Perpignan.
- Poppe, Q., & Poppe, P. (2015, September 09). *Shells for Sale*. Opgeroepen op z.j., van www.conchology.be: <http://www.conchology.be/?t=33&family=LYMNAEIDAE>
- Pronk, R., Stokman, H., & Geus, Y. d. (2014). *Parasieten*. dapkrommerijstreek.
- Rana, M., Roohi, N., & Khan, M. (2014). Fasciolosis in cattle, a review. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, vol 24, no 3, pp 668-675.
- Rapsch, C., Dahinden, T., Heinsmann, D., Togerson, P., Braun, U., Deplazes, P., et al. (2008). *An interactive map to assess the potential spread of Lymnaea truncatula and the free-living stages of Fasciola hepatica in Switzerland*. Zwitserland: Elsevier.

- Ritsema, H., Heuvelink, G., Heinen, M., Bogaart, P., Bolt, F. v., Broeke, M. H., et al. (2012). *Meten en interpreteren van grondwaterstanden*. Wageningen: Wageningen UR.
- RIVM. (2015). *Antibioticaresistentie stabiel, maar meer resistente bacteriën verwacht*. Den Haag: RIVM.
- Rondelaud, D., Hourdin, P., Vignoles, P., Dreyfuss, G., & Cabartet, J. (2011). *The detection of snail host habitats in liver fluke infected farms by use of plant indicators*. Elsevier.
- Rotgers, G. (2015). Beducht op leverbot bij melkvee. *Veehouder&Veearts*, pp 18.
- Rull, G., & Bonsalle, A. (2014). *Fasciola Hepatica*. Southampton: University of Southampton.
- Salcha, A. (1991). *Liver fluke disease (fasciolosis) : epidemiology, economic impact and public health significance*. Maleisië: Department of Veterinary Pathology and Microbiology.
- Sanabria, R., Mouzet, R., Courtioux, B., Vignoles, P., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., et al. (2012). Intermediate snail hosts of French *Fasciola hepatica*: *Lymnaea neotropica* and *Lymnaea viatrix* are better hosts than local *Galba truncatula*. *Parasitology Research*, Vol 111, no 6, pp 1-6.
- Sergaent, P. (2005). *Laagfrequente magnetische afscherming van elektrische installaties*. Gent: Faculteit Ingenieurswetenschappen Universiteit Gent.
- Sigma. (2012). *Veiligheidsinformatieblad kaliumpermanganaat*. Sigma-Aldrich.
- Skuce, P., & Zadoks, R. (2013). Liver fluke – A growing threat to UK livestock production. *Cattle practice*, vol 21, no 2, pp 138-149.
- Stad & Land Dierenklinieken. (2015). *Salmonella*. Opgeroepen op Oktober 02, 2015, van www.dierenklinieken.net: <http://www.dierenklinieken.net/dieren/rundvee-salmonella.aspx>
- Sustainable Control of Parasites. (2015). *Endoparasieten*. Sustainable Control of Parasites.
- The Cattle Site. (2015). *Liver Fluke*. Opgeroepen op September 10, 2015, van www.thecattlesite.com: <http://www.thecattlesite.com/diseaseinfo/182/liver-fluke/>
- Ticheler, M. (2006). *Voedsel uit de magnetron ongezond?*
- Tromp, A. (2011). *Ontwikkeling van een serodiagnostische cathepsine B-ELISA voor de detectie van Fasciola hepatica bij het paard*. Wageningen: Wageningen UR.
- Tweede kamer der Staten Generaal. (2008-2009). *Vragen gesteld door de leden der Kamer, met de daarop door de regering gegeven antwoorden*. Den Haag: Tweede Kamer.
- Universiteit van Gent. (z.j.). *Focus op Leverbot, praktische handleiding*. Vlaanderen: Diergezondheidszorg Vlaanderen.
- Vaessen, M., Veling, J., Frankena, K., E.A.M., G., & Klunder, T. (2011). Risk factors for salmonella dublin infection on dairy farms. *Veterinary Quarterly*, vol 20, no 3, pp 97-99.

Vandenbussche, V., Jollyn, F. T., Zwaenepoel, A., Vanhecke, L., & Hoffmann, M. (2022). *Systematiek van natuurtypen voor Vlaanderen*. Vlaanderen: Ministerie van de Vlaamse Gemeenschap.

Veeteeltvlees. (2011, Oktober 25). Eerste pour-on-middel tegen leverbot én schurft. *Veeteeltvlees*, pp. 1-2.

Vliet, J. v., Vlaar, L., & Leendertse, P. (2009). *Grond onstmetting*. Culemborg: CLM Onderzoek en Advies.

Vlot, T. (2013). Elektromagnetische straling in de magnetron. *LeefNu*, 31-21.

Bijlage 1: Mogelijke leverbotslakken

In deze bijlagen zijn verschillende slakkenhuisjes te zien. Deze slakken zijn allemaal tussengastheer van de leverbot. In paragraaf 2.1.3 is te vinden wat de reden is dat deze slakken tussengastheer zijn.



Bijlage 5: Dieptemeting

Bakje:	1	2	3	4
Gemiddelde Temperatuur:				
Aantal slakken:				
Startdatum:				
Einddatum:				
Aantal slakken per diepte van 1 centimeter:				
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

Bakje:	1	2	3	4
Gemiddelde Temperatuur:				
Aantal slakken:				
Startdatum:				
Einddatum:				
Aantal slakken per diepte van 1 centimeter:				
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

Bakje:	1	2	3	4
Gemiddelde Temperatuur:				
Aantal slakken:				
Startdatum:				
Einddatum:				
Aantal slakken per diepte van 1 centimeter: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10				

Bijlage 6: Schema infectiegraad slakken

Nummer	Galba Truncatula	Overige soorten	Geïnfecteerd	Niet geïnfecteerd
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				
30				
31				
32				
33				
34				
35				
36				
37				
38				
39				
40				
41				
42				
43				
44				
45				
46				
47				
48				
49				
50				

Bijlage 7: Resultaten stoommeting

Num .	Datum	Gewenste temperatuur	Gemeten temperatuur	Aantal slakken	Duur behandeling	Tijd meten na behandeling	Slakken dood	Slakken levend	Galba Truncatula	Besmette Galba Truncatula
1	20-10-15	25°C	26.0°C	5	60 sec	24 uur	1	4	0	0
2	20-10-15	25°C	25.4°C	5	60 sec	24 uur	0	5	2	0
3	20-10-15	25°C	24.9°C	5	60 sec	24 uur	0	5	1	0
4	20-10-15	30°C	30.2°C	5	60 sec	24 uur	0	5	3	0
5	20-10-15	30°C	29.9°C	5	60 sec	24 uur	0	5	2	0
6	20-10-15	30°C	30.5°C	5	60 sec	24 uur	3	2	2	0
7	20-10-15	35°C	36.0°C	5	60 sec	24 uur	1	4	0	0
8	20-10-15	35°C	35.7°C	5	60 sec	24 uur	1	4	1	0
9	20-10-15	35°C	34.2°C	5	60 sec	24 uur	1	4	0	0
10	20-10-15	40°C	39.8°C	5	60 sec	24 uur	0	5	0	0
11	20-10-15	40°C	39.7°C	5	60 sec	24 uur	0	5	1	0
12	20-10-15	40°C	39.0°C	5	60 sec	24 uur	1	4	1	0
13	20-10-15	45°C	43.0°C	5	60 sec	24 uur	1	4	1	0
14	20-10-15	45°C	44.6°C	5	60 sec	24 uur	3	2	0	0
15	20-10-15	45°C	42.0°C	5	60 sec	24 uur	0	5	0	0
16	20-10-15	50°C	50.9°C	5	60 sec	24 uur	1	4	1	0
17	20-10-15	50°C	48.1°C	5	60 sec	24 uur	3	2	0	0
18	20-10-15	50°C	52.1°C	5	60 sec	24 uur	3	2	0	0
				90					15	0

Bijlage 8: Resultaten temperatuurmeting

Num .	Datum	Gewenste temperatuur	Gemeten temperatuur	Aantal slakken	Duur behandeling	Tijd meten na behandeling	Slakken dood	Slakken levend	Galba Truncatula	Besmette Galba Truncatula
1	21-10-15	25°C	25.4°C	5	60 sec	24 uur	1	4	0	0
2	21-10-15	25°C	25.8°C	5	60 sec	24 uur	1	4	2	0
3	21-10-15	25°C	25.7°C	5	60 sec	24 uur	1	4	1	0
4	21-10-15	30°C	31.0°C	5	60 sec	24 uur	1	4	0	0
5	21-10-15	30°C	30.4°C	5	60 sec	24 uur	1	4	1	0
6	21-10-15	30°C	30.1°C	5	60 sec	24 uur	0	5	2	0
7	21-10-15	35°C	35.7°C	5	60 sec	24 uur	1	4	0	0
8	21-10-15	35°C	34.2°C	5	60 sec	24 uur	1	4	2	0
9	21-10-15	35°C	36.0°C	5	60 sec	24 uur	2	3	2	0
10	21-10-15	40°C	39.0°C	5	60 sec	24 uur	1	4	2	0
11	21-10-15	40°C	40.7°C	5	60 sec	24 uur	0	5	2	0
12	21-10-15	40°C	39.8°C	5	60 sec	24 uur	1	4	0	0
13	21-10-15	45°C	45.9°C	5	60 sec	24 uur	2	3	3	0
14	21-10-15	45°C	43.4°C	5	60 sec	24 uur	1	4	3	0
15	21-10-15	45°C	44.7°C	5	60 sec	24 uur	1	4	2	0
16	21-10-15	50°C	49.0°C	5	60 sec	24 uur	1	4	1	0
17	21-10-15	50°C	50.1°C	5	60 sec	24 uur	2	3	0	0
18	21-10-15	50°C	48.5°C	5	60 sec	24 uur	1	4	0	0
				90					20	0

Bijlage 9: Resultaten stralingsmeting

Num .	Datum	Aantal slakken	Duur behandeling	Tijd meten na behandeling	Slakken dood	Slakken levend	Galba Truncatula	Besmette Galba Truncatula
1	11-11-15	5	15 sec	24 uur	0	5	2	0
2	11-11-15	5	15 sec	24 uur	0	5	1	0
3	11-11-15	5	15 sec	24 uur	0	5	2	0
4	11-11-15	5	30 sec	24 uur	1	4	1	0
5	11-11-15	5	30 sec	24 uur	0	5	0	0
6	11-11-15	5	30 sec	24 uur	2	3	1	0
7	11-11-15	5	45 sec	24 uur	4	1	0	0
8	11-11-15	5	45 sec	24 uur	4	1	2	0
9	11-11-15	5	45 sec	24 uur	5	0	1	0
10	11-11-15	5	60 sec	24 uur	5	0	2	0
11	11-11-15	5	60 sec	24 uur	5	0	0	0
12	11-11-15	5	60 sec	24 uur	5	0	0	0
		60					12	0

Bijlage 10: Resultaat dieptemeting

Bakje:	1	2	3	4
Gemiddelde Temperatuur:	5	8.4	11.3	21.7
Aantal slakken:	5	5	5	5
Startdatum:	19-11-15	19-11-15	19-11-15	19-11-15
Einddatum:	26-11-15	26-11-15	26-11-15	26-11-15
Aantal slakken per diepte van 1 centimeter:	5(-1 cm)	5(0 cm)	5(0 cm)	3(0 cm) 2(1 cm)
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

Bakje:	1	2	3	4
Gemiddelde Temperatuur:	5	8.4	11.3	21.7
Aantal slakken:	5	5	5	5
Startdatum:	19-11-15	19-11-15	19-11-15	19-11-15
Einddatum:	26-11-15	26-11-15	26-11-15	26-11-15
Aantal slakken per diepte van 1 centimeter:	3(0 cm) 2(1 cm)	5(0 cm)	4(0 cm) 1(1 cm)	5(0 cm)
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

Bakje:	1	2	3	4
Gemiddelde Temperatuur:	5	8.4	11.3	21.7
Aantal slakken:	5	5	5	5
Startdatum:	19-11-15	19-11-15	19-11-15	19-11-15
Einddatum:	26-11-15	26-11-15	26-11-15	26-11-15
Aantal slakken per diepte van 1 centimeter:				
1				
2				
3				
4	3(0 cm)	2(0 cm)	4(0 cm)	5(0 cm)
5	2(1 cm)	3(1 cm)	1(1 cm)	
6				
7				
8				
9				
10				

Bijlage 11: Resultaat infectiegraad slakken

Nummer	Galba Truncatula	Overige soorten	Geïnfecteerd	Niet geïnfecteerd
1		+		+
2		+		+
3		+		+
4		+		+
5	+			+
6		+		+
7		+		+
8		+		+
9	+			+
10	+			+
11		+		+
12		+		+
13	+			+
14	+			+
15		+		+
16	+			+
17		+		+
18	+			+
19		+		+
20		+		+
21		+		+
22		+		+
23		+		+
24		+		+
25		+		+
26		+		+
27		+		+
28	+			+
29	+			+
30	+			+
31		+		+
32		+		+
33		+		+
34		+		+
35		+		+
36		+		+
37		+		+
38	+			+
39		+		+
40		+		+
41		+		+
42		+		+
43		+		+
44		+		+
45		+		+
46		+		+
47	+			+
48		+		+
49		+		+
50		+		+
Totaal:	12	38		50

Bijlage 12: Foto's onderzoek leverbot

In deze bijlagen zijn foto's opgenomen die tijdens het doen van het onderzoek zijn gemaakt. Tevens geven deze foto's een beeld van de onderzoeksopzet. Onder de foto's staat een beschrijving van wat de foto zegt.



De potjes hierboven zijn per proef gevuld met bagger. Na het behandelen van de slakken zijn deze in een potje gestopt. Op de deksel staat een nummer. Dit nummer is opgenomen in de tabellen in bijlage 6 en 7. Elke meting van 5 slakken werd in een apart potje gestopt. Na 24 uur zijn uit elk potje de vijf slakken gehaald om te onderzoeken welke er leven of niet.



Hierboven is de stoombuis te zien die is gebruikt voor de stoomproef en voor de temperatuurmeting. Onder de buis staat een bakje met water dat op het fornuis wordt verwarmd totdat het water kookt en stoom door de buis gaat. In de buis zit een klep die zorgt dat de temperatuur wordt verlaagd door minder stoom door te laten en zo de temperatuur te halen die bij de sleuf staat vermeld. Indien de klep wordt weggehaald loopt de temperatuur ongeveer 15 graden op. Onder het karton zijn twee ventilatiesleuven te zien waardoor overtollige stoom weg kan. Het karton zorgt ervoor dat deze stoom verder van de buis wordt afgevoerd om te zorgen dat de thermometer niet wordt opgewarmd door de stoom langs de buis. Op het karton ligt een roostertje om de slakken op te stomen.



Op deze foto's zijn een tweetal verschillende potjes te zien. Nadat de slakken zijn behandeld gaan deze in een potje met een rode deksel. Deze hebben een nummer dat correspondeert met de behandeling. Na 24 uur worden de slakken uit het potje gehaald en worden ze in een wit klein potje, tevens genummerd, gestopt. In dit potje zitten ze een dag. Zo kunnen de slakken makkelijk worden gepakt om onder de microscoop te houden. Daarnaast is het aantal slakken geteld wat dood en levend is voordat deze in een wit potje worden gestopt.



Hiernaast op het beeld zijn een aantal grassprietten te zien. De vier sprietten komen van hetzelfde perceel uit de greppel. De linker twee sprietten zijn stengels met een aantal blaadjes eraan, de twee rechtse sprietten komen geven de bloeiwijze aan.

Na determinatie is vastgesteld dat het mannagras is. De greppel van het perceel waar de slakken geogst zijn staat vol met dit gras. In paragraaf 2.1.4 staat vermeld dat het mannagras een indicatorplant kan wezen voor het voorkomen van de leverbotslak.



De 3 foto's hiernaast geven een beeld van de proefopzet van de dieptemeting die is uitgevoerd. Vanwege het tijdstip van het seizoen konden de 3 metingen niet na elkaar worden uitgevoerd.

De bovenste foto geeft een beeld van de uniformiteit van de 4 bakken die zijn gebruikt. Elk met 3 vakjes met 5 slakken en één datalogger.

De tweede foto geeft een beeld in een van de bakken die zijn gebruikt. Onder in de bak ligt een 10 centimeter veengrond waarop in elke bak 3 pollen met gras zijn gedrukt. Daartussen de pollen staan plexiglas schotjes om de metingen gelijk te kunnen houden.

De derde foto geeft aan hoe de indeling van de bak is. In de middelste pol staat een datalogger die de temperatuur, bodemvocht en lichtintensiteit meet. De schotjes die de metingen scheiden van elkaar zijn ook te zien.

