

3 Eigene Untersuchungen - Material und Methoden

3.1 Versuchsanordnung

3.1.1 Untersuchungszeitraum

Die Untersuchungen fanden vom 5. Juni bis 23. September 2000 statt.

3.1.2 Beschreibung des Untersuchungsgebietes

Das Versuchsgelände befand sich im Südwesten von Berlin auf dem Gelände des Institutes für Parasitologie und Internationale Tiergesundheit der Freien Universität Berlin (Königsweg 67, 14163 Berlin).

Es handelte sich um eine Grasweide von ca. 360 m². Auf den angrenzenden Weiden wurden mehrere Schafe und Ziegen sowie ein Schwarzbuntes Rind und zwei Schottische Hochlandrinder gehalten. Vor Versuchsbeginn wurde die Versuchsfläche ebenfalls als Viehweide genutzt. Im Norden grenzte die Weide an eine dichte Hecke. 20 m südlich des Untersuchungsgebietes befanden sich ebenfalls mehrere Weiden, auf denen ständig ca. 20 Schottische Hochlandrinder gehalten wurden.

Auf der Versuchsweide wurden vor Versuchsbeginn 90 Auslagestellen für Dungfladen so gewählt, dass sie jeweils einen Abstand von 2m hatten. Die Auslagestellen wurden mit Holzstäbchen markiert.

In Abbildung 3.1.2 ist der Lageplan der Versuchsweide dargestellt.

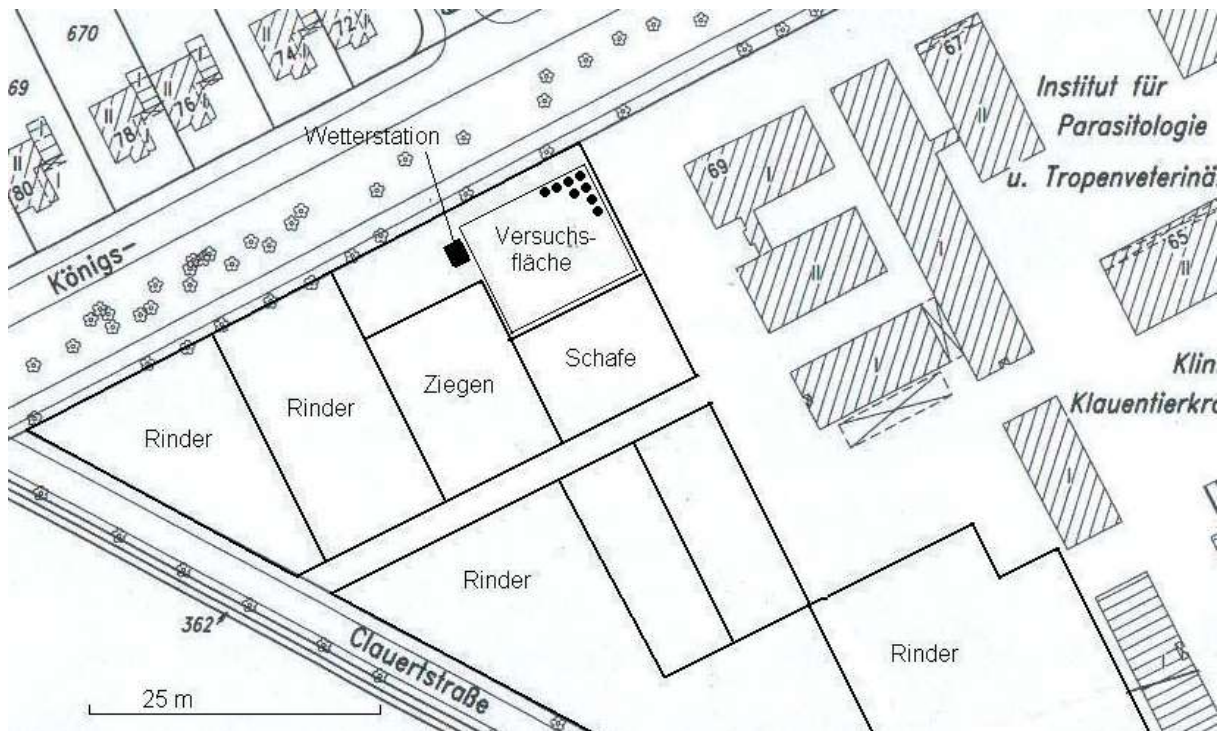


Abb. 3.1.2: Lage der Versuchsweide (Quelle: Bauordnungsamt Bezirksamt Berlin Steglitz-Zehlendorf und eigene Zeichnung)

3.1.3 Tiermaterial

Bei den Rindern, die zur Entnahme der Kotproben herangezogen wurden, handelt es sich um 20 weibliche Tiere der Rasse "Deutsche Schwarzbunte" des Instituts für Fortpflanzung der FU Berlin. Alle Tiere standen im Ausbildungsstall der FU in Anbindehaltung. Sie wurden unmittelbar vor diesem Versuch nicht mit Anthelminthika behandelt.

Auch wurde sichergestellt, dass während des Untersuchungszeitraumes die Tiere mit keinen anderen Medikamenten behandelt werden, die über den Kot ausgeschieden werden könnten.

Vor Versuchsbeginn wurde eine semiquantitative koproskopische Untersuchung auf Magen-Darm-Würmer, Lungenwürmer und Leberegel durchgeführt, um den Ist-Status zu ermitteln. Die Ergebnisse dieser Untersuchung gibt Tabelle 3.1.3 wieder.

Tab. 3.1.3 Kotuntersuchung der Versuchstiere am 26. 5. 2000

Tier-Nr	Flotation	Sedimentation	Larvenauswander- Verfahren	Gruppen- zuordnung
0015	-	-	-	KO
0016	-	-	-	IV
0017	MDW +	-	-	KO
0018	-	-	-	KO
0019	Strong. +	-	-	KO
0030	-	-	-	IV
0031	-	-	-	IV
0047	MDW +	-	-	IV
0048	MDW +	-	-	DO
0050	-	-	-	DO
0051	-	-	-	DO
0053	MDW +	-	-	EP
0054	-	-	-	MO
8117	-	-	-	MO
9095	-	-	-	EP
9114	-	-	-	DO
9118	-	-	-	EP
9137	MDW +	-	-	MO
9145	-	-	-	MO
123363	-	-	-	EP

- 0 Eier (entspricht keinem Befall)
+ 1 – 10 Eier (entspricht geringgradigem Befall)
++ 11 – 40 Eier (entspricht mittelgradigem Befall)
+++ 41 – 200 Eier (entspricht starkem Befall)

Abkürzungen: MDW = Magen-Darm-Wurm-Larven, Strong. = *Strongyloides sp.*

3.1.4 Behandlung der Tiere

Die Tiere wurden in 5 Behandlungsgruppen a 4 Tieren eingeteilt, wobei die Zuordnung mittels Losverfahren erfolgte. Die Behandlung erfolgte laut den in Tabelle 3.1.4.1 aufgeführten Kriterien.

Tabelle 3.1.4.1 Behandlung der Tiere

Gruppe	Wirkstoff/ Handelspräparat	Handelspräparat	Wirkstoff- dosierung µg/kg KGW	Medikamenten- dosierung ml/10 kg KGW
KO	unbehandelt	-	-	-
MO	Moxidectin	Cydectin 0,5 % Pour-on®	500	1
DO	Doramectin	Dectomax® 0,5 % Pour-on	500	1
EP	Eprinomectin	Eprinex Pour-on®	500	1
IV	Ivermectin	Ivomec® Pour-on	500	1

Die Dosierung der Medikamente in den behandelten Gruppen erfolgte nach KGW (Körpergewicht).

In Tabelle 3.1.4.2 sind die den Versuchstieren verabreichten Medikamentenmengen dargestellt.

Die Behandlung der Tiere erfolgte um 15.00 Uhr am 05.06.2000 nach Entnahme der Kotproben für Auslagetag 0.

Tab. 3.1.4.2: Standplatz der Tiere, Gewichte, Dosierung der Medikamente

Gruppe	Ohrmarke	Standplatz	Gewicht (kg)	Medikament	Dosis (ml)
KO	0015	2	-	unbehandelt	-
KO	0017	4	-	unbehandelt	-
KO	0018	5	-	unbehandelt	-
KO	0019	6	-	unbehandelt	-
MO	9145	21	455	Cydectin® Pour-on	45,5
MO	0054	22	464	Cydectin® Pour-on	46,6
MO	8117	24	618	Cydectin® Pour-on	61,8
MO	9137	28	596	Cydectin® Pour-on	59,6
DO	0048	11	500	Dectomax® Pour-on	50,0
DO	0050	13	520	Dectomax® Pour-on	52,0
DO	0051	14	454	Dectomax® Pour-on	45,4
DO	9114	20	550	Dectomax® Pour-on	55,0
EP	9095	30	545	Eprinex® Pour-on	54,5
EP	0053	32	535	Eprinex® Pour-on	53,5
EP	9118	35	486	Eprinex® Pour-on	48,6
EP	123363	36	560	Eprinex® Pour-on	56,0
IV	0016	3	530	Ivomec® Pour-on	53,0
IV	0030	7	600	Ivomec® Pour-on	60,0
IV	0031	8	575	Ivomec® Pour-on	57,5
IV	0047	10	460	Ivomec® Pour-on	46,0

KO = Tiergruppe "Kontrolle" (unbehandelt)

MO = Tiergruppe "Moxidectin"

DO = Tiergruppe "Doramectin"

EP = Tiergruppe "Eprinomectin"

IV = Tiergruppe "Ivermectin"

3.1.5 Materialgewinnung für die Auslage

Die Fladenauslage erfolgte jeweils an den Tagen 0 sowie 2, 5, 10, 15 und 20 nach Behandlung. Bei Entnahme der Kotproben für Auslagetag 0 waren sämtliche Tiere noch unbehandelt. Die Tiere wurden trotzdem bereits in 5 Gruppen eingeteilt und diese entsprechend der späteren Behandlung benannt.

Der Dung wurde immer zum gleichen Zeitpunkt am frühen Morgen vor dem Melken zwischen 7 und 8 Uhr entnommen. Um diese Zeit ruhten die meisten Tiere noch. Nach dem Auftreiben setzten viele Tiere spontan Kot ab. Blieb dies aus, wurde der Kot rektal entnommen. Von jedem Tier wurden je 2 Liter Dung mittels Messbecher abgemessen. Der Kot der Tiere einer Gruppe wurde in einem Eimer gesammelt und mit einem Rührmixer gründlich durchmischt. Der Kot wurde dann sofort zur Versuchsweide transportiert und hier an den zuvor markierten Auslegestellen ausgebracht, wobei die Verteilung auf die Auslegestellen mittels Losverfahren erfolgte. Pro Medikamentengruppe wurden pro Auslagetag 3 Fladen platziert. Um die spätere Probenentnahme zu erleichtern, wurde an den Auslegestellen ein Kunststoffgeflecht (50 x 50 cm, Maschenweite 0,5 cm) unter den Fladen platziert. Zum Schutz vor Vögeln wurde ein Drahtgeflecht über die Fladen gespannt. Zur Markierung der ausgelegten Fladen erhielten diese jeweils ein Schild, aus dem Gruppe, Auslagetag und Fladenummer (1, 2, 3) abzulesen waren. Während der gesamten Versuchsdauer wurde das Gras um die Kuhfladen wöchentlich geschnitten.

In Tabelle 3.1.5 sind die Termine der Auslagetage mit den dazugehörigen Kürzeln dargestellt.

Tab. 3.1.5: Daten der Fladenauslage auf die Weide

Tage nach der Behandlung	Datum der Auslage	Kürzel
0	05.06.2000	A0
2	07.06.2000	A2
5	10.06.2000	A5
10	15.06.2000	A10
15	20.06.2000	A15
20	25.06.2000	A20

Von den 3 pro Gruppe und Auslagetag platzierten Fladen dienten Fladen 1 und 2 der Probenentnahme („Entnahme-Fladen“). Fladen 3 wurde fotografisch dokumentiert („Foto-Fladen“) (in Abb. 3.1.5 grau unterlegt) .

Abbildung 3.1.5 zeigt die Verteilung der Fladen auf der Versuchsweide.

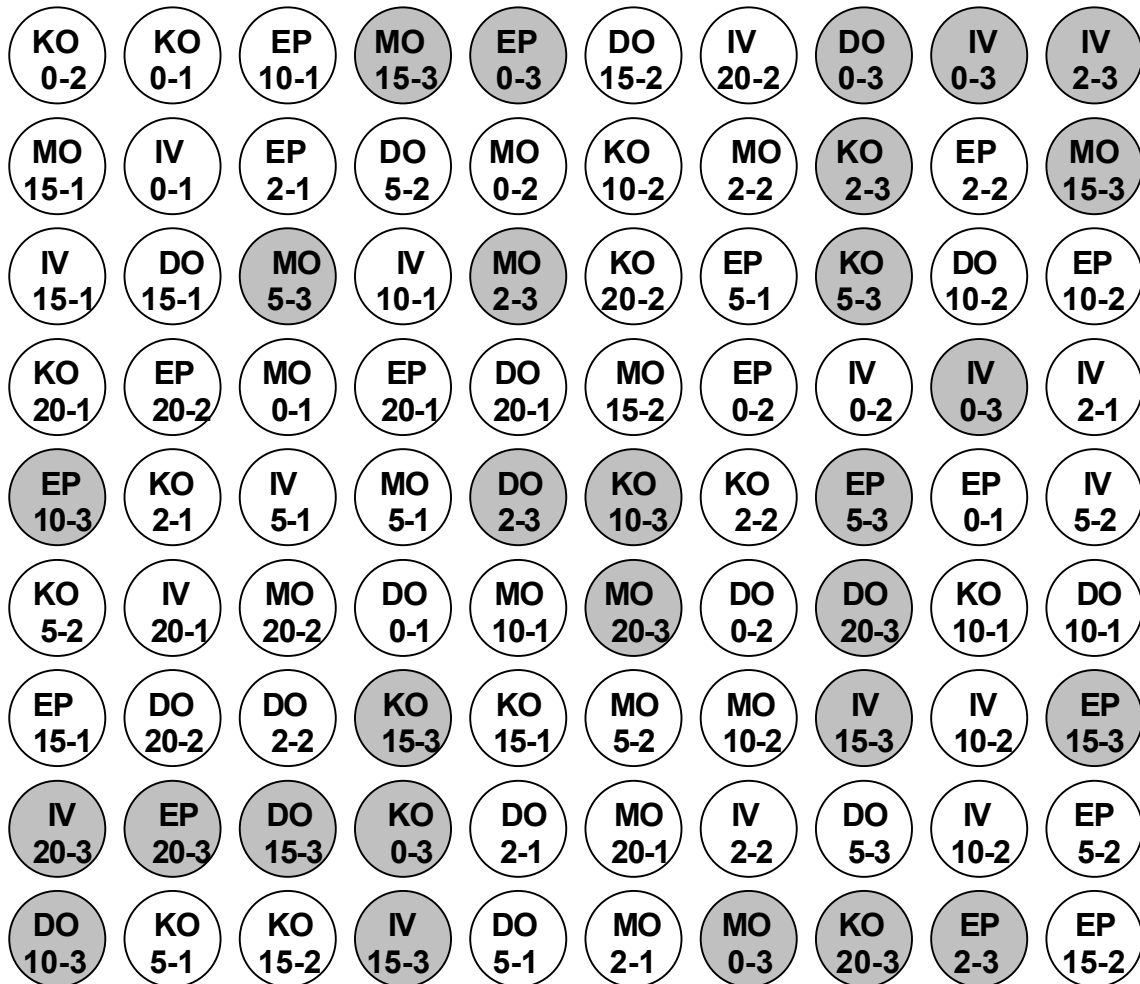


Abb.3.1.5: Verteilung der Fladen auf der Weide

3.2 Untersuchungsmaterial

3.2.1 Probenentnahme

Die Probenentnahme erfolgte an den Tagen 0, 3, 7, 14, 21, 35, 49 und 63 nach Auslage.

Am Entnahmetag 0 des jeweiligen Auslagetages wurden bereits vor Auslage auf der Weide 10 g Kot entnommen und in das Labor verbracht. An den Entnahmetagen 3, 7, 14, 21, 35, 49 und 63 wurden die Proben jeweils um 10.00 Uhr entnommen.

Dazu wurde aus je 2 Fladen pro Auslagetag und Gruppe je eine Probe in Form eines Tortenstücks aus dem Kuhfladen geschnitten. Aus der Spitze dieses Stückes wurde der Ansatz zur Nematodenzählung gewählt. Das restliche Tortenstück diente als Material für die parallel verlaufende Studie zur Bestimmung der Arthropodenfauna (SCHLUMP 2003). In der folgenden Tabelle sind die Entnahmetage beispielhaft für Auslagetag 0 mit den entsprechenden Kürzeln dargestellt.

Tab.3.2.1: Daten der Entnahmetage mit den dazugehörigen Kürzeln am Beispiel von Auslagetag 0

Tage nach der Behandlung	Datum der Entnahme (am Beispiel A0)	Kürzel
0	05.06.2000	A0 E0
3	08.06.2000	A0 E3
7	12.06.2000	A0 E7
14	21.06.2000	A0 E14
21	26.06.2000	A0 E21
35	10.07.2000	A0 E35
49	24.07.2000	A0 E49
63	07.08.2000	A0 E 63

3.2.2 Probenansatz

Die Gewinnung der Nematoden aus den entnommenen Proben erfolgte mittels Auswanderverfahren nach BAERMANN-WETZEL.

Dazu wurden 10 g des entnommenen Materials in einen BAERMANN-Trichter verbracht und dieser so weit mit Wasser aufgefüllt, dass ein breitflächiger Kontakt zur Probe bestand. Nach 24 Stunden wurden die ersten 5 ml Flüssigkeit aus dem BAERMANN-Trichter in einem Zentrifugenröhrchen aufgefangen und bei 1500 U/min 3 Minuten zentrifugiert (SCHAPER, 1989). Nach Absaugen des Überstandes bis auf 2,5 ml erfolgte der Zusatz der gleichen Menge 8 %-iger Formalinlösung zur Konservierung (Eckert, 2000).

3.2.3 Fotografische Dokumentation

Um makroskopische Unterschiede im Fladenabbau zu erfassen, wurde der dritte Kuhfladen pro Gruppe und Auslagetag einmal wöchentlich mit einer Digitalkamera (Canon C-3030 Zoom) fotografiert. Die Kamera wurde hierzu so auf ein Stativ geschraubt, dass eine Aufsicht des Fladens im Abstand von 1,2 m festgehalten werden konnte.

3.3 Untersuchungsmethoden

3.3.1 Nematodenzählung

Zur Auszählung wurde die Anzahl der Nematoden in 10 % der Probe untersucht. Dazu wurden die 5 ml wiederum zentrifugiert und 2,5 ml Überstand abpipettiert. Nach gründlicher Durchmischung wurden mittels einer Eppendorf-Pipette je 10 µl auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckgläschen bedeckt. Bei dieser Menge Flüssigkeit lagen die Würmer einzeln und konnten so besser identifiziert und gezählt werden.

Pro Probe wurden 25 Deckgläschen durchgemustert, was einer Gesamtmenge von 250 µl entspricht und die Anzahl der Nematoden in 1 g Kot wiedergeben. Insgesamt wurden 480 Proben untersucht.

3.3.2 Nematodenbestimmung

Die Bestimmung der adulten Nematoden erfolgte mittels der von SUDHAUS (2001) erstellten Übersicht, an Hand von Originalliteratur (SACHS, 1949; SACHS, 1950; OSCHKE, 1952; WEINGÄRTNER, 1955) und mit Hilfe von Bestimmungswerken (ANRASSY, 1984; BONGERS, 1988)

3.4 Meteorologische Daten

Folgende Wetterdaten wurden während des Untersuchungszeitraums erhoben:

Temperatur maximale Temperatur minimale Temperatur	▷	gemessen mittels Maximum-, Minimum -, Thermometer, dokumentiert per Aufzeichnungen
relative Luftfeuchtigkeit	▷	gemessen und dokumentiert mittels eines Thermohygrographens
Regenmenge	▷	Messung durch Regenmesser in mm/m^2

Die Thermometer und der Thermohygrograph wurden in einem Wetterhäuschen installiert, das 1m über dem Boden am Rande der Versuchsweide frei stand. Alle Wetterdaten wurden täglich um 12.00 Uhr erhoben.

3.5 Auswertung der Daten

3.5.1 Datenbearbeitung

Die tabellarische Bearbeitung der erhobenen Daten sowie die graphische Darstellung in Form von Balken- und Liniendiagrammen erfolgte mit dem Programm EXCEL 2000.

3.5.2 Auswertung des Makroskopischen Dungabbaus anhand der Fotodokumentation

Die über 14 Wochen wöchentlich gemachten Fotos wurden auf verschiedene Parameter, die den Dungabbau veranschaulichen, untersucht.

Als Kriterien dienten:

- Austrocknungsgrad der Oberfläche
- Erkennbarkeit der Fladenform
- Pflanzendurchwuchs
- Intaktheit der Fladenoberfläche (beinhaltet Aufbrechen der oberflächlichen Kruste durch Witterungseinflüsse bzw. Käfer/Regenwürmer)

3.5.3 Auswertung der Nematodenzählung

Alle adulten Nematoden sowie Larvalstadien wurden gezählt. Die Adulten wurden soweit möglich bis zur Art bestimmt. War die Bestimmung bis zur Art nicht möglich, so erfolgte die Bestimmung bis zur Gattung, für die Gattung Diplogaster dann weiter bis in die in Kapitel 2.1.2.2 beschriebenen Gruppen. Die in allen Fladen der einzelnen Behandlungsgruppen gezählten adulten Nematoden wurden den zwei großen Nematodengruppen („Spezifische Dungnematoden“ und „Bodennematoden“) zugeordnet.

Die Auswertung erfolgte nach folgenden Kriterien:

Besiedlungszahl (Ergebnisse der Nematodenzählung)

- Gesamtbesiedlungszahl über den Beobachtungszeitraum (63 Tage), berechnet für 1 Gramm Dung
- Besiedlungszahl an den Auslagetagen, berechnet für 1 Gramm Dung
für jeden Auslagetag wurde anhand der maximalen Besiedlungszahl ein Schwankungsbereich von 80 % festgelegt, der zwischen 10 % und 90 % der festgestellten Besiedlungszahl lag und verglichen

Besiedelnde Arten (Ergebnisse der Nematodenbestimmung)

- Verlauf der Artenvielfalt in den Behandlungsgruppen über den Gesamtzeitraum sowie prozentuale Verteilung der Dung- und Bodennematoden
- Verlauf der Artenvielfalt in den Behandlungsgruppen eines Auslagetages über den Beobachtungszeitraum von 63 Tagen sowie prozentuale Verteilung der Dung- und Bodennematoden

Spezielle Betrachtung ausgewählter Dungnematoden

Die Art *Rhabditis monhystera*, die *Diplogaster monhysteroides*-Gruppe und die *Stercoraria*-Gruppe wurden nochmals getrennt betrachtet, um zu sehen, ob diese in unbehandeltem Dung gehäuft auftretenden Arten bzw. Artengruppen die Beurteilung eines selektiven Effektes der Makrozyklischen Laktone ermöglichen.

Dazu wurden folgende Kriterien betrachtet:

- Gesamtindividuenzahl
- Zeitliches Auftreten der Art / Artengruppe in Dung eines Auslagetages