



PraktijkRapport 4

Kopervoorziening bij melkvee in West-Nederland



februari 2002





Colofon

Uitgever

Praktijkonderzoek Veehouderij
Postbus 2176, 8203 AD Lelystad
Telefoon 0320 - 293 211
Fax 0320 - 241 584
E-mail info@pv.agro.nl.
Internet <http://www.pv.wageningen-ur.nl>

Redactie en fotografie

Praktijkonderzoek Veehouderij

© Praktijkonderzoek Veehouderij

Het is verboden zonder schriftelijke toestemming van de uitgever deze uitgave of delen van deze uitgave te kopiëren, te vermenigvuldigen, digitaal om te zetten of op een andere wijze beschikbaar te stellen.

Aansprakelijkheid

Het Praktijkonderzoek Veehouderij aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen

Bestellen

ISSN 0169-3689
Eerste druk 2002/oplage 100
Prijs € 17,50

Losse nummers zijn schriftelijk, telefonisch, per E-mail of via de website te bestellen bij de uitgever.



PRAKTIJKONDERZOEK
VEEHOUDERIJ

PraktijkRapport 4

Kopervoorziening bij melkvee in West-Nederland

Wijbrand Ouweltjes
Guillaume Counotte
Paul Dobbelaar

februari 2002

Voorwoord

Onder melkveehouders in West-Nederland bestaat veel belangstelling voor de mineralenvoorziening van het melkvee. Daarbij speelt een rol dat het ruwvoer op veel bedrijven uitsluitend uit graslandproducten bestaat. Op praktijkcentrum Zegveld is op initiatief van de heren Beukema en Bol in de loop van 1999 uitgebreid gediscussieerd over de mineralenvoorziening van het melkvee in het westelijk veenweidegebied. Vermoed wordt dat met name de kopervoorziening afwijkt van die in de rest van het land. Vandaar dat het GD-fonds voor West- en Midden-Nederland voorliggend literatuuronderzoek heeft laten uitvoeren. Het onderzoek is uitgevoerd door het Praktijkonderzoek Veehouderij, de Gezondheidsdienst voor Dieren en de Faculteit der Diergeneeskunde. De uitvoering van het onderzoek is begeleid door een begeleidingscommissie bestaande uit de volgende personen:

Anton Beynen (Faculteit der Diergeneeskunde, Utrecht)
Tjark Boxem (Praktijkonderzoek Veehouderij, Lelystad)
Karel van Houwelingen (Praktijkonderzoek Veehouderij, Zegveld)
Gert Schoterman (Cavo Latuco, Utrecht)
Jan Veling (Gezondheidsdienst voor Dieren, Deventer)
Aart de Zeeuw (DAP Crimpenerwaert, Bergambacht)

Ir. F. Mandersloot,
Hoofd Divisie Rundvee Schapen Paarden Geiten

Samenvatting

Betekenis van koper voor het dier

Koper is voor veel diersoorten en ook voor de mens van belang voor een goede gezondheid. Omdat het in relatief kleine hoeveelheden nodig is wordt het een spoorelement genoemd. Melkkoeien hebben, vooral in vergelijking met niet-herkauwers, echter een aanzienlijke koperbehoefte. Koper maakt onderdeel uit van enkele enzymen (SuperOxideDismutase en ceruloplasmine) en wordt in het lichaam getransporteerd door de transporteiwitten albumine en metallothionine. Koper is onder meer betrokken bij de ijzerabsorptie, bloedvorming, vorming van het haarkleed en botvorming, en wordt in het lichaam gebruikt om de redox-potentiaal (het energie-evenwicht tussen metalen en eiwitten) te handhaven. Doordat koper bij uiteenlopende processen is betrokken kunnen bij tekorten allerlei gebreksverschijnselen ontstaan. Een kopertekort versterkt de toxische werking van zware metalen en vermindert de beschikbaarheid van anti-oxidanten. Er zijn aanwijzingen dat kopertekorten, vooral in combinatie met verhoogd molybdeen, een verminderde afweer bewerkstelligen. De achterliggende oorzaken zijn echter nog niet opgehelderd. Een kopertekort heeft bij melkvee geen duidelijke effecten op vruchtbaarheid. Typerend voor een langdurig kopertekort is een afwijkend haarkleed (koperbril). Andere verschijnselen die samenhangen met een kopertekort zijn diarree, een slechte ontwikkeling, blokvoeten (bij jongvee), verminderde eetlust, slechte conditie, verlaagde melkproductie, botontkalking en bloedarmoede. Deze verschijnselen zijn echter niet typerend voor een kopertekort en kunnen ook door andere oorzaken worden veroorzaakt.

Ook bij een koperovermaat kunnen nadelige verschijnselen optreden. Dat betekent dat niet alleen een te lage maar ook een te hoge kopervoorziening moet worden vermeden. Schapen zijn gevoeliger voor een koperovermaat dan rundvee. Verschijnselen die bij rundvee veroorzaakt kunnen worden door een koperovermaat zijn een plotseling verminderde eetlust, geelzucht, bloedwateren, verstopping van het maagdarmkanaal maar ook diarree. Ook kan een koperovermaat beschadigingen van cellen en weefsels (met name lever en nieren) door vrije radicalen veroorzaken. Een matig verhoogde koperopname veroorzaakt een verhoogd ijzergehalte in het plasma, maar door de bufferende werking van de lever treedt dit effect in het algemeen alleen op indien de verhoogde koperopname gedurende langere tijd plaatsvindt.

Producten van dierlijke oorsprong

Koper vervult zoals gezegd meerdere functies in het lichaam. Ook de mens heeft koper nodig voor een goed functioneren van het lichaam. Producten van dierlijke oorsprong bevatten koper. Er is voor de mens meer kans op kopertekort dan op koperovermaat via het voedsel. Het koper in producten van dierlijke oorsprong is daarom ook voor de humane gezondheid van belang. Een onjuiste kopervoorziening van rundvee heeft weinig gevolgen voor de kopergehalten van hun melk en vlees, zeker zolang de dieren geen duidelijke gebreksverschijnselen of vergiftigingsverschijnselen vertonen. Het blijkt bijvoorbeeld dat een overmaat aan koper niet tot meetbaar verhoogde kopergehalten in spiervlees leidt. Uit onderzoek bij varkens is gebleken dat de lever bij extreem hoge koperopname dusdanig veel koper kan bevatten dat deze niet meer geschikt is voor menselijke consumptie. Bij melkvee zijn dergelijke hoge koperopnames echter niet aan de orde. Indien de dieren gezondheidsproblemen hebben mogen de melk en het vlees bovendien niet in de humane consumptie keten terecht komen, dus ook dan is er nog geen direct gevaar voor de mens.

Kopervoorziening

In de praktijk is er bij melkvee in Nederland vaker sprake van kopertekort dan van koperovermaat. Er worden twee soorten tekorten onderscheiden: primair (het rantsoen bevat te weinig koper) en secundair (het rantsoen bevat voldoende koper, maar dat kan niet worden benut). In de praktijk zijn de tekorten vrijwel altijd secundair. De koperbenutting wordt vooral verminderd door verhoogde gehalten aan S, Mo en Fe in het rantsoen. Enerzijds zorgen deze mineralen er voor dat de koper wordt gebonden in niet opneembare verbindingen, aan de andere kant wordt ook de kopervoorraad in de lever aangesproken zonder dat dit benut kan worden. Een kopertekort tengevolge van een ijzerovermaat geeft geen duidelijk zichtbare verschijnselen, in tegenstelling tot een kopertekort ten gevolge van andere oorzaken. Behalve de absolute concentratie en interacties met andere mineralen is ook de chemische vorm waarin koper voorkomt in het rantsoen van belang voor de mate waarin gebrek- of overmaatverschijnselen optreden. Dit wordt veroorzaakt doordat niet alle koperhoudende verbindingen even goed kunnen worden benut. Zo is koper uit koperoxide voor runderen veel slechter te benutten dan koper uit kopersulfaat. Overigens heeft onderzoek naar organisch gebonden mineralen in vergelijking met anorganische mineralen geen eenduidige resultaten opgeleverd.

De beoordeling van de kopervoorziening is zonder chemische bepalingen in het dier niet goed mogelijk. Enerzijds zijn zoals gezegd de verschijnselen bij onjuiste kopervoorziening zeer divers en vaak niet specifiek. Anderzijds is de benutting van de met het rantsoen opgenomen koper in het algemeen zeer gering, en kan bovendien aanzienlijk variëren. Weliswaar is van een aantal factoren bekend dat ze de koperbenutting ongunstig beïnvloeden, maar met de huidige kennis is het niet mogelijk om vanuit rantsoenkenmerken de koperbenutting goed te voorspellen. Gesteld wordt zelfs dat het door de grote variatie in benutting onmogelijk is om de

koperbehoefte uit te drukken in een gewenst gehalte in het rantsoen. Desondanks wordt in de praktijk gewerkt met dergelijke normen. De nieuwe Amerikaanse normen zijn duidelijk hoger dan de huidige Nederlandse normen. Bovendien worden daarin voor hogere producties hogere normen gegeven.

Tot nu toe werd in Nederland voor de bepaling van de koperstatus het kopergehalte in serum bepaald. Dit onderzoek geeft aan dat de huidige beoordelingsnormen voor koper in serum niet hoeven te worden aangepast. Deze parameter geeft echter maar beperkte informatie, omdat een variabel deel van het totale serumkoper biologisch niet beschikbaar kan zijn. Bovendien gaat bij een tekort in de voorziening door de bufferende werking van de lever de bloedspiegel pas dalen op het moment dat die lever nog maar een zeer beperkte voorraad koper bevat. Ook de verschillende andere in de literatuur beschreven parameters die in bloedplasma bepaald kunnen worden als indicator van de koperstatus hebben dit nadeel. Beoordeling van de kopervoorziening kan volgens deskundigen daarom het beste geschieden door het bepalen van kopergehalte van de lever. Dat is sinds kort ook in Nederland routinematig mogelijk bij de Gezondheidsdienst voor Dieren. Uit de literatuur zijn echter aanwijzingen gehaald dat er voor het aantonen van tekorten en overmaten verschillende parameters gebruikt moeten worden, omdat hierbij verschillende processen een rol spelen. Beoordeling van meerdere variabelen tegelijkertijd lijkt voordelen te bieden boven beoordeling van afzonderlijke variabelen. Vermoed wordt daarom dat onderzoek van serum een aanvulling kan zijn op onderzoek van leverbiopten.

De kopervoorziening is in weideperiode in het algemeen slechter dan tijdens de stalperiode. Tekorten worden het eerst bij jongvee verwacht (voor groei en ontwikkeling is de koperbehoefte relatief hoog en het krachtvoerbruik is laag). Met name bij ouder jongvee maar ook bij melkvee worden in de praktijk soms lage bloedwaardes voor koper aangetroffen. Dat is vooral het geval bij lage krachtvoergiften. Lage kopergehalten in het bloed leiden, vooral bij voor de dieren goede overige omstandigheden, echter niet altijd tot klinische klachten, zodat supplementatie niet direct nodig lijkt zijn. Bij stress kunnen echter wel problemen gaan optreden. Daardoor is het tijdig herkennen van een onjuiste voorziening lastig.

Ontwikkelingen in de veehouderij

De afgelopen 30 jaar is hooi in het rantsoen vervangen door kuilvoer. Daardoor is de koperbenutting afgenomen. In grote delen van het land is daarnaast snijmaïs een belangrijk deel van het rantsoen gaan uitmaken. Snijmaïs heeft weliswaar een laag kopergehalte, maar dat is wel goed benutbaar en geeft in combinatie met gras(kuil) mogelijkheden om energie en eiwit in het rantsoen beter te balanceren. Verder is men aanzienlijk meer krachtvoer (met hieraan toegevoegde mineralen) gaan verstrekken. Ook is het gebruik van losse mineralen inmiddels tamelijk ingeburgerd. Momenteel is de biologische melkveehouderij in opkomst, en komen er steeds meer gebieden waar veehouderij ten dienste staat van natuurbeheer. Bovendien wil men het verbruik van aangekocht krachtvoer verminderen. Door deze ontwikkelingen kan een suboptimale mineralenvoorziening de komende jaren vaker voorkomen.

Westelijk veenweidegebied

De koper- en zinkgehalten in de bodem in het westelijk veenweidegebied zijn op veel plaatsen hoog doordat in het verleden stadscompost is gebruikt om het land op te hogen. Ook in de graskuilen uit dat gebied worden relatief hoge kopergehalten gevonden. Directe kopertekorten zijn daarom in het veenweidegebied niet erg waarschijnlijk. Omdat echter ook de gehalten aan S, Mo en Fe in het ruwvoer relatief hoog zijn is het wel mogelijk dat indirecte tekorten optreden. Dat wordt versterkt indien rantsoenen met een relatief hoge OEB worden gevoerd. Doordat in dit veenweidegebied weinig of geen maïs wordt gevoerd is dat waarschijnlijk het geval. Verder zijn de sulfaatgehalten van slootwater in het westelijk veenweidegebied onder invloed van zoute kwel op sommige plaatsen duidelijk verhoogd, vooral daar waar geen gebiedsvreemd water wordt ingelaten. Vermoedelijk wordt oppervlaktewater in het veenweidegebied vaker als drinkwater gebruikt dan in andere delen van Nederland. Dat betekent dat sulfaten uit het veedrinkwater ook bij kunnen dragen aan een verminderde koperbenutting. Bloedanalyses uitgevoerd door de Gezondheidsdienst voor Dieren leveren echter geen aanwijzing op dat de koperstatus in het westelijke veenweidegebied duidelijk afwijkt van die in de rest van Nederland, maar het bloedonderzoek heeft maar een beperkte waarde bij de diagnostiek van een suboptimale kopervoorziening. Bovendien zijn de onderzochte monsters mogelijk niet representatief voor de gebieden waaruit ze afkomstig zijn. Behalve het westelijke veenweidegebied zijn er bovendien nog een aantal andere gebieden waarvan gemeld wordt dat kopertekorten regelmatig problemen veroorzaken.

Praktische bespiegeling

De in Nederland geldende normen met betrekking tot de kopervoorziening zijn grotendeels gebaseerd op inmiddels gedateerd onderzoek. Ze laten ruimte voor twijfel of bijvoorbeeld de kopervoorziening wel voldoende is. Daarom worden in de praktijk vaak extra mineralen, waaronder koper, gevoerd zonder dat daar een goede onderbouwing aan ten grondslag ligt. Niet alleen kopertekorten maar ook koperovermaten hebben echter een negatief effect op de diergezondheid. Ook voor vele andere mineralen en spoorelementen geldt dat behalve

tekorten ook overmaten schadelijke effecten kunnen hebben, mede als gevolg van onderlinge interacties. Dat betekent dat ook onnodig verhogen van de mineralenvoorziening sterk moet worden afgeraden.

Summary

Copper's significance for animals

For many animal species – including humans – copper is important for good health. It is required in relatively small amounts and so is called a trace element. Dairy cows, however, require a large amount of copper, especially by comparison with non-ruminants. Copper is a component of various enzymes (SuperOxideDismutase and ceruloplasmin) and is transported in the body by the proteins albumin and metallothionin. It is involved in iron absorption, the formation of blood, the forming of the coat and of bone, and is used in the body to maintain the redox potential (the energy balance between metals and proteins). Because copper is involved in a variety of processes, a shortage of the element can result in a range of deficiency symptoms. A copper deficiency intensifies the toxicity of heavy metals and reduces the availability of anti-oxidants. There are indications that copper deficiencies, especially when combined with increased molybdenum, bring about reduced immunity, but the underlying reasons for this remain unclear. A copper deficiency has no clear effects on the fertility of dairy cattle. A prolonged copper deficiency is typified by a deviant coat ('spectacles'). Other symptoms associated with copper deficiency are poor development, rickets (in calves), loss of appetite, poor condition, reduced milk yield, osteoporosis, and anaemia. However, these symptoms are not specific to copper deficiency and may have other causes.

Undesirable symptoms can also occur if there is an excess of copper. This means that it is necessary to avoid providing either too much or too little copper. Sheep are more susceptible than cattle to excess copper. Symptoms that can appear in cattle as a result of too much copper are a sudden loss of appetite, jaundice, red water, obstructed gastro-enteric tract, and also diarrhoea. Excessive copper can also result in cells and tissue (particularly liver and kidneys) being damaged by free radicals. A moderately excessive intake of copper causes an enhanced iron content of the plasma, but because of the buffering effect of the liver, this effect generally only appears if the increased intake of copper is prolonged.

Products of animal origin

As already noted, copper has various functions in the body. Humans also need copper for their bodies to function properly. Products of animal origin contain copper, but as humans are more likely to suffer a copper deficiency rather than a copper excess from their food, the copper in products of animal origin is important for human health. Giving cattle inappropriate amounts of copper has little impact on the copper contents of their milk and meat, particularly if the animals are not exhibiting clear symptoms of copper deficiency or poisoning. For example, it has been found that an oversupply of copper does not result in measurably higher copper contents in lean meat. Research on pigs has shown that with extremely high copper intake the liver can contain so much copper that it is no longer suitable for human consumption. However, one can ignore such high intakes of copper in cattle and, furthermore, if the animals have health problems, their milk and meat may not enter the human consumption chain and there is therefore no direct danger for humans.

Copper supply

In practice, Dutch dairy cattle are more likely to be deficient in copper than to have copper poisoning. Two sorts of deficiency are distinguished: primary (the ration contains too little copper) and secondary (the ration contains sufficient copper but it cannot be utilised). In practice, the deficiency is almost always secondary. Copper utilisation is primarily reduced by the enhanced levels of S, Mo and Fe in the ration. On the one hand these minerals ensure that the copper is bonded in compounds that cannot be taken up, but on the other hand the copper reserve in the liver is drawn on without it being utilisable. In contrast to a copper deficiency resulting from other causes, a copper deficiency resulting from an iron surplus gives no clearly visible symptoms. In addition to the absolute concentration and interactions with other minerals, the chemical form in which the copper occurs in the ration is also important for the intensity of the deficiency or poisoning symptoms. This is caused because not all the copper-containing compounds are equally utilisable: copper in copper oxide is much less utilisable for cattle than copper from copper sulphate, for example. Moreover, research comparing organic compounds with inorganic compounds has not given unequivocal results.

Without chemical determinations it is not very easy to assess the copper supply in the animal. On the one hand, as already noted, the symptoms resulting from inappropriate copper supply are very diverse and often not

specific. On the other hand, the utilisation of the copper taken up with the ration is, in general, very small and, moreover, can vary greatly. Though it is known that certain factors do adversely affect copper utilisation, given our current knowledge it is not possible to accurately predict the copper utilisation from the characteristics of the ration. It is even postulated that the huge variation in utilisation makes it impossible to express the copper requirement as a desired content in a ration. In spite of this, such norms are used in practice. The new American norms are clearly higher than the current Dutch norms and, moreover, higher norms are given for higher production.

To date, the copper content of the serum has been used to determine the copper status. This study reveals that the current assessment norms for copper in serum do not need to be modified. However, this parameter gives limited information only, because a variable part of the total serum copper can be biologically unavailable. Moreover, because of the buffering action of the liver, when there is an inadequate supply the content in the blood will only decline from the moment that the reserves in the liver are extremely small. The various other parameters that are described in the literature and can be determined in blood plasma as an indicator of the copper status also have this disadvantage. This is why experts believe that the best way to assess the copper supply is by determining the copper content of the liver. It has recently become possible to do this routinely in the Netherlands, at the Animal Health Service. However, the literature indicates that different parameters must be used to demonstrate deficiencies and excesses, because different processes play a role. It seems to be more advantageous to assess several variables simultaneously, rather than individually. It is thought that research on serum could augment research on liver biopsies.

In general, the copper supply is better during the pasturing period than during the period the animals are confined in housing. Deficiencies are expected to manifest first in calves (the copper requirement for growth and development is relatively high and the utilisation of concentrates is low). Low copper contents are often found in the blood of older calves, and also in the blood of dairy cattle – especially if the supply of concentrates is small. However, low copper contents in the blood do not always lead to clinical symptoms – especially not if the conditions for the animals are otherwise good – and therefore supplements do not seem to be necessary immediately. However, problems may emerge if the animals are stressed. This makes the timely identification of an inappropriate copper supply difficult.

Trends in livestock farming

In the last 30 years the hay in the ration has been replaced by silage, with the result that copper utilisation has fallen. In large parts of the Netherlands silage maize has also become an important component of the ration. Though silage maize does have a low copper content, the copper is well utilisable and, when combined with grass or grass silage makes it possible to better balance the energy and protein in the ration. Furthermore, farmers are feeding appreciably more concentrates (fortified with minerals), and supplying individual minerals has also become fairly common practice. Organic dairy farming is now in the ascendant, and in more and more areas the livestock farming is being used to manage nature. Furthermore, farmers want to reduce the amount of concentrates they buy in. All these trends could result in a suboptimal mineral supply becoming more common in the coming years.

The western peaty pasture area

The copper and zinc contents in the soils of the western peaty pasture area of the Netherlands are high in many places, because in the past town waste was used to raise the ground level. Relatively high copper contents are also found in the grass silage pits in this area. For these reasons, there seems to be little likelihood of direct copper deficiencies in the peaty pasture area. However, because the levels of S, Mo and Fe in the roughage are also relatively high, it is very probable that indirect deficiencies will occur. This will be intensified if rations have a relatively high degradable protein balance. The latter is very likely, given that in this peaty pasture area maize is fed rarely, if at all. Furthermore, in some places in the western part of the peaty pasture area the sulphate levels of the water in the ditches delimiting the fields have been appreciably raised as a result of the upwelling of saline groundwater. The problem is particularly acute in areas in which the hydrology is managed to ensure that 'chemically alien' water does not flow in from outside the area. It is probable that in the peaty pasture area the source of drinking water is more likely to be surface water than is the case elsewhere in the Netherlands (where groundwater is the source of drinking water). This means that sulphates from the water for the livestock could also contribute to a reduced copper utilisation. However, blood analyses carried out by the Animal Health Service have not provided any evidence that the copper status in the western peaty pasture area clearly deviates from that in the rest of the Netherlands, but this blood analysis is of only little value when diagnosing suboptimal copper supply. Furthermore, the samples analysed may not have been representative of the areas they came

from. In addition to the western peaty pasture area there are other parts of the Netherlands in which copper deficiencies are regularly reported.

Implications for practice

The norms for copper supply that hold in the Netherlands are largely based on research that is out of date. They leave room for doubt about whether, for example, the copper supply is indeed sufficient. For this reason, farmers often give their livestock extra minerals, including copper, to ensure that the animals have a good basic supply. However, not only too little but also too much copper can adversely affect animal health. And for many other minerals and trace elements it is also true that excess amounts can have just as damaging effects as deficiencies – partly because of interactions. This means that it is very inadvisable to raise the supply of minerals unnecessarily.

Inhoudsopgave

Voorwoord

Samenvatting

Summary

1	Inleiding	1
2	Koper in het dier	2
2.1	Betekenis van spoorelementen voor functioneren van het dier.....	2
2.2	Koperbehoefte.....	2
2.3	Koperbenutting	2
2.4	Invloed van interacties op koperbenutting.....	3
2.4.1	Molybdeen	3
2.4.2	Zwavel	5
2.4.3	IJzer	6
2.4.4	Zink	7
2.4.5	Overige metalen en spoorelementen (seleen, lood, cadmium, arseen, kwik, mangaan)	7
2.4.6	Diversen	8
2.5	Organische mineralen.....	8
2.6	Onderzoek naar voorziening voor koper en koperantagonisten.....	8
2.7	Klinische effecten van tekorten en overmaten aan koper	9
2.7.1	Inleiding	9
2.7.2	Effect op bot	10
2.7.3	Effect op oxidatie.....	10
2.7.4	Effect op andere spoorelementen en zware metalen	11
2.7.5	Effect op cellen en celorganellen.....	11
2.7.6	Effect op organen	11
2.7.7	Effect op enzymen, eiwitten en andere biochemische parameters	12
2.8	Koper en fertiliteit	12
2.9	Koper en immuniteit	13
2.9.1	Inleiding	13
2.9.2	Onderzoek bij runderen	14
2.10	Koper als pro-oxidant en anti-oxidant.....	15
2.10.1	Algemeen.....	15
2.10.2	Melkvee	16
3	Omgevingsfactoren met betrekking tot de kopervoorziening	17
3.1	Algemeen.....	17
3.2	Lucht.....	17
3.3	Water	18
3.4	Bodem.....	19
3.5	Gewas	22
4	Statusbepaling.....	25
4.1	Urine, melk, haren.....	25
4.2	Bloed.....	25
4.3	Organen.....	26

4.4	Statusbepaling in de praktijk	27
5	Producten van dierlijke oorsprong	28
6	Conclusies.....	30
Aanbevelingen en voorstellen voor nader onderzoek		31
Literatuur		32
Bijlagen		45
	Bijlage 1a Sulfaatgehalten in polderwater en boezemwater in West-Nederland	45
	Bijlage 1b Gehalten aan ijzer, koper, sulfaat en zink in poldersloten in West-Nederland	46
	Bijlage 2a Regionale verdeling mineralengehalten in graskuilen (onderzoek Blgg 1996-1998)	47
	Bijlage 2b Regionale verdeling percentage door Blgg onderzochte maïspartijen	48
	Bijlage 3 Regionale verdeling uitslagen bloedonderzoeken GD in 2000	49

1 Inleiding

Uit onderzoek is gebleken dat een onjuiste mineralenvoorziening tot gezondheidsproblemen bij melkvee kan leiden. De voortdurend gestegen melkproductie heeft invloed op de mineralenbehoefte. Voor het milieu heeft de mineralenvoorziening gevolgen omdat een deel van de verstrekte mineralen via mest en urine wordt uitgescheiden en zo op het land terecht komt. Verder is de mineralenvoorziening indirect van belang voor de samenstelling van de voor humane consumptie bedoelde producten. In de praktijk is niet altijd sprake van adequate voorziening en wordt als gevolg van de twijfel omtrent de normen waarschijnlijk niet efficiënt met bepaalde mineralen omgesprongen. Bovendien heeft het verstrekken van extra spoorelementen het gevaar in zich van overdosering (Beede, 1991).

Vooraf ten aanzien van koper komen in de praktijk problemen voor (Smolders et al., 1993). De Gezondheidsdienst komt in de praktijk soms zeer ernstige gezondheidsproblemen bij melkvee tegen die mogelijk samenhangen met een onjuiste kopervoorziening. Onderzoek van het Praktijkonderzoek en de Faculteit Diergeneeskunde (Wentink et al., 1999) gaf aan dat de huidige beoordeling van de koperstatus gebrekkig is. Vanwege de gebrekkige kennis is het stellen van de juiste diagnose een uitermate tijdrovende en lastige zaak. Het bleek bijvoorbeeld dat de verschijnselen die kenmerkend worden geacht voor Cu-gebrek soms ontbreken, terwijl er wel sprake is van een Cu-tekort in de lever. Bekend is dat een aantal elementen (met name Mo, S, en Fe) antagonistische werking hebben ten opzichte van Cu, maar de precieze mechanismen zijn voor zover bekend niet opgehelderd. Vermoed wordt dat de Nederlandse veenweidegebieden vanwege de afwijkende mineralenvoorraden in de bodem en het oppervlaktewater mogelijk specifieke problemen hebben ten aanzien van de koperhuishouding, maar problemen kunnen zich ook in andere gebieden voordoen. Verwacht mag worden dat deze problematiek zich voor de biologische veehouderij in versterkte mate doet gelden. Door restricties ten aanzien van krachtvoergrondstoffen is biologisch krachtvoer veel duurder dan gangbaar krachtvoer. Het krachtvoergebruik wordt verder beperkt doordat het rantsoen voor minimaal 60% uit ruwvoer moet bestaan. Het krachtvoerverbruik in de biologische melkveehouderij zal hierdoor aanzienlijk lager zijn dan in de gangbare melkveehouderij, terwijl krachtvoer in het algemeen veel hogere concentraties mineralen en spoorelementen bevat door toevoeging van premixen. De onderbouwing van de huidige normen is mede door de interactie met andere elementen matig, waardoor er allerlei problemen op kunnen treden en deze normen voor de praktijk onvoldoende houvast bieden.

Mineralen worden op basis van de benodigde hoeveelheden onderscheiden in macromineralen en spoorelementen. In dit rapport wordt over spoorelementen gesproken indien het element betreft die in kleine hoeveelheden (minder dan 100 mg/kg ds in het rantsoen) een positief effect op het functioneren van het dier hebben. Een aantal spoorelementen behoort tot de metalen. In het algemeen geldt dat metalen in pure vorm niet giftig zijn, terwijl de vrije, geladen vorm meestal biologisch te actief is. Daarom zijn veel metalen in het lichaam gebonden aan eiwitten. Er zijn ook zware metalen waarvan geen positief effect is geconstateerd, zoals lood, cadmium en kwik. Metaaleiwitten zijn ontstaan in de evolutie voor de regulatie van een aantal processen. Globaal gezien geldt dat ijzerverbindingen worden gebruikt bij elektron-overdrachtseiwitten, molybdeen betrokken is bij katalyse van kleine moleculen (stikstof), zink bij hydrolytische moleculen en koper bij de handhaving van het energie-evenwicht tussen metalen en eiwitten (Egami, 1975).

Koper wordt in de dunne darm via eiwitten opgenomen, maar ook opname via de longen is mogelijk. Zo is opname van zware metalen en spoorelementen ten gevolge van luchtverontreiniging aangetoond bij werkers in bepaalde industrieën (Brune et al., 1980). Ook kan koper vrijkomen uit implantaten (Keller et al., 1984). De uitscheiding van koper vindt voornamelijk plaats via ontlasting, gal (leveragebonden koper), urine en melk (Auza, 1983). Het verschil tussen opname en uitscheiding van koper leidt tot voorraadverandering in de lever. De opname en uitscheiding van verschillende mineralen, spoorelementen en zware metalen verloopt vaak via hetzelfde mechanisme (darm – long, galwegen) waardoor interacties optreden tussen deze elementen (Aggett, 1985).

Het doel van het in dit rapport beschreven onderzoek is de huidige kennis van de kopervoorziening van melkvee, met speciale aandacht voor het westelijk veenweidegebied, te bundelen. Praktische adviezen worden opgesteld en kennishiaten worden aangegeven.

2 Koper in het dier

2.1 Betekenis van spoorelementen voor functioneren van het dier

Koper is voor veel diersoorten en ook voor de mens van belang voor een goede gezondheid. Omdat het in relatief kleine hoeveelheden nodig is wordt het een spoorelement genoemd. Melkkoeien hebben, vooral in vergelijking met niet-herkauwers, echter een aanzienlijke koperbehoefte. Koper is aangetoond in de enzymen Cu-Zn-superoxide-dismutase (SOD) en ceruloplasmine. Daarnaast komt koper voor in een aantal transporteiwitten (albumine, metallothionine). Koper is in het lichaam betrokken bij de ijzerabsorptie (via ceruloplasmine), hemoglobinevorming in de lever (wel bij pluimvee, niet bij rundvee (Orten et al., 1975)) en handhaving van het energie-evenwicht tussen metalen en eiwitten (via SOD) (Barceloux, 1999a; Chan et al., 1998). Bij de mens blijkt bij ernstige bloedarmoede het kopergehalte vaak te zijn verhoogd (Weijers, 1931), en helpt in een aantal gevallen ijzertoediening niet om de bloedarmoede te verhelpen. Dat koper reeds lang in de evolutie een rol speelt, kan worden opgemaakt uit het feit dat ook in schimmels SOD voorkomt (Dolashka-Angelova et al., 1999). Onderzoek naar de rol van spoorelementen is moeilijk omdat de specifieke rol van spoorelementen veelal pas aan het licht komt als het lichaam zodanig geprikkeld wordt dat de specifieke functie van het betreffende spoorelement noodzakelijk is. Als gevolg hiervan kan tijdelijk meer van dit spoorelement nodig zijn dan gebruikelijk (Nielsen, 1990). Het toeschrijven van klinische verschijnselen aan tekorten aan mineralen en spoorelementen is daarom niet altijd eenvoudig. Zo blijkt uit recente literatuur dat de hoge frequentie van botbreuken en botontkalking bij elanden in Zuid Noorwegen wordt veroorzaakt door onvoldoende voeding ten gevolge van overbevolking en daardoor meer beslag op voedselvoorraden (Ytrehus et al., 1999). Aanvankelijk werd vermoed dat de oorzaak verstoring van mineralen- en spoorelementenhuishouding was.

2.2 Koperbehoefte

De behoefte aan spoorelementen wordt veelal in hoeveelheden per kg ds uitgedrukt. In het Tabellenboek Veevoeding 2000 wordt de Cu-behoefte van rundvee in Nederland op 10 mg per kg ds gesteld (uitgave CVB, 2000). Door de NRC werd 10 mg/kg droge stof in het rantsoen als minimum voor de praktijk aanbevolen, maar in de nieuwste uitgave worden aanzienlijk hogere normen genoemd (NRC, 2001). Zo wordt voor een koe van 650 kg en een productie van 40 kg melk per dag een gehalte van 15.7 mg/kg genoemd. Ook is opvallend dat nu een hoger gehalte in het rantsoen wordt aanbevolen voor dieren met hogere producties. Verder wordt opgemerkt dat hogere Cu-gehalten nodig zijn indien het vee voeders met hogere Mo-gehalten of andere stoffen die ook de beschikbaarheid van Cu verslechteren krijgt voorgeschoteld. In sommige publicaties wordt de behoefte aan Cu uitgedrukt in Cu/Mo ratio's. Hiervoor worden verschillende waardes aangegeven, variërend van 2:1 tot 5:1. Deze benadering is onvolledig, omdat aan de effecten van het zwavelgehalte voorbij wordt gegaan. Volgens de benadering van het ARC wordt de Cu-absorptiecoëfficiënt geschat op basis van het S en het Mo-gehalte (ARC, 1980). Om tot een nog betrouwbaarder schatting van de absorptiecoëfficiënt te komen zouden de effecten van Fe hieraan toegevoegd moeten worden. Een schatting van de absorptiecoëfficiënt van Cu op basis van ten minste deze drie stoffen kan gebruikt worden om de bruto Cu-behoefte te berekenen door de netto behoefte van Cu hierdoor te delen. Daarmee zou de koperbehoefte op een vergelijkbare manier als de Mg-behoefte geschat kunnen worden. Nu door het Bedrijfslaboratorium elementen die het gehalte en de beschikbaarheid van koper beïnvloeden in ruwvoerders bepaald kunnen worden, kan de beschikbaarheid van Cu ook beter geschat worden.

2.3 Koperbenutting

De opname door het lichaam van koper uit het rantsoen is afhankelijk van een aantal factoren: de chemische vorm (bijv. koper in lysine of koper in sulfaat (Vulpe en Packman, 1995), het rantsoen (in vers gras is beschikbaarheid van koper minder dan in droog gras (Suttle, 1986), erfelijke factoren (metallothioninen komen in 4 subvormen voor, de aanwezigheid is gedeeltelijk erfelijk bepaald (Yuzbasiyan-Gurkan et al., 1997)) en interacties met andere mineralen. Per diersoort kunnen de effecten van deze factoren echter anders zijn. Zo wordt bij varkens en pluimvee de beschikbaarheid van zowel koper als zink verhoogd door fytase in het voer, terwijl bij rundvee doordat in de pens fytase gevormd wordt toevoeging aan het voer geen effect heeft.

In de pens van herkauwers zit koper meestal in de wateroplosbare fractie, terwijl andere spoorelementen (mangaan, zink) meestal bacterieel gebonden zijn (Wetzel en Menke, 1978). Dit is van belang omdat oplosbare spoorelementen sneller een interactie aangaan met andere stoffen dan gebonden spoorelementen. De opname

van koper door het lichaam gebeurt door metallothioninen (MT). Dit zijn metaalbindende eiwitten (Florianczyk, 1996). Deze eiwitten spelen een rol bij de opname van koper uit de darmen via het bloed naar de levercellen. Er zijn vier soorten metallothioninen. Deze op hun beurt bestaan weer uit iso-vormen. Deze spelen waarschijnlijk allemaal een rol bij verschillende processen met verschillende sporelementen (Nordberg en Nordberg, 2000). Ook de opname van koper via de longen gebeurt door metallothioninen (Romeu-Moreno et al., 1994). Het aan metallothioninen gebonden koper wordt in de cellen naar celcompartimenten getransporteerd. Diverse eiwitten spelen een rol bij dit transport (onder andere glutathion). Een overmaat of tekort van deze eiwitten speelt een rol bij klinische symptomen (Vulpe en Packman, 1995). Omgekeerd bestaat er echter geen relatie tussen de glutathion-uitscheiding in de gal en de gehalten aan koper en zink in de gal (Dijkstra et al., 1993). Wel lijkt koper op zijn beurt een rol te spelen bij de degradatie van glutathion (Zer et al., 1991) waardoor indirect een interactie met de biologische functie van seleen (glutathion-peroxidase) te verwachten is.

2.4 Invloed van interacties op koperbenutting.

De koperstatus van het dier kan deficiënt zijn door een primair of een secundair kopertekort. Bij primair kopertekort is het gehalte aan koper in het rantsoen te laag, terwijl het opgenomen koper wel normaal benut wordt. Bij het aanhouden van de geldende Cu-bemestingsnormen voor grasland, waardoor het weidegras ten minste 7 mg Cu/kg ds zal bevatten (Henkens, 1988), zal de grascomponent van het rantsoen voldoende Cu bevatten en is een primair kopertekort onwaarschijnlijk. De Nederlandse norm stemt overeen met de Franse norm om gebrekverschijnselen te voorkomen (Gueguen et al., 1988). Bij een secundair kopertekort is het kopergehalte op zich toereikend, maar is de beschikbaarheid ervan te laag. Dit kan worden veroorzaakt door interacties met andere mineralen. In de literatuur wordt vooral aandacht geschonken aan interacties van koper met molybdeen en zwavel. In het algemeen verlagen deze elementen de koperbenutting. Begin jaren '60 was de negatieve invloed van molybdeen op de koperbenutting reeds bekend, van de rol van zwavel lijkt in die tijd nog weinig bekend te zijn geweest (Binnerts, 1964). Ook van ijzer en zink wordt vermoed dat het de koperbenutting vermindert, en ook andere elementen kunnen invloed op de koperbenutting hebben. De mogelijke interacties worden in dit hoofdstuk beschreven.

2.4.1 Molybdeen

In het verleden werd veel aandacht besteed aan alleen molybdeen. Mogelijke bronnen van molybdeen zijn: luchtverontreiniging door de metaalverwerkende industrie, ophoping van berkenbladeren, berkenbomen, bepaalde vlinderbloemigen (in feite azo-bacteriën aan de wortels). De bronnen van molybdeen kunnen dus zeer divers zijn, de biologische beschikbaarheid van molybdeen uit deze verschillende bronnen kan sterk verschillen. De biologische beschikbaarheid van molybdeen uit vliegias lijkt bijvoorbeeld erg hoog te zijn. Zo hoog dat zelfs paarden hiervan last hebben (sterfte) (Ladefoged en Sturup, 1995). Niet alleen het absolute gehalte van koper en molybdeen is van belang, vooral de verhouding Cu : Mo speelt een rol (bijvoorbeeld bij lammeren) (Garcia-Fernandez et al., 1999). Er zijn diverse praktijkgevallen beschreven van gezondheidsproblemen en tegenvallende productie ten gevolge van een verkeerde molybdeen : koper verhouding in het voer bij koeien (Irwin et al., 1979) en schapen (Ivan en Veira, 1985).

Molybdeen speelt een rol bij enkele basisprocessen in het lichaam, zoals de vorming van NO in het lichaam en andere processen waarbij N-O verbindingen zijn betrokken. De meest voorkomende vorm zijn de poly-molybdaten. Het toxische effect bestaat in eerste instantie uit een kopertekort (Barceloux, 1999b). De werking van molybdeen is echter per diersoort verschillend. Bij ratten werd geen koperdeficiëntie gezien na toevoeging van molybdeenverbindingen. Wel werd een toename van het koperplasma gemeten (Bremner et al., 1982). Bij schapen werd na toediening van molybdeen meer molybdeen in het bot aangetroffen, echter niet minder koper. Met name in de verbeningszone werd meer molybdeen gevonden (Hidiroglou et al., 1982). Bij ratten is aangetoond dat molybdeen veranderingen teweeg brengt in de epifyseale groeiplaat, maar het effect van molybdeen was onafhankelijk van de koperstatus. Molybdeen heeft effect op celvermeerdering binnen de groeiplaat terwijl koperdeficiëntie effect heeft op chondrocyten (Parry et al., 1993). In de humane lever zijn koper en molybdeen omgekeerd gecorreleerd met elkaar (Meinel et al., 1979). Bij paarden lijkt er geen verband tussen Mo-opname en Cu-metabolisme te zijn. Thiomolybdaat is tot nu toe bij paarden niet aangetoond (Strickland et al., 1987).

Klinische effecten van molybdeen kunnen mogelijk worden verklaard door verschuivingen van evenwichten in de koperbindende eiwitten (Wang en Mason, 1988). Bij schapen en runderen werd aangetoond dat molybdeen de werking van ceruloplasmine, cytochroomoxidase en superoxide dismutase vermindert (Chidambaram et al.,

1984). Daarnaast remt molybdeen het sulfide-oxidase-systeem (Roshchin en Lukashev, 1978). Dit kan ook gunstig zijn: Molybdeen heeft een reducerend effect op het ontstaan van nitrosamine-geïnduceerde tumoren (Seaborn en Yang, 1993). Bij een andere studie leek molybdeen echter geen rol te spelen bij anticarcinogene enzymen bij ratten (Yang en Yang, 1989). Bij dit onderzoek werd gevonden dat lage (minder dan 0.1 mg/L) toediening van molybdeen via het water al snel het molybdeen in lever verhoogt. Echter tussen 0.1 en 5 mg/L vindt geen verdere stijging van molybdeen in lever plaats, terwijl boven 5 mg/L wel weer stijging plaatsvindt.

Bij mensen zijn de klinische effecten van verhoogd molybdeen in stof nog niet duidelijk. Wel werd ook bij de mens verhoogde ceruloplasmine-activiteit gevonden (Walravens et al., 1979). Ook bij kalveren werd gevonden dat het toedienen van molybdeen leidt tot verhoogde aanmaak van ceruloplasmine (Fisher, 1976). Molybdeen veroorzaakt bij schapen een verhoogd serum-koper, maar een verlaagd leverkoper (Auza et al., 1989). Het effect van molybdeen is afhankelijk van de dosis: een hoge dosis geeft een snel effect, een lage dosis laat een effect op langere termijn zien. Hoog molybdeen geeft bij schapen een verminderde groei en een slechtere voederconversie. De oplosbaarheid van koper in de pens vermindert (Ivan en Veira, 1985). Bij hoge molybdeentoediening aan schapen vormde zich een koper- en molybdeenstapeling in de nieren. Er werden echter geen verhoogde enzymwaarden in het serum gevonden van lever-, spier- en nierenzymen. Ook andere effecten bleven uit bij schapen (Van Ryssen et al., 1982). Ook ziet men geen effect van koper alleen of in combinatie met molybdeen op de seleenstatus bij schapen (White et al., 1989a). In Zweden is een tot dusverre onbekende ziekte bij elanden opgetreden. De beschrijving lijkt op chronische weerstandsvermindering (Frank et al., 2000a; Frank et al., 2000b; Frank et al., 2000c; Frank et al., 2000d). Men vermoedt dat de oorzaak is gelegen in een verhoogde molybdeenopname gedurende de laatste 15 jaar, die zorgt voor een chronisch kopertekort. Er zijn aanwijzingen dat collageen minder gecross-linkt is na toediening van molybdeen. De mechanische eigenschappen veranderen (Bibr et al., 1987). Uit proeven bij lammeren die een worminfectie doormaakten bleek dat toevoeging van molybdeen aan het rantsoen de schadelijke effecten beperkte. De auteurs veronderstellen dat molybdeen direct of indirect de weerstandsreactie verhoogt (Suttle et al., 1992a). Na toevoeging van molybdeen is de albumine in serum lager. Dit effect kan echter niet zomaar aan molybdeen of koper worden toegeschreven. Albumine kan ook verlaagd zijn bij een sterkere acute-fase-reactie. Er waren in deze proeven echter geen acute fase eiwitten bepaald (Suttle et al., 1992b).

Molybdeen wordt voor 28 – 77 % geabsorbeerd en via urine uitgescheiden. Indien de koperopname minder is, wordt de toxiciteit van molybdeen groter. Bij ratten is het meest kritische aangrijppunt de reproductie en de foetale ontwikkeling (Vyskocil en Viau, 1999). Molybdeen wordt door cellen via hetzelfde mechanisme opgenomen als andere monovalente ionen (Cl, anorganisch P, SO₄) (Gimenez et al., 1993). Als voor het toedienen van molybdeen eerst koper is toegediend, verdwijnt molybdeen veel langzamer uit plasma dan wanneer niet eerst koper is geïnjecteerd (Hynes et al., 1985). In gebieden met verhoogd molybdeen kan koper via drinkwater de koperstatus goed handhaven (Farmer et al., 1982). Molybdeen wordt ook efficiënt opgenomen via de dunne darm. De interactie van molybdeen en koper vindt in het lichaam plaats door competitie van het transport via albumine (Mason, 1986; Mason et al., 1988). Molybdeen wordt bij pony's via de urine weer uitgescheiden. Daarbij heeft het wel de uitscheiding van koper via gal doen toenemen. Ook de uitscheiding van koper via ontlasting neemt toe (Cymbaluk et al., 1981). Hartmans (1970) achtte de Mo-gehalten in de onze Nederlandse rundveerantsoenen dermate laag dat dit element in het algemeen van ondergeschikte betekenis voor het ontstaan van Cu-gebrek zou zijn. Door verontreiniging kunnen echter lokaal specifieke problemen ontstaan. In de situatie die is beschreven door Verweij (1970) wezen klinische verschijnselen bij pinken op een kopertekort. Ook de bloedspiegel van koper was laag. De kopergehalten van de grond en het gras waren echter hoog. De molybdeengehalten waren zeer hoog (30-80 ppm tegen normaal 0.5-3 ppm). Dit bleek te zijn veroorzaakt door uitstoot van molybdeen via de lucht door een bedrijf in de buurt. Telfer (1999) gaat er van uit dat molybdeen de belangrijkste remmende factor is voor de koperbenutting in Engeland. Ook voor enkele andere landen worden veengronden genoemd met hoge molybdeengehalten. De problemen met de kopervoorziening zijn het sterkst in de weideperiode, het molybdeengehalte varieert over de seizoenen.

Samenvattend kan worden gesteld dat de biologische beschikbaarheid van molybdeen erg variabel is. Een teveel aan biologisch beschikbaar molybdeen in verhouding tot koper kan leiden tot een kopertekort. Aan de ene kant wordt de opname van koper uit het maag-darmkanaal geremd door vorming van niet opneembare verbindingen (vooral in combinatie met zwavel), aan de andere kant wordt ook de kopervoorraad in de lever aangesproken zonder dat dit koper biologisch beschikbaar komt. Hoe de effecten van molybdeen op het functioneren van het organisme precies tot stand komen is nog niet geheel opgehelderd. Bovendien lijkt de werking van molybdeen voor de mens en de verschillende soorten landbouwhuisdieren te verschillen. Het belang van molybdeen voor de koperhuishouding in het veenweidegebied in west Nederland is niet geheel duidelijk.

2.4.2 Zwavel

Zwavel is in verband met de vorming van zwavelhoudende aminozuren voor herkauwers een onmisbaar element. Omdat zwavel ook in ruwvoer voor een belangrijk deel in aminozuren voorkomt wordt het ruw eiwit gehalte vaak als maat voor het S-gehalte van gras gehanteerd. Bij hogere stikstofgiften zal het ruw eiwit gehalte toe kunnen nemen zonder dat het S-gehalte verder toeneemt. Het ruw eiwit bestaat namelijk behalve uit werkelijk eiwit ook uit niet eiwit stikstof ofwel NPN. Ook uit de gegevens van Blgg blijkt dat het verband tussen het RE-gehalte en het S-gehalte in graskuilen en vers gras matig is (de correlatie bedraagt 0.38). Het S-gehalte van vers gras is evenals het RE-gehalte aanzienlijk hoger dan dat van graskuil (3.7 en 250 resp. 2.8 en 180). Dit wordt veroorzaakt door een verschil in groeistadium, niet door conservering.

Verbindingen van molybdeen en zwavel noemt men thiomolybdaten. Na toediening van thiomolybdaat bij schapen neemt het koper in de lever af, terwijl molybdeen in de lever toeneemt. In de nieren nemen zowel koper als molybdeen toe. Met name de hepatocyten verliezen koper (Kumaratilake en Howell, 1987). Tetrathiomolybdaat kan dus wel als giftig voor hepatocyten worden beschouwd, maar is dit niet voor humane fibroblasten die ook koper bevatten (McArdle et al., 1989). Thiomolybdaat kan ook cadmium verwijderen bij ratten. Na toediening van thiomolybdaat komt er meer koper (en ook cadmium) in gal en bloed terecht (Lai en Sugawara, 1997). Tetrathiomolybdaat verhoogt dus de uitscheiding van koper via de gal, maar niet via urine of speeksel (Ke en Symonds, 1989). Met radioactief molybdeen (^{99}Mo) is aangetoond dat thiomolybdaat kan worden gevormd in pens van schapen (Price et al., 1987) uit zwavel en molybdeen. In de pens worden eenvoudig di- en tri-thiomolybdaten gevormd uit S en Mo. Tetrathiomolybdaten worden minder snel gevormd (Clarke en Laurie, 1980). Bij paarden is geen verband tussen molybdeenopname en kopermetabolisme gevonden, er kan ook geen thiomolybdaat worden aangetoond (Strickland et al., 1987).

Suttle (1975) publiceerde over de interactie van zwavel met het molybdeen en kopermetabolisme. Zwavel kan met molybdeen thiomolybdaatverbindingen vormen. Daarnaast is bekend dat koper met uit zwavelbronnen afkomstige sulfiden verbindingen vormt. In de pens kan daardoor CuS gevormd worden. Dit is vooral gevonden op jong eiwitrijk weidegras. Omweiden op kort weidegras moet hierom vermeden worden. Bosman en Deijs (1969) suggereerden dat H_2S door de penswand opgenomen zou kunnen worden en biochemisch actieve Cu-vormen kan binden. Dat zou leiden tot verhoogde Cu-uitscheiding. Dit vermoeden is wellicht niet reëel omdat koper in het bloed aan eiwitten gebonden is en sulfide voornamelijk met het Cu aanwezig in de pens oplosbare fractie reageert. Van Dokkum et al. (1998) geven aan dat er ook nu nog een gebrek aan kennis is omtrent de vorming van sulfiden in de pens uit drinkwater en voer en hun effecten op de mineralenhuishouding.

Naast het puur aanwezig zijn van het element zwavel, is de chemische vorm waarin het zwavel voorkomt ook belangrijk. Sulfaat heeft bijvoorbeeld minder invloed op de koperbenutting dan elementair S. Niet alleen de interactie van zwavel met koper is van belang, maar vooral de interactie van zwavel in combinatie met molybdeen op koper. Bij ratten en cavia's vertoont bijvoorbeeld sulfaat geen interactie met molybdeen maar sulfide wel (Mason et al., 1978b). Sulfide-vorming in de pens vermindert ook de beschikbaarheid van het oplosbare koper bij schapen (Ivan et al., 1986). In de Nederlandse handleiding voor mineralenonderzoek worden sulfiden de belangrijkste factor genoemd die de koperbenutting kan beïnvloeden (COMV, 1996). In de praktijk voorkomende Mo-gehalten kunnen hierop versterkend werken.

Bij schapen is het minimumniveau waarbij molybdeen in combinatie met diverse zwavelniveaus het kopermetabolisme kan beïnvloeden bepaald. Dit bleek 2.4 mg Mo per kg voer te zijn (Lamand et al., 1989). Normaal is koper gebonden aan laagmoleculaire eiwitten, maar koper dat vrijkomt uit de lever is gebonden aan hoogmoleculaire eiwitten. Het koper in de hoogmoleculaire eiwitten komt niet beschikbaar voor het lichaam, maar wordt verwijderd. Hogere molybdeen- en zwavelgehalten leiden tot meer koper in het serum dat neerslaat na toevoeging van trichloorazijnzuur (TCA-onoplosbaar eiwit) (Mason et al., 1978a). Dit wijst op een sterke binding van koper met hoogmoleculaire eiwitten. Ook na toediening van een dieet met alleen hoog zwavel kan men meer totaal koper in plasma meten waarbij de TCA-onoplosbare koperfractie het scherpst stijgt (Lamand et al., 1980). Dit geeft aan dat er niet benutbaar koper vrijkomt uit de lever als gevolg van hogere molybdeen- en zwavelgehalten. Dat betekent dat het totale kopergehalte in het bloed niet precies aangeeft wat biologisch beschikbaar is.

Hoge zwavelgehalten kunnen neurofysiologische afwijkingen veroorzaken bij schapen. Schapen die laag koper, laag Mo en laag thiamine kregen vertoonden de ernstigste afwijkingen (Olkowski, 1990a). In Oost Afrika lijkt de vulkanische grond (met hoge gehalten aan zowel molybdeen als zwavel) ervoor te zorgen dat veel dieren daar

een kopertekort hebben (Faye et al., 1991)). Verhoogd zwavel in de voeding van het rund leidt tot versnelde uitscheiding van molybdeen doordat competitie optreedt in tubulaire reabsorptie in nieren (Ryan et al., 1987).

De thiomolybdaten binden op hun beurt met het oplosbare koper zodat koper minder wordt geabsorbeerd (Suttle en Field, 1983). Bij ratten is ingespoten tetra-thio-molybdaat de beste antagonist tegen koper (Mills et al., 1981a). De effecten van ammonium-tetrathiomolybdaat op koper zijn afhankelijk van de manier waarop koper wordt opgenomen (Mills et al., 1981b). Tetrathiomolybdaat vertraagt groei bij schapen, terwijl ook de geslachtsrijpe leeftijd veel later komt (Moffor en Rodway, 1991). Trithiomolybdaat komt na toediening snel in de lever terecht. Het wordt dan gebonden aan hoogmoleculaire koperhoudende eiwitten. Het lijkt erop dat door toediening van S-Mo nieuwe kopereiwitten en nieuwe evenwichten ontstaan in de eiwitten, inclusief albumine (Wang et al., 1987). In vitro kinetiek-experimenten van trithiomolybdaat in runder- en honden-serum-albumine met koper laat zien dat het evenwicht tussen koper en molybdeenverbindingen met albumine reversibel zijn (Woods en Mason, 1987). Thiomolybdaat heeft een sterker effect dan cysteïne-Mo op de verhouding Cu-oplosbaar/-onoplosbaar eiwitgehalten (Allen en Gawthorne, 1987b). Thiomolybdaat veroorzaakt een verschuiving van koper naar de TCA-onoplosbare-fractie in het serum bijvoorbeeld bij schapen (Gooneratne et al., 1981a). Dit koper is biologisch niet beschikbaar. Hierdoor heeft thiomolybdaat een beschermende werking tegen kopervergiftiging bij schapen (Gooneratne et al., 1981b).

Tetrathiomolybdaat bevordert bij diverse diersoorten de uitscheiding van koper via de galwegen. Ook wordt de binding van koper met macromoleculen bevorderd, waardoor koper niet meer biologisch beschikbaar is. Hierdoor ontstaat een negatieve koperbalans (Gooneratne et al., 1989a, Gooneratne et al., 1989b). Ook humaan is de behandeling van mensen met koperstapeling door thiomolybdaat beschreven (snelle verwijdering van koper) (Danks, 1991). Tetrathiomolybdaat verhoogt specifiek de koperuitscheiding via de gal, maar niet de uitscheiding van zink of ijzer (Gooneratne et al., 1989c). In andere weefsels waar ook koper wordt gevonden lijkt er wel een significant effect te zijn, maar dit effect is zelden klinisch van betekenis (Sugawara et al., 1999). Wel lijkt molybdeen in de vorm van ammonium-tetrathiomolybdaat een verandering te veroorzaken van de koperopslag van de lever naar de hersenen. Er is namelijk een verband gevonden tussen de koperstatus in de lever voor en na toediening van ammonium-tetrathiomolybdaat en de hoeveelheid koper in de hersenen voor en na toediening bij dieren die een hoge koperstatus in de lever hebben (Haywood et al., 1998).

Zwavel remt, vooral in combinatie met molybdeen, de koperbenutting. Aan de ene kant wordt de opname van koper uit het maagdarmlkanaal geremd door vorming van niet opneembare verbindingen, aan de andere kant wordt ook de kopervoorraad in de lever aangesproken zonder dat dit koper biologisch beschikbaar komt. De chemische vorm waarin zwavel voorkomt is van belang voor de grootte van het effect. De beschikbaarheid van Cu kan geschat worden op basis van gehalten aan S en Mo in het voer. Bij een S-gehalte van 3 mg per kg ds zou de absorptiecoëfficiënt bij een Mo-gehalte van 1 mg/kg ds ruim 4% bedragen en bij een Mo-gehalte van 4 mg/kg ds ruim 3%. Een absorptiecoëfficiënt groter dan 5% wordt behaald bij een S-gehalte van 2 of minder, waarbij de verschillen tussen de verschillende Mo-gehalten klein zijn (ARC, 1980). Deze gegevens zijn bij schapen vastgesteld. Gegeven de Mo- en S-gehalten in het veenweidegebied zullen beide elementen de Cu-benutting waarschijnlijk belemmeren.

2.4.3 IJzer

Ook ijzer is voor de kopervoorziening van belang. Met name ingekuuld gras kan hoge Fe-gehalten bevatten, welke deels veroorzaakt worden door hogere grondgehalten. Daarnaast kan drinkwater rijk aan ijzer zijn en loopt het Fe-gehalte van mineralenmengsels uiteen. Effecten van extra ijzer werden onderzocht door Humphries et al. (1983) in een proef met vier behandelingen: een controlegroep, een groep met 800 mg Fe/kg, 5 mg Mo/kg of 800 mg Fe/kg en 5 mg Mo/kg. Voordat met deze behandelingen begonnen werd, werd een Cu-arm rantsoen gegeven om de lever-kopergehalten tot 100 mg/kg ds te verlagen. Mo-supplementatie (al dan niet in combinatie met Fe) leidde tot een lagere voeropname, groeivertraging en een slechtere voerbenutting. Na 20 weken traden uiterlijke veranderingen op bij de kalveren die Mo, al dan niet in combinatie met Fe, opnamen. De textuur van het haarkleed veranderde en er trad depigmentatie en een moeilijke gang ("stilted gait") door een steile stand van de ondervoet op. Dat wordt als een typisch kenmerk van kopertekort beschouwd. Diarree bleef in het geheel uit. De symptomen van een Mo-overmaat stemden overeen met die van een kopertekort, hetgeen bij een Fe-overmaat niet het geval was. Bij een kopertekort ten gevolge van een Fe-overmaat werden namelijk nauwelijkszichtbare afwijkingen geconstateerd. Over mogelijke oorzaken van verschillen in effecten van Mo ten opzichte van Fe op de koperstofwisseling was ten tijde van uitvoering van het onderzoek weinig bekend. De koperstatus werd door alle supplementaties duidelijk beïnvloed: plasma- en leverkopergehalte daalden duidelijk onder invloed van de Fe-, Mo- of een combinatie van Fe- en Mo-opname. De activiteit van Cu-bevattende enzymen ceruloplasmine en superoxide-

dismutase (SOD) bleek eveneens af te nemen. Bij de mens speelt bij klinische effecten van een chronisch ijzerverschot eerder Mn-SOD een rol dan CuZn-SOD (Zhao et al., 1995). Het kopergehalte in de lever bleek al 8 weken na het begin van de behandeling fors verlaagd te zijn, terwijl het plasma Cu-gehalte pas op de bemonstering na 16 weken significant gedaald was. De activiteit van plasma-ceruloplasmine was eveneens pas na 16 weken verlaagd. Hierbij werd om de 8 weken bemonsterd en frequenter bemonsteren kan een gedetailleerder verloop van deze parameters verschaffen.

Geconcludeerd kan worden dat Fe een duidelijk remmend effect op de Cu-beschikbaarheid heeft. Blijkbaar treedt dat effect al bij Fe-opname van 800 mg per kg voer op! De symptomen die bij door andere oorzaken veroorzaakte kopertekorten optredend blijven echter uit. Later onderzoek gaf aan dat al bij 250 mg Fe/kg voer Cu-reserves in de lever verminderd worden. Dat betekent dat op het merendeel van de melkbedrijven in Nederland de Cu-status door de opname van Fe via ingekuild gras verlaagd zou kunnen zijn. Ontijzering van ijzerrijk drinkwater kan de kopervoorziening ten goede komen.

2.4.4 Zink

Naast molybdeen, zwavel en ijzer zijn er ook nog andere (tweewaardige) elementen zoals zink die een interactie kunnen aangaan met het koper. Zink speelt een rol bij het afweermecanisme. Tijdens de fase van acute infectie wordt serum-Zn verplaatst naar Zn-methionine in de lever. Dieren die geen methionine kunnen maken vertonen dit effect niet. Dus methionine speelt een essentiële rol bij het transport van zink (Rofe et al., 1996). De stoffen die een effect hebben op de methionine-synthese, hebben ook effect op het kopermetabolisme indien zink (of bijvoorbeeld cadmium) aanwezig is (Southern en Baker, 1983). Ook bij kippen is er een relatie tussen zink, koper en infecties (bijvoorbeeld Eimeria-besmetting). Zinkgebrek komt niet door besmetting. De zinkbehoefte kan niet worden gemeten door bloed-Zn of bot-Zn. De infectie verlaagt bij pluimvee wel de Zn-weefsel-niveaus terwijl zink en koper onderling een antagonistische werking hebben (Southern en Baker, 1983).

Bekend is dat toevoegen van zink aan het rantsoen de kopergehalten in de lever kan verlagen (Allen en Masters, 1980). Ook hier zijn weer grote verschillen tussen de diersoorten. Bij varkens kan een overmaat aan zink kopertekort veroorzaken (Pritchard et al., 1985). Bij nertsen is het zinkgehalte in de lever direct gecorreleerd met het zinkgehalte in het voer maar zijn geen effecten op koper gemeten (Aulerich et al., 1991). Bij ratten werd in een studie aangetoond dat een hoge opname van zink geen effect heeft op het kopergehalte in het bloedplasma. Er leek wel een verminderde uitscheiding van koper via de urine plaats te vinden (Bonner et al., 1981). In een andere studie met ratten werd echter gevonden dat toediening van zink (via zinksulfaat) het kopergehalte in het serum laat dalen (Hallmans, 1978). Bij schapen is er weer wel een duidelijke interactie tussen zink en koper gevonden: een verhoogde zinkopname kan kopervergiftiging voorkomen. Na zinktoediening werd een daling van het kopergehalte in de lever met 40 % gemeten (Bremner et al., 1976). De verdeling van koper en zink over de diverse weefsels (inclusief bloed) bij schapen is afhankelijk van leeftijd en opname van deze metalen. Indien zink wordt toegediend, wordt koper lager in bloed maar niet in de lever. Wel is de spiegel van het eiwit ceruloplasmine dan lager (Saylor en Leach, 1980). Paarden zijn erg gevoelig voor zinkovermaat zonder dat dit echter aan de koperstatus valt te relateren (Kowalczyk et al., 1986).

Na extra zinktoediening bij kalveren werd een zinkgehalte in de lever gemeten van 1400 mg/kg ds en in de nier van ongeveer 1000 mg/kg ds. De gehalten aan mangaan, koper en ijzer waren niet veranderd (Graham et al., 1988). Indien veel koper aanwezig is, lijkt zink een koperreducerend effect te hebben bij jonge, nog niet herkauwende kalveren (Jenkins en Hidioglou, 1989). Bij volwassen runderen worden echter geen duidelijke effecten van zink op de koperhuishouding gerapporteerd.

2.4.5 Overige metalen en spoorelementen (seleen, lood, cadmium, arseen, kwik, mangaan)

Aangezien er veel tweewaardige metalen en spoorelementen zijn, mag men verwachten dat veel metalen een interactie kunnen aangaan met koper. Echter men moet bedacht zijn op vereenvoudigde modellen die later niet blijken te voldoen. Niet alleen effecten op koper zijn geconstateerd, ook omgekeerd: er blijkt een sterke interactie te zijn tussen koper, sulfaat en verhoogd seleen bij ratten (Kezhou et al., 1987). Dit terwijl er bij schapen geen effect lijkt te zijn van koper alleen of in combinatie met molybdeen op de seleenstatus (White et al., 1989a). Een andere aangetoonde relatie is de relatie tussen koper en lood bij ratten: koper versterkt het effect van loodvergiftiging (Cerklewski en Forbes, 1977). Ook effecten van tin op koper zijn beschreven (Chiba et al., 1984), evenals interacties tussen koper en arseen en cadmium, vrijkomend bij koper- en zinksmelters (Diaz-Barriga et al., 1990). Mogelijk verlopen deze effecten via metallothioninen (Liu et al., 1994). Daarom had een deel van het

onderzoek ook betrekking op het effect van diverse stoffen op de MT-synthese (Steinebach en Wolterbeek, 1994).

2.4.6 Diversen

Alle koperbindende stoffen kunnen ook de koperhuishouding beïnvloeden. Bijvoorbeeld alfa-aminozuren (Treshchalina en al., 1985), cysteine (Baker en Czarnecki-Maulden, 1987), enzovoort. Ook fysiologische afwijkingen (zoals proximale tubulaire necrose van de nier) kunnen leiden tot een verstoorde koperhuishouding (meer koper wordt uitgescheiden via de urine) (Chmielnicka et al., 1992).

2.5 Organische mineralen

Behalve door interacties zou het ook kunnen dat door verschillende biochemische eigenschappen van de stoffen waarin de mineralen in het rantsoen voorkomen de beschikbaarheid verschilt. Koper kan namelijk in vele fysisch-chemische vormen in het milieu voorkomen, met grote verschillen in biobeschikbaarheid. Deze kan nog niet goed worden vastgesteld (Slooff et al., 1990). Indien bijvoorbeeld een deel van de mineralen in graskuil aanwezig is in aanhangende bodemdeeltjes dan is het waarschijnlijk dat deze mineralen minder goed benut kunnen worden dan die in de plantendelen. Ook is er de laatste jaren een toenemende belangstelling voor organisch gebonden mineralen, vooral in de USA. Met organisch gebonden mineralen wordt in dit onderzoek overigens niet bedoeld op bijvoorbeeld zeewierpreparaten, maar op mengsels waarin mineralen aan organische dragers zijn gebonden. Vooral zink wordt in de USA in organisch gebonden vorm veel gebruikt, veel meer dan in Duitsland (Schenkel, 2000). Het gaat daarbij vooral om chelaten. Daarbij is de gedachte dat mineralen in deze vorm beter benutbaar zijn dan mineralen uit anorganische verbindingen. De betere benutbaarheid zou veroorzaakt worden door een verminderde afbraak in de pens en verbeterde absorptie in de dunne darm. Het meeste onderzoek is uitgevoerd naar zink en in mindere mate koper. Uit onderzoek van Gruber en Bellof (1998) bleek dat verstrekken van organisch gebonden zink aan melkkoeien een verlagend effect had op het celgetal in vergelijking met Zn-oxide. Clark et al. (1995) vonden dat het immuunsysteem bij vleesvee-vaarzen beter functioneerde na toediening van organisch gebonden mineralen (Zn, Cu, Mn en Co) dan na toediening van dezelfde hoeveelheden anorganische mineralen. Campbell et al. (1999) vonden dat organisch gebonden mineralen (o.a. Cu-lysine en Zn-methionine) toegediend bij rantsoenen met voldoende mineralen een zeer beperkte gunstige invloed hadden op vruchtbaarheid maar geen effect op melkproductie of celgetal. Gallagher en Cottrill (1985) vonden dat de kopervoorziening via organisch gebonden koper in een oplosbare bolus niet beter op peil werd gehouden dan met koperoxide uit kopernaalden. Boila et al. (1984) rapporteerden geen duidelijke verschillen in Cu-bloedspiegels tussen verstrekking van koper als koperglycinaat en als kopersulfaat. Ook het onderzoek van Olsen et al. (1999) gaf geen duidelijke verschillen in effecten tussen organische en anorganische mineralen.

De resultaten van wetenschappelijk onderzoek naar de effecten zijn dus niet geheel eensluidend, en bovendien is er nog geen sluitende verklaring gegeven voor een mogelijk positief effect. Eén van de moeilijkheden is dat soms zeer hoge doseringen zijn gebruikt, hetgeen de vertaalslag naar de praktijk bemoeilijkt (Schenkel, 2000). Ook bij varkens en pluimvee zijn er geen duidelijke wetenschappelijke aanwijzingen dat zink in chelaatvorm een hogere beschikbaarheid heeft dan zinksulfaat. Zinksulfaat is voor beide diersoorten wel beter te benutten dan zinkoxide (Jongbloed et al., 1998). Voor herkauwers is koper uit koperoxide veel slechter te benutten dan koper uit kopersulfaat. Weijers (1931) geeft aan dat bij bloedarmoede bij de mens toepassen van organische of anorganische suppletie geen duidelijke verschillen te zien gaf. Wel was de zuiverheid van de preparaten van belang: te zuivere preparaten werkten vaak onvoldoende omdat er bijvoorbeeld ook koper nodig was. Indien dus bijvoorbeeld onzuivere organische preparaten vergeleken worden met zuivere anorganische preparaten dan kunnen de resultaten behoorlijk worden vertekend.

2.6 Onderzoek naar voorziening voor koper en koperantagonisten

Op vier proefbedrijven in Nederland is het effect van Cu-supplementatie bij pinken onderzocht. Op deze bedrijven waren eerder zeer lage Cu-waarden in serum vastgesteld. Supplementatie startte in de herfst van 1993 en deze werd tijdens het stalseizoen voortgezet. Gedurende het weideseizoen werd geen aanvullend Cu verstrekt. Nadat de dieren weer opgestald waren, kregen zij de laatste twee maanden voor afkalven krachtvoer bij. Deze periode waarin aan de proefgroep Cu gesupplementeerd werd, besloeg dus alleen een deel van de herfst en de daarop

aansluitende stalperiode. De Cu-status werd beoordeeld aan de hand van bloed- en leveronderzoek. Het ruwvoer bestond uit graskuil en snijmaïs of luzerne. Het gemiddelde zwavelgehalte bedroeg 3.7 g/kg ds, wat boven het landelijke gemiddelde van 2.8 ligt. Symptomen van Cu-tekort werden niet gesignaleerd en in gewicht en hoogtemaat deden zich geen significante verschillen voor. Het aantal inseminaties per dracht was voor beide groepen 1.7. Tijdens het stalseizoen was de groei per dag duidelijk hoger dan in het weideseizoen en het is niet uitgesloten dat bij een hoger groeiniveau in de weideperiode wel een groeiverschil ten gunste van de gesupplementeerde groep zou bestaan (Wentink et al., 1999). Ook de melkproductie en melksamenstelling in de eerste lactatie verschilde echter niet voor beide groepen, dus er is geen enkele aanwijzing voor schadelijke gevolgen van de slechte kopervoorziening.

In het buitenland zijn kopertekorten bij runderen aangetoond (Balbuena et al., 1999; Dargatz et al., 1999; McFarlane et al., 1990), soms ondanks extra koperverstrekking. Wel kan door extra koperverstrekking de koperstatus verbeteren (Balbuena et al., 1999; Smolders et al., 1993). Uit de bloedonderzoeken naar de koperstatus op PV-proefbedrijven blijkt dat ook daar regelmatig de norm (7.5-18 µmol/l) niet wordt gehaald. Op het proefbedrijf te Zegveld is het gemiddelde kopergehalte in het bloedplasma iets lager dan het overall gemiddelde. Gezien de hoge kopergehalten in het ruwvoer is dit waarschijnlijk vooral een gevolg van de relatief slechte benutting. Behalve de koperstatus geeft ook de status voor de koperantagonisten informatie over de kopervervoorziening. Wat dat betreft is op de PV-proefbedrijven bloedonderzoek uitgevoerd naar de zink- en seleniumstatus, de andere antagonisten zijn nauwelijks onderzocht.

Zink zit in het Nederlandse ruwvoer in het algemeen in ruim voldoende hoeveelheden. Via het krachtvoer wordt in het algemeen eveneens zink verstrekt. Tekorten zijn daarom in Nederland onwaarschijnlijk, in het buitenland kan dat anders liggen. Zo werd gevonden dat er bij vlesvee in de USA regelmatig zinktekorten voorkwamen, soms ondanks extra zinkvoorziening (USDA, 2000). Op het proefbedrijf in Zegveld zijn tot dusverre bij bloedonderzoek op zink alleen waarden binnen het normale gebied gevonden. Deze bepaling is bovendien niet vaak uitgevoerd, wat mede aangeeft dat er niet veel problemen werden vermoed met betrekking tot de zinkvoorziening. Ook Hartmans (1965) concludeerde dat de zinkvoorziening in Nederland in het algemeen ruim voldoende is, en dat extra zinkverstrekking in het algemeen moet worden afgeraden. Waarschijnlijk speelt zink in de praktijk als koperantagonist geen grote rol.

Het seleniumgehalte van Nederlandse ruwvoerders is zodanig laag dat in het algemeen aanvulling via krachtvoer noodzakelijk is om op 0.15mg/kg ds in het rantsoen te komen. Op zand- en veengronden komt de laagste seleniumstatus voor, met name bij pinken (Binnerts, 1979). Opvallend is daarom dat de graskuilen uit het veenweidegebied gemiddeld hogere seleniumgehalten hebben dan graskuilen uit de rest van Nederland. Mogelijk is ook de benutting van selenium in het veenweidegebied relatief slecht. Uit de bloedonderzoeken op PV-proefbedrijven blijkt dat zeer regelmatig de norm niet wordt gehaald. Dit komt op het proefbedrijf in Zegveld niet duidelijk vaker voor dan op de andere proefbedrijven. Op enkele bedrijven zijn aanzienlijke aantallen monsters onderzocht. Ook daarbij valt op dat de variatie in GSH-Px groot is. Omdat vooral een seleniumovermaat ongunstig is voor de koperbenutting, en die in de praktijk waarschijnlijk niet zo vaak voor zal komen, wordt vermoed dat ook selenium in de praktijk onder normale omstandigheden als koperantagonist geen grote rol speelt.

2.7 Klinische effecten van tekorten en overmaten aan koper

2.7.1 Inleiding

Zoals zoveel spoorelementen, kent ook koper in biologische systemen een zogenaamd driefase effect: bij een laag gehalte in het lichaam heeft toevoeging een stimulerend effect, bij een normaal gehalte ziet men geen klinisch verschil wanneer men iets meer toevoegt of weglaat en bij een hoog gehalte kan men remming op biologische processen waarnemen (Bozhkov, 1997). Zo zijn er dus effecten van (ernstig) kopergebrek en effecten van een (ernstige) overmaat aan koper beschreven. Bij verschijnselen die worden gezien bij kopergebrek is het bovendien afhankelijk van hoe het kopergebrek tot stand is gekomen: door verminderde opname, door verminderde beschikbaarheid, door verdringing bij opname, door verdringing bij transport of door verdringing in het lichaam.

Naast de hoeveelheid met het rantsoen opgenomen koper zijn er dus nog veel meer variabelen die een rol spelen bij het biologisch beschikbaar zijn van koper en de effecten die het opgenomen koper heeft. Zo is beschreven dat verandering van de zuurgraad van de bodem, leidend tot een verhoging van de molybdeenopname door planten, bij de eland een secundair kopertekort veroorzaakte. De klinische effecten die werden gezien bestonden uit:

diarree, verminderde eetlust, vermageren, verbleken van haarkleed, kaalheid op de kop, hartstilstand en botontkalking (Frank, 1998). Omgekeerd zijn de verschijnselen van kopervergiftiging per diersoort weer anders. Effecten van kopervergiftiging die werden gezien bij runderen (ten gevolge van opname van pluimvee-resten die waren behandeld met koperverbindingen) zijn verminderde eetlust, geelzucht, bloed in de urine, verstopping en diarree. Bij sectie werd een sterk geel gekleurde lever gevonden. De nieren waren donkerbruin en de blaas was gevuld met dezelfde donkerbruin gekleurde urine. De belangrijkste histopathologische bevindingen zijn weefselbeschadiging ten gevolge van stolling, geprogrammeerd afsterven van oude cellen ten gunste van jonge cellen bij weefselvernieuwing, galstuwings en vermeerdering van galgangen. In de nieren werden ontstekingen en de aanwezigheid van bilirubine gevonden (Tokarnia et al., 2000). Voor diverse diersoorten en voor de mens zijn toxische effecten beschreven van een overmaat aan koper: schapen (Van Niekerk et al., 1994; Van Ryssen en Stielau, 1981), kinderen (Walker, 1999) en kamelen (Abu et al., 1993). De klinische effecten kunnen worden begrepen indien de regulatie en de biochemie van koperovermaat (Dameron en Harrison, 1998) of kopertekort duidelijk zijn. Daarbij moet men zoals reeds eerder aangegeven, steeds rekening houden met het rantsoen: afhankelijk van het rantsoen kan eenzelfde hoeveelheid koper in verschillende mate toxisch zijn (Funk en Baker, 1991). De toxiciteit van koper hangt meer af van de vorm en de binding aan eiwitten dan van de absolute concentratie. Metallothionine is hierbij één van de belangrijkste eiwitten (Evering et al., 1991). Dit is een eiwitsoort die beschermt tegen kopervergiftiging (Freedman en Peisach, 1989). Of dit ook kan verklaren waarom vooral jongere dieren gevoelig zijn voor kopervergiftiging (Junge en Thornburg, 1989) of waarom toediening van koper de gemiddelde leeftijd van muizen verlaagt (Massie en Aiello, 1984) is nog niet geheel duidelijk.

2.7.2 Effect op bot

Een kopertekort leidt bij het rund onder meer tot botontkalking (Whitelaw et al., 1979). Bij paarden is aangetoond dat er een relatie is tussen ontstekingen in botvormende cellen en kopertekort. Mogelijk is hierbij ceruloplasmine van belang. Het kopertekort kwam in dit geval waarschijnlijk door zink of molybdeen (Bridges et al., 1984). De effecten van koper op botvorming worden veel meer bij jonge dieren gezien dan bij oudere dieren.

2.7.3 Effect op oxidatie

Koper is in het lichaam vaak in de Cu^+ -vorm aanwezig in eiwitten. Bij het vrijkomen kan dit koper eenvoudig door afgifte van een elektron naar Cu^{2+} overgaan. Dat koper een rol speelt als elektron-acceptor is aangetoond door nitraat – nitriet omzettingen in koperdeficiënte cellen (Matsubara et al., 1982). Hierdoor heeft koper een effect op veel biochemische oxidatieprocessen. Zo is na toediening van koper een toename van SOD en afname van GSH in levercellen van ratten gemeten. Een overmaat aan koper leidt hierdoor tot verstoring van anti-oxidant-enzymfuncties. (Abdel Rahim et al., 1986; Russanov et al., 1986). Dit kan schadelijke gevolgen hebben. Zo is aangetoond dat oxidatieve beschadiging na een koperoverdosis samenvalt met functionele afwijkingen van mitochondria (Sokol et al., 1993), via peroxidatieve splitsing in liposomen (Nakano, 1993). Het is dan ook niet verwonderlijk dat stoffen die oxidatie tegen kunnen gaan (vitamine E of GSH-Px) de schadelijke gevolgen van koperovermaat verminderen (Britton en Bacon, 1994; Sokol et al., 1990; Sokol et al., 1996). De werking van toxische stoffen die via vetoxidatie hun werking hebben, is afhankelijk van de koperstatus. Indien het toxisch effect niet via het mechanisme van vetoxidatie verloopt is dat niet het geval.

Tweewaardige metaalionen kunnen in het algemeen vet(per)oxidatie veroorzaken (elektronoverdracht). Met name ijzer (in laag gehalte), koper en vanadium (hoog gehalte) zijn hiervoor verantwoordelijk (Furono et al., 1996). Geoxideerde vetten zijn bijvoorbeeld bij het frituren niet meer bruikbaar doordat het smeltpunt verandert. Daarom moet ook nooit in een koperen pan worden gefrituurd. De relatie tussen koper en vetoxidatie is ook bij ratten aangetoond (Dillard en Tappel, 1984). Koper lijkt ook effect te hebben op het vetgehalte en serumcholesterol bij stieren: meer koper, minder vet in de achterhand (Engle et al., 2000). Toediening van extra kopersulfaat leidt bij ratten tot een verhoogd kopergehalte in de lever, vet-peroxidatie, verhoogd SOD en verlaagd GSH-Px (Sansinanea et al., 1998). Zeer waarschijnlijk zorgt het geoxideerde vet voor celbeschadigingen (Klein et al., 1998). Lysosomaal koper lijkt hogere toxiciteit te hebben dan metallothionine-koper (Klein et al., 1998). Tijdens koperdeficiëntie kunnen toevoegingen van leverbeschadigende stoffen via verandering van de vetoxidatie door koper grotere effecten hebben dan bij adequate kopervoorziening (Fischer et al., 1991).

2.7.4 Effect op andere spoorelementen en zware metalen

In de vorige onderdelen was sprake van effecten van andere spoorelementen op koper. Een teveel of tekort aan koper kan ook effect hebben op de opname en werking van andere spoorelementen en zware metalen. Met name langdurig matig verhoogde kopergehalten hebben nadelige effecten zonder dat dit direct tot klinische verschijnselen leidt. Bij schapen wordt het ijzermetabolisme verstoord, een overmaat aan koper zorgt voor een verhoogd plasma-ijzergehalte. Theil en Calvert (1978) vonden geen effect van koper op het ijzergehalte in lever, wel was het ijzergehalte in de milt sterk verhoogd. Langdurig verhoogde kopergehalten bij schapen beïnvloeden verder seleen, waarschijnlijk doordat de leverfunctie wordt aangetast en daardoor het seleenmetabolisme wordt verstoord (White et al., 1989b). Onderzoek van Koenig et al. (1991) gaf echter aan dat koper geen effect had op de seleenabsorptie bij melkkoeien. Deficiëntie aan spoorelementen verhoogt in het algemeen de opname (en daardoor de toxische werking) van zware metalen zoals lood en cadmium (Petering, 1978).

2.7.5 Effect op cellen en celorganellen

Veel effecten van kopertekort en koperovermaat worden veroorzaakt door effecten op het functioneren van cellen en celorganellen. In rattenlevers is aangetoond dat door koper meer malondialdehyde ontstaat hetgeen een beschadigend effect heeft op cellen. Andere eiwitten zoals albumine kunnen dit effect verminderen (Strubelt et al., 1996). Bij vissen is aangetoond dat koper het aantal lysosomen doet toenemen en het aantal mitochondria doet afnemen (Khangarot, 1992). De effecten van teveel koper in de lever zijn echter sterk afhankelijk van de diersoort (Alt et al., 1990). In de hepatocyten lijkt de celkern het belangrijkste celorgaan te zijn waar de toxiciteit plaats heeft (Denizeau en Marion, 1989). Omgekeerd kunnen chromosomale afwijkingen ook ontstaan door een kopertekort (Abba et al., 2000). De suggestie ligt voor de hand dat er in de celkern processen plaats vinden waarbij koper nodig is. Maar een teveel aan koper zorgt voor een verhoogde opname in de celkern met oxidatieve beschadigingen als gevolg. Uit elektronmicroscopisch onderzoek blijkt dat een koperoverdosis verhoging van de lysosomen, een gezwollen endoplasmatisch reticulum en celkerndegeneratie teweeg kan brengen (Fuentealba en Haywood, 1988). Bij toediening van koper bij schapen zijn de effecten op subcellulair niveau dat koper met name in levercellen in lysosomen en het cytosol aanwezig is (Kumaratilake en Howell, 1989a). De werking van molybdeen zou erin berusten dat na toediening van thiomolybdaat (bij schapen) koper uit de cytosol-fractie wordt vrijgemaakt (Kumaratilake en Howell, 1989b).

2.7.6 Effect op organen

De effecten van koper op cellen en celorganellen komen tot uitdrukking in effecten op organen. Bovendien is kopersulfaat irriterend voor de maag (Barceloux, 1999a). Dit is een puur chemisch etsen van de maag. Indien koper netjes wordt gestapeld, kan een verhoogd koper aanwezig zijn zonder klinische klachten (Weaver et al., 1999). Dit geldt voor meerdere diersoorten. Naast de lever is ook de nier een orgaan dat te lijden heeft van een overmaat aan koper.

Na experimentele toediening van relatief zeer hoge koperhoeveelheden bij ratten werden de nieren met een elektronenmicroscopie bekeken. Daarbij werd een onherstelbare celkernbeschadiging vastgesteld, gepaard gaande met intranucleaire stapeling van koper, zwavel, fosfor en calcium. Ook in de lysosomen werd koper aangetroffen (Fuentealba et al., 1989; Gooneratne et al., 1989d). Er vonden beschadigingen plaats in de tubuli van de nieren. De effecten op niercellen komen daarmee overeen met de effecten op levercellen. Op drie plaatsen in de nieren werden fysiologische beschadigingen aangetroffen na kopertoediening, vergelijkbaar met die van cadmiumtoxiciteit (Gooneratne et al., 1986). Hierdoor was ook de nierfunctie aangetast.

Onderzoek bij LEC-ratten geeft aan dat door stapeling van koper zink wordt verdrongen in Cu-Zn-Metallothionine waardoor hydroxyl-radicalen worden gevormd in plaats van dat het als Cu-Zn-MT als antioxidant werkt (Suzuki et al., 1996). Doordat de levercellen dan snel beschadigd kunnen worden, hebben hepatotoxinen bij dieren met koperstapeling een groter effect dan bij dieren met een normale koperhuishouding (Aston et al., 1998). Ook humaan zijn de effecten van koperovermaat op levercellen beschreven (met name DNA-effecten) (Aston et al., 2000). De sterfte van levercellen kan zo geleidelijk gaan dat de leverfunctie wordt verstoord zonder dat dit zichtbaar wordt in de leverenzymen in het serum (Gaeta et al., 1980).

Een verminderde beschikbaarheid van Cu/Zn-SOD leidt tot neurologische aandoeningen (Crow et al., 1997). Er zijn ook effecten van koper op hersenen beschreven. Koper speelt een rol bij de dimeer-vorming van hersencellen.

Vooraf indien koper vrijkomt ten gevolge van pathologische situaties, wordt de dimeer-vorming gestimuleerd. Hierdoor ontstaat er ook stimulatie van de NO-vorming (Matsui et al., 2000). Molybdeen geeft een vorm van hersenbeschadiging (poly-encephalomalacia) na zowel kopertekort als bij normaal koper waarbij thiamine geen rol lijkt te spelen (Sager et al., 1990). Tenslotte werden ook in andere organen soms afwijkingen gezien ten gevolge van kopervergiftiging. Bij ganzen veroorzaakte 600 mg/kg kopersulfaat een acute vergiftiging met verschijnselen vergelijkbaar met kopervergiftiging bij andere vogelsoorten. Daarbij werd een groenverkleuring van de longen gezien (Henderson en Winterfield, 1975).

2.7.7 Effect op enzymen, eiwitten en andere biochemische parameters

Tenslotte kan koper invloed hebben op diverse andere biochemische processen. Zo is bekend dat koperjodide in combinatie met organische verbindingen kan zorgen voor effecten op het DNA (Ahmad et al., 2000). Onderzoek naar de mutageniteit van organische koperverbindingen bij ratten leverde op dat mogelijk een lichte mate van mutageniteit aanwezig is, maar er geen sprake was van carcinogeniteit (Kostyniak et al., 1990). Door het bufferende effect van de lever ontstaan effecten van overmaat pas na langere tijd. Bij schapen werd bijvoorbeeld een lichte overmaat aan koper pas na 50 dagen in het serum teruggevonden (Bires et al., 1991). De effecten van een overmaat worden dan ook meestal gezien in enzymen die betrokken zijn bij oxidatieprocessen, bijvoorbeeld catalase bij forellen (Arillo et al., 1984), of bij leverenzymen (Jenkins, 1989; Rana en Kumar, 1981; Sugawara et al., 1995). Klinische effecten komen eerder aan het licht indien het dier een extra prikkel krijgt toegediend (verhoogde infectiedruk, meer andere mineralen, ozon, enzovoort).

2.8 Koper en fertiliteit

Effecten op de voorplanting kunnen worden onderscheiden in effecten op het mannelijk dier en het vrouwelijk dier. De literatuur is niet eenduidig over de effecten bij het mannelijk dier. Zo werd in een studie waarbij gekeken werd naar correlaties tussen spoorelementen en spermatellingen bij de mens geen effect van koper geconstateerd (Abou-Shakra et al., 1989). Het effect van molybdeen en molybdeen in combinatie met zwavel op de vruchtbaarheid van schapen is gemeten door de sperma-eigenschappen en testosteron te meten. Hierbij werd geconstateerd dat kopertekort ten gevolge van molybdeen en zwavel-molybdeen invloed heeft op de spermakwaliteit (zowel wat betreft hoeveelheid, beweeglijkheid als morfologie) (Van Niekerk en Van Niekerk, 1989). Ook bij in het wild levende impala's werden bij verhoogde kopergehalten in de lever sperma-afwijkingen (meer vacuoles) geconstateerd (Ackerman et al., 1999).

Bij het vrouwelijke dier is onder meer gekeken naar het effect van kopertekort of koperovermaat op de foetus. De foetus is gevoelig voor veranderingen van de koperstatus bij het moederdier. Zo heeft een verhoogde molybdeentoediening bij ratten ook effect op foetussen (Fungwe et al., 1989). Na toediening van koperacetaat worden ontstekingsreacties gezien door koperdepositie. Hierdoor ontstaat ook groeiachterstand bij embryo's. Dit wordt veroorzaakt door een verminderd aantal botvormende kernen (Haddad et al., 1991). Maar niet alleen een koperovermaat heeft een negatief effect op de ongeboren vrucht, ook bij kopertekort werd een dergelijk effect gezien. Afhankelijk van het kopergehalte in de lever, komt koper wel of niet in de drie verschillende eiwitfracties voor (eerst verdwijnt koper uit lichte eiwitten, dan intermediair en tenslotte uit zware eiwitten) (Keen et al., 1984). Indien dragende ratten worden blootgesteld aan zware metalen die de opname van koper en ijzer verminderen, kan dit tot gevolg hebben dat er ook een tekort is aan koper en ijzer bij de foetussen (Chmielnicka en Sowa, 1996).

Humaan geldt dat indien de moeder minder mineralen binnenkrijgt, er ook minder mineralen in de melk worden uitgescheiden (Dang et al., 1985). Muizen met weinig tot geen koper in de melk kunnen hun jongen niet in leven houden (Howell en Mercer, 1994). Dit betekent dus dat de spoorelement-status van het moederdier wel degelijk van invloed kan zijn op de hoeveelheid die wordt doorgegeven aan het kind.

Effecten van spoorelementen op de fertiliteit van koeien kunnen via drie wegen tot stand komen. Ten eerste maken veel spoorelementen deel uit van enzymen. Tekorten of overmaten kunnen de werking van diverse enzymen beïnvloeden. Dat heeft gevolgen voor de energie- en eiwitstofwisseling en de synthese van hormonen. Voor een optimale stofwisseling in de pens zijn macro- en micro-elementen nodig en daarom is een afname van de voeropname een symptoom van, eventueel geringe, deficiënties. Magnesium en kobalt zijn duidelijke voorbeelden hiervan. Ten slotte zijn spoorelementen bestanddelen van anti-oxidanten, die weefsel beschermen tegen de schadelijke effecten van zogenaamde vrije radicalen.

Gedurende veel jaren werd aangenomen dat een kopertekort tot verminderde fertiliteit zou leiden. Niettemin suggereerden Littlejohn en Lewis al in 1960 dat er geen relatie tussen koperstatus en fertiliteit van koeien zou bestaan (Black, 1998). Larson et al. (1980) onderzochten de relatie tussen serum koperconcentratie en diverse fertiliteitskenmerken van 115 Holstein koeien binnen een koppel en konden daarbij geen relaties vaststellen. Bij een observationele studie (Peterson en Waldern, 1977) werd gezocht naar de samenhang tussen rantsoenkenmerken en het non-return- percentage. De Cu/Mo ratio van kuilgras bleek de variabele met de sterkste samenhang te zijn. Dit was deels te verklaren uit het aandeel koper uit hooi van de totale koperopname. Het onderzoek werd uitgevoerd op 68 melkveebedrijven in een bepaalde regio in Canada. Phillippo et al. (1985) vonden geen relatie tussen de gemiddelde serum-koperconcentratie van koppels met het bevruchtingspercentage. Dat laatste liep van 37 tot 65% uiteen. Rowlands et al. (1977) vergeleken bloedwaardes van koeien afkomstig van meerdere bedrijven, waarbij koeien ingedeeld werden op basis van aantal inseminaties per conceptie. Koeien met 4 of meer inseminaties per dracht hadden een enigszins hogere koperconcentratie dan koeien met een lager aantal benodigde inseminaties (Rowlands et al., 1977). Verstrekking van extra organisch gebonden Co, Cu, Mn en Zn boven de norm aan melkkoeien die met bST werden behandeld had geen effect op de melkproductie en slechts een zeer gering verkortend effect op het interval afkalven-1^e tocht (Campbell et al., 1999). Bovendien was de tussenkalftijd niet verschillend. Bij schapen met een kopertekort werd door Suttle en Field (1974) een verminderde vruchtbaarheid gevonden. Uit onderzoek met Nederlandse gegevens bleek dat het ijzergehalte van graskuilen wel maar het kopergehalte niet was gerelateerd aan het non return percentage, maar de betekenis van dat verband leek gering. Een hoger ijzergehalte hing samen met een lager non return percentage (Ouweltjes, 2000). Phillippo et al. (1982) vergeleken het effect van supplementatie met alleen Fe, alleen Mo of Fe en Mo met elkaar. Een behandeling met S, al dan niet in combinatie met Mo ontbrak. Het drachtigheidspercentage was op bij de Mo-groep het laagst, Fe leek de fertiliteit niet te verminderen. Vervolgonderzoek gaf aan dat Mo-supplementatie het op gang komen van de puberteit vertraagt, de bevruchtingsresultaten verslechtert en het aantal ovulaties verlaagt. De toegepaste Mo-supplementatie bedroeg 5 mg/kg ds bij een rantsoen bestaande uit gerstestro aangevuld met gerst. Ovulatierekking leek toe te nemen naarmate de opname met Mo langer plaats vond. Mogelijk werd het effect van Mo veroorzaakt door een afname van de LH-release (Phillipo et al., 1987). Zij verwijzen naar studies op veengronden die bekend staan om hun hoge gehalten aan Mo en waar een relatie tussen de Cu-status en fertiliteit aangetoond werd. Het niveau van blootstelling aan extra ijzer was in dit onderzoek lager dan de ijzergehalten die aangetroffen worden in graskuilen die in het westelijk veenweidegebied gewonnen zijn. Het is daarom niet uit te sluiten dat dergelijke hoge ijzeropnames wel schadelijke effecten op de fertiliteit kunnen hebben.

De literatuur geeft weinig houvast om te vermoeden dat een kopertekort voor de fertiliteit van koeien van wezenlijke betekenis is. Een overmaat aan molybdeen (5 mg toegevoegde Mo/kg ds) kan wel tot verslechtering van de fertiliteit leiden en dit gaat gepaard met een lagere Cu-status. Onder dergelijke omstandigheden is een lage Cu-status niet zozeer oorzaak van een tegenvallende fertiliteit, maar een indicator van een te hoge Mo-opname. Meting van de Mo-status kan daarom relevant zijn. Ten aanzien van de effecten van een Fe-overmaat is gericht onderzoek vereist. Over de mogelijke betekenis van zwavel voor fertiliteit van koeien is in de literatuur geen informatie gevonden.

2.9 Koper en immuniteit

2.9.1 Inleiding

Het immuunapparaat bestaat uit een groot aantal componenten, waardoor onderzoek naar de invloed van omgevingsfactoren zoals voeding op het immuunapparaat veelal tot enkele onderdelen daarvan beperkt is. Zijn effecten op organen, cellen, biochemische parameters en organellen nog redelijk te meten, het meten van effecten op de afweer (immuunrespons) wordt veel moeilijker (De Hollander, 2001). De afweer bestaat uit een cascade van reacties waarbij diverse soorten cellen zijn betrokken. Hierbij zijn allerlei aanhechtingseiwitten op celmembranen van belang, evenals de capaciteit om lichaamsvreemde micro-organismen te verteren indien ze eenmaal zijn gefagocyteerd door afweercellen. Men kan daarom moeilijk spreken van 'het effect op afweer', hoogstens van 'het effect op een bepaald onderdeel van de afweer'. Het is dan van belang een goede inschatting te maken hoe belangrijk dit onderdeel is in de cascade van de afweer om een uitspraak te doen in hoeverre de afweer verminderd zou kunnen zijn ten gevolge van dit effect. Hierbij moet dan tenslotte weer rekening worden gehouden met verschillen tussen diersoorten. Veel studies eindigen dan ook met: de immuunrespons is getest door diverse testen (bijvoorbeeld: antilichamen te meten na toediening van varkens-erythrocyten; lymfocyt blastogeen-respons; PHA-test). Er worden dan geen consistente gegevens verkregen die een uitspraak kunnen doen over de immuun-functies (Ward en Spears, 1997).

Effecten van koperdeficiëntie op de immunestatus van dieren blijken tussen de diersoorten duidelijk te verschillen. Het eenvoudig extrapoleren van bevindingen bij de laboratoriumdieren naar melkvee is dan ook niet aan de orde. In onderzoek bij ratten (Windhauser et al., 1991) en muizen (Blakley en Hamilton, 1987) werd bij koperdeficiëntie een verminderde specifieke immunerespons gevonden. Bij vissen (forel) heeft een verandering van het gehalte aan koper en zink effect op witte bloedcellen: bij meer koper neemt het totaal aantal witte bloedcellen af en verschuift het beeld naar meer neutrofiële cellen (Dethloff et al., 1999). De effecten van kopertekort op afweer zijn ook afhankelijk van de wijze waarop het kopertekort tot stand is gekomen. Een door molybdeen veroorzaakt kopertekort heeft mogelijk andere effecten dan een tekort ten gevolge van verminderde resorptie. Een door thiomolybdaat veroorzaakt kopertekort benadeelt de macrofaagfunctie. De peroxidevorming in de macrofagen die nodig is voor de afbraak van lichaamsvreemde micro-organismen is dan minder, en de vetoxidatie hoger (Cerone et al., 2000). Wanneer de Coombs-test als maat voor de immunerespons wordt genomen, ziet men bij een koperovermaat een verhoogde indirecte Coombs-test. Dit betekent dat er meer erythrocyten met antistoffen in de circulatie zijn (Wilhelmsen, 1979).

Uit meting van de immunologische reacties (na challenge met BHV) bij molybdeenbehandelde dieren blijkt dat de afweer sterker reageert dan bij onbehandelde dieren (Arthington et al., 1996b). De studies die de effecten van kopertekort op afweer meten zijn echter niet consistent in hun resultaten. Gevonden werd enerzijds dat een kopertekort ten gevolge van verhoogd molybdeen een effect heeft op de neutrofiële witte bloedcellen zonder echter een direct meetbaar effect van de fysiologische activiteit van deze witte bloedcellen (Arthington et al., 1996a). In een andere studie werd anderzijds gevonden dat koperdeficiëntie ten gevolge van molybdeenovermaat een negatief effect lijkt te hebben op neutrofiel-fysiologie: er werd een verminderd vermogen om gisten uit te schakelen gemeten. Uit deze laatste studie kwam ook naar voren dat het aannemelijk is dat een molybdeen-geïnduceerd secundair kopertekort ernstigere gevolgen heeft dan een primair tekort (Boyne en Arthur, 1986).

Ook in andere studies wordt beschreven dat het immuunsysteem minder goed lijkt te werken na een thiomolybdaat geïnduceerd kopertekort (Cerone et al., 1998). Hoe ernstig de effecten zijn op de afweer is echter nog onduidelijk. Twee studies geven aan dat er zowel met als zonder toediening van extra molybdeen effecten zijn van kopertekort op de immunerespons van runderen na stimulatie van het immuunsysteem, maar dat deze effecten niet dramatisch zijn (Ward en Spears, 1999). Ook in een artikel van Suttle over de weerstand en de immunerespons bij koeien werd geconstateerd dat kopertekort in combinatie met molybdeenovermaat de gevoeligheid van lammeren voor microbiële infecties verhoogt. Ook maag- en darmnematodes kunnen dan beter aanhechten, maar zijn niet sterker ziekteverwekkend. Molybdeen lijkt acute-fase-respons te stimuleren (Suttle en Jones, 1989). Tenslotte heeft natuurlijk niet alleen koper (overmaat of tekort) een effect op de afweer, maar de combinatie met andere stoffen is ook van belang voor de totale afweer. Bij een studie waarbij diverse stoffen (thiamine, zwavel, koper, molybdeen) werden betrokken, bleek koper vooral effect op fagocytose te hebben (Olkowski et al., 1990b).

2.9.2 Onderzoek bij runderen

Over onderzoek naar het effect van de koperstatus op de immuniteit tegen infecties werd al in het begin van de jaren 80 gepubliceerd. In Brits onderzoek werd de koperstatus van ooien, lammeren en kalveren gemanipuleerd: controledieren hadden toereikende Cu-status en proefdieren waren koperdeficiënt. De immunestatus werd door middel van verschillende testen geëvalueerd waaronder het vermogen van de leukocyten om de schimmel *Candida albicans* te fagocyteren en te doden. Hierbij bleek dat het vermogen de schimmel te doden door de koperdeficiëntie ernstig afnam. Het fagocyterend vermogen werd echter niet door de Cu-status beïnvloed. Supplementatie na een periode van tekort ging gepaard met herstel van de capaciteit de schimmel te doden (Jones en Suttle, 1981).

Het functioneren van neutrofielen werd onderzocht bij kruislingvaarzen die op verschillende rantsoenen gevoerd werden. Deze bestonden uit een met Cu gesupplementeerd rantsoen, een rantsoen waaraan Mo of Fe was toegevoegd en als vierde een Cu gesupplementeerd rantsoen dat beperkt gevoerd werd. Inductie van een kopertekort door Mo en door Fe en beperking van de voeropname leidde tot een afname van het vermogen om *Candida albicans* te doden. De fagocytose-activiteit was lager voor de groepen met de Mo en de Fe supplementatie. Ook andere eigenschappen waren verminderd door supplementatie met Mo of Fe, zoals de SOD-activiteit en het percentage dode cellen na incubatie. De auteurs concludeerden dat een kopertekort ontstaat door supplementatie met Mo of Fe gepaard gaat met een afname van diverse functies van neutrofielen en dat geldt in mindere mate voor een beperking van de voeropname (Boyne en Arthur, 1986).

Gedurende vijf maanden werden vleeskalveren met of zonder kopersupplementatie gevoerd. De dieren werden experimenteel besmet met een virus (IBR) en een bacterie (*P. hemaolytica*). Het serumkopergehalte, de ceruloplasmine-activiteit en het kopergehalte in diverse organen waren steeds hoger bij de met koper gesupplementeerde dieren. De SOD-activiteit was in de lever, maar niet in longweefsel, verlaagd. Er werden geen verschillen in immuunglobulinen G en M gevonden. De koperdeficiënte kalveren bereikten sneller een piekwaarde aan antilichamen tegen IBR dan de kopergesupplementeerde groep. De antilichaamtiter tegen *P. hemaolytica* waren 30 dagen na de infectie veel hoger bij de met koper gesupplementeerde kalveren dan bij de koperdeficiënte kalveren. Zowel voor als na de infectie was er geen effect van de koperstatus op het vermogen van lymfocyten tot celdeling. Dat bleek na prikkeling van de lymfocyten met phytohemagglutine-P (PHAP) en pokeweed mitogeen (PWM) (Stabel et al., 1993).

Oudere pinken van vleesrassen en later hun kalveren werden blootgesteld aan een van vier behandelingen: een controlegroep of supplementatie met hetzij Fe, hetzij Mo, hetzij Cu. De behandelingen bleken geen effect te hebben op het IgG-gehalte van de geproduceerde biest of het serum IgG-gehalte van kalveren van 7 dagen oud. Deze kalveren werden verder vervolgd en alleen de met Cu gesupplementeerde kalveren hadden een toereikende Cu-status, de andere waren deficiënt. De met Mo gesupplementeerde kalveren vertoonden verschijnselen van kopertekort (ruig haarkleed, kleurveranderingen). Deze kalveren hadden bovendien lagere antilichaamtiter dan de controlekalveren. Cu-supplementatie ging op sommige intervallen gepaard met lagere antilichaamtiter dan de controle of de met Fe gesupplementeerde groep na een tweevoudige injectie met varkenserytrocyten. Dezelfde effecten werden gevonden bij gangbare blastogene respons testen van lymfocyten. De auteurs vermoeden dat andere fysiologische functies zoals de energie- en eiwitstofwisseling of de mineralenhuishouding eerder door een Cu-tekort beïnvloed worden dan dat de specifieke immuniteit verminderd is (Ward et al., 1997).

Verschillende immuniteitsparameters werden bij 5 maanden oude vleeskalveren onderzocht, door Cerone et al. (1998) waarbij bij één groep Cu-deficiëntie door een Mo- en S-overmaat geïnduceerd werd. Deze Mo- en S-overmaat leidde na 2 maanden tot een afname van het serum kopergehalte en tot een minder grote daling van de ceruloplasmine-activiteit. Het aantal leukocyten bleek niet beïnvloed te worden door de Cu-status, maar wel de differentiatie ervan. Het Cu-tekort ging gepaard met:

- 1) een toename van de monocyten,
- 2) een afname van de B-lymfocyten met 40%,
- 3) een afname van de T-lymfocyten met slechts 7%,

De neutrofielen bleken onder invloed van het Cu-tekort een geringer fagocyterend vermogen te hebben. Het wordt niet op voorhand uitgesloten dat deze effecten het gevolg zijn van de Mo-overmaat in plaats van het tekort aan Cu, zoals ook bij fertiliteit het geval bleek te zijn.

Specifiek bij melkvee is nog weinig onderzoek verricht naar effecten van de koperstatus op onderdelen van het immuunapparaat. De Cu-status lijkt echter wel van invloed te zijn op het functioneren van dat immuunapparaat. Mogelijk heeft een Mo-overmaat, evenals bij fertiliteit, een direct negatief effect. Bevindingen bij laboratoriumdieren gelden niet zonder meer voor melkvee. Bij nieuw onderzoek naar aspecten van de kopervoorziening bij melkvee dienen verschillende immuunparameters geëvalueerd te worden.

2.10 Koper als pro-oxidant en anti-oxidant

2.10.1 Algemeen

Oxidatieve stress wordt veroorzaakt door "vrije radicalen". Met vrije radicalen worden zeer reactieve zuurstof- en stikstofverbindingen bedoeld, waarvan de hoge reactiviteit een gevolg is van het bezit van een of meer *ongepaarde* elektronen. Van meer dan 15 verbindingen is bekend dat deze tot oxidatieve stress kunnen leiden en enkele belangrijke radicalen zijn de volgende: het superoxideanion $O_2^{\cdot-}$, waterstofperoxide H_2O_2 , en het hydroxylradicaal OH^{\cdot} . Het lichaam beschikt over een groot aantal mechanismen om zich tegen deze reactieve verbindingen te beschermen.

Deze vrije radicalen worden onder normale stofwisselingsomstandigheden in de cellen aangemaakt en oxidatieve stress ontstaat indien de vorming van deze radicalen duidelijk toeneemt of indien beschermende mechanismen tekort schieten. Houdt oxidatieve stress enige tijd aan, dan leidt dat tot beschadiging van in principe alle moleculen en weefsels. Lipiden zijn erg gevoelig voor oxidatieve beschadiging en doordat celmembranen veel onverzadigde vetzuren bevatten, kan schade door lipidperoxidatie optreden. Beschadiging van eiwitten kan de activiteit van de betrokken enzymen verminderen. Dit kan ook veroorzaakt worden door producten die ontstaan

door oxidatieve beschadiging van sacchariden zoals glucose. Oxidatieve beschadiging is met behulp van diverse parameters meetbaar. Alleen met behulp van dergelijke parameters is goed onderzoek naar de effecten van pro-oxidanten en de behoefte aan specifieke anti-oxidanten mogelijk. Humaan speelt oxidatieve stress een oorzakelijke rol bij veel ziektes (kanker, hart- en vaatziekten, neurondegeneratieve ziektes, diabetes en reuma) en veroudering.

Koper kan zich evenals Fe als pro-oxidant gedragen. Dat wil zeggen dat verbindingen van beide elementen de vorming van "vrije radicalen" kunnen versterken. Minder reactieve radicalen zoals het superoxideanion $O_2^{\bullet-}$ en waterstofperoxide (H_2O_2) kunnen met Fe radicalen vormen die veel reactiever zijn, zoals het hydroxylradicaal OH^{\bullet} . Deze reactie staat bekend als de "Fenton-reactie". Normaal gesproken is Fe aan de intracellulaire inhoud gebonden, maar het kan daaruit vrijgemaakt worden. Koper is normaliter niet voor oxidatieve reacties beschikbaar, behalve bij excessieve opname.

2.10.2 Melkvee

Bij melkvee is weinig specifiek onderzoek met betrekking tot de aard en omvang van oxidatieve stress verricht. Traditioneel stonden met name selenium en vitamine E bij melkvee in de belangstelling, en in geringe mate β -caroteen. Parameters die aard en omvang van oxidatieve stress weergeven, werden bij melkvee tot nu toe nagenoeg niet gehanteerd. Als eerste dienen bestaande testen hiervoor op hun bruikbaarheid bij melkvee te worden geëvalueerd.

Rundvee kan aan zowel een Fe als Cu-overmaat blootgesteld worden. Het langdurig overdoseren van koeien met koper of ijzer kan in potentie nadelige effecten voor de gezondheid en vruchtbaarheid van koeien hebben. Het is thans niet bekend welke combinatie van duur en hoogte van een overmaat van Fe en/of Cu tot méér radicaalvorming bij melkvee leidt. Radicalen kunnen door anti-oxidanten onschadelijk worden gemaakt en veel stoffen hebben een anti-oxidatieve werking. Enkele daarvan bevatten koper: ceruloplasmine en Cu-Zn-superoxidedismutase. Tekorten aan Cu leiden tot een verminderde beschikbaarheid van deze anti-oxidanten. Cu is dus van belang als anti-oxidant, maar mogelijk ook als pro-oxidant.

Het is duidelijk dat specifiek onderzoek naar de aard en omvang van radicaalvorming en de rol van tekorten en overmaten aan sporelementen als Fe en Cu daarbij gewenst is. Bij de vakgroep Gezondheidszorg Landbouwhuisdieren van de Faculteit der Diergeneeskunde is daar middels een pilotstudy met zes koeien in de zomer van 2000 een begin mee gemaakt. Op grond van dergelijk onderzoek kan normering voor de behoeftes aan sporelementen en vitamines beter onderbouwd worden.

3 Omgevingsfactoren met betrekking tot de kopervoorziening

3.1 Algemeen

Graskuil is in de afgelopen 30 jaar steeds meer in de plaats van hooi in het rantsoen gekomen (COMV, 1996). Dit heeft een ongunstig effect op de koperabsorptie, omdat koper uit hooi beter benutbaar is dan koper uit graskuil. Verder wordt het gewas waarschijnlijk ook in een jonger groeistadium gemaaid. Hierdoor stijgt het eiwitgehalte, ook dit wordt als ongunstig voor de koperbenutting aangemerkt. De veranderde wijze van mestaanwending leidt in het algemeen tot een verminderde uitspoeling van mineralen. Waarschijnlijk geldt dat door de sterke binding aan organische stof in veel mindere mate voor koper en zink. Een andere verandering is dat de productie per koe aanzienlijk is gestegen. Dit is gepaard gegaan met hogere krachtvoerniveaus. Bovendien is het gebruik van losse mineralen in de melkveehouderij tamelijk ingeburgerd en lijkt nog stijgend. De belangrijkste redenen om extra mineralen te verstrekken zijn ziektepreventie en verbeteren van de vruchtbaarheid. Aan hoogproductieve koeien wordt vaak boven de Nederlandse normen mineralen verstrekt, omdat getwijfeld wordt of die normen voor deze dieren wel voldoende hoog zijn. Vermoed wordt dat door extra mineralen te verstrekken de algehele weerstand wordt verbeterd. Inmiddels wordt getracht de krachtvoerhoeveelheden weer te verlagen en eigen geteeld krachtvoer te gebruiken. Voor de biologische melkveehouderij zijn beperkingen ten aanzien van het gebruik van losse mineralen bovendien niet denkbeeldig. Daarmee vermindert de mineralenvoorziening van het melkvee aanzienlijk. Deze veranderingen kunnen er toe leiden dat suboptimale mineralenvoorziening meer problemen gaat veroorzaken.

In dit hoofdstuk wordt als eerste ingegaan op de omgevingsfactoren lucht, water en bodem. Lucht wordt meegenomen omdat het een van de mogelijke aanvoerroutes van mineralen is en er hierin bovendien regionale verschillen kunnen bestaan. Oppervlaktewater is vooral van belang omdat het als drinkwater voor het vee dient. Tevens is het een mogelijke aanvoerroute van mineralen. De bodem is van belang omdat hierop het ruwvoer groeit en omdat bodemdeeltjes worden opgenomen door het vee. Verder staat ook het oppervlaktewater in contact met de omliggende landbodem.

3.2 Lucht

Aanvoer van spoorelementen via de lucht kan oorzaak zijn voor specifieke problemen. Dat was bijvoorbeeld het geval in de omgeving van Arnhem, waar door luchtverontreiniging een sterke verhoging van de molybdeengehalten van het ruwvoer optrad (Verweij, 1970). Het betrof hier een extreem hoge uitstoot, zodat problemen vrij snel optraden. Lagas et al. (1996) noemen regionale verschillen in atmosferische depositie ook als één van de oorzaken voor verhoogde gehalten aan zware metalen in het westelijke weidegebied.

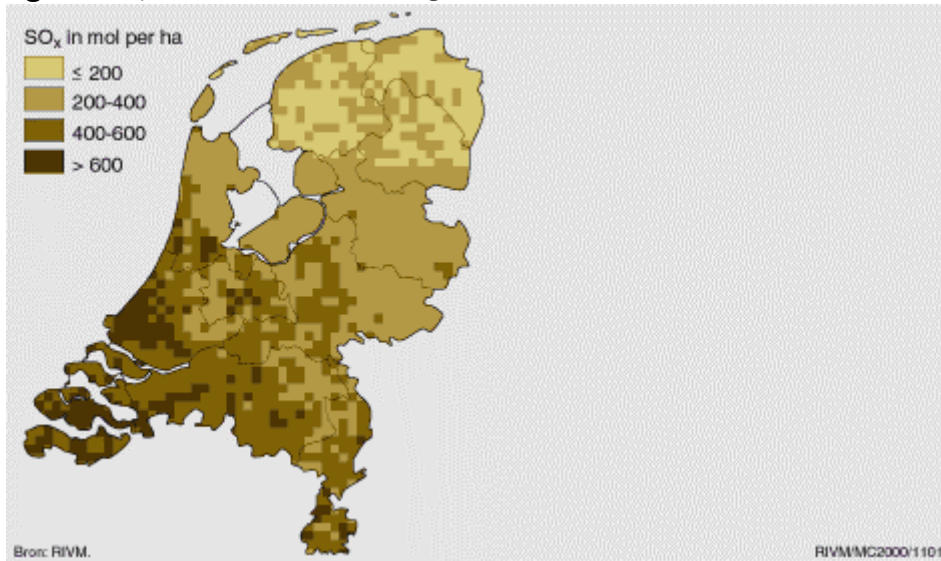
Van de in dit onderzoek meegenomen mineralen worden niet systematisch gegevens verzameld van emissie van Mo, Ca, Fe en Se. Er zijn wel gegevens beschikbaar over de emissie van zware metalen naar de lucht (RIVM, 2000). Hiervan is echter geen regionale verdeling gegeven. Er blijkt sprake te zijn van een geringe toename van de emissie van koper en een duidelijke afname van de emissie van zink. Enkele cijfers staan in tabel 1.

Tabel 1 Emissie van zware metalen naar de lucht

Metaal	Emissies naar lucht (in 1 000 kg) per jaar				
	1990	1995	1997	1998	1999*
Koper (Cu)	36	39	42	42	45
Zink (Zn)	213	135	107	90	91

Bron : VROM/HIMH (Milieucompendium 2000)

Uit gegevens van de milieudienst Rijnmond blijkt dat de luchtkwaliteit in de Rijnmond de laatste jaren is verbeterd (DCMR Milieudienst Rijnmond, 2000). Zo is de uitstoot van zware metalen naar de lucht uit afvalverbrandingsinstallaties door technische aanpassingen sterk gedaald. Dit rapport biedt geen vergelijkende cijfers met andere delen van Nederland. Waarschijnlijk is de emissie in de Rijnmond echter niet duidelijk hoger dan in andere delen van het land, omdat de industrie slechts een beperkte bijdrage levert. Het grootste deel van de emissie is afkomstig van het verkeer, daarom is de emissie waarschijnlijk gerelateerd aan de verkeersintensiteit. Verder zijn er cijfers beschikbaar van de depositie van zwavelverbindingen die in de atmosfeer uit SO₂ ontstaan. Hiervan is wel een regionale verdeling gegeven in de onderstaande figuur.

Figuur 1 Depositie van zwavelverbindingen via de lucht in 1999

De zwaveldepositie is hoger in gebieden met veel menselijke activiteiten, zoals de Randstad. Vooral ten noorden van Rotterdam is de depositie hoger dan in de rest van het land. Ook in gebieden met een hogere ruwheid van het terrein, zoals de Veluwe bossen, is de depositie relatief hoog. In het noorden van het land is er sprake van duidelijk lagere depositie. Uit deze figuur blijkt tevens dat in het grootste deel van het veenweidegebied de depositie niet hoger is dan in de rest van Nederland. Uit het milieucompendium blijkt verder dat de uitstoot van zwavel vanuit de diverse bronnen naar de lucht de laatste jaren aanzienlijk is afgenomen. Hierdoor zijn er inmiddels gebieden waar landbouwkundig gezien zwaveltekorten voorkomen (Bussink, 1999), vooral zandgebieden in noord Nederland. Door zwavelbemesting kan in die gebieden de grasopbrengst worden verhoogd.

Samenvattend kan worden gesteld dat het westelijke veenweidegebied wat betreft de aanvoer van de in dit onderzoek in beschouwing genomen mineralen via de lucht niet sterk lijkt af te wijken van andere gebieden in Nederland.

3.3 Water

Behalve emissie naar de lucht vindt ook emissie plaats naar oppervlaktewater. In het Milieucompendium (RIVM, 2000) worden alleen cijfers gegeven van de emissie van zware metalen naar water, voor de overige in dit onderzoek meegenomen elementen zijn geen cijfers gevonden. Zoals blijkt uit tabel 2 is er in Nederland sprake van een geleidelijke toename van de emissie van koper naar water, terwijl de emissie van zink iets is afgenomen.

Tabel 2 Emissie van zware metalen naar water

metaal	Emissies naar water ¹⁾ (in 1000 kg)			
	1990	1995	1998	1999*
Koper (Cu)	187	195	206	212
Zink (Zn)	498	440	468	460

Bron : VROM/HIMH (Milieucompendium 2000)

¹⁾ De som van de emissies op riool (indirect) en op oppervlaktewater (direct)

De tabel geeft de totale emissie vanuit de diverse bronnen, een regionale verdeling van deze emissie is niet precies bekend. Zowel via inlaat van gebiedsvreemd water als via lozingen uit het rioolstelsel kunnen zware metalen in het oppervlaktewater terecht komen. Ook voor de emissie naar water geldt dat deze het sterkst wordt beïnvloed door menselijke activiteiten (via huishoudens en via het verkeer). Dit betekent dat waarschijnlijk ook de emissie naar water hoger is in dichtbevolkte gebieden. Een groot deel van deze emissie wordt via het rioolstelsel echter afgevoerd naar rioolwaterzuiveringsinstallaties. Een groot deel van de zware metalen wordt er daar uit verwijderd. De uiteindelijke belasting van het oppervlaktewater is dus veelal lager. Toch geven Verweij et al. (1996) aan dat in oppervlaktewater grenswaarden voor koper en zink veelvuldig worden overschreden. Met

betrekking tot de verspreiding van zware metalen via het oppervlaktewater blijken nog vele factoren onzeker te zijn (Kramer et al., 1998).

Melkkoeien hebben een aanzienlijke waterbehoefte, ruim 100l/dag bij een productie van ± 30 kg/dag (IKC, 1993). Een deel van dat water wordt via het voer opgenomen, vooral bij beweiding. Oppervlaktewater is voor de melkveehouderij bij het beoordelen van de mineralenvoorziening van belang omdat melkkoeien via het drinkwater ook mineralen op kunnen nemen. Zeker in het veenweidegebied is een groot deel van het veedrinkwater oppervlaktewater, op een aantal bedrijven zelfs ook in de stalperiode. Hierbij is het onderscheid tussen boezemwater en slotwater van belang. Het boezemwater wordt vaker door de waterschappen beoordeeld dan het slotwater omdat zij de kwaliteit daarvan via aan- en afvoer meer kunnen beïnvloeden. Het veedrinkwater komt echter meestal uit de poldersloten, die meer stilstaand water bevatten. In bijlage 1b zijn de gehalten aan ijzer, koper, sulfaat en zink in oppervlaktewater in west Nederland weergegeven zoals deze zijn bepaald door het Hoogheemraadschap Rijnland. In het westelijk veenweidegebied speelt zoute kwel een rol. Door stuwing vanuit het zeewater komen verhoogde sulfaatgehalten in het oppervlaktewater voor, met name in de poldersloten. Uit bijlage 1a blijkt dat de sulfaatgehalten van poldersloten veel meer kunnen variëren dan die in boezemwater. Meer dan 11% van het slotwater heeft een sulfaatgehalte van >250 mg/l, terwijl slechts 0.5% van het boezemwater per liter meer dan 250mg sulfaat bevat. Oude Elferink en Meijer (2000) suggereren dat de via drinkwater opgenomen zwavelverbindingen risico's voor de diergezondheid in kunnen houden. Bij het oppervlaktewater is waarschijnlijk ook de waterbodem van belang (Kramer et al., 1998). Deze is veelal een afspiegeling van de landbodem. Dat betekent voor het veenweidegebied dat ook in een groot deel van de waterbodems hoger dan gewenste kopergehalten voorkomen. Door binding aan sulfiden kan dit koper echter biologisch niet beschikbaar zijn. Vooral gebieden waar weinig gebiedsvreemd water wordt ingelaten verdienen aandacht omdat daar de kans op afwijkende samenstelling het grootst is. In de praktijk is gesignaleerd dat vervanging van oppervlaktewater door leidingwater vaak een positief effect heeft op de resultaten op een bedrijf (Van der Grift, 2001). Sanders en Sanders (1983) losten gezondheidsproblemen als gevolg van kopertekorten mede op door een zwavelfilter op het als drinkwater gebruikte bronwater toe te passen.

Gebiedsspecifieke verschillen in aanvoer van mineralen via emissie naar oppervlaktewater lijken geen grote rol te spelen bij beoordeling van de mineralenvoorziening. De minerale samenstelling van het drinkwater is echter wel een belangrijk aandachtspunt in het veenweidegebied. Dit lijkt in de praktijk veelal nog onderbelicht te worden.

3.4 Bodem

Voor veel mineralen is de aanvoer op grasland groter dan de afvoer. Ook voor melkveebedrijven op veengrond is sprake van accumulatie van koper en zink in de bodem (Groot et al., 1998). Dat betekent dat ophoping plaatsvindt, hetgeen als een lange termijn probleem wordt beschouwd (McGrath en Prost, 1997). Veranderingen in de bodem zijn namelijk trage processen. Het Milieucompendium (RIVM, 2000) vermeldt voor de bodem met name de gehalten aan zware metalen. Een teveel aan zware metalen in de bodem is ongewenst uit oogpunt van gewasopbrengsten en gezondheid van mens en dier. Er is nog veel onbekend over de invloed van mineralen op het milieu, maar er wordt vermoed dat geringe veranderingen in mineralengehalten een wezenlijke invloed hebben op allerlei natuurlijke evenwichten (Gezondheidsraad, 1998). Verreweg de belangrijkste aanvoerpost voor Cu en Zn op het rundveebedrijf is het krachtvoer. Verder vindt aanvoer plaats via speciale mineralenmengsels. Via dierlijke mest komen deze mineralen in de bodem terecht. Dierlijke mest is de voornaamste aanvoerpost van zware metalen naar de bodem. In de praktijk worden nu, waarschijnlijk veelal zonder dat daarvoor een duidelijk aangetoonde noodzaak is, extra mineralen verstrekt aan het melkvee. Vooral bij hoge producties worden klachten omtrent uiergezondheid (hoge celgetallen, te veel klinische mastitis) en vruchtbaarheid (slecht drachtig worden) vaak toegeschreven aan een onvoldoende mineralenvoorziening. Het idee daarbij is dat zodoende eventuele tekorten worden aangevuld of voorkomen, terwijl er geen nadelige effecten worden verwacht van verstrekking boven de norm. Deze werkwijze betekent echter wel dat er extra mineralen het bedrijf binnenstromen, die waarschijnlijk voor een groot deel in de mest terecht komen. Hierdoor treedt extra stapeling in de bodem op. Uit tabel 3 is af te lezen dat er voor koper sprake is van een afname van de belasting van landbouwgronden, terwijl voor zink de belasting ongeveer gelijk blijft.

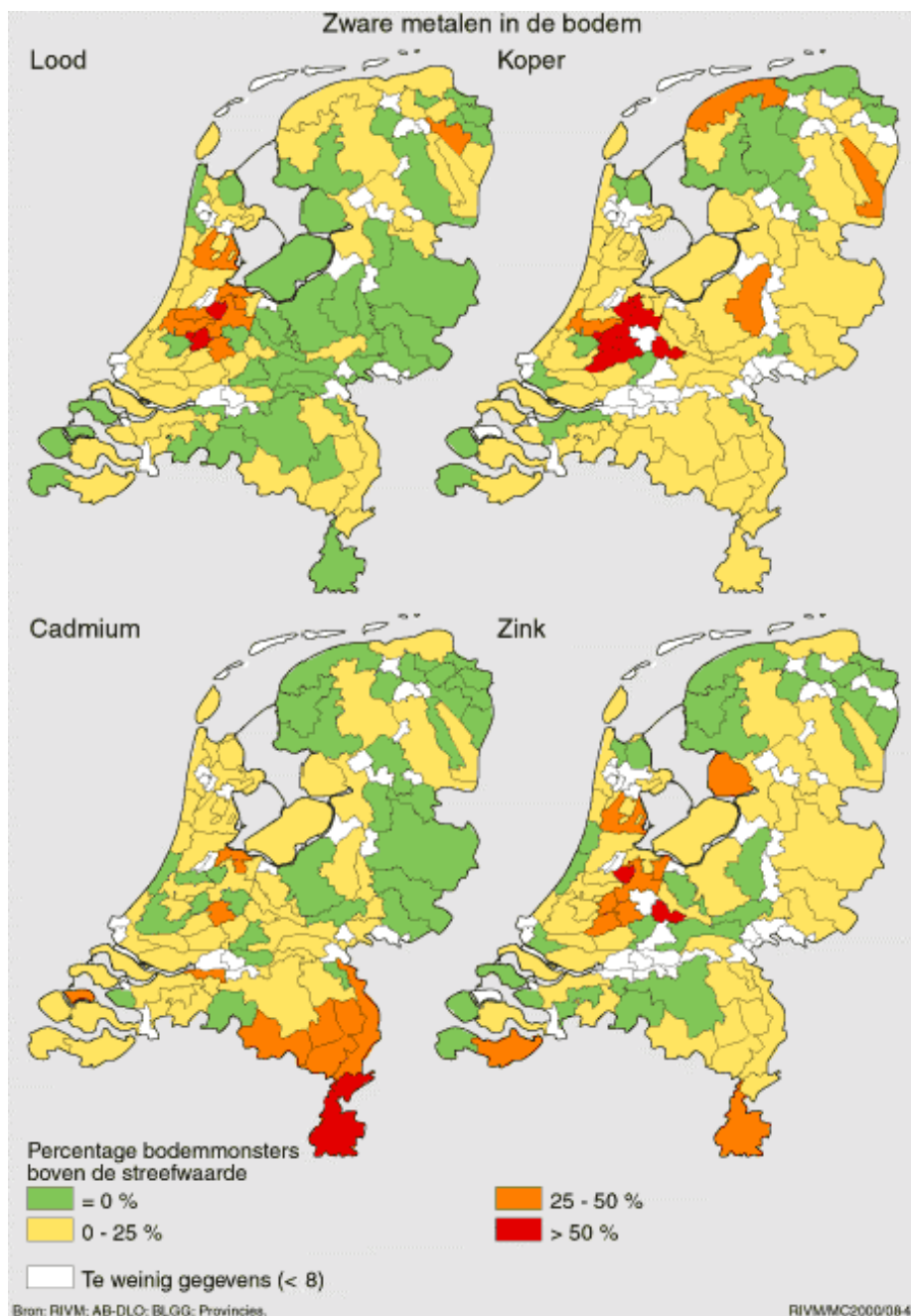
Tabel 3 Belasting van landbouwgrond met zware metalen (1980-1998, in 1000kg per jaar)

	1980	1986	1990	1995	1996	1997	1998
Koper (Cu)							
Bruto belasting	1 360	1 140	970	800	860	810	810
Afvoer met gewas	140	140	130	110	100	110	100
Netto belasting	1 220	1 000	840	690	760	700	710
Zink (Zn)							
Bruto belasting	2 400	2 370	2 270	2 260	2 360	2 500	2 310
Afvoer met gewas	700	750	690	720	650	750	600
Netto belasting	1 700	1 620	1 580	1 540	1 710	1 750	1 710

Bron : VROM/HIMH (Milieucompendium 2000)

In de periode 1980-1998 is de jaarlijkse accumulatie (aanvoer-afvoer) van koper in landbouwgrond afgenomen van 0.6 kg tot 0.35 kg koper per hectare. Voor zink ligt de netto belasting voor deze periode op een vrijwel ongewijzigd niveau van bijna 1 kg/ha per jaar. Deze ontwikkelingen worden voor een belangrijk deel bepaald door regelgeving die de gehalten van zware metalen in veevoer aan een maximum bindt. De hoeveelheid zink in veevoer is de laatste jaren echter weer gestegen. Ook voor de bodembelasting is geen regionale verdeling gegeven, maar deze hangt waarschijnlijk samen met de intensiteit van de veehouderij in de verschillende regio's. Het veenweidegebied lijkt wat dat betreft niet ongunstig te scoren.

Behalve de aanvoer van mineralen is ook de reeds aanwezige bodemvoorraad van belang. Op de bodem groeit immers het gewas, en dieren kunnen ook gronddeeltjes binnen krijgen. De regionale verdeling van de zware metalen in landbouwgronden is weergegeven in figuur 2.

Figuur 2 Regionale verdeling van zware metalen in de bodem op landbouwgronden in Nederland in 1995

De streefwaarde wordt gedefinieerd als: "Milieukwaliteitsniveau waaronder sprake is van verwaarloosbare risico's voor mens en ecosysteem. Deze is voor bodem afhankelijk van het gehalte aan organische stof en het lutumgehalte (gehalte deeltjes kleiner dan $2 \mu\text{m}$)" (RIVM, 2000). In deze figuur valt het westelijke veenweidegebied wel op. Er komen in verhouding vooral veel monsters met hoge kopergehalten en in iets mindere mate verhoogde zinkgehalten voor. Verder bevat de bodem in vergelijking met andere gebieden waarschijnlijk ook veel zwavel en ijzer. Als oorzaak voor de hoge gehalten wordt het gebruik van zogenaamde toemaakdekken genoemd (Van Toor en Van der Vleuten, 1990). In een ver verleden werd in het veenweidegebied stadscompost met verhoogde gehalten aan zware metalen verspreid. Gemiddeld noemen zij voor veengrasland 46.0 mg Cu/kg en 143 mg Zn/kg bodemmateriaal. De pH van deze veengronden was gemiddeld 5.5. In de praktijk worden vaak nog wat lagere waarden gevonden (4.8-5.2; Van Houwelingen, 2001). Met name voor kleigronden werden hogere pH's gevonden. Verder werden de veengronden gekenmerkt door hoge gehalten aan lutum en humus. Lagas et al. (1996) rapporteren dat er in de periode 1986-1992 geen wezenlijke veranderingen zijn opgetreden. Een verder teruggaand historisch overzicht van gehalten aan zware metalen in landbouwgronden is echter niet beschikbaar.

Van Toor en Van der Vleuten (1990) adviseren onderzoek naar de relatie tussen gehalten aan zware metalen in de bodem en in de erop geteelde gewassen uit te voeren. Door de bodemgesteldheid wordt er in het veenweidegebied nauwelijks maïs geteeld, waardoor de ruwvoerrantsoenen afwijken van vooral de zandgebieden. Ook het aandeel klaver zal waarschijnlijk laag zijn door de stikstoflevering van de bodem, waarbij mogelijk ook de pH nog een rol speelt.

Beleidsmakers streven naar een evenwicht tussen de aan- en afvoer van zware metalen. Daarom zijn er sinds 1986 verlaagde wettelijke maximale gehalten aan Cu en Zn in veevoer. Er is perspectief voor een verdere verlaging van de Cu- en Zn-gehalten van varkens- en pluimveevoeders, waardoor de milieubelasting verder kan afnemen. Voor rundvee is van belang dat de benutting van Cu gering en bovendien variabel is, terwijl het een onmisbaar element is. Ondanks dat er een aanzienlijke variatie is in het gehalte aan Cu in rundveemest ($42 \pm 16 \text{ mg/kg ds}$ aan Cu: Hotsma et al., 1996) is daarom verlaging van de kopergehalten in rundveevoer niet aan te bevelen. Daarvoor moet eerst het inzicht in de koperbenutting verbeteren waarmee de beschikbaarheid van koper mogelijk verhoogd kan worden.

Veengrond wordt gekenmerkt door een iets lagere pH dan zand- en kleigronden en door een hoog gehalte aan organische stof. Een lage pH verhoogt de beschikbaarheid van Cu voor het gewas, doordat zich dan meer Cu in de vloeibare fase bevindt. Bij lagere pH neemt de beschikbaarheid van Mo af. Henkens (1988) rapporteerde dat bij minder dan 4% organische stof de kopergehalten van het gewas bij eenzelfde concentratie in de bodem stegen naarmate het organische stofgehalte afnam. Boven 4% organische stof werd geen verband gevonden met het kopergehalte van het gewas. Deze conclusie wordt tegengesproken door Smart (1981) die aangeeft dat koper met organische verbindingen onoplosbare complexen vormt. Ook Temminghoff (2001) vermoedt dat op veengrond de organische stof wel degelijk een rol kan spelen bij de Cu-speciatie. Hij spreekt echter over binding van vrij koper aan opgeloste organische stof, waardoor de hoeveelheid koper in de bodemoplossing een veelvoud kan zijn van de hoeveelheid vrij koper. Hartmans (1970) legde een relatie tussen kopergebrek bij runderen en de ontwateringstoestand van de bovengrond. Slooff et al. (1990) noemen Cu/C als een maat voor de mobiliteit van Cu. Door ondergrondse oxidatie van sulfiden (door uitgespoeld nitraat) kan de koperconcentratie stijgen. Aangegeven wordt dat bij $>0.45\% \text{ ds S}$ en $\text{Cu/Mo} < 3$ door complexvorming in de pens de Cu-opname geblokkeerd wordt. Hogere Mo-gehalten werden juist gevonden op gronden met hogere organisch stofgehalten zoals veengronden of op slecht gedraineerde gronden (Miller, 1979).

De verschillende veengebieden in de wereld kunnen specifieke kenmerken hebben, waardoor ook bijbehorende specifieke problemen voorkomen. Op veengrond in de Everglades in Florida werd bij runderen bijvoorbeeld bloedarmoede geconstateerd die werd veroorzaakt door een seleniumtekort (Morris et al., 1984). Problemen ten aanzien van de kopervoorziening worden echter wel regelmatig genoemd, o.a. door McFarlane et al., 1990. Zij geven aan dat de koperbenutting (het kopergehalte in het gewas was normaal) werd belemmerd door een hoog molybdeengehalte in het gewas. Szalay et al. (1975) vonden lage kopergehalten in de geteelde voedergrassen op Hongaarse veengronden. Schmidt et al. (1989) vonden daarbij ook een hoog molybdeengehalte. Tveitnes (1975) vond dat op koperarme veengrond in Noorwegen de gewasopbrengst verhoogd kon worden door koperbemesting. Dit betekent dat resultaten van buitenlands onderzoek naar mineralenvoorziening in veengebieden met de nodige voorzichtigheid moet worden geïnterpreteerd.

De aanvoer van koper en zink per hectare is in het westelijke veenweidegebied waarschijnlijk niet hoger dan in andere gebieden in Nederland. De gehalten aan koper en zink in de bodem zijn in het veenweidegebied echter verhoogd door activiteiten uit het verleden. De rol van het hoge gehalte organische stof in veengronden bij de opname van koper door het gewas blijkt nog niet geheel te zijn opgehelderd. Vanwege de nog steeds doorgaande opstapeling is een onnodig hoge aanvoer ongewenst voor het milieu. Als gevolg van de bodemgesteldheid zal het ruwvoer overwegend uit gras en graskuil bestaan.

3.5 Gewas

De beschikbaarheid van de meeste essentiële metalen is niet rechtevenredig met de concentratie ervan in de bodem (Allen, 1999; Temminghoff, 1998). Van Hooft (1995) spreekt over het biobeschikbare gehalte en het totale gehalte. In de bodem worden mineralen gedeeltelijk gebonden aan lutumdeeltjes en organische stof. Voor opname door gewassen moeten de spoorelementen eerst in de waterfase worden opgelost. Onder andere de pH is hierbij van belang: bij een lage pH zijn meer Cu-ionen opgelost die daardoor voor de plant beschikbaar kunnen komen. Ook kan echter bij een lage pH de koperbenutting verminderen doordat slecht oplosbare koperfosfaten worden gevormd (Neijenhuis, 1990). Frank (1998) vond bij elanden een secundair kopergebrek wat geweten werd aan een verhoogde molybdeenopname van het gewas door een verandering van de pH van de bodem. De

chemische vorm van Cu in de bodem kan eveneens worden beïnvloed door de waterspiegel in de bodem, die de redoxpotentiaal (het energie-evenwicht tussen metalen en eiwitten) beïnvloed. Vermoed wordt dat ook de redox-toestand invloed heeft op de biologische beschikbaarheid van Cu (Engel, 1990). Slechts een zeer gering deel van de in de bodem aanwezige koper is beschikbaar (Lagas et al., 1996).

Op zandgrond is gebleken dat bij lage gehalten aan organische stof in de bodem het Cu-gehalte in het gewas hoger is dan bij hogere gehalten aan organische stof bij eenzelfde bodemvoorraad Cu. De concentratie van metalen in de bodem is hierdoor niet recht evenredig met de beschikbaarheid ervan voor de groeiende gewassen, daarom wordt soms gesproken over het biobeschikbare kopergehalte en het totale kopergehalte. Verschillende gewassen die groeien op dezelfde bodem kunnen bovendien aanzienlijk verschillen in minerale samenstelling (Garmo et al., 1986). Dat betekent dat ook de botanische samenstelling van de grasmat van belang is voor de mineralengehalten van het ruwvoer. Vlinderbloemigen nemen bijvoorbeeld meer Mo op dan grassen. Dat betekent dat naarmate het aandeel klavers in een grasbestand op Mo-rijke gronden toeneemt de Cu-voorziening meer aandacht verdient. Is het Cu-gehalte in de bodem laag, dan is het Cu-gehalte van klaver lager dan van Engels raaigras. Is echter het Cu-gehalte van de grond hoog, dan is het Cu-gehalte van klaver hoger dan van Engels raaigras. Naarmate het aandeel klavers in het grasland gaat toenemen, kan dit aspect daarom van belang worden (BSAP, 1983). Grasland in het veenweidegebied bevat echter in het algemeen weinig klaver, waarbij de lage pH en de N-mineralisatie een rol spelen. De graskwaliteit in het veenweidegebied is in het algemeen minder goed dan in zand- en kleigebieden.

Dit onderzoek richt zich op Cu en de Cu-antagonisten (voor wat betreft de koperbenutting door het dier) S, Mo, Zn, Ca, Fe en Se. De bemestingsadviesbasis (Hoeks et al., 1988) noemt hiervan alleen Ca en Cu. Ca is van belang voor de pH van de grond. Omdat er voortdurend uitspoeling vanuit de zodelaag plaatsvindt is niet te verwachten dat de aanvoer van Ca enig probleem oplevert. Voor de grasproductie is ook van extra aanvoer van Cu niet snel een nadelig effect te verwachten, omdat een hoger Cu-gehalte dan geadviseerd niet leidt tot extra opname door het gras en ook niet leidt tot een slechtere grasgroei. Bij de grondtoestanden voor koper 'te laag' en 'vrij laag' is het Cu-gehalte in het gras aan de lage kant. Gras is weinig gevoelig voor Cu-gebrek, de Nederlandse gronden bevatten in het algemeen voldoende Cu voor de grasgroei. De Cu-bemestingsnormen zijn vooral van belang voor de kopervoorziening van de runderen (Henkens, 1988). Kopertekorten in de bodem zijn wel bekend in de bosteelt (Neijenhuis, 1990). Bij bebossing van voormalige landbouwgronden speelt echter een rol dat door stoppen met bekalken de pH en Ca^{2+} -concentratie dalen en de concentratie aan opgeloste organische koolstof in het bodemvocht stijgt. Dit veroorzaakt een verhoogde oplosbaarheid van Cu en verhoogt de kans op uitspoeling naar het grondwater (Koopmans, 1995). Organisch gebonden koper is mobieler dan vrije koperionen. Gereduceerde ionen (Fe^{2+} in plaats van Fe^{3+} bijvoorbeeld) zijn beter oplosbaar. De redoxpotentiaal wordt in landbouwgrond echter van ondergeschikt belang geacht. Bij een pH van 4.5 en hoger wordt de Cu-concentratie in de vloeibare fase voornamelijk bepaald door het gehalte aan opgeloste organische stof, bij een pH lager dan 4.5 neemt de Cu-concentratie in de vloeibare fase toe bij verdere daling van de pH.

Ondanks dat gras bij hoge kopergehalten in de bodem niet meer koper opneemt blijkt dat in het Westelijke veenweidegebied een hoog Cu-gehalte in de grond gepaard gaat met relatief hoge waarden in de onderzochte graskuilen. Mogelijk is er sprake van grond in de monsters, maar de gehalten aan ruw as in de graskuilen uit dit gebied zijn niet hoger dan die in de rest van het land. Ook de gehalten aan Fe, Se, S en Mo zijn relatief hoog voor graskuilen uit West-Nederland. De Zn-gehalten van de graskuilen uit West Nederland zijn niet duidelijk hoger dan die van de graskuilen uit de rest van het land. Zie hiervoor bijlage 2a, die is gebaseerd op alle door Blgg op mineralen onderzochte graskuilen uit de jaren 1996, 1997 en 1998. De daarin weergegeven gehalten zijn regionale gemiddelden. Dat betekent ook dat voor individuele voerpartijen een aanzienlijk grotere variatie voorkomt. Zie hiervoor PV-rapport 418 (Ouweltjes, 2000). Naast de nadelige invloed van Fe, S en Mo voor de koperabsorptie speelt ook het gehalte aan onbestendig eiwit mogelijk een rol. In bijlage 2b is het percentage onderzochte maïspartijen per regio weergegeven. Hieruit blijkt dat bedrijven uit west- en noord Nederland relatief weinig maïspartijen voor onderzoek aanbieden. Waarschijnlijk betekent dit ook dat maïs in die gebieden een beperkt deel van het rantsoen uitmaakt. Vooral hierdoor zal de OEB van de gevoerde rantsoenen in die gebieden in de regel waarschijnlijk hoger zijn dan in bijvoorbeeld de zandgebieden. Dit is nadelig voor de koperabsorptie. Daarentegen is het kopergehalte in het ruwvoer relatief hoog.

Er blijkt een opvallend groot verschil in vooral de Fe- en Co-gehalten van vers gras en graskuilen. Voor enkele andere mineralen zijn er weliswaar eveneens verschillen, maar deze zijn beduidend kleiner. Graskuil bevat een iets hoger ruw as gehalte. Zie de gemiddelden in tabel 4.

Tabel 4 Gemiddelde mineralengehalten in vers gras en graskuil zoals onderzocht door Blgg in 1996-1998

variabele	vers gras	graskuil
Ruw as	107	127
Cu	8.8	8.5
Zn	52	46
Fe	229	545
Se	61	49
S	3.7	2.8
Mo	2.5	2.2
Co	124	244

Ook is nagegaan of de mineralengehalten van gras een verloop in de tijd gedurende het jaar kennen. Uit de Blgg-gegevens van 1996 tot en met 1998 bleek dat er alleen voor S een geringe trend gedurende het jaar bleek te bestaan: het S-gehalte neemt van mei tot oktober geleidelijk wat toe. Overigens was dat duidelijker voor graskuil dan voor vers gras. Hierbij kan meespelen dat na juli relatief weinig grasmonsters worden onderzocht, terwijl er nog wel geweid wordt. De gegevens van de koeien&kansen bedrijven, waar wel gedurende het gehele groeiseizoen grasmonsters worden onderzocht, vertonen echter geen andere trends. Er is bovendien geen aanwijzing dat tussen grondsoorten verschil in verloop gedurende het jaar bestaat.

De grasproductie wordt nauwelijks beïnvloed door iets verlaagde of verhoogde kopergehalten van de mest. Directe kopertekorten zijn in het westelijke veenweidegebied niet waarschijnlijk, maar indirecte tekorten zijn wel mogelijk. De mate waarin het koper uit het ruwvoer beschikbaar is, is niet helemaal duidelijk, doordat dit door allerlei interacties maar ook door mineralen uit aanhangende grond kan worden beïnvloed.

4 Statusbepaling

Om te bepalen of een dier over voldoende koper beschikt, wil men de koperstatus bepalen. Hierbij ontstaan drie vragen: welk materiaal (bijvoorbeeld melk, bloed) is het meest geschikt voor het bepalen van de koperstatus, welke biochemische parameter is hiervoor het meest geschikt, vervolgens kan de vraag worden gesteld: welke referentiewaarden moeten worden gehanteerd zodat een tekort of een overmaat aanneemelijk lijkt. Tot nu toe is in de beschikbare literatuur niet één parameter naar voren gekomen die kan worden gebruikt als "gouden standaard" voor het vaststellen van de koperstatus in het lichaam. Het vaststellen van een tekort aan spoorelementen is moeilijk door invloeden van ziekte, voeding, enz. Deze factoren moeten in de diagnose worden betrokken voordat men de diagnose koperdeficiëntie kan stellen (Graham, 1991). Ook interacties van andere spoorelementen (molybdeen) kunnen de diagnostiek beïnvloeden. Hoewel molybdeen de koperbenutting remt verhoogt het in eerste instantie de kopergehalten in serum, maar verlaagt de gehalten in de lever (Allen en Gawthorne, 1986). Aangezien koper in serum gebonden kan zijn aan verschillende eiwitten, kan het zinvol zijn om onderscheid te maken tussen TCA-onoplosbaar koper en andere kopervormen (TCA-onoplosbaar = hoog moleculair eiwitgebonden koper, maar niet koperalbumine) (Allen en Gawthorne, 1986; Allen en Gawthorne, 1987a). Dit is van belang omdat bij een kopertekort ten gevolge van verdringing door andere metalen, het koper aan andere eiwitten wordt gebonden. Ook andere pathofysiologische processen kunnen de diagnostiek beïnvloeden. Bij infectie kan het koper verhoogd en de zink verlaagd zijn in serum (Milanino et al., 1988). Tenslotte zijn er aanwijzingen dat parameters die goed werken bij het aantonen van tekorten ongeschikt zijn voor het vaststellen van een kopervergiftiging en omgekeerd. Het eenvoudigst is het meten van biochemische parameters in urine, melk of haren.

4.1 Urine, melk, haren

Melk is geëvalueerd als vloeistof om de mineralenstatus te bepalen. Echter melk is hiervoor minder geschikt gebleken omdat melk meestal geen verhoogde of verlaagde kopergehalten laat zien (Biego et al., 1998). In een enkel artikel wordt de koperstatus vastgesteld door koper in urine te meten gecombineerd met bijvoorbeeld niet-eiwitgebonden serumkoper (Eife et al., 1999). Urine alleen is niet geschikt voor het bepalen van de koperstatus, aangezien alleen bij sterke overmaat of bij verdringing door andere metalen koper in urine wordt uitgescheiden. Tenslotte kan in principe haar worden gebruikt als middel om de koperstatus te bepalen: echter alleen een ernstig kopertekort (beneden 20 mg/kg droge stof in de lever) geeft effect op haar en serumkoper (Kellaway et al., 1978). Vervuiling van haar is de meest bekende factor waardoor haren meestal onbruikbaar zijn voor de diagnostiek van mineralen, spoorelementen en zware metalen.

4.2 Bloed

Metingen in bloed kunnen worden opgesplitst in het direct meten van koper in serum (of plasma) (al dan niet met trichloorazijnzuur-onteiwitting = TCA) en het meten van koperafhankelijke eiwitten (enzymen of andere eiwitten). Volgens Kincaid (1981) is het kopergehalte in het bloed binnen een etmaal in tegenstelling tot het zinkgehalte vrij constant. Een belangrijk nadeel van al deze methoden is dat de spiegels in het bloed bij een te lage kopervoorziening pas bij uitputting van de lever duidelijk gaan dalen. Ze geven dus feitelijk geen informatie over de voorziening.

Directe kopermetingen

Meestal wordt de koperstatus vastgesteld door middel van bloedanalyses (Dargatz et al., 1999). Koperconcentraties gemeten in serum beneden de 5.9 $\mu\text{mol/L}$ worden beschouwd als koperdeficiënt. Alhoewel per diersoort specifieke referentiewaarden gelden, blijken de marges van koper in serum toch redelijk nauw te zijn. Zo zijn bijvoorbeeld de referentiewaarden van koper bij kamelen vergelijkbaar met die van runderen: 11.0 – 18.9 $\mu\text{mol/L}$ (Faye en Bengoumi, 1994). Ook bij schapen wordt koper in serum gebruikt als een maat voor kopertekort. De behandeling van een kopertekort of een koperovermaat gebeurt dan op grond van het kopergehalte in het serum (Whitelaw et al., 1979). Van belang is verder dat bij toediening of opname van molybdeen en zwavel, vooral indien dit in de vorm van tetrathiomolybdaat geschiedt, het kopergehalte in het serum aanvankelijk verhoogd wordt door vrijkomen van koper uit de lever. De voorraad in de lever neemt af. Het vrijgekomen koper is gebonden aan hoogmoleculaire eiwitten en biologisch niet beschikbaar. Na verloop van tijd vermindert ook serumkoper doordat lever minder afgeeft en koper via nieren wordt uitgescheiden (Howell en Kumaratilake, 1990). Door analyse van het kopergehalte met en zonder trichloorazijnzuur toevoeging kan onderscheid gemaakt worden tussen beschikbaar en niet beschikbaar koper.

Koper-enzym-metingen:

In het lage gebied (koperdeficiënt) is er een lineair verband tussen super-oxide-dismutase-activiteit (SOD) en de koperconcentratie in het serum bij schapen. Deze relatie kan echter worden verstoord door molybdeen en zwavel, waardoor verkeerde conclusies getrokken kunnen worden. Zo leidt het toedienen van molybdeen en sulfaat tot lagere SOD-waarden en tot vrijkomen van biologisch niet beschikbaar koper uit de lever (Andrewartha en Caple, 1980; DiSilvestro en Carlson, 1991; Fischer et al., 1993; Strain en Lynch, 1990). Metallothionine (MT) is ook gebruikt als indicator voor de opname van koper en zink (ook als indicator voor opname van spoorelementen in het algemeen) (Bremner, 1987). Echter MT geeft niet specifiek de koperstatus weer. Metallothioninen zorgen namelijk voor de opname van spoorelementen (onder andere koper) vanuit de darm en voor het transport naar de lever. Ze zijn echter niet betrokken bij de uitscheiding. Ceruloplasmine is een koperhoudend eiwit dat vaak wordt gebruikt als maat voor de koperstatus (Brewer et al., 2000; Cartana et al., 1991). Ceruloplasmine wordt ook gebruikt voor het meten van verschillen in beschikbaarheid tussen diverse koperbronnen (Eckert et al., 1999). Het gebruik van ceruloplasmine loopt bij een kopertekort samen met een verlaging van het hematocriet (verminderde ijzeropname) (Brewer et al., 2000; Igarza et al., 1999). Veranderingen in ceruloplasmine lijken reversibel te zijn (Lannon en Mason, 1986). Ook moet worden bedacht dat er verschillen zijn in ceruloplasmine tussen plasma en serum (plasma hoger dan serum) (Paynter, 1982). Daarnaast worden soms specifieke parameters gemeten als indicatie voor de koperstatus: reticulocyten in schapen (Howell en Gopinath, 1977) en AST en ALT als indicator voor leverbeschadiging bij ratten ten gevolge van overmaat aan koper (Hwang et al., 1998). Zure fosfatase werd gebruikt als marker voor beschadiging ten gevolge van chronische kopervergiftiging.

Combinaties:

Dat er niet een éénduidige parameter is in bloed of serum voor het vaststellen van de koperstatus van een dier, blijkt steeds weer. Iedereen is op zoek naar de gouden standaard (Kegley en Spears, 1994). In vrijwel alle bestudeerde artikelen wordt aangegeven dat de afzonderlijke gebruikte parameter(s) voor de koperstatus hun beperkingen hebben. Daarom wordt vaak gebruik gemaakt van combinaties. De volgende combinaties zijn beschreven:

- Plasmakoper en ceruloplasmine (Ali en Noaim, 1992; Kegley en Spears, 1994; Murthy et al., 1981).
- Plasmakoper, ceruloplasmine en SOD (Ward et al., 1997).
- SOD in longweefsel en ceruloplasmine in plasma als parameters voor kopertekort en de gevolgen van zuurstofstress (Jenkinson et al., 1984).
- TCA-oplosbaar koper, ceruloplasmine (Mason et al., 1983).
- TCA-oplosbaar koper, ceruloplasmine en SOD (Kincaid en White, 1988).
- Ceruloplasmine en beta-globuline (Mahmoud en Ford, 1983).
- Cytochroom c-oxidase en ceruloplasmine (bij ratten) (Szpiech et al., 1983).

4.3 Organen

In veel experimenten zijn leverbiopten gebruikt om de koperstatus te bepalen (Olson et al., 1984), eventueel aangevuld met histochemische methoden als parameter voor koperoverdosis (Fuentealba et al., 1987). Het kopergehalte in de lever wordt dan ook naast gehalten in bloedplasma aangehouden als maat voor kopervervoering waarbij diverse referentiewaarden worden gehanteerd (bijv. 23 mg/kg = tekort, 90 = voldoende) (Arthington et al., 1996b). De relatie tussen het kopergehalte in de lever en in het serum is sterk afhankelijk van de koperstatus en de diersoort. Ten gevolge van leverbeschadigingen kan het kopergehalte in de lever stijgen zonder dat het kopergehalte in het serum verandert (Dashti et al., 1987). Zo lijkt er geen relatie te bestaan tussen het kopergehalte in de lever en het serum bij de muskus-os. Bij deze diersoort lijkt ook de interactie tussen koper en molybdeen niet op te gaan (Blakley et al., 2000). Koper uit de lever wordt via de gal afgevoerd. Dit houdt automatisch in dat wanneer de galwegen zijn afgesloten, het kopergehalte (alsmede zink en ijzer) in de galvloeistof stijgt (Deol et al., 1992). Ook stoffen die invloed op de leverfunctie hebben, kunnen de uitscheiding beïnvloeden (zie ook bij interacties). Er komt dan meer koper in het bloed terecht waardoor ook de nier meer koper kan bevatten. Bijvoorbeeld na dioxinetoediening heeft de nier een 4-voudige koperconcentratie (Elsenhans et al., 1991). Na opname van formaline (omgezet tot formiaat) wordt via inductie van metallothionine de zink en koperconcentratie in de lever veranderd (Goering, 1989). Voor verontreiniging met lood, zink en cadmium bij runderen zijn lever, nier en bot-lood en nier-cadmium de beste indicatoren voor contact (Milhaud en Mehennaoui, 1988), terwijl molybdeenvergiftiging ten gevolge van motorolie (met MoS₂ als additief) de volgende symptomen geeft: bloedarmoede, sterk verlaagde ceruloplasmine-activiteit, verhoogd Mo, verlaagd Cu in lever, bloed en nieren (Sas, 1989).

4.4 Statusbepaling in de praktijk

Algemeen wordt er van uit gegaan dat het bepalen van het kopergehalte in de lever het beste inzicht geeft in de koperstatus van runderen. Tot dusverre is het in Nederland in de praktijk nog gebruikelijk om de kopervoorziening te bepalen aan de hand van bloedwaarden. Dit in tegenstelling tot bijvoorbeeld Nieuw Zeeland, waar het onderzoeken van leverbiopten inmiddels routine is. Bloedwaarden geven vooral bij subklinische tekorten maar in beperkte mate inzicht. Tot nu toe kan de Gezondheidsdienst nog geen routinematig onderzoek van leverbiopten uitvoeren, maar binnenkort is dat wel mogelijk. Daarmee verbetert voor de praktijk de mogelijkheid om inzicht te krijgen in de koperstatus. De resultaten van de in het jaar 2000 door de GD op ijzergehalte, kopergehalte, seleniumstatus en zinkgehalte onderzochte bloedmonsters zijn weergegeven in bijlage 3. Hiermee wordt inzicht verkregen in de in de praktijk voorkomende waarden en in de regionale verdeling, ook al zijn deze gegevens niet representatief omdat ze waarschijnlijk voornamelijk op klachtenbedrijven betrekking hebben. Verder geeft het inzicht in de mate waarin monsters voor deze onderzoeken worden aangeboden. Uit de resultaten is geconcludeerd dat er geen aanwijzingen zijn dat het westelijk veenweidegebied een duidelijk lagere koperstatus heeft dan de rest van Nederland. Ook voor de andere 3 spoorelementen wijkt dit gebied niet duidelijk af van andere gebieden in Nederland. Bloedonderzoek op ijzer- en zinkgehalten wordt bovendien betrekkelijk weinig uitgevoerd, waarschijnlijk vooral omdat er in de praktijk weinig twijfel is aan de juistheid van de voorziening voor deze elementen.

5 Producten van dierlijke oorsprong

De belangrijkste producten van de melkveehouderij zijn melk en vlees. De mineralenvoorziening van melkvee is weliswaar primair van belang voor een goede diergezondheid, maar zou ook gevolgen kunnen hebben voor de samenstelling van melk en vlees, eventueel zelfs voor de volksgezondheid. Daarom is nagegaan wat er bekend is van de invloed van de mineralenvoorziening op de mineralengehalten in deze producten. In de literatuur vermelde mineralengehalten in melk en vlees zijn vermeld in tabel 5.

Tabel 5 In de literatuur genoemde mineralengehalten in koemelk en rundvlees

Mineraal	Product	Gehalte	Bron
Koper	Melk	0.02-0.05 mg/kg	IDF, 1992
Koper	Vlees	0.05 mg/kg	Westhoek et al., 1996
IJzer	Melk	0.2 mg/kg	IDF, 1992
Zink	Melk	2.3-5.1 mg/kg	IDF, 1992
Zink	Vlees	4.5 mg/kg	Westhoek et al., 1996
Molybdeen	Melk	.23 μ mol/l	Anderson, 1992
Selenium	Melk	2-50 μ g/kg	IDF, 1992

Er zijn in de literatuur ook aanzienlijk van de bovenstaande waarden afwijkende kopergehalten gevonden. Zo rapporteerden Moreno-Rojas et al. (1993) een gehalte van 0.16 ± 0.03 mg/kg, en Schwarz en Kirchgessner (1978) rapporteren een range van 0.15 tot 0.20 mg/kg. Het blijkt dat er inderdaad variatie is in de mineralengehalten in melk. Als mogelijke oorzaken worden genoemd seizoenseffecten (Lopez Mahia et al., 1991; Coni et al., 1995), raseffecten (Merkel et al., 1992), lactatienummer (Kume en Tanabe, 1993) en mastitis (Steffert, 1993; El Deeb et al., 1987). De laatste auteurs vonden dat bij uierontsteking de gehalten aan Cu, Zn en Fe van de melk stegen. Als een van de belangrijkste redenen voor de gevonden verschillen wordt echter genoemd dat de gehalten dusdanig laag zijn dat er aanzienlijke bepalingfouten worden gemaakt (IDF, 1992; Flynn, 1992). Verder worden verschillen veroorzaakt doordat er na het melken mineralen (bijvoorbeeld uit leidingen) in de melk terecht kunnen komen (Bluethgen et al., 1997). Mede hierdoor kunnen mineralengehalten van zuivelproducten sterk verschillen van die van rauwe melk (Coni et al., 1994).

Ook een variatie in de mineralenvoorziening kan echter leiden tot afwijkende mineralengehalten (Coni et al., 1995). Diverse onderzoekers hebben gekeken naar de invloed van de mineralenvoorziening op de mineralengehalten in koemelk. Boila et al. (1984) vonden dat de kopervoorziening van zogende kalveren niet verbeterde door verstrekking van extra koper aan hun moeders. Zij leidden daaruit af dat het kopergehalte in de melk niet werd verhoogd door de verbeterde kopervoorziening van de zoogkoeien. De literatuur is echter niet eenduidig in hoeverre de kopervoorziening weerspiegeld wordt in de kopergehalten in de melk (Van Hooft, 1995). Kirchgessner et al. (1978) vonden dat een onvoldoende zinkvoorziening resulteerde in een verhoogd kopergehalte van de melk. Opname van extra zink heeft nauwelijks effect op de zinkgehalten in de melk (Bruwaene en Kirchmann, 1979; Schwarz en Kirchgessner, 1978; Van Hooft, 1995). Het ijzergehalte in de melk wordt niet door voeding wordt beïnvloed (IDF, 1992). Met name voor selenium lijkt het wel duidelijk dat een ruimer aanbod tot hogere gehalten in de melk leidt (Hidiroglou et al., 1987; IDF, 1992; Knowles et al., 1997). Ook voor molybdeen is dat waarschijnlijk het geval (Wittenberg en Devlin, 1987; Hognl, 1975). In dit verband is van belang dat selenium in koemelk minder goed beschikbaar is dan in humane melk (Shen et al., 1996). Voor de humane gezondheid is er echter meer gevaar voor mineralentekorten dan voor mineralenoverschotten, terwijl ecosystemen wel schade kunnen ondervinden van overmaten. De huidige koperbelasting levert in de praktijk geen gezondheidsproblemen op bij de mens (Slooff et al., 1990). Weijers (1931) meldde dat het kopergehalte in moedermelk hoger is dan dat in koemelk. Volgens Krachler et al. (1998) bevat koemelk in het algemeen onvoldoende spoorelementen (o.a. Cu, Mo en Zn) voor zuigelingen. Hoge gehalten aan koper (Duval, 1995; Goulet, 1997) en ijzer kunnen een nadelige invloed hebben op de melksmaak. Dat is een mogelijk negatief aspect van een ruime voorziening, maar gezien de waarschijnlijk zeer geringe invloed op de gehalten in de melk is het voor de praktijk niet van groot belang.

Ook is het denkbaar dat het mineralengehalte van het vlees door de opname van mineralen via het voer wordt beïnvloed. Van koper en zink zijn er gegevens over de gehalten in vlees in relatie tot het aanbod, voor de andere mineralen die in deze studie worden meegenomen zijn die tot dusverre nog niet gevonden. Er wordt aangenomen dat zowel koper als zink niet accumuleren in spierweefsel. Koper wordt opgeslagen in de lever, voor zink geldt dat bij volwassen dieren nauwelijks. Alleen bij een zeer hoge opname via het voer van goed opneembaar koper bij varkens (>250mg) kunnen de kopergehalten in de levers dusdanig hoog zijn dat er nadelige gevolgen zijn voor de humane consumptie (Jongbloed et al., 1998). Omdat in de warenwet voor koper en zink geen normen voor koper

en zink worden gegeven geeft Van Hooft (1995) geen risicoschattingen voor deze elementen. Het ontbreken van normen wordt gemotiveerd met de onwaarschijnlijkheid van voor consumptie schadelijke gehalten. Een eventueel onnodig ruime mineralenvoorziening heeft daarom waarschijnlijk voor de consument van rundvlees nauwelijks gevolgen.

6 Conclusies

- Aanvoer van koper via de lucht speelt net als aanvoer via emissie naar oppervlaktewater in Nederland geen rol bij de kopervoorziening van melkvee en jongvee.
- Sulfaatgehalten in het slootwater zijn in het westelijk veenweidegebied onder invloed van zoute kwel vaak hoger dan in andere gebieden en kunnen van sloot tot sloot bovendien aanmerkelijk verschillen. De kans op hoge sulfaatgehalten is het grootst bij weinig inlaat van gebiedsvreemd water.
- Omdat koeien in het westelijk veenweidegebied bovendien vaker oppervlaktewater als drinkwater opnemen kan dit sulfaat de kopervoorziening negatief beïnvloeden.
- In het westelijk veenweidegebied komen verhoogde gehalten aan koper en zink in de bodem voor door activiteiten uit het verleden.
- Het inzicht in het bepalen van het voor de plant beschikbare koper neemt toe maar is nog niet volledig. De grasproductie wordt nauwelijks beïnvloed door verhoogde of verlaagde kopergehalten in de bodem. De botanische samenstelling is van belang voor de mineralengehalten in het ruwvoer en daarmee voor de mineralenvoorziening van het vee. Verder kan zowel een verhoging als een verlaging van de grondwaterstand de beschikbaarheid van koper voor het gewas beïnvloeden. Vooral een verhoging van de grondwaterstand speelt in de praktijk een rol.
- Zowel molybdeen, zwavel als ijzer spelen een rol bij de koperbenutting. Bij verhoogde gehalten aan deze stoffen in het rantsoen neemt de koperbenutting af. Niet geheel duidelijk is hoe belangrijk de invloed van elk van deze 3 in het westelijk veenweidegebied is. Het inschatten van de bruto koperbehoefte is hierdoor natte vinger werk.
- De nieuwste NRC-norm houdt in tegenstelling tot de Nederlandse norm voor kopervoorziening rekening met de hoogte van de melkproductie. Bij een toenemende melkproductie wordt volgens die norm een toenemend kopergehalte in het rantsoen geadviseerd.
- De hoge kopergehalten in de bodem in het veenweidegebied resulteren in relatief hoge kopergehalten in het gewas. De benutbaarheid van dit koper is waarschijnlijk laag, omdat ook de gehalten aan molybdeen, zwavel en ijzer relatief hoog zijn. Indirecte kopertekorten komen hierdoor mogelijk voor.
- Resultaten van onderzoek naar mogelijke voordelen van organisch gebonden koper in plaats van kopersulfaat zijn niet eenduidig.
- De huidige beoordelingsnormen voor koper in serum zijn bruikbaar, maar geven maar in beperkte mate inzicht in de kopervoorziening. Bloedanalyses uitgevoerd door de GD leveren geen aanwijzing op dat de koperstatus in het westelijke veenweidegebied duidelijk afwijkt van die in de rest van Nederland, maar het bloedonderzoek is alleen bij twijfel aan een goede kopervoorziening uitgevoerd.
- Met name bij ouder jongvee, maar ook bij melkvee, worden lage bloedwaarden voor koper, maar ook seleen (GSH-Px) aangetroffen, vooral bij lage krachtvoergiften. Dergelijke lage bloedwaarden hoeven niet altijd tot klinische klachten te leiden, zodat supplementatie op voorhand niet nodig lijkt zijn. In stresssituaties kunnen echter wel problemen gaan optreden.
- Zowel een kopertekort als een koperovermaat heeft ongunstige effecten op biologische processen. Bij kopertekorten zijn onder meer diarree, een verminderde eetlust, vermageren, verbleken en dof worden van het haarkleed, kaalheid op de kop, plotselinge hartstilstand en botontkalking geconstateerd. De effecten lijken afhankelijk van de leeftijd van het dier, bij jongvee kunnen ook blokvoeten voorkomen. Bij koperovermaat zijn bij runderen onder meer een sterk geel gekleurde lever en donkerbruine nieren en urine gevonden.
- Een kopertekort heeft geen wezenlijke invloed op de fertiliteit van koeien. Meting van de molybdeenstatus kan relevant zijn, omdat wel een gunstig effect van kopersupplementatie op fertiliteit is aangetoond bij een molybdeenovermaat. De effecten van een ijzer- en zwavelovermaat op vruchtbaarheid zijn niet goed bekend.
- De koperstatus heeft zeer waarschijnlijk invloed op de werking van het immuunapparaat. Molybdeen kan hierbij van belang zijn. Bevindingen bij laboratoriumdieren gelden niet zonder meer voor melkvee.
- Koper is van belang als anti-oxidant, maar bij overdosering mogelijk ook als pro-oxidant.
- Bij de statusbepaling zijn aparte bepalingen voor mogelijke tekorten en overmaten beter bruikbaar dan bepalingen die voor beide afwijkingen gebruikt worden. Onderzoek van leverbiopten heeft de voorkeur boven onderzoek van serum voor de bepaling van de koperstatus. Bovendien zullen idealiter meerdere variabelen tegelijkertijd beoordeeld moeten worden.
- De kopervoorziening van melkvee heeft nauwelijks effect op de voor humane consumptie geproduceerde producten. Dat geldt zowel voor melk als voor vlees.

Aanbevelingen en voorstellen voor nader onderzoek

1. Er dient een protocol te worden opgesteld aan de hand waarvan eventuele kopertekorten of overmaten kunnen worden vastgesteld. Het protocol dient tevens aan te geven welke maatregelen dan getroffen moeten worden.
2. De benutting van koper is vooral afhankelijk van molybdeen, zwavel en ijzer. De huidige behoeftenorm voor koper houdt daar geen rekening mee. Voorgesteld wordt daarom een rekenmethode te ontwikkelen om de beschikbaarheid van koper in voedermiddelen afhankelijk van de gehalten aan molybdeen, zwavel en ijzer te kunnen schatten.
3. Vermeende probleemgebieden, zoals bijvoorbeeld het westelijk veenweidegebied, kunnen vervolgens aan de hand van het protocol worden gescreend.
4. Uit dit onderzoek blijkt dat het kopergehalte in het ruwvoer in het westelijk veenweidegebied relatief hoog is, maar de benutting waarschijnlijk laag. Voorgesteld wordt te onderzoeken in hoeverre kopertekorten in dit gebied een gevolg zijn van een overmaat aan S, Fe en/of Mo. Daarbij dient ook de rol van vooral sulfaten uit het drinkwater te worden meegenomen.
5. Het gebruik van organische en anorganische mineralen en spoorelementen in de Nederlandse melkveehouderij is niet goed bekend. Aanbevolen wordt een inventarisatie uit te voeren. Indien de diagnostiek geen vragen meer oplevert verdient het ten zeerste aanbeveling de werking van organisch gebonden mineralen te onderzoeken.
6. Bij onderzoek naar behoefte en effecten van spoorelementen dienen ook immuniteitsparameters meegenomen te worden.
7. Zowel ijzer als molybdeen verlagen de koperstatus. Kopertekort door molybdeenovermaat veroorzaakt wel duidelijke gebreksverschijnselen, kopertekort door ijzerovermaat niet. Aanbevolen wordt te onderzoeken wat hiervan de oorzaak is.
8. Voorgesteld wordt te onderzoeken of in de Nederlandse rantsoennormen net als in de nieuwste NRC-normen rekening gehouden moet worden met de hoogte van de melkproductie.
9. De botanische samenstelling en de grondwaterstand zijn van belang voor de mineralengehalten in het ruwvoer en daarmee voor de mineralenvoorziening van het vee. Bij een meer extensieve (bijvoorbeeld ecologische) veehouderij zijn vaak zowel de botanische samenstelling (veel klaver) als een verhoogde grondwaterspiegel ongunstig voor de kopervoorziening. Bovendien wordt vaak weinig krachtvoer verstrekt. Het verdient aanbeveling te onderzoeken onder welke bedrijfsomstandigheden (nat/droogte, botanische samenstelling, rantsoen) supplementatie van jongvee, droge koeien resp. melkkoeien met mineralen is aan te bevelen.
10. De literatuur geeft onvoldoende houvast omtrent de effecten van koper, molybdeen, ijzer en zwavel op fertiliteit en het immuunapparaat en eventuele toxische effecten. Aanbevolen wordt te onderzoeken vanaf welk voorzieningsniveau nadelige effecten op fertiliteit en weerstand of effecten van toxische aard optreden van deze 4 spoorelementen, en welke omstandigheden (bijvoorbeeld de duur van een bepaalde dosering) hierbij van belang zijn. Op grond van dergelijk onderzoek kan normering voor de behoeftes aan spoorelementen en vitamines beter onderbouwd worden.

Literatuur

1. ARC, 1980. The nutrient requirements of Ruminant Livestock.
2. Abba, M., De Luca, J. C., Mattioli, G., Zaccardi, E., and Dulout, F. N. 2000. Clastogenic effect of copper deficiency in cattle. *Mutat.Res.* 466, pp 51 - 55.
3. Abdel Rahim, A. G., Arthur, J. R., and Mills, C. F. 1986. Effects of dietary copper, cadmium, iron, molybdenum and manganese on selenium utilization by the rat. *J.Nutr.* 116, pp 403 - 411.
4. Abou-Shakra, F. R., Ward, N. I., and Everard, D. M. 1989. The role of trace elements in male infertility. *Fertil.Steril.* 52, pp 307 - 310.
5. Abu, Damir H., Eldirdiri, N. I., Adam, S. E., Howarth, J. A., Salih, Y. M., and Idris, O. F. 1993. Experimental copper poisoning in the camel (*Camelus dromedarius*). *J.Comp Pathol.* 108, pp 191 - 208.
6. Ackerman, D. J., Reinecke, A. J., Els, H. J., Grobler, D. G., and Reinecke, S. A. 1999. Sperm abnormalities associated with high copper levels in impala (*Aepyceros melampus*) in the Kruger National Park, South Africa. *Ecotoxicol.Environ.Saf.* 43, pp 261 - 266.
7. Aggett, P. J. 1985. Physiology and metabolism of essential trace elements: an outline. *Clin.Endocrinol.Metab.* 14, pp 513 - 543.
8. Ahmad, A., Farhan, Asad S., Singh, S., and Hadi, S. M. 2000. DNA breakage by resveratrol and Cu(II): reaction mechanism and bacteriophage inactivation. *Cancer Lett.* 154, pp 29 - 37.
9. Ali, K. E. and al Noaim, A. A. 1992. Copper status of Najdi sheep in eastern Saudi Arabia under penned and grazing conditions. *Trop.Anim Health Prod.* 24, pp 115 - 120.
10. Allen, H.E. 1999. Zinc chemistry and bioavailability in aquatic and soil environments. Paper gepresenteerd tijdens symposium "Zinc: Environmental Fate and Effects", Ede.
11. Allen, J. D. and Gawthorne, J. M. 1986. Involvement of organic molybdenum compounds in the interaction between copper, molybdenum, and sulfur. *J.Inorg.Biochem.* 27, pp 95 - 112.
12. Allen, J. D. and Gawthorne, J. M. 1987a. Effect of molybdenum treatments on the distribution of Cu and metallothionein in tissue extracts from rats and sheep. *J.Inorg.Biochem.* 31, pp 161 - 170.
13. Allen, J. D. and Gawthorne, J. M. 1987b. Involvement of the solid phase of rumen digesta in the interaction between copper, molybdenum and sulphur in sheep. *Br.J.Nutr.* 58, pp 265 - 276.
14. Allen, J. G. and Masters, H. G. 1980. Prevention of ovine lupinosis by the oral administration of zinc sulphate and the effect of such therapy on liver and pancreas zinc and liver copper. *Aust.Vet.J.* 56, pp 168 - 171.
15. Alt, E. R., Sternlieb, I., and Goldfischer, S. 1990. The cytopathology of metal overload. *Int.Rev.Exp.Pathol.* 31, pp 165 - 188.
16. Anderson, R.R. 1992. Comparison of trace elements in milk of four species. *J. Dairy Sci.* 75 p3050-3055.
17. Andrewartha, K. A. and Caple, I. W. 1980. Effects of changes in nutritional copper on erythrocyte superoxide dismutase activity in sheep. *Res.Vet.Sci.* 28, pp 101 - 104.
18. Arillo, A., Calamari, D., Margiocco, C., Melodia, F., and Mensi, P. 1984. Biochemical effects of long-term exposure to cadmium and copper on rainbow trout (*Salmo gairdneri*): validation of water quality criteria. *Ecotoxicol.Environ.Saf.* 8, pp 106 - 117.
19. Arthington, J. D., Corah, L. R., and Blecha, F. 1996a. The effect of molybdenum-induced copper deficiency on acute-phase protein concentrations, superoxide dismutase activity, leukocyte numbers, and lymphocyte proliferation in beef heifers inoculated with bovine herpesvirus-1. *J.Anim Sci.* 74, pp 211 - 217.
20. Arthington, J. D., Spell, A. R., Corah, L. R., and Blecha, F. 1996b. Effect of molybdenum-induced copper deficiency on in vivo and in vitro measures of neutrophil chemotaxis both before and following an inflammatory stressor. *J.Anim Sci.* 74, pp 2759 - 2764.
21. Aston, N. S., Morris, P. A., Tanner, M. S., and Variend, S. 1998. An animal model for copper-associated cirrhosis in infancy. *J.Pathol.* 186, pp 215 - 221.
22. Aston, N. S., Watt, N., Morton, I. E., Tanner, M. S., and Evans, G. S. 2000. Copper toxicity affects proliferation and viability of human hepatoma cells (HepG2 line). *Hum.Exp.Toxicol.* 19, pp 367 - 376.
23. Aulerich, R. J., Bursian, S. J., Poppenga, R. H., Braselton, W. E., and Mullaney, T. P. 1991. Toleration of high concentrations of dietary zinc by mink. *J.Vet.Diagn.Invest.* 3, pp 232 - 237.
24. Auza, N. 1983. Copper in ruminants. Review. *Ann.Rech.Vet.* 14, pp 21 - 37.
25. Auza, N., Braun, J. P., Benard, P., Thouvenot, J. P., and Rico, A. G. 1989. Hematological and plasma biochemical disturbances in experimental molybdenum toxicosis in sheep. *Vet.Hum.Toxicol.* 31, pp 535 - 537.
26. BSAP, 1983. Occasional publication no. 7.
27. Baker, D. H. and Czarnecki-Maulden, G. L. 1987. Pharmacologic role of cysteine in ameliorating or exacerbating mineral toxicities. *J.Nutr.* 117, pp 1003 - 1010.

28. Balbuena, O., L.R. McDowell en R.C. Stahringer. 1999. Supplementation with injectable copper in calves and cows with hypocupraemia. *Veterinaria Argentina* 16 (154) p272-280.
29. Barceloux, D. G. 1999a. Molybdenum. *J.Toxicol.Clin.Toxicol.* 37, pp 231 - 237.
30. Barceloux, D. G. 1999b. Copper. *J.Toxicol.Clin.Toxicol.* 37, pp 217 - 230.
31. Beede, D.K. 1991. Mineral and water nutrition. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 7 (2) p373-390.
32. Bibr, B., Deyl, Z., Lener, J., Kucera, J., and Simkova, M. 1987. The mechanism of action of molybdenum and tungsten upon collagen structures in vivo. *Physiol Bohemoslov.* 36, pp 417 - 424.
33. Biego, G. H., Joyeux, M., Hartemann, P., and Debry, G. 1998. Determination of mineral contents in different kinds of milk and estimation of dietary intake in infants. *Food Addit.Contam.* 15, pp 775 - 781.
34. Binnerts, W.T. 1964. Sporenelementen en rundvee. *Landbouwkundig Tijdschrift* 76-17:725-732.
35. Binnerts, W.T. 1979. The selenium status of dairy cows in the Netherlands derived from milk and blood analysis. *Neth. Milk and dairy Journal* 33 p24-30.
36. Bires, J., Kovac, G., and Vrzgula, L. 1991. Mineral profile of serum in experimental copper intoxication of sheep from industrial emissions. *Vet.Hum.Toxicol.* 33, pp 431 - 435.
37. Black, D.H. 1998. Copper supplementation and bovine fertility. PhD-thesis, University of Liverpool.
38. Blakley, B. R., Kutz, S. J., Tedesco, S. C., and Flood, P. F. 2000. Trace mineral and vitamin concentrations in the liver and serum of wild muskoxen from Victoria Island. *J.Wildl.Dis.* 36, pp 301 - 307.
39. Blakley, B.R. and D.L. Hamilton. 1987. The effect of copper deficiency on the immune response of mice. *Drug-Nutr Interact* 5 p103.
40. Bluethgen, A., W.H. Heesch en R. Burt. 1997. Heavy metals and other trace elements in milk and milk products. Monograph on residues and contaminants in milk and milk products. Bruxelles (Belgium). International Dairy Federation.
41. Boila, R.J., T.J. Devlin, R.A. Drysdale en L.E. Lillie. 1984. Supplementary copper for grazing beef cattle - injectable copper glycinate, and copper sulfate in free-choice mineral supplements. *Can. J. Anim. Sci.* 64 p675-696.
42. Bonner, F. W., King, L. J., and Parke, D. V. 1981. The influence of high dietary zinc on tissue disposition and urinary excretion of cadmium, zinc, copper and iron after repeated parenteral administration of cadmium to rats. *Toxicology.* 19, pp 247 - 254.
43. Bosman, M.S.M. en W.B. Deijs. 1969. Biochemisch onderzoek over het koper in ruwvoer en de benutting daarvan door het dier. *Jaarboek IBS* p. 37-44.
44. Boyne, R. and Arthur, J. R. 1986. Effects of molybdenum or iron induced copper deficiency on the viability and function of neutrophils from cattle. *Res.Vet.Sci.* 41, pp 417 - 419.
45. Bozhkov, A. I. 1997. Three dose-dependent stages of the effect of copper ions on functional activity of biological systems. *Biochemistry (Mosc.)*. 62, pp 149 - 157.
46. Bremner, I. 1987. Interactions between metallothionein and trace elements. *Prog.Food Nutr.Sci.* 11, pp 1 - 37.
47. Bremner, I., Mills, C. F., and Young, B. W. 1982. Copper metabolism in rats given di- or trithiomolybdates. *J.Inorg.Biochem.* 16, pp 109 - 119.
48. Bremner, I., Young, B. W., and Mills, C. F. 1976. Protective effect of zinc supplementation against copper toxicosis in sheep. *Br.J.Nutr.* 36, pp 551 - 561.
49. Brewer, G. J., Dick, R. D., Grover, D. K., LeClaire, V., Tseng, M., Wicha, M., Pienta, K., Redman, B. G., Jahan, T., Sondak, V. K., Strawderman, M., LeCarpentier, G., and Merajver, S. D. 2000. Treatment of metastatic cancer with tetrathiomolybdate, an anticopper, antiangiogenic agent: Phase I study. *Clin.Cancer Res.* 6, pp 1 - 10.
50. Bridges, C. H., Womack, J. E., Harris, E. D., and Scrutchfield, W. L. 1984. Considerations of copper metabolism in osteochondrosis of suckling foals. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 185, pp 173 - 178.
51. Britton, R. S. and Bacon, B. R. 1994. Role of free radicals in liver diseases and hepatic fibrosis. *Hepatogastroenterology.* 41, pp 343 - 348.
52. Brune, D., Nordberg, G., and Wester, P. O. 1980. Distribution of 23 elements in the kidney, liver and lungs of workers from a smeltery and refinery in North Sweden exposed to a number of elements and of a control group. *Sci.Total Environ.* 16, pp 13 - 35.
53. Bruwaene, R. van en R. Kirchmann. 1979. Irradiation of organic wastes for the purpose of animal food. *European Society of Nuclear Methods in Agriculture*, p68-73.
54. Bussink, D.W. 1999. Zwavelbemesting in voorjaar kan hogere grasopbrengst geven. *Praktijkonderzoek* 12 (2) p10-11.
55. COMV. 1996. Handleiding mineralenonderzoek bij rundvee in de praktijk. CVB.
56. Campbell, M.H., J.K. Miller en F.N. Schrick. 1999. Effect of additional cobalt, copper, manganese and zinc on reproduction and milk yield of lactating dairy cows receiving bovine somatotropin. *J. Dairy Sci.* 82 p1019-1025.

57. Cartana, J., Arola, L., and Mas, A. 1991. Effects of acute nickel toxicity upon plasma and liver metal homeostasis as a function of sex. *Toxicology*. 69, pp 133 - 141.
58. Cerklewski, F. L. and Forbes, R. M. 1977. Influence of dietary copper on lead toxicity in the young male rat. *J.Nutr.* 107, pp 143 - 146.
59. Cerone, S. I., Sansinanea, A. S., Streitenberger, S. A., Garcia, M. C., and Auza, N. J. 1998. The effect of copper deficiency on the peripheral blood cells of cattle. *Vet.Res.Comm.* 22, pp 47 - 57.
60. Cerone, S., Sansinanea, A., Streitenberger, S., Garcia, C., and Auza, N. 2000. Bovine monocyte-derived macrophage function in induced copper deficiency [In Process Citation]. *Gen.Physiol Biophys.* 19, pp 49 - 58.
61. Chan, S., Gerson, B., and Subramaniam, S. 1998. The role of copper, molybdenum, selenium, and zinc in nutrition and health. *Clin.Lab Med.* 18, pp 673 - 685.
62. Chiba, M., Ogihara, K., Inaba, Y., Nishima, T., and Kikuchi, M. 1984. The organ distribution of tin and the effect of tin on concentrations of several essential elements in rabbit. *Toxicology*. 31, pp 23 - 32.
63. Chidambaram, M. V., Barnes, G., and Frieden, E. 1984. Inhibition of ceruloplasmin and other copper oxidases by thiomolybdate. *J.Inorg.Biochem.* 22, pp 231 - 240.
64. Chmielnicka, J. and Sowa, B. 1996. Cadmium interaction with essential metals (Zn, Cu, Fe), metabolism metallothionein, and ceruloplasmin in pregnant rats and fetuses. *Ecotoxicol.Enviro.Saf.* 35, pp 277 - 281.
65. Chmielnicka, J., Szymanska, J. A., Brzeznicza, E. A., and Kaluzynski, A. 1992. Changes in concentration of essential metals in kidneys and urine as indices of gentamicin nephrotoxicity in female Wistar rats. *Pharmacol.Toxicol.* 71, pp 185 - 189.
66. Clark, C.K., R.P. Ansotegui en J.A. Paterson. 1995. Mineral nutrition of the beef cow to impact immunologic response. *Bovine Practitioner*. 29 p30-37.
67. Clarke, N. J. and Laurie, S. H. 1980. The copper-molybdenum antagonism in ruminants. I. The formation of thiomolybdates in animal rumen. *J.Inorg.Biochem.* 12, pp 37 - 43.
68. Coni, E., A. Bocca, D. Ianni en S. Caroli. 1995. Preliminary evaluation of the factors influencing the trace element content of milk and dairy products. *Food chemistry* 52 (2) p123-130.
69. Coni, E., S. Caroli, D. Ianni en A. Bocca. 1994. A methodological approach to the assesment of trace elements in milk and dairy products. *Food chemistry* 50 (2) p203-210.
70. Crow, J. P., Sampson, J. B., Zhuang, Y., Thompson, J. A., and Beckman, J. S. 1997. Decreased zinc affinity of amyotrophic lateral sclerosis-associated superoxide dismutase mutants leads to enhanced catalysis of tyrosine nitration by peroxynitrite. *J.Neurochem.* 69, pp 1936 - 1944.
71. Cymbaluk, N. F., Schryver, H. F., Hintz, H. F., Smith, D. F., and Lowe, J. E. 1981. Influence of dietary molybdenum on copper metabolism in ponies. *J.Nutr.* 111, pp 96 - 106.
72. DCMR Milieudienst Rijnmond. 2000. Het milieu in de regio Rotterdam in 2000. ISBN 90-802579-6-6
73. Dameron, C. T. and Harrison, M. D. 1998. Mechanisms for protection against copper toxicity. *Am.J.Clin.Nutr.* 67, pp 1091S - 1097S.
74. Dang, H.S., Jaiswal D.D., Wadhvani, C.N., Somasunderam, S. and Dacosta, H. 1985. Breast feeding: Mo, As, Mn, Zn and Cu concentrations in milk of economically poor Indian tribal and urban women. *Sci Total Environ* 44, pp 177 - 182.
75. Danks, D. M. 1991. Copper and liver disease. *Eur.J.Pediatr.* 150, pp 142 - 148.
76. Dargatz, D.A. F.B. Garry, G.B. Clark en P.F. Ross. 1999. Serum copper concentrations in beef cows and heifers. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 215(12) p1828-1832.
77. Dashti, H., Jeppsson, B., Hagerstrand, I., Hultberg, B., Srinivas, U., Abdulla, M., Joelsson, B., and Bengmark, S. 1987. Early biochemical and histological changes in rats exposed to a single injection of thioacetamide. *Pharmacol.Toxicol.* 60, pp 171 - 174.
78. Denizeau, F. and Marion, M. 1989. Genotoxic effects of heavy metals in rat hepatocytes. *Cell Biol.Toxicol.* 5, pp 15 - 25.
79. Deol, H. S., Howell, J. M., Dorling, P. R., and Symonds, H. W. 1992. The effect of copper and heliotrope on the composition of bile in sheep. *Res.Vet.Sci.* 53, pp 324 - 330.
80. Dethloff, G. M., Schlenk, D., Hamm, J. T., and Bailey, H. C. 1999. Alterations in physiological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with exposure to copper and copper/zinc mixtures. *Ecotoxicol.Enviro.Saf.* 42, pp 253 - 264.
81. DiSilvestro, R. A. and Carlson, G. P. 1991. Effects of moderate copper deficiency on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 197, pp 32 - 35.
82. Diaz-Barriga, F., Llamas, E., Mejia, J. J., Carrizales, L., Santoyo, M. E., Vega-Vega, L., and Yanez, L. 1990. Arsenic-cadmium interaction in rats. *Toxicology*. 64, pp 191 - 203.
83. Dijkstra, M., Kuipers, F., Smit, E. P., Havinga, R., and Vonk, R. J. 1993. The role of glutathione in bile secretion of endogenous trace elements in rats. *J.Lab Clin.Med.* 121, pp 751 - 758.
84. Dillard, C. J. and Tappel, A. L. 1984. Lipid peroxidation and copper toxicity in rats. *Drug Chem.Toxicol.* 7, pp 477 - 487.

85. Dokkum, H.P. van, G.H.M. Counotte, G.A.L. Meijer en I.R.M. Hovenkamp-Obbema. 1998. Achtergronddocument referentiewaarden waterkwaliteit-diergezondheid. Rapport TNO-MEP.
86. Dolashka-Angelova, P., Angelova, M., Genova, L., Stoeva, S., and Voelter, W. 1999. A novel Cu,Zn superoxide dismutase from the fungal strain *Humicola lutea* 110: isolation and physico-chemical characterization. *Spectrochim.Acta A Mol.Biomol.Spectrosc.* 55A, pp 2249 - 2260.
87. Duval, M. 1995. La vitamine E pour diminuer le rancissement du lait. *Producteur de Lait Quebecois* 16 (2) p39.
88. Eckert, G. E., Greene, L. W., Carstens, G. E., and Ramsey, W. S. 1999. Copper status of ewes fed increasing amounts of copper from copper sulfate or copper proteinate. *J.Anim Sci.* 77, pp 244 - 249.
89. Egami, F. 1975. Origin and early evolution of transition element enzymes. *J.Biochem.(Tokyo).* 77, pp 1165 - 1169.
90. Eife, R., Weiss, M., Barros, V., Sigmund, B., Goriup, U., Komb, D., Wolf, W., Kittel, J., Schramel, P., and Reiter, K. 1999. Chronic poisoning by copper in tap water: I. Copper intoxications with predominantly gastrointestinal symptoms [see comments]. *Eur.J.Med.Res.* 4, pp 219 - 223.
91. El-Deeb, S.A., H.N. Hassan en S.A. El-Deeb. 1987. Changes in the cow's milk composition as affected with mastitis infection. *Alexandria-Journal-of-Agricultural-Research* 32 (3) p163-174.
92. Elsenhans, B., Forth, W., and Richter, E. 1991. Increased copper concentrations in rat tissues after acute intoxication with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Arch.Toxicol.* 65, pp 429 - 432.
93. Engel, T. 1990. Biobeschikbaarheid van koper onder verschillende veldomstandigheden. Stageverslag, Delta instituut voor hydrobiologisch onderzoek, Yerseke.
94. Engle, T. E., Spears, J. W., Armstrong, T. A., Wright, C. L., and Odle, J. 2000. Effects of dietary copper source and concentration on carcass characteristics and lipid and cholesterol metabolism in growing and finishing steers. *J.Anim Sci.* 78, pp 1053 - 1059.
95. Evering, W. E., Haywood, S., Bremner, I., and Trafford, J. 1991. The protective role of metallothionein in copper overload: I. Differential distribution of immunoreactive metallothionein in copper- loaded rat liver and kidney. *Chem.Biol.Interact.* 78, pp 283 - 295.
96. Farmer, P. E., Adams, T. E., and Humphries, W. R. 1982. Copper supplementation of drinking water for cattle grazing molybdenum- rich pastures. *Vet.Rec.* 111, pp 193 - 195.
97. Faye, B. and Bengoumi, M. 1994. Trace-elements status in camels. A review. *Biol.Trace Elem.Res.* 41, pp 1 - 11.
98. Faye, B., Grillet, C., Tessema, A., and Kamil, M. 1991. Copper deficiency in ruminants in the Rift Valley of East Africa. *Trop.Anim Health Prod.* 23, pp 172 - 180.
99. Fischer J., Johnson, M.A. and Tackett, R.L. 1991. The effect of copper deficiency on adriamycin toxicity. *Toxicol Lett* 57, pp 147-158.
100. Fischer, J.G., Tackett, R.L., Howerth, E.W. and Johnson, M.A. 1993. Copper deficient rat heart can compensate for doxorubicin-induced oxidant stress. *Biol Trace Elem Res* 37, pp 233 - 251.
101. Fisher, G. L., Hjerpe, C. A., and Qualls, C. W. 1976. Effects of dietary molybdenum on the metabolism of copper and molybdenum in young cattle. *Bioinorg.Chem.* 6, pp 11 - 28.
102. Florianczyk, B. 1996. Function of metallothionein in the body. *Postepy Hig.Med.Dosw.* 50, pp 375 - 382.
103. Flynn, A. 1992. Minerals and trace elements in milk. *Adv. Food Nutr. Res.* 36 p209-252.
104. Frank, A. 1998. 'Mysterious' moose disease in Sweden. Similarities to copper deficiency and/or molybdenosis in cattle and sheep. Biochemical background of clinical signs and organ lesions. *Sci.Total Environ.* 209, pp 17 - 26.
105. Frank, A., Anke, M., and Danielsson, R. 2000d. Experimental copper and chromium deficiency and additional molybdenum supplementation in goats. I. Feed consumption and weight development. *Sci.Total Environ.* 249, pp 133 - 142.
106. Frank, A., Danielsson, R., and Jones, B. 2000b. The 'mysterious' disease in Swedish moose. Concentrations of trace elements in liver and kidneys and clinical chemistry. Comparison with experimental molybdenosis and copper deficiency in the goat. *Sci.Total Environ.* 249, pp 107 - 122.
107. Frank, A., Danielsson, R., and Jones, B. 2000c. Experimental copper and chromium deficiency and additional molybdenum supplementation in goats. II. Concentrations of trace and minor elements in liver, kidneys and ribs: haematology and clinical chemistry. *Sci.Total Environ.* 249, pp 143 - 170.
108. Frank, A., Sell, D. R., Danielsson, R., Fogarty, J. F., and Monnier, V. M. 2000a. A syndrome of molybdenosis, copper deficiency, and type 2 diabetes in the moose population of south-west Sweden. *Sci.Total Environ.* 249, pp 123 - 131.
109. Freedman, J. H. and Peisach, J. 1989. Resistance of cultured hepatoma cells to copper toxicity. Purification and characterization of the hepatoma metallothionein. *Biochim.Biophys.Acta.* 992, pp 145 - 154.

110. Fuentealba, I. C., Haywood, S., and Foster, J. 1989. Cellular mechanisms of toxicity and tolerance in the copper-loaded rat. III. Ultrastructural changes and copper localization in the kidney. *Br.J.Exp.Pathol.* 70, pp 543 - 556.
111. Fuentealba, I. C., Haywood, S., and Trafford, J. 1987. Evaluation of histochemical methods for the detection of copper overload in rat liver. *Liver.* 7, pp 277 - 282.
112. Fuentealba, I. and Haywood, S. 1988. Cellular mechanisms of toxicity and tolerance in the copper-loaded rat. I. Ultrastructural changes in the liver. *Liver.* 8, pp 372 - 380.
113. Fungwe, T. V., Buddingh, F., Yang, M. T., and Yang, S. P. 1989. Hepatic, placental, and fetal trace elements following molybdenum supplementation during gestation. *Biol.Trace Elem.Res.* 22, pp 189 - 199.
114. Funk, M. A. and Baker, D. H. 1991. Toxicity and tissue accumulation of copper in chicks fed casein and soy- based diets. *J.Anim Sci.* 69, pp 4505 - 4511.
115. Furono, K., Suetsuga, T., and Sugihara, N. 1996. Effects of metal ions on lipid peroxidation in cultured rat hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid. *J.Toxicol.Environ.Health.* 48, pp 121 - 129.
116. Gaeta, G. B., Adinolfi, L., and Utili, R. 1980. [Chronic copper toxicity of the liver in rat: preliminary observations]. *Boll.Soc.Ital.Biol.Sper.* 56, pp 1626 - 1628.
117. Gallagher, J. en B.R. Cottrill. 1985. Methods of copper supplementation of cattle. *Vet. Rec.* 117 (18) p468.
118. Garcia-Fernandez, A. J., Motas-Guzman, M., Navas, I., Maria-Mojica, P., and Romero, D. 1999. Sunflower meal as cause of chronic copper poisoning in lambs in southeastern Spain. *Can.Vet.J.* 40, pp 799 - 801.
119. Garmo, T.H., A. Frosle en R. Hoie. 1986. Levels of copper, molybdenum, sulphur, zinc, selenium, iron and manganese in native pasture plants from a mountain area in southern Norway. *Acta Agric. Scand.* 36 p147-161.
120. Gezondheidsraad, 1998. Risico-evaluatie van stoffen: zink.
121. Gimenez, I., Garay, R., and Alda, J. O. 1993. Molybdenum uptake through the anion exchanger in human erythrocytes. *Pflugers Arch.* 424, pp 245 - 249.
122. Goering, P. L. 1989. Acute exposure to formaldehyde induces hepatic metallothionein synthesis in mice. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 98, pp 325 - 337.
123. Gooneratne, R., Laarveld, B., and Christensen, D. 1989a. Effect of ⁶⁷Cu and ⁹⁹Mo labeled tetrathiomolybdate on the distribution of ⁶⁷Cu, Cu, and ⁹⁹Mo in bile fractions in sheep. *J.Inorg.Biochem.* 35, pp 233 - 246.
124. Gooneratne, S. R., Gawthorne, J. M., and Howell, J. M. 1989b. Distribution of Cu, Zn, and Fe in the soluble fraction of the kidney in normal, copper-poisoned, and thiomolybdate-treated sheep. *J.Inorg.Biochem.* 35, pp 37 - 53.
125. Gooneratne, S. R., Howell, J. M., Gawthorne, J. M., and Kumaratilake, J. S. 1989d. Subcellular distribution of copper in the kidneys of normal, copper- poisoned, and thiomolybdate-treated sheep. *J.Inorg.Biochem.* 35, pp 23 - 36.
126. Gooneratne, S. R., Howell, J. M., and Aughey, E. 1986. An ultrastructural study of the kidney of normal, copper poisoned and thiomolybdate-treated sheep. *J.Comp Pathol.* 96, pp 593 - 612.
127. Gooneratne, S. R., Howell, J. M., and Gawthorne, J. M. 1981a. Intravenous administration of thiomolybdate for the prevention and treatment of chronic copper poisoning in sheep. *Br.J.Nutr.* 46, pp 457 - 467.
128. Gooneratne, S. R., Howell, J. M., and Gawthorne, J. M. 1981b. An investigation of the effects of intravenous administration of thiomolybdate on copper metabolism in chronic Cu-poisoned sheep. *Br.J.Nutr.* 46, pp 469 - 480.
129. Gooneratne, S.R., Chaplin, R.K., Trent, A.M. and Christensen, D.A. 1989c. Effect of tetrathiomolybdate administration on the excretion of copper, zinc, iron and molybdenum in sheep bile. *Br Vet J* 145, pp 62 - 72.
130. Goulet, J. 1997. Une odeur de sante. *Producteur de Lait Quebecois* 17 (8) p48-49.
131. Graham, T. W., Holmberg, C. A., Keen, C. L., Thurmond, M. C., and Clegg, M. S. 1988. A pathologic and toxicologic evaluation of veal calves fed large amounts of zinc. *Vet.Pathol.* 25, pp 484 - 491.
132. Graham, T.W. 1991. Trace element deficiencies in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 7, pp 153 - 215.
133. Grift, J. van der. 2001. Persoonlijke mededeling.
134. Groot, M.S.M., J.J.B. Bronswijk, W.J. Willems, T. de Haan en P. del Castilho. 1998. Landelijk meetnet bodemkwaliteit. Resultaten 1995. Rapport nr. 714801024, RIVM, Bilthoven.
135. Gruber, H. en G. Bellof. 1998. Der Einfluss organischer Zink-Verbindungen auf die Eutergesundheit der Milchkuh. *Milchpraxis* 36(3) p124-127.
136. Gueguen, L., M. Lamand en F. Meschy. 1988. Nutrition Minérale in: Alimentation des bovins, ovins et caprins. *Uitgave INRA Parijs.*

137. Haddad, D. S., al Alousi, L. A., and Kantarjian, A. H. 1991. The effect of copper loading on pregnant rats and their offspring. *Funct.Dev.Morphol.* 1, pp 17 - 22.
138. Hallmans, G. 1978. Local absorption of zinc from wounds treated with different concentrations of zinc sulphate. *Acta Derm.Venereol.* 58, pp 413 - 419.
139. Hartmans, J. 1965. Een onderzoek naar de zinkvoorziening van het Nederlandse rundvee. Verslagen van landbouwkundige onderzoekingen no. 664, Pudoc, Wageningen.
140. Hartmans, J. 1970. Gezond vee op gezonde bedrijven. Wolters-Noordhof.
141. Haywood, S., Dincer, Z., Holding, J., and Parry, N. M. 1998. Metal (molybdenum, copper) accumulation and retention in brain, pituitary and other organs of ammonium tetrathiomolybdate-treated sheep. *Br.J.Nutr.* 79, pp 329 - 331.
142. Henderson, B. M. and Winterfield, R. W. 1975. Acute copper toxicosis in the Canada goose. *Avian Dis.* 19, pp 385 - 387.
143. Henkens, P.L.C.M. 1988. Basis van richtlijnen voor koperbemesting op grasland. *Meststoffen* 1 p47-49.
144. Hidiroglou, M., A.J. Mc Allister en C.J. Williams. 1987. Parturition supplementation of selenium and vitamin E to dairy cows: assessment of selenium status and reproductive performance. *J. Dairy Sci.* 70 (6) p1281-1288.
145. Hidiroglou, M., Morris, G., and Ivan, M. 1982. Chemical composition of sheep bones as influenced by molybdenum supplementation. *J.Dairy Sci.* 65, pp 619 - 624.
146. Hoeks, P. et al. 1998. Adviesbasis bemesting grasland en voedergrassland. Themaboek, PR Lelystad.
147. Høgl, O. 1975. Molybden als toxischer Faktor in einem Schweizer Alpental. *Mitteilungen-aus-dem-Gebiete-der-Lebensmitteluntersuchung-und-Hygiene* 66 (4) p485-495.
148. Hollander, E.J. de. 2001. Invloed van de koperstatus op de immunofunctie van runderen. Scriptie faculteit diergeneeskunde. Deze scriptie werd op immunologisch gebied door drs. E. Kornalijslijper begeleid
149. Hooft, W.F. van. 1995. Risico's voor de volksgezondheid als gevolg van blootstelling van runderen aan sporenelementen bij beweiding. Rapport nr. 693810001, RIVM, Bilthoven.
150. Hotsma, P.H., W.J. Bruins en E.J.R. Maathuis. 1996. Gehalten aan zware metalen in meststoffen. IKC-Landbouw, Ede publ. no 28.
151. Houwelingen, K.M van. 2001. Persoonlijke mededeling.
152. Howell, J. M. and Gopinath, C. 1977. Copper toxicity in sheep: the effects of repeated intravenous injections of copper sulphate. *Res.Vet.Sci.* 22, pp 86 - 94.
153. Howell, J. M. and Kumaratilake, J. S. 1990. Effect of intravenously administered tetrathiomolybdate on plasma copper concentrations of copper-loaded sheep. *J.Comp Pathol.* 103, pp 321 - 334.
154. Howell, J. M., Shunxiang, Y., and Gawthorne, J. M. 1993. Effect of thiomolybdate and ammonium molybdate in pregnant guinea pigs and their offspring. *Res.Vet.Sci.* 55, pp 224 - 230.
155. Humphries, W.R, M. Phillip, B.W. Young and I. Bremner. 1983. The influence of dietary iron and molybdenum on copper metabolism in calves. *British J. of Nutrition* (49) p. 77-86.
156. Hwang, D. F., Wang, L. C., and Cheng, H. M. 1998. Effect of taurine on toxicity of copper in rats. *Food Chem.Toxicol.* 36, pp 239 - 244.
157. Hynes, M., Woods, M., Poole, D., Rogers, P., and Mason, J. 1985. Some studies on the metabolism of labelled molybdenum compounds in cattle. *J.Inorg.Biochem.* 24, pp 279 - 288.
158. IDF, 1992. Trace elements in milk and milk products. *Bulletin of the IDF* 278.
159. IKC, 1993. Handboek voor de rundveehouderij, IKC-RSP Lelystad publ. No 35.
160. Igarza, L., Quiroga, M. A., Agostini, M. C., and Auza, N. 1999. Experimental model for the study of molybdenosis in the primary copper deficiency in rats. *Acta Physiol Pharmacol.Ther.Latinoam.* 49, pp 170 - 176.
161. Irwin, M. R., Bergin, W. C., Sawa, T. R., McKinney, L. B., and Kimura, H. 1979. Poor growth performance associated with hypocupremia in Hawaiian feedlot cattle. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 174, pp 590 - 593.
162. Ivan, M. and Veira, D. M. 1985. Effects of copper sulfate supplement on growth, tissue concentration, and ruminal solubilities of molybdenum and copper in sheep fed low and high molybdenum diets. *J.Dairy Sci.* 68, pp 891 - 896.
163. Ivan, M., Veira, D. M., and Kelleher, C. A. 1986. The alleviation of chronic copper toxicity in sheep by ciliate protozoa. *Br.J.Nutr.* 55, pp 361 - 367.
164. Jenkins, K. J. 1989b. Effect of copper loading of preruminant calves on intracellular distribution of hepatic copper, zinc, iron, and molybdenum. *J.Dairy Sci.* 72, pp 2346 - 2350.
165. Jenkins, K.J. and Hidiroglou, M. 1989a. Tolerance of the calf for excess copper in milk replacer. *J Dairy Sci* 72, pp 150 - 156.
166. Jenkinson, S. G., Lawrence, R. A., Grafton, W. D., Gregory, P. E., and McKinney, M. A. 1984. Enhanced pulmonary toxicity in copper-deficient rats exposed to hyperoxia. *Fundam.Appl.Toxicol.* 4, pp 170 - 177.
167. Jones, D.G. and N.F. Suttle. 1981. Some effects of copper deficiency on leukocyte function in sheep and cattle. *Research in Veterinary Science* 31 p151-156.

168. Jongbloed, A.W., J.D. van der Klis, Z. Mroz, P.A. Kemme, H. Prins en B.W. Zaalmink. 1998. Vermindering van koper, zink en cadmium in varkens- en pluimveevoeders. Een literatuuroverzicht. ID-DLO rapport 98.006, ID Lelystad.
169. Junge, R. E. and Thornburg, L. 1989. Copper poisoning in four llamas. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 195, pp 987 - 989.
170. Ke, Y. and Symonds, H. W. 1989. Enhancement of tetrathiomolybdate-induced biliary copper excretion in sheep by general anaesthesia and the effect on copper excretion in urine and bile. *Res.Vet.Sci.* 46, pp 344 - 348.
171. Keen, C. L., Cohen, N. L., Hurley, L. S., and Lonnerdal, B. 1984. Molecular localization of copper and zinc in rat fetal liver in dietary and drug-induced copper deficiency. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 118, pp 697 - 703.
172. Kegley, E. B. and Spears, J. W. 1994. Bioavailability of feed-grade copper sources (oxide, sulfate, or lysine) in growing cattle. *J.Anim Sci.* 72, pp 2728 - 2734.
173. Kellaway, R. C., Sitorus, P., and Leibholz, J. M. 1978. The use of copper levels in hair to diagnose hypocuprosis. *Res.Vet.Sci.* 24, pp 352 - 357.
174. Keller, J. C. and Kaminski, E. J. 1984. Toxic effects of Cu implants on liver. *Fundam.Appl.Toxicol.* 4, pp 778 - 783.
175. Kezhou, W., Stowe, H. D., House, A. M., Chou, K., and Thiel, T. 1987. Comparison of cupric and sulfate ion effects on chronic selenosis in rats. *J.Anim Sci.* 64, pp 1467 - 1475.
176. Khangarot, B. S. 1992. Copper-induced hepatic ultrastructural alterations in the snake-headed fish, *Channa punctatus*. *Ecotoxicol.Environ.Saf.* 23, pp 282 - 293.
177. Kincaid, R. L. and White, C. L. 1988. The effects of ammonium tetrathiomolybdate intake on tissue copper and molybdenum in pregnant ewes and lambs. *J.Anim Sci.* 66, pp 3252 - 3258.
178. Kincaid, R.L. 1981. Factors associated with the variation of copper and zinc in plasma of lactating cows. *Nutrition reports international* 23 (3) p493-498.
179. Kirchgessner, M., F.J. Schwarz, H.P. Roth en W.A. Schwarz. 1978. Wechselwirkungen zwischen den Spurenelementen Zink, Kupfer und Eisen nach Zinkdepletion und -repletion von Milchkuhen. *Archiv fur Tierernahrung* 28 (11-12) p723-733.
180. Klein, D., Lichtmannegger, J., Heinzmann, U., Muller-Hocker, J., Michaelsen, S., and Summer, K. H. 1998. Association of copper to metallothionein in hepatic lysosomes of Long- Evans cinnamon (LEC) rats during the development of hepatitis. *Eur.J.Clin.Invest.* 28, pp 302 - 310.
181. Knowles, S.O., J. Lee en N.D. Grace. 1997. Metabolism of trace elements in lactating dairy cows: perspectives of selenium and iodine in animal health and human nutrition. *Proceedings 32nd Annual Conf. of the Nutrition Society of New Zealand, Massey University, New Zealand, July, 1997* p174-183.
182. Koenig, K.M., W.T. Buckley en J.A. Shelford. 1991. True absorption of selenium in dairy cows: stable isotope tracer methodology and effect of dietary copper. *Can. J. Anim. Sci.* 71 (1) p175-183.
183. Koopmans, G.F. 1995. The effects of changing land use on the behavior of copper in the soil. Rapport nr. 30, AB-DLO, Haren.
184. Kostyniak, P.J., Nakeeb, S.M., Schopp, E.M., Maccubbin, A.E., John, E.K., Green, M.A. and Kung, H.F. 1990. Acute toxicity and mutagenicity of the copper complex of pyruvaldehyde- bis (N-4-methylthiosemicarbazone), Cu-PTSM. *J Appl Toxicol* 10, pp 417 - 421.
185. Kowalczyk, D. F., Gunson, D. E., Shoop, C. R., and Ramberg, C. F., Jr. 1986. The effects of natural exposure to high levels of zinc and cadmium in the immature pony as a function of age. *Environ.Res.* 40, pp 285 - 300.
186. Krachler, M., E. Rossipal en K.J. Irgolic. 1998. Trace elements in formulas based on cow and soy milk and in Austrian cow milk determined by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Biol. Trace elem. Res.* 65 (1) p53-74.
187. Kramer, P.R.G. S. van Dijk, en J.E.M. Beurskens. 1998. Verkenning bodemkwaliteit regionale wateren : huidige en toekomstige gehalten van zware metalen in slootbodems. Rapport nr. 733007003, RIVM, Bilthoven.
188. Kumaratilake, J. S. and Howell, J. M. 1987. Effects of intravenously administered tetra-thiomolybdate on the distribution of copper in the liver and kidney of copper loaded sheep: a histochemical study. *Res.Vet.Sci.* 42, pp 154 - 161.
189. Kumaratilake, J. S. and Howell, J. M. 1989a. Intracellular distribution of copper in the liver of copper-loaded sheep—a subcellular fractionation study. *J.Comp Pathol.* 101, pp 161 - 176.
190. Kumaratilake, J. S. and Howell, J. M. 1989b. Intravenously administered tetra-thiomolybdate and the removal of copper from the liver of copper-loaded sheep. *J.Comp Pathol.* 101, pp 177 - 199.
191. Kume, S.I. en S. Tanabe. 1993. Effect of parity on colostral mineral concentrations of Holstein cows and value of colostrum as a mineral source for newborn calves. *J. Dairy Sci.* 76 (6) p1654-1660.

192. Ladefoged, O. and Sturup, S. 1995. Copper deficiency in cattle, sheep and horses caused by excess molybdenum from fly ash: a case report. *Vet.Hum.Toxicol.* 37, pp 63 - 65.
193. Lagas, P, M.S.M. Groot, R. Koops, W.J. Willems, J.P.A. Lijzen, J.B.S. Gan, E.G. van de Velde, H. Booy, J.R.M. Alkemade, H.A.G. Heusinkveld en A.H.M. Baltissen. 1996. Bodemkwaliteitskartering van de Nederlandse landbouwgronden. Rapport nr. 714801003, RIVM, Bilthoven.
194. Lai, Y. R. and Sugawara, N. 1997. Outputs of hepatic copper and cadmium stimulated by tetrathiomolybdate (TTM) injection in Long-Evans Cinnamon (LEC) rats pretreated with cadmium, and in Fischer rats pretreated with copper and cadmium. *Toxicology.* 120, pp 47 - 54.
195. Lamand, M. 1989. Influence of molybdenum and sulfur on copper metabolism in sheep: comparison of elemental sulfur and sulfate. *Ann.Rech.Vet.* 20, pp 103 - 106.
196. Lamand, M., Lab, C., Tressol, J. C., and Mason, J. 1980. Biochemical parameters useful for the diagnosis of mild molybdenosis in sheep. *Ann.Rech.Vet.* 11, pp 141 - 145.
197. Lannon, B. and Mason, J. 1986. The inhibition of bovine ceruloplasmin oxidase activity by thiomolybdates in vivo and in vitro: a reversible interaction. *J.Inorg.Biochem.* 26, pp 107 - 115.
198. Larson, L.L., H.S. Mabruk and S.R. Lowry. 1980. Relationship between early postpartum blood composition and reproductive performance. *J. Dairy Sci.* 63 p283-289.
199. Liu, X., Jin, T., Nordberg, G. F., Sjostrom, M., and Zhou, Y. 1994. Influence of zinc and copper administration on metal disposition in rats with cadmium-metallothionein-induced nephrotoxicity. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 126, pp 84 - 90.
200. Lopez Mahia, P. P. Paseiro Losada en J. Simal Lozano. 1991. Trace elements in raw cow milk. *Alimentaria* 28 (226) p45-47.
201. Mahmoud, O. M. and Ford, E. J. 1983. Absorption and excretion of organic compounds of copper by sheep. *J.Comp Pathol.* 93, pp 551 - 558.
202. Mason, J., Cardin, C. J., and Dennehy, A. 1978a. The role of sulphide and sulphide oxidation in the copper molybdenum antagonism in rats and guinea pigs. *Res.Vet.Sci.* 24, pp 104 - 108.
203. Mason, J., Lamand, M., Tressol, J. C., and Lab, C. 1978b. The influence of dietary sulphur, molybdate and copper on the absorption, excretion and plasma fraction levels of ⁹⁹Mo in sheep. *Ann.Rech.Vet.* 9, pp 577 - 586.
204. Mason, J., Lamand, M., Tressol, J. C., and Mulryan, G. 1988. Studies of the changes in systemic copper metabolism and excretion produced by the intravenous administration of trithiomolybdate in sheep. *Br.J.Nutr.* 59, pp 289 - 300.
205. Mason, J., Lamand, M., and Hynes, M. J. 1983. ⁹⁹Mo metabolism in sheep after the intravenous injection of [⁹⁹Mo] thiomolybdates. *J.Inorg.Biochem.* 19, pp 153 - 164.
206. Mason, J., Woods, M., and Poole, D. B. 1986. Accumulation of copper on albumin in bovine plasma in vivo after intravenous trithiomolybdate administration. *Res.Vet.Sci.* 41, pp 108 - 113.
207. Massie, H. R. and Aiello, V. R. 1984. Excessive intake of copper: influence on longevity and cadmium accumulation in mice. *Mech.Ageing Dev.* 26, pp 195 - 203.
208. Matsubara, T., Frunzke, K., and Zumft, W. G. 1982. Modulation by copper of the products of nitrite respiration in *Pseudomonas perfectomarinus*. *J.Bacteriol.* 149, pp 816 - 823.
209. Matsui, Lee, I, Suzuki, M., Hayashi, N., Hu, J., Van Eldik, L. J., Titani, K., and Nishikimi, M. 2000. Copper-dependent formation of disulfide-linked dimer of S100B protein. *Arch.Biochem.Biophys.* 374, pp 137 - 141.
210. McArdle, H. J., Gross, S. M., Vogel, H. M., Ackland, M. L., and Danks, D. M. 1989. The effect of tetrathiomolybdate on the metabolism of copper by hepatocytes and fibroblasts. *Biol.Trace Elem.Res.* 22, pp 179 - 188.
211. McFarlane, J.D., G.J. Judson en J. Gouzos. 1990. Copper deficiency in ruminants in the South East of South Australia. *Austr. J. of Exp. Agric.* 30 p187-193.
212. McGrath, S.P. en T.L. Prost. 1997. Behaviour of trace elements in terrestrial ecosystems. Contaminated soils: 3rd International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements, Paris, France, 15-19 May, 1995. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA); Paris; France 1997 p35-54.
213. Meinel, B., Bode, J. C., Koenig, W., and Richter, F. W. 1979. Contents of trace elements in the human liver before birth. *Biol.Neonate.* 36, pp 225 - 232.
214. Merkel, R.C., L.R. McDowell, H.L. Popenoe en N.S. Wilkinson. 1992. Comparison of the mineral content of milk and calf serum from water buffalo and Charolais cattle. *Buffalo Journal* 8 (1) p9-15.
215. Milanino, R., Marrella, M., Moretti, U., Concari, E., and Velo, G. P. 1988. Copper and zinc status in rats with acute inflammation: focus on the inflamed area. *Agents Actions.* 24, pp 356 - 364.
216. Milhaud, G. E. and Mehennaoui, S. 1988. Indicators of lead, zinc and cadmium exposure in cattle. I. Results in a polluted area. *Vet.Hum.Toxicol.* 30, pp 513 - 517.
217. Miller, W.J. 1979. Dairy cattle feeding and nutrition. Academic press p. 147-148

218. Mills, C. F., El Gallad, T. T., Bremner, I., and Weham, G. 1981b. Copper and molybdenum absorption by rats given ammonium tetrathiomolybdate. *J.Inorg.Biochem.* 14, pp 163 - 175.
219. Mills, C. F., El Gallad, T. T., and Bremner, I. 1981a. Effects of molybdate, sulfide, and tetrathiomolybdate on copper metabolism in rats. *J.Inorg.Biochem.* 14, pp 189 - 207.
220. Moffor, F. M. and Rodway, R. G. 1991. The effect of tetrathiomolybdate on growth rate and onset of puberty in ewe-lambs. *Br.Vet.J.* 147, pp 421 - 431.
221. Moreno-Rojas, R., M.A. Amaro-Lopez en G. Zurera-Cosano. 1993. Micronutrients in natural cow, ewe and goat milk. *International-Journal-of-Food-Sciences-and-Nutrition* 44 (1) p37-46.
222. Morris, J.G., W.S. Cripe, H.L Chapman, D.F. Walker, J.B. Armstrong, J.D. Alexander, R. Miranda, A. Sanchez, B. Sanchez, J.R. Blair-West en D.A. Denton. 1984. Selenium deficiency in cattle associated with Heinz bodies and anemia. *Science* 223: 4635, 491-493.
223. Murthy, R. C., Srivastava, R. S., and Chandra, S. V. 1981. Serum ceruloplasmin in manganese-treated rats. *Toxicol.Lett.* 7, pp 217 - 220.
224. NRC, 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. Seventh edition, 2001.
225. Nakano, M. 1993. A possible mechanism of iron neurotoxicity. *Eur.Neurol.* 33 Suppl 1, pp 44 - 51.
226. Neijenhuis, E. 1990. Kopergebrek in het Salland-Twente gebied, literatuuronderzoek naar het risico op kopergebrek voor de bosgroep Salland-Twente. Doctoraal-scriptie vakgroep bosbouw, LU Wageningen.
227. Nielsen, F. H. 1990. New essential trace elements for the life sciences. *Biol.Trace Elem.Res.* 26-27, pp 599 - 611.
228. Nordberg, M. and Nordberg, G. F. 2000. Toxicological aspects of metallothionein. *Cell Mol.Biol.(Noisy-le-grand)*. 46, pp 451 - 463.
229. Olkowski, A. A., Gooneratne, S. R., Crichlow, E. C., Rousseaux, C. G., and Christensen, D. A. 1990b. Effects of high dietary sulfur on brain functions using evoked potentials technique. *Can.J.Vet.Res.* 54, pp 113 - 118.
230. Olkowski, A. A., Gooneratne, S. R., and Christensen, D. A. 1990a. Effects of diets of high sulphur content and varied concentrations of copper, molybdenum and thiamine on in vitro phagocytic and candidacidal activity of neutrophils in sheep. *Res.Vet.Sci.* 48, pp 82 - 86.
231. Olsen, P.A., D.R. Brink, D.T. Hickok, M.P. Carlson, N.R. Schneider, D.C. Adams, D.J. Colburn, A.B. Johnson en G.H. Deutscher. 1999. Effects of supplementation of organic and inorganic combinations of copper, cobalt, manganese, and zinc above nutrient requirement levels on postpartum two-year-old cows. *J. Anim. Sci.* 77 (3) p522-532.
232. Olson, K. J., Fontenot, J. P., and Failla, M. L. 1984. Influence of molybdenum and sulfate supplementation and withdrawal of diets containing high copper broiler litter on tissue copper levels in ewes. *J.Anim Sci.* 59, pp 210 - 216.
233. Orten, J. M., Orten, A. U., Sardesai, V. M., and Cheng, L. C. 1975. The role of copper in the biosynthesis of heme. pp. 643-65. In: Brewer.GJ, ed.*Erythrocyte.structure.and function.*New York., Liss., 1975.W1.PR668E.v.1 1975.
234. Oude Elferink, S.J.W.H. en G.A.L. Meijer. 2000. Risico's van zwavelverbindingen in drinkwater voor runderen. Rapport ID-TNO diervoeding, Lelystad.
235. Ouweltjes, W. 2000. Ruwvoersamenstelling, vruchtbaarheid en celgetal. Intern rapport 418, Praktijkonderzoek Veehouderij, Lelystad.
236. Parry, N. M., Phillippo, M., Reid, M. D., McGaw, B. A., Flint, D. J., and Loveridge, N. 1993. Molybdenum-induced changes in the epiphyseal growth plate. *Calcif.Tissue Int.* 53, pp 180 - 186.
237. Paynter, D. I. 1982. Differences between serum and plasma ceruloplasmin activities and copper concentrations: investigation of possible contributing factors. *Aust.J.Biol.Sci.* 35, pp 353 - 361.
238. Petering, H. G. 1978. Some observations on the interaction of zinc, copper, and iron metabolism in lead and cadmium toxicity. *Environ.Health Perspect.* 25, pp 141 - 145.
239. Peterson, R.G. and D.E. Waldern. 1977. A survey of dairy herds in the Fraser valley of British Columbia to determine possible causes of unsatisfactory reproductive performance. *Can. J. An. Sci* 57: 395-404
240. Phillipo, M., W.R. Humphries , I. Bremner and B.W. Young. 1982. Possible effect of molybdenum on fertility in the cow. *Proceeding Nutrition Society* 80 A.
241. Phillipo, M., W.R. Humphries , I. Bremner, T. Atkinson and G.D. Henderson. 1985. 5th International Symposium on Trace elements in Man and Animals (TEMA5) P. 176-180
242. Phillipo, M., W.R. Humphries , I. Bremner, T. Atkinson, G.D. Henderson and P.H. Garthwaite. 1987. The effect of dietary molybdenum and iron on copper status, puberty, fertility and oestrous cycles in cattle. *J. Agric. Sci.* 109 p321-336.
243. Price, J., Will, A. M., Paschaleris, G., and Chesters, J. K. 1987. Identification of thiomolybdates in digesta and plasma from sheep after administration of ⁹⁹Mo-labelled compounds into the rumen. *Br.J.Nutr.* 58, pp 127 - 138.

244. Pritchard, G. C., Lewis, G., Wells, G. A., and Stopforth, A. 1985. Zinc toxicity, copper deficiency and anaemia in swill-fed pigs. *Vet.Rec.* 117, pp 545 - 548.
245. RIVM, 2000. Milieucompendium 2000.
246. Rana, S. V. and Kumar, A. 1981. Effect of molybdenum and copper on key enzymes of rat kidney with special reference to physiological antagonism. *Toxicol.Lett.* 7, pp 393 - 397.
247. Rofe, A. M., Philcox, J. C., and Coyle, P. 1996. Trace metal, acute phase and metabolic response to endotoxin in metallothionein-null mice. *Biochem.J.* 314 (Pt 3), pp 793 - 797.
248. Romeu-Moreno, A., Aguilar, C., Arola, L., and Mas, A. 1994. Respiratory toxicity of copper. *Environ.Health Perspect.* 102 Suppl 3, pp 339 - 340.
249. Roshchin, A. V. and Lukashov, A. A. 1978. Interaction of molybdenum with other elements and compounds in the organism. *J.Hyg.Epidemiol.Microbiol.Immunol.* 22, pp 137 - 143.
250. Rowlands, G.J., W. Little and B.A. Kitchenham. 1977. Relationship between blood composition and fertility in dairy cows - a field study. *J. Dairy Res.* 44 p1-7.
251. Russanov, E. M., Kassabova, T. A., Konstantinova, S. G., and Balevska, P. S. 1986. Effect of chronic copper loading on the activity of rat liver antioxidative enzymes. *Acta Physiol Pharmacol.Bulg.* 12, pp 51 - 56.
252. Ryan, J., McKillen, M., and Mason, J. 1987. Sulphate/molybdate interactions: in vivo and in vitro studies on the group VI oxyanion transport system in ovine renal tubule epithelial cells. *Ann.Rech.Vet.* 18, pp 47 - 55.
253. Sager, R. L., Hamar, D. W., and Gould, D. H. 1990. Clinical and biochemical alterations in calves with nutritionally induced polioencephalomalacia [published erratum appears in *Am J Vet Res* 1991 Mar;52(3):514]. *Am.J.Vet.Res.* 51, pp 1969 - 1974.
254. Sanders, D.E. en J.A. Sanders. 1983. Diagnosis and management of copper deficiency in dairy cattle. *Modern Veterinary Practice* 64 (8) p613-616.
255. Sansinanea, A.S., Cerone, S.I., Streitenberger, S.A., Garcia, C. and Auza, N. 1998. Oxidative effect of hepatic copper overload. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* 48, pp 25 - 31.
256. Sas, B. 1989. Secondary copper deficiency in cattle caused by molybdenum contamination of fodder: a case history. *Vet.Hum.Toxicol.* 31, pp 29 - 33.
257. Saylor, W. W. and Leach, R. M., Jr. 1980. Intracellular distribution of copper and zinc in sheep: effect of age and dietary levels of the metals. *J.Nutr.* 110, pp 448 - 459.
258. Schenkel, H. 2000. Einsatz organischer Spurenelementverbindungen zur Versorgung landwirtschaftlicher Nutztiere.
259. Schmidt, R., G. Tolgyesi en J. Varga. 1989. Mineral composition of grasses grown on peat soils in northwestern Hungary and fertilization experiments. Manganese. *Proc. Of the XVI International Grassland Congress* p777-778.
260. Schwarz, F.J. en M. Kirchgessner. 1978. Kupfer- und Zinkgehalte in der Milch und im Plasma von Kuhen nach hoher nutritiver Kupferdosierung. *Zeitschr. Fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung.* 166 (1) p5-8.
261. Seaborn, C. D. and Yang, S. P. 1993. Effect of molybdenum supplementation on N-nitroso-N-methylurea-induced mammary carcinogenesis and molybdenum excretion in rats. *Biol.Trace Elem.Res.* 39, pp 245 - 256.
262. Shen, L.H., P. van Dael, J. Luten en H. Deelstra. 1996. Estimation of selenium bioavailability from human, cow's, goat and sheep milk by an in vitro method. *Int. J. of Food sciences and nutrition* 47 (1) p75-81.
263. Slooff, W., R.F.M.J. Cleven, J.A. Janus en J.P.M. Ros. 1990. Basisdocument koper. *Publicatiereeks milieubeheer* nr. 5, RIVM, Bilthoven.
264. Smart, M.E., J. Gudmundson and D.A. Christensen 1981 Trace mineral deficiencies in cattle: A Review.
265. Smolders, E.A.A., Tj. Boxem, C. Kalis, Tj. Jorna, K. van Houwelingen en J. Zonderland. 1993. Koper, magnesium en selenium bij jongvee op veenweidebedrijven. *Praktijkonderzoek* 6 (2) p19-22
266. Sokol, R. J., Devereaux, M. W., O'Brien, K., Khandwala, R. A., and Loehr, J. P. 1993. Abnormal hepatic mitochondrial respiration and cytochrome C oxidase activity in rats with long-term copper overload. *Gastroenterology.* 105, pp 178 - 187.
267. Sokol, R. J., Devereaux, M., Mierau, G. W., Hambidge, K. M., and Shikes, R. H. 1990. Oxidant injury to hepatic mitochondrial lipids in rats with dietary copper overload. Modification by vitamin E deficiency. *Gastroenterology.* 99, pp 1061 - 1071.
268. Sokol, R. J., McKim, J. M., Jr., and Devereaux, M. W. 1996. alpha-tocopherol ameliorates oxidant injury in isolated copper- overloaded rat hepatocytes. *Pediatr.Res.* 39, pp 259 - 263.
269. Southern, L. L. and Baker, D. H. 1983. Zinc toxicity, zinc deficiency and zinc-copper interrelationship in *Eimeria acervulina*-infected chicks. *J.Nutr.* 113, pp 688 - 696.

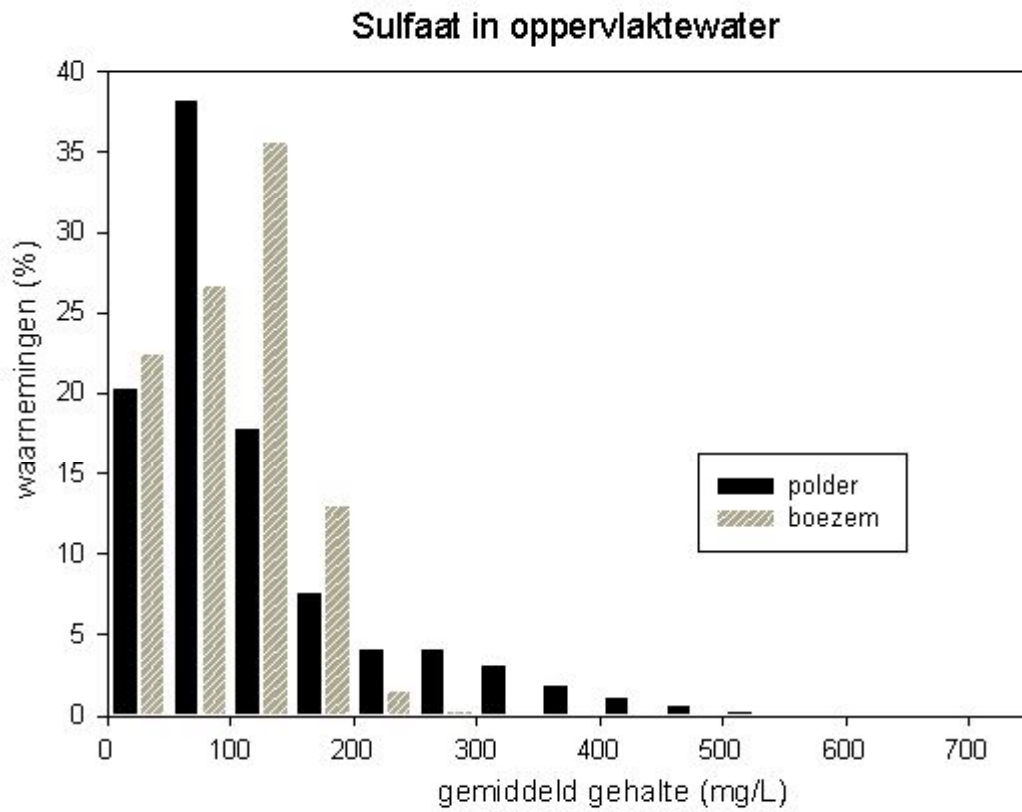
270. Stabel, J.R., J.W. Speard, and T.T. Brown, 1993. Effect of copper deficiency on tissue, blood characteristics and immune function of calves challenged with Infectious Bovine Rhinotracheitis and *Pasteurella hemolytica*. *J. An. Sci.* 71 p1247-1255.
271. Steffert, I.J. 1993. Compositional changes in cow's milk associated with health problems. *Milkfat flavour forum* (ISBN 0-473-02113-7) p119-125.
272. Steinebach, O. M. and Wolterbeek, H. T. 1994. Role of cytosolic copper, metallothionein and glutathione in copper toxicity in rat hepatoma tissue culture cells. *Toxicology*. 92, pp 75 - 90.
273. Strain, J. J. and Lynch, S. M. 1990. Excess dietary methionine decreases indices of copper status in the rat. *Ann.Nutr.Metab.* 34, pp 93 - 97.
274. Strickland, K., Smith, F., Woods, M., and Mason, J. 1987. Dietary molybdenum as a putative copper antagonist in the horse. *Equine Vet.J.* 19, pp 50 - 54.
275. Strubelt, O., Kremer, J., Tilse, A., Keogh, J., Pentz, R., and Younes, M. 1996. Comparative studies on the toxicity of mercury, cadmium, and copper toward the isolated perfused rat liver. *J.Toxicol.EnvIRON.Health.* 47, pp 267 - 283.
276. Sugawara, N., Ikeda, T., Lai, Y. R., and Sugawara, C. 1999. The effect of subcutaneous tetrathiomolybdate administration on copper and iron metabolism, including their regional redistribution in the brain, in the Long-Evans Cinnamon rat, a bona fide animal model for Wilson's disease. *Pharmacol.Toxicol.* 84, pp 211 - 217.
277. Sugawara, N., Li, D., Sugawara, C., and Miyake, H. 1995. Response of hepatic function to hepatic copper deposition in rats fed a diet containing copper. *Biol.Trace Elem.Res.* 49, pp 161 - 169.
278. Suttle, N. F. 1975. The role of organic sulphur in the copper-molybdenum-S interrelationship in ruminant nutrition. *Br.J.Nutr.* 34, pp 411 - 420.
279. Suttle, N. F. 1986. Copper deficiency in ruminants; recent developments. *Vet.Rec.* 119, pp 519 - 522.
280. Suttle, N. F. and Field, A. C. 1983. Effects of dietary supplements of thiomolybdates on copper and molybdenum metabolism in sheep. *J.Comp Pathol.* 93, pp 379 - 389.
281. Suttle, N. F. and Jones, D. G. 1989. Recent developments in trace element metabolism and function: trace elements, disease resistance and immune responsiveness in ruminants. *J.Nutr.* 119, pp 1055 - 1061.
282. Suttle, N. F., Knox, D. P., Angus, K. W., Jackson, F., and Coop, R. L. 1992b. Effects of dietary molybdenum on nematode and host during *Haemonchus contortus* infection in lambs. *Res.Vet.Sci.* 52, pp 230 - 235.
283. Suttle, N. F., Knox, D. P., Jackson, F., Coop, R. L., and Angus, K. W. 1992a. Effects of dietary molybdenum on nematode and host during *Trichostrongylus vitrinus* infection in lambs. *Res.Vet.Sci.* 52, pp 224 - 229.
284. Suttle, N.F. and A.C. Field. 1974. The effect of dietary molybdenum on hypocupraemic ewes treated subcutaneous copper. *Vet. Rec.* 95 p165-168.
285. Suzuki, K. T., Rui, M., Ueda, J., and Ozawa, T. 1996. Production of hydroxyl radicals by copper-containing metallothionein: roles as prooxidant. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 141, pp 231 - 237.
286. Szalay, S., Z. Samsoni en M. Szilagyi. 1975. Trace element deficiency symptoms in plants grown on peaty soils of Hungary. *Novenytermeles* 24 p35-45.
287. Szpiech, M., Dabrowski, Z., and Miszta, H. 1983. The effect of molybdenum upon blood serum enzymatic ceruloplasmin activity in rats. *Sci.Total Environ.* 30, pp 213 - 219.
288. Telfer, S.B. 1999. Correspondentie n.a.v. artikel Wentink et al., 1999.
289. Temminghoff, E.J.M. 1998. Chemical speciation of heavy metals in sandy soils in relation to availability and mobility. Proefschrift, Landbouwniversiteit Wageningen.
290. Temminghoff, E.J.M. 2001. Persoonlijke mededeling.
291. Theil, E. C. and Calvert, K. T. 1978. The effect of copper excess on iron metabolism in sheep. *Biochem.J.* 170, pp 137 - 143.
292. Tokarnia, C. H., Dobereiner, J., Peixoto, P. V., and Moraes, S. S. 2000. Outbreak of copper poisoning in cattle fed poultry litter. *Vet.Hum.Toxicol.* 42, pp 92 - 95.
293. Toor, C.H. van en C.W.J.M van der Vleuten. 1990. Rapport van onderzoek naar de gehalten aan cadmium, koper, lood en zink in de Nederlandse landbouwgronden. Bedrijfslaboratorium voor Grond- en Gewasonderzoek, Oosterbeek.
294. Treshchalina, E. M., Matveichuk, N. V., Gudratov, N. O., and Potapova, G. I. 1985. Characteristics of the mechanism of action of complex copper (II) compounds with alpha-amino acids. *Biull.Eksp.Biol.Med.* 99, pp 86 - 88.
295. Tveitnes, S. 1975. Copper and molybdenum as plant nutrients for leys. *Meldinger fra Norges Landbrukhoegskole* 54: 7.
296. USDA, 2000. Serum zinc concentrations of U.S. beef cattle. Info sheet: www.aphis.usda.gov/vs/ceah/cahm.

297. Van Niekerk, F. E. and Van Niekerk, C. H. 1989. The influence of experimentally induced copper deficiency on the fertility of rams. I. Semen parameters and peripheral plasma androgen concentration. *J.S.Afr.Vet.Assoc.* 60, pp 28 - 31.
298. Van Niekerk, F. E., Cloete, S. W., Coetzer, W. A., Du Plessis, S. S., Wellington, A. C., and Smith, W. A. 1994. An assessment of the toxicity of parenteral treatment with copper EDTA and copper heptonate in sheep. *J.S.Afr.Vet.Assoc.* 65, pp 46 - 51.
299. Van Ryssen, J. B. and Stielau, W. J. 1981. Effect of different levels of dietary molybdenum on copper and Mo metabolism in sheep fed on high levels of Cu. *Br.J.Nutr.* 45, pp 203 - 210.
300. Van Ryssen, J. B., Botha, W. S., and Stielau, W. J. 1982. Effect of a high copper intake and different levels of molybdenum on the health of sheep. *J.S.Afr.Vet.Assoc.* 53, pp 167 - 170.
301. Verweij, J.H.P. 1970. Molybdeenovermaat bij het rund door luchtverontreiniging. Proefschrift, Rijksuniversiteit Utrecht.
302. Verweij, W., M.N. Mons, J.E.M. Aalbers en R.G.H. Cruchten. 1996. Koperemissies door drinkwaterleidingen. Rapport nr. 734301012, RIVM, Bilthoven.
303. Vulpe, C. D. and Packman, S. 1995. Cellular copper transport. *Annu.Rev.Nutr.* 15, pp 293 - 322.
304. Vyskocil, A. and Viau, C. 1999. Assessment of molybdenum toxicity in humans. *J.Appl.Toxicol.* 19, pp 185 - 192.
305. Walker, N. I. 1999. Copper toxicosis in an Australian child. *Eur.J.Med.Res.* 4, pp 249 - 251.
306. Walravens, P. A., Moure-Eraso, R., Solomons, C. C., Chappell, W. R., and Bentley, G. 1979. Biochemical abnormalities in workers exposed to molybdenum dust. *Arch.Environ.Health.* 34, pp 302 - 308.
307. Wang, Z. Y. and Mason, J. 1988. Studies on the uptake and subsequent tissue distribution of [35S]trithiomolybdate in rats: effects on metallothionein copper in liver, kidney, and intestine. *J.Inorg.Biochem.* 33, pp 19 - 29.
308. Wang, Z. Y., Poole, D., and Mason, J. 1987. The uptake and intracellular distribution of [35S]trithiomolybdate in bovine liver in vivo. *J.Inorg.Biochem.* 31, pp 85 - 93.
309. Ward, J. D. and Spears, J. W. 1997. Long-term effects of consumption of low-copper diets with or without supplemental molybdenum on copper status, performance, and carcass characteristics of cattle. *J.Anim.Sci.* 75, pp 3057 - 3065.
310. Ward, J. D. and Spears, J. W. 1999. The effects of low-copper diets with or without supplemental molybdenum on specific immune responses of stressed cattle. *J.Anim.Sci.* 77, pp 230 - 237.
311. Ward, J.D., G.P. Gengelbach and J.W. Spears. 1997. The effects of Copper deficiency with and without high dietary iron and molybdeneum on immune function. *J. An. Sci.* 75 p1400-1408.
312. Weaver, D. M., Tyler, J. W., Marion, R. S., Casteel, S. W., Loiacono, C. M., and Turk, J. R. 1999. Subclinical copper accumulation in llamas. *Can.Vet.J.* 40, pp 422 - 424.
313. Weijers, W.A.M. 1931. Koper en anaemie. Proefschrift, RU Leiden.
314. Wentink, G.H., G. Smolders, Tj. Boxem, Th. Wensing, K.E. Müller en A.M. van den Top. 1999. Lack of clinical abnormalities in dairy heifers with low blood and liver copper levels. *Vet. Rec.* 145 p258-259.
315. Westhoek, H.J., L. Beijer, W.J. Bruins, P.H. Hotsma, J.W.M. Janssen en E.J.R. Maathuis. 1996. Aan- en afvoerbilansen van zware metalen van Nederlandse landbouwgronden. IKC-Landbouw, Ede publ. No. 28.
316. Wetzal, R. and Menke, K. H. 1978. Behavior of the trace elements copper, zinc and manganese in bovine rumen. 1. Trace element content of different fractions of rumen fluid and the effect of copper sulfate administration. *Arch.Tierernahr.* 28, pp 221 - 233.
317. White, C. L., Cadwalader, T. K., Hoekstra, W. G., and Pope, A. L. 1989b. The metabolism of ⁷⁵Se-selenomethionine in sheep given supplementary copper and molybdenum. *J.Anim.Sci.* 67, pp 2400 - 2408.
318. White, C. L., Caldwalader, T. K., Hoekstra, W. G., and Pope, A. L. 1989a. Effects of copper and molybdenum supplements on the copper and selenium status of pregnant ewes and lambs. *J.Anim.Sci.* 67, pp 803 - 809.
319. Whitelaw, A., Armstrong, R. H., Evans, C. C., and Fawcett, A. R. 1979. A study of the effects of copper deficiency in Scottish blackface lambs on improved hill pasture. *Vet.Rec.* 104, pp 455 - 460.
320. Wilhelmssen, C. L. 1979. An immunohematological study of chronic copper toxicity in sheep. *Cornell Vet.* 69, pp 225 - 232.
321. Windhauser, M.M., L.C. Kappel, J. McClure and M. Hegsted. 1991. Suboptimal levels of dietary copper vary immunoresponsiveness in rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 30: 205.
322. Wittenberg, K.M. en T.J. Devlin. 1987. Effects of dietary molybdenum on productivity and metabolic parameters of lactating beef cows and their offspring. *Can. J. Anim. Sci.* 67 p1055-1066.
323. Woods, M. and Mason, J. 1987. Spectral and kinetic studies on the binding of trithiomolybdate to bovine and canine serum albumin in vitro: the interaction with copper. *J.Inorg.Biochem.* 30, pp 261 - 272.
324. Yang, M. T. and Yang, S. P. 1989. Effect of molybdenum supplementation on hepatic trace elements and enzymes of female rats. *J.Nutr.* 119, pp 221 - 227.

325. Ytrehus, B., Skagemo, H., Stuve, G., Sivertsen, T., Handeland, K., and Vikoren, T. 1999. Osteoporosis, bone mineralization, and status of selected trace elements in two populations of moose calves in Norway. *J.Wildl.Dis.* 35, pp 204 - 211.
326. Yuzbasiyan-Gurkan, V., Blanton, S. H., Cao, Y., Ferguson, P., Li, J., Venta, P. J., and Brewer, G. J. 1997. Linkage of a microsatellite marker to the canine copper toxicosis locus in Bedlington terriers [see comments]. *Am.J.Vet.Res.* 58, pp 23 - 27.
327. Zer, H., Freedman, J. H., Peisach, J., and Chevion, M. 1991. Inverse correlation between resistance towards copper and towards the redox-cycling compound paraquat: a study in copper-tolerant hepatocytes in tissue culture. *Free Radic.Biol.Med.* 11, pp 9 - 16.
328. Zhao, M., Matter, K., Laissue, J. A., and Zimmermann, A. 1995. Copper/zinc and manganese superoxide dismutase immunoreactivity in hepatic iron overload diseases. *Histol.Histopathol.* 10, pp 925 - 935.

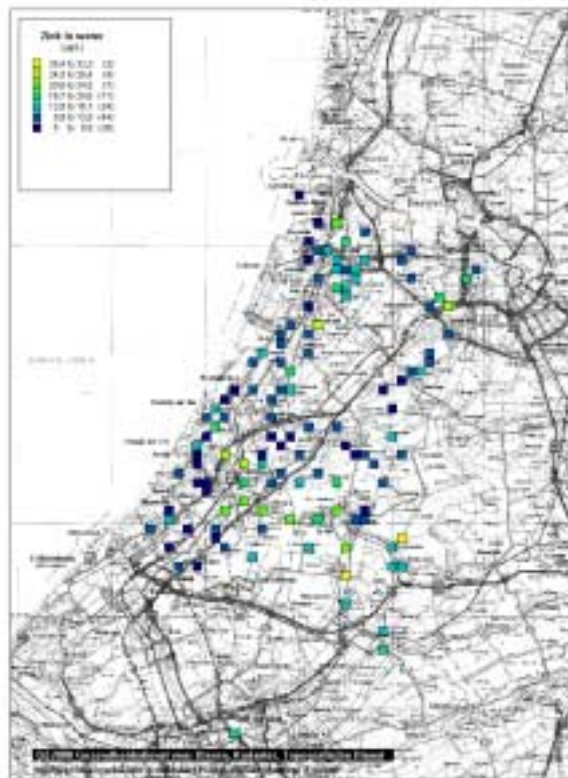
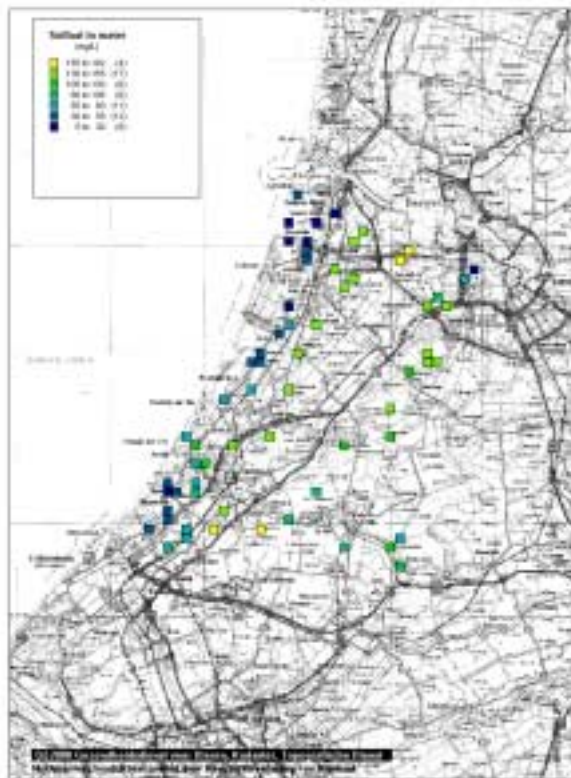
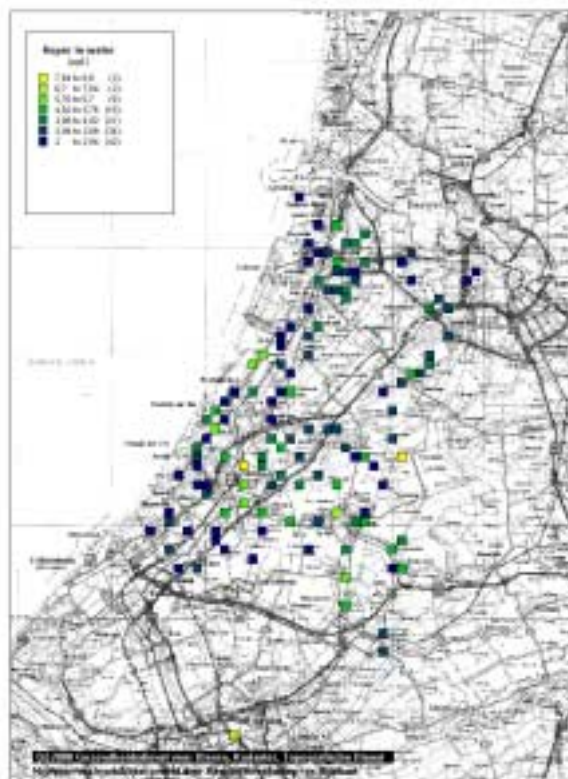
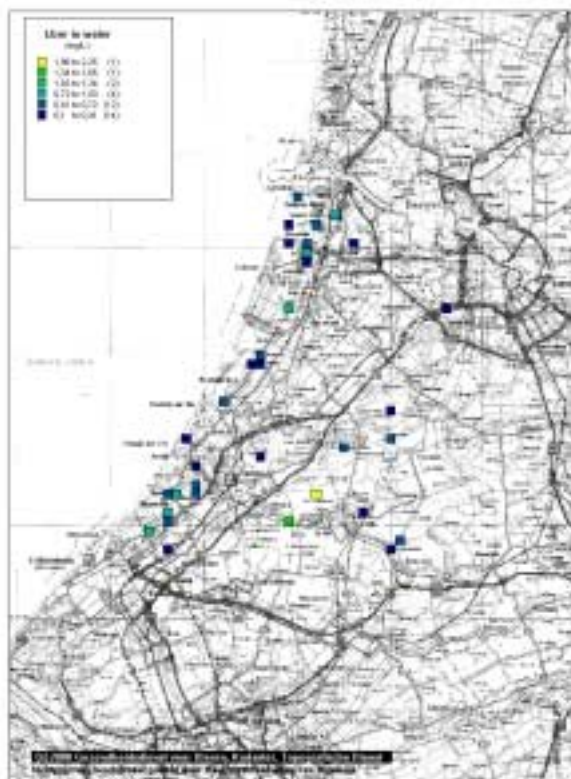
Bijlagen

Bijlage 1a Sulfaatgehalten in polderwater en boezemwater in West-Nederland

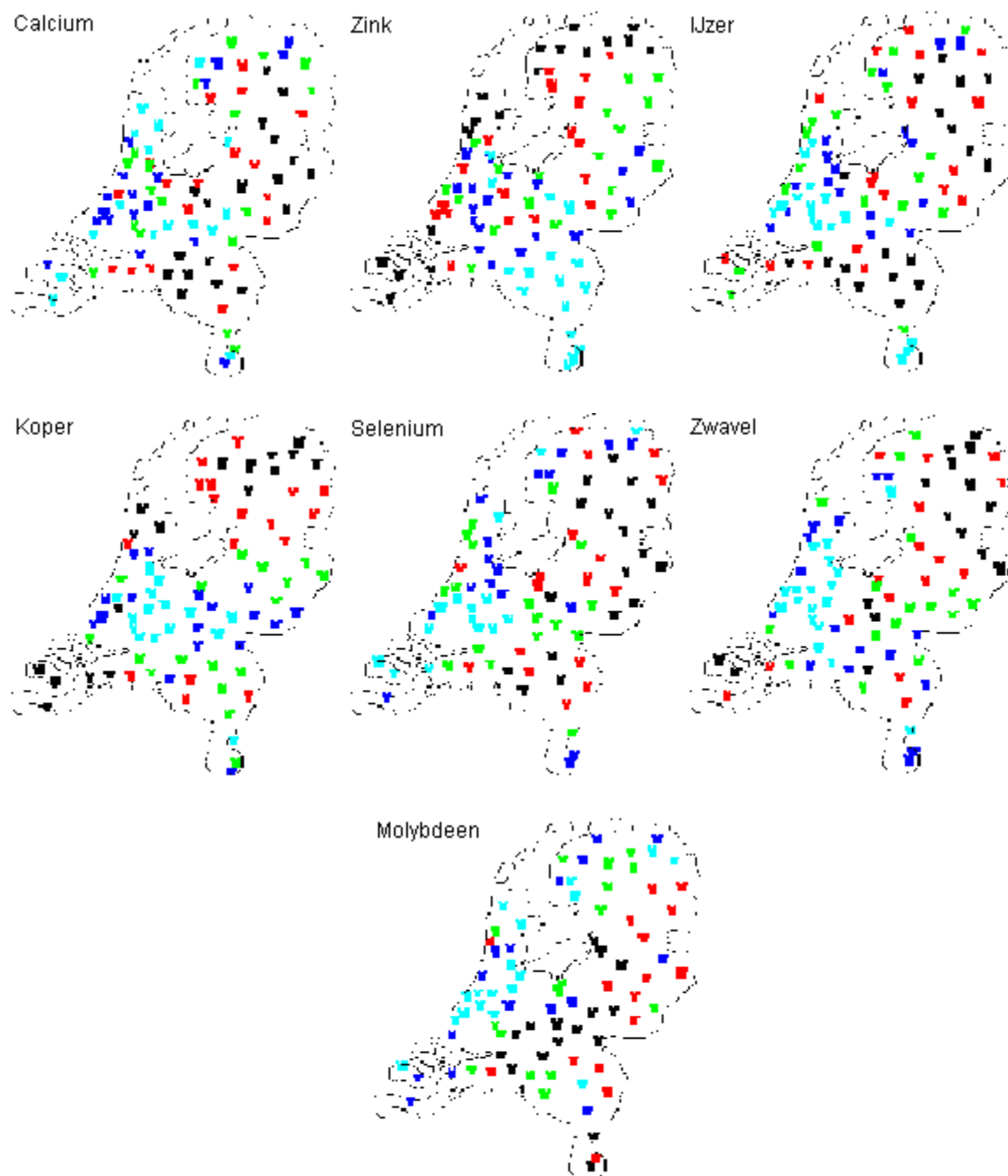


De voor deze grafiek gebruikte gegevens zijn afkomstig van het Hoogheemraadschap van Rijnland.

Bijlage 1b Gehalten aan ijzer, koper, sulfaat en zink in poldersloten in West-Nederland



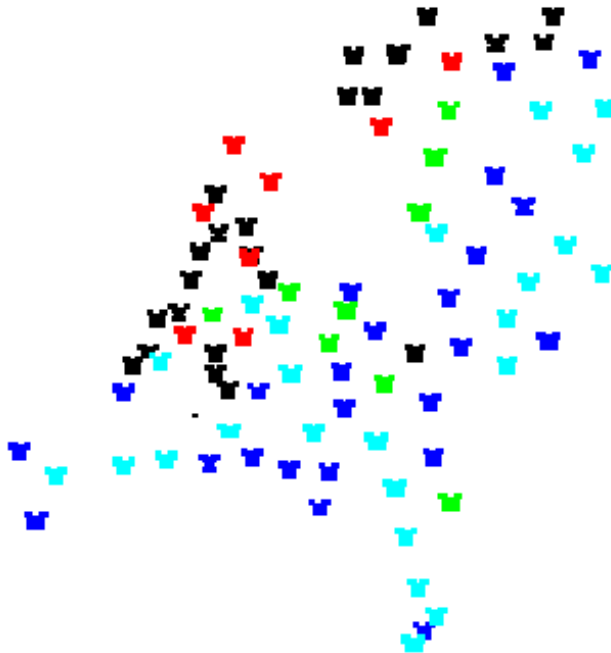
Bijlage 2a Regionale verdeling mineralengehalten in graskuilen (onderzoek Blgg 1996-1998)



Algemene legenda

	Ca		Cu		Zn		Fe		Se		S		Mo	
Omschrijving	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
Zeer laag gehalte	4.49	5.01	6.61	7.46	31.4	39.3	279	370	29.4	35.6	2.43	2.61	0.94	1.72
Laag gehalte	5.02	5.63	7.47	8.07	39.7	43.5	385	452	36.0	41.3	2.61	2.72	1.74	2.02
Gemiddeld gehalte	5.66	5.94	8.08	8.45	43.5	45.8	453	565	41.6	49.8	2.72	2.81	2.04	2.30
Hoog gehalte	5.94	6.14	8.48	9.14	45.9	49.9	566	657	51.2	63.8	2.81	3.02	2.35	2.59
Zeer hoog gehalte	6.17	7.19	9.17	10.68	51.4	62.2	660	799	63.8	82.1	3.02	3.40	2.60	3.50

Bijlage 2b Regionale verdeling percentage door Blgg onderzochte maïspartijen



Legenda

Omschrijving	percentage	
	Min	Max
Zeer gering aandeel maïs	0	17
Gering aandeel maïs	18	22
Gemiddeld aandeel maïs	23	27
Groot aandeel maïs	28	32
Zeer groot aandeel maïs	33	100

Bijlage 3 Regionale verdeling uitslagen bloedonderzoeken GD in 2000

