



Hochschule Neubrandenburg

Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften

Studiengang Food Chain Environments

## **Masterthesis**

zur Erlangung des akademischen Grades

„Master of Science (M.Sc.)“

# **Metagenomanalytik verschiedener Einstreumaterialien aus der Milchviehhaltung**

vorgelegt von

Karin Alena Krangemann

betreut von

Prof.in Dr.in Lisa Bachmann

Dr. Timo Homeier-Bachmann

Neubrandenburg, der 28.02.2025

urn:nbn:de:gbv:519-thesis-2024-0717-5

## Abstract

The future of bedding materials in dairy farming is evolving toward innovative solutions that enhance animal welfare. This study aimed to gather preliminary insights into the microbial risks of the relatively new compost bedding (CB). Specifically, it investigated differences in microbiome composition and the occurrence of antibiotic resistance genes among three bedding types: recycled manure (RM), straw with lime (SL), and CB.

Bedding samples (n=26) from German dairy farms underwent metagenomic sequencing (Illumina NovaSeq X Plus). Microbial composition was analyzed via Kraken2, evaluating dominant phyla,  $\alpha$ - and  $\beta$ - diversity indices, and key pathogens linked to mastitis and digital dermatitis. The resistome was characterized using AMR++ and MEGARes enabling the evaluation of 18 different classes of antibiotic resistance genes (ARGs).

The microbiome of all bedding materials was predominantly composed of the phyla *Pseudomonadota*, *Actinomycetota*, and *Bacillota*. CB showed significantly lower *Bacillota* ( $p = 0,038$ ) but higher *Bacteroidota* ( $p < 0,001$ ) abundances than RM and SL. Furthermore, CB was more diverse (Shannon index: 3,88) and had lower abundances of *Staphylococcus aureus* ( $p = 0,011$ ), *Streptococcus uberis* ( $p = 0,028$ ), and *Treponema* ( $p = 0,022$ ;  $p = 0,010$ ) species, whereas no significant differences in abundances were shown between RM and SL. Resistome analysis revealed RM had significantly higher abundances for Phenicol ( $p = 0,014$ ), Tetracycline ( $p = 0,005$ ), and Trimethoprim ( $p < 0,001$ ) ARGs compared to LS and CB. All bedding types showed high abundances for Aminoglycoside and Macrolides, Lincosamides and Streptogramins ARGs. CB samples displayed the lowest abundance of ARGs ( $p = 0,012$ ), suggesting effective reduction of ARGs through composting.

In conclusion, CB does not pose a higher microbial risk than RM and SL bedding in German dairy farms.

## Inhalt

<b>Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen .....</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>3</b>
<b>2 Stand der Wissenschaft.....</b>	<b>5</b>
2.1 Konventionelle Haltungssysteme und Einstreumaterialien .....	5
2.1.1 Stallhaltungssysteme in Deutschland .....	5
2.1.2 Konventionelle Einstreumaterialien für Liegeboxen .....	6
2.2 Kompostierungsmaterial als Alternative zu konventionellen Einstreumaterialien .....	8
2.2.1 Allgemeines Management von Kompostierungs-Laufstall-Systemen .....	8
2.2.2 Verschiedenes Komposteinstreumaterial und Ablauf des Kompostierungsprozesses .....	8
2.2.3 Kompostierungseinstreu und Tierwohl .....	10
2.3 Risiken der Einstreu in Milchviehbetrieben .....	11
2.3.1 Mikrobielle Risiken von Einstreu in Milchviehbetrieben.....	11
2.3.2 Einstreu als Reservoir für Mastitiserreger .....	12
2.3.3 Einstreu als Risikofaktor für Dermatitis digitalis.....	14
2.4 Antibiotikaresistenzen im Umfeld der Milchviehhaltung .....	16
2.4.1 Einsatz von Antibiotika in der Milchviehhaltung .....	16
2.4.2 Einstreu als Reservoir für Resistenzen.....	18
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>20</b>
3.1 Probenahme .....	20
3.2 DNA-Extraktion.....	21
3.3 Metagenomsequenzierung .....	22
3.4 Analyse der Metagenomdaten.....	22
3.4.1 Charakterisierung des Mikrobioms .....	22
3.4.2 Untersuchung des Resistoms .....	24
3.4.3 Statistisches Vorgehen .....	25

<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>26</b>
4.1 DNA Extraktion und Metagenomsequenzierung .....	26
4.2 Mikrobiom .....	26
4.2.1 Mikrobiom Charakterisierung auf Phylumebene .....	26
4.2.2 Diversitätsindizes: Analyse des Mikrobioms auf Familienebene.....	30
4.2.3 Vorkommen von pathogenen Spezies .....	31
4.3 Resistom .....	34
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>36</b>
5.1 Mikrobiom Ergebnisse.....	36
5.1.1 Vorkommen verschiedener Phyla im Mikrobiom der Einstreu .....	36
5.1.2 Diversität des Mikrobioms in der Einstreu .....	38
5.1.3 Vorkommen von mit Mastitis assoziierten Bakterienspezies und Gattungen .....	39
5.1.4 Vorkommen von mit DD assoziierten Bakterienspezies und Gattungen .....	40
5.2 Resistom Ergebnisse .....	42
5.3 Kritik der verwendeten Methoden.....	44
5.3.1 Probenahme und DNA-Extraktion .....	44
5.3.2 Anwendung der Metagenomsequenzierung zur Charakterisierung von Mikrobiom und Resistom .....	45
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>46</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>48</b>
<b>Verzeichnis der Abbildungen .....</b>	<b>58</b>
<b>Verzeichnis der Tabellen.....</b>	<b>58</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>59</b>
<b>Verzeichnis der Anlagen .....</b>	<b>60</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>63</b>



## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

16S	Untereinheit der Ribosomen mit 16 Svedberg Einheiten
AmpC	AmpC $\beta$ -Laktamase
ANOVA	Varianzanalyse (engl. analysis of variance)
ARG	Antibiotikaresistenzgen
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BLE	Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
bp	Basenpaare
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
BW	Baden-Württemberg
BY	Bayern
DD	Dermatitis digitalis
DLG	Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
ESBL	Extended spectrum $\beta$ -Laktamase
G	Gülfesubstrat
GI	Gastrointestinaltrakt
K	Kompostierung
kaP	Kationische antimikrobielle Peptide
KNS	Koagulase negative Staphylokokken
M	Misteinstreu
MLS	Makrolide, Lincosamide und Streptogramine
MV	Mecklenburg-Vorpommern
NMOE	Nicht Mist organische Einstreu
NRW	Nordrhein-Westfalen
OE	Organische Einstreu
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PraeRi	Prävalenzstudie zur Tiergesundheit, Hygiene und Biosicherheit in deutschen Milchkuhbetrieben
RMS	recyceltes Gülleseparat (engl. recycled manure solids)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure

S	Stroh ohne Kalk
SH	Schleswig-Holstein
SK	Gekalktes Stroh
SummeARG	Summe aller detektierten Resistenzgen-Abundanzen
TAMG	Tierarzneimittelgesetz
TAR	Tierarzneimittelabgabemengenregister
WHO	World Health Organisation

## 1 Einleitung

Die Milchviehhaltung steht heute vor vielfältigen Herausforderungen, die sowohl den ökonomischen Erfolg der Betriebe als auch das Tierwohl betreffen. Mit dem wachsenden wissenschaftlichen Verständnis für das Verhalten von Milchkühen und dem steigenden Druck von Verbraucherseite geraten konventionelle Haltungssysteme zunehmend in den Fokus der öffentlichen Wahrnehmung (Waldrop *et al.*, 2021). Zukünftig könnte dieser externe Druck Landwirt\*innen dazu veranlassen, alternative Haltungsformen in Betracht zu ziehen (Bewley *et al.*, 2017; Jambor *et al.*, 2022). Da der Stellenwert des Kuhkomforts für die Optimierung von Leistung, Gesundheit und Wohlbefinden erkannt wurde, gewinnen innovative Lösungen zur Verbesserung der Haltungsbedingungen laktierender Kühe immer mehr an Bedeutung (Bewley *et al.*, 2017).

In diesem Kontext gewinnt die Idee der Kompostiergeställe an Bedeutung. Kompostiergeställe werden mit Nebenprodukten wie Sägemehl oder Stroh eingestreut, die sich mit den Exkrementen der Tiere vermengen und einen kontinuierlichen Kompostierungsprozess durchlaufen (Janni *et al.*, 2007). Dadurch entsteht eine weiche und trockene Liegefläche, die den Tierkomfort verbessert, die Prävention von Lahmheiten fördert und den steigenden Anforderungen der Verbraucher an das Tierwohl gerecht werden kann (Prävalenzstudie zur Tiergesundheit, Hygiene und Biosicherheit in deutschen Milchkuhbetrieben (PraeRi), 2020). Der große Vorteil der Kompostierungseinstreu, dass das Material kontinuierlich einem Kompostierungsprozess unterliegt und daher als Teil einer nachhaltigen Kreislaufwirtschaft nach der Nutzung als Einstreu als Dünger weiterverwendet werden kann, birgt Risiken, die näher untersucht werden müssen (Kuipers *et al.*, 2022). Dazu gehört die Frage der mikrobiologischen Sicherheit. Der wiederholte Einsatz von antimikrobiellen Wirkstoffen in der Tierhaltung, auch wenn dieser in Deutschland strengen Regulierungen unterliegt, fördert die Weitergabe und Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen (ARG) (Arbeitsgruppe Antibiotikaresistenz des Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) und Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), 2024). Die nicht nur regional, sondern auch global fortschreitende Verbreitung von ARG birgt das Risiko, dass therapeutische Maßnahmen im Falle bakterieller Infektionen beim Mensch und Tier an Wirksamkeit verlieren (Antão und Wagner-Ahlf, 2018). Die Lebensmittelkette bildet eine Transmissionsroute für ARG tragende Bakterien, die aus der Umwelt und vom Stall ausgehend über Milchprodukte und Fleisch zum Menschen übertragen werden können (Bengtsson-Palme *et al.*, 2018). Resistente Bakterien wurden bereits in Einstreu und auch in der Tankmilch nachgewiesen (Badawy *et al.*, 2022; Wu, H. *et al.*, 2022). Das Risiko der Weitergabe von ARG oder ARG-tragenden Bakterien entlang der Lebensmittelkette muss minimiert werden und sollte bei der Verwendung neuartiger Einstreumaterialien evaluiert werden.



Ein weiteres Risiko, das zu erforschen ist, ist das Vorkommen pathogener Bakterienspezies. Zwei der häufigsten bakteriellen und kostenintensivsten Gesundheitsprobleme im Milchviehsektor sind Mastitis und Digital dermatitis. Durch sie wird die Milchproduktion, Tiergesundheit und Tierwohl erheblich beeinträchtigt, da sie mit Schmerzen, Stress und eingeschränkter Leistungsfähigkeit der Tiere einhergehen (Ruegg und Adkins, 2024). Sie verursachen zudem hohe wirtschaftliche Verluste durch Behandlungskosten, Produktionsausfälle und vorzeitige Abgänge (Liang *et al.*, 2017; Petersson-Wolfe *et al.*, 2018). Die mit diesen Krankheiten assoziierten pathogenen Bakterienspezies wurden bereits in Einstreu nachgewiesen, sodass ein direkter oder indirekter Einfluss der Einstreu auf die Prävalenz dieser Krankheiten vermutet werden kann (Rowbotham und Ruegg, 2016; Dias *et al.*, 2024).

Vor diesem Hintergrund zielt die vorliegende Arbeit darauf ab, das Mikrobiom und Resistom von Einstreumaterialien, sowohl konventioneller Materialien wie Mist, Gülleseparat oder gekalktes Stroh als Einstreu in Liegeboxen, als auch Kompostierungseinstreu in Tiefstreuställen, zu untersuchen. Dafür wurde DNA aus Einstreuproben von 26 Betrieben extrahiert und anschließend eine Metagenomsequenzierung (Illumina NovaSeq X Plus Sequenzer) angewandt. Die Sequenzdaten wurden durch bioinformatische Pipelines ausgewertet: Mithilfe der Kraken2-Pipeline wurde das Mikrobiom charakterisiert, während die Resistomanalyse unter Einsatz der AMR++ Pipeline und der MEGARes-Datenbank durchgeführt wurde. Zusätzlich wurde die Abundanz von Mastitis und DD assoziierten Spezies berechnet und die Diversität der Mikrobiome bestimmt.

Durch diese Herangehensweise sollen umfassende Einblicke in die Zusammensetzung und Diversität der mikrobiellen Gemeinschaften sowie in das Vorkommen von Antibiotikaresistenzgenen gewonnen werden. Die Ergebnisse sollen helfen, das mikrobielle Risiko der in Deutschland noch nicht lange angewandten Komposteinstreu besser einschätzen zu können.

## 2 Stand der Wissenschaft

### 2.1 Konventionelle Haltungssysteme und Einstreumaterialien

#### 2.1.1 Stallhaltungssysteme in Deutschland

Die Stallgestaltung befindet sich in einem kontinuierlichen Wandel, wobei sich im Laufe der letzten 100 Jahre verschiedene Stallsysteme, wie Anbindehaltung, Boxenlauf- und Tieflaufstall etabliert haben (Bewley *et al.*, 2017). In Deutschland ist die Laufstallhaltung mit 65% der Milchviehbetriebe das dominierende Haltungssystem. Allerdings werden 89% der in Deutschland lebenden Milchkühe in Laufställen gehalten, da Anbindeställe oft weniger Tiere pro Betrieb aufweisen (Statistisches Bundesamt, 2021; Tergast *et al.*, 2022).

Anbindehaltung wird auch heute noch in ganz Deutschland, vorrangig aber in Süddeutschland praktiziert (Tergast *et al.*, 2022; Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE), 2024). Häufig kommen die Kühe dabei im Sommer tagsüber auf die Weide und werden nachts angebunden. Im Winter bleiben sie ganztags auf ihren Plätzen. Der Vorteil von Anbindehaltung ist ein niedriger Platzbedarf und geringe Kosten pro Tier (Pelzer *et al.*, 2012; BLE, 2024). In Anbindeställen sind die sogenannten „Funktionsbereiche“ Fressen und Liegen für jedes Tier auf den Anbindeplatz begrenzt. Aufgrund fehlender Möglichkeiten zum Ausleben sozialer Interaktionen, eingeschränkter Bewegungsmöglichkeiten und gilt das Haltungssystem als nicht artgerecht und viele Anbindeställe wurden zu anderen Haltungssystemen wie den Boxenlaufställen umgebaut (Pelzer *et al.*, 2012; Bewley *et al.*, 2017; BLE, 2024).

Im Gegenteil zur Anbindehaltung, dürfen sich Kühe in Boxenlaufställen frei bewegen und können selbstständig zwischen den räumlich voneinander getrennten Funktionsbereichen Fressen, Trinken, Liegen und Bewegen entscheiden (Bewley *et al.*, 2017; BLE, 2024). Das hat unter anderem den Vorteil, dass die Einstreu auf den Liegeflächen nicht mit Exkrementen vermengt wird. Für die Liegeboxen sind zwei Typen sehr verbreitet: Hochboxen und Tiefboxen. Der Unterschied besteht darin, dass Hochboxen bis zu 20 cm höher als der Laufgang gebaut sind, während Tiefboxen Mulden sind, in denen verdichtete Einstreu eine Matratze bildet, welche mit weiterer Einstreu, einer sogenannten Verbrauchsschicht, ergänzt wird (Pelzer *et al.*, 2012; BLE, 2024).

Eine weitere Haltungsform, die bisher noch selten in Deutschland vertreten ist, ist der Tiefstreustall. In Tiefstreuställen werden Lauf- und Liegefläche kombiniert, sodass sich die Kühe frei bewegen und ablegen können. Tiefstreuställe sind eine geeignete Alternative für Gebäude ehemaliger Anbindeställe, in denen der Platz für den Bau eines Liegeboxenstalls nicht ausreicht. Allerdings muss das Einstreu in

Tiefstreuställen regelmäßig ergänzt werden, wodurch ein höherer Arbeitsaufwand entstehen kann, (Pelzer *et al.*, 2012; BLE, 2024).

Einstreu oder Matratzen haben sowohl in Hoch-, und Tiefboxen als auch in Haltungsplätze Anbindeställen und Tiefstreuställe die Funktion, den Kühen eine weiche und trockene Liegefläche zu bieten (Wolfe *et al.*, 2018). Es ist belegt, dass Kühe weiche Untergründe zum Liegen bevorzugen und sich dadurch die tägliche Liegezeit verlängert (Wolfe *et al.*, 2018). Weiterhin werden eingestreute Hochboxen besser angenommen als Hochboxen ohne Einstreu (PraeRi, 2020). So hat Einstreu insgesamt einen wichtigen Einfluss auf den Kuhkomfort. Zudem trägt trittsichere, weiche und gleichmäßig ausgebrachte Einstreu in Liegeboxen zu einer niedrigen Prävalenz von Lahmheit und Sprunggelenkläsionen bei (PraeRi, 2020).

Auch die Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft (DLG) e. V. empfiehlt das Einstreuen von Liegeboxen, sowohl Hoch- als auch Tiefboxen, mit weichem Material (Pelzer *et al.*, 2012). Weitere Anforderungen sind eine gute Verformbarkeit und feuchtigkeitsbindende Eigenschaften, die ein trockenes Liegen ermöglichen. Beispiele für häufig verwendete Materialien sind Stroh, sowie Mischungen daraus, wie Stroh-Mist oder Kalk-Stroh, Sand, Sägemehl und Güllesubstrat (Pelzer *et al.*, 2012). Folgend werden verschiedene Einstreumaterialien vorgestellt, welche sowohl in Hochboxen in kleiner Menge als auch in Tiefboxen als Matratze oder Verbrauchsschicht angewandt werden können.

#### 2.1.2 Konventionelle Einstreumaterialien für Liegeboxen

Rinder- oder Pferdemist können gut verwendet werden, um eine verdichtete Matratze zu bilden. Aufgrund des hohen Infektionsdrucks wird von der Verwendung von Kälbermist oder Mist aus Abkalbeställen abgeraten (Pelzer *et al.*, 2012). Weiterhin kann mit einer Stroh-, Kalk- und Wassermischung eingestreut werden. Der Kalk wird zur besseren Feuchtigkeitsbindung beigemischt und zur Keim- und Bakterienreduktion aufgrund des alkalischen pH-Werts (Schmidt, 2020; Sutter, 2020). Werden Stroh-Mist oder eine Stroh-Kalk-Mischung als Matratze in Hochboxen verwendet, kann anschließend Stroh oder Häckselstroh als Verbrauchsschicht gestreut werden. Das Stroh sollte dann wöchentlich nachgestreut werden. Die Verbrauchsschicht hat hier den Zweck, direkten Kontakt der Kühe mit dem Mist oder Stroh-Kalk-Gemisch zu vermeiden (Pelzer *et al.*, 2012; Sutter, 2020).

Sägemehl, Güllesubstrat und Sand können ebenfalls zum Einstreuen von Liegeboxen verwendet werden. Bei gutem Einstreumanagement nimmt Sägemehl ausreichend Flüssigkeit auf und bietet eine saubere und komfortable Liegefläche. Allerdings wird der Verbrauch an Sägemehl mit 8 – 13 m<sup>3</sup> je Box pro Jahr wesentlich höher geschätzt als bei anderen Materialien (Pelzer *et al.*, 2012; Dimov und Marinov, 2021). Noch höher ist der Verbrauch an Sand als Einstreumaterial mit bis zu 15 kg je Box

täglich. Sand findet vorallem in Amerika Anwendung, wo es durch ein Spülmistungssystem mittels Separatoren aus dem Flüssigmist wieder abgeschieden werden kann. Trotz hygienischen Vorteilen wird aus technischen Gründen den reinigungs- und Melkbetrieb betreffend vom Einsatz von Sand als Einstreu in Liegeboxen in Deutschland abgeraten (Pelzer *et al.*, 2012; Dimov und Marinov, 2021).

Zur Herstellung von Gülleseparat wird aus der Gülle mit 1-15% Trockenmasse die flüssige Phase abgeschieden, sodass ein frisches Gülleseparat mit 20-40% Trockenmasse entsteht. Der Trockenmassegehalt kann sich durch Trocknung direkt nach Ausbringung in Liegeboxen oder durch einen anschließenden Kompostierungsprozess auf 35-70% weiter erhöht werden (Fournel *et al.*, 2019; Sutter, 2020). Immer wieder wird dem Material ein hoher Tierkomfort nachgesagt, welcher allerdings in der Review Studie von Leach *et al.* (2015) als anekdotisch bewertet wird. Weiterhin schlussfolgern sie, dass es bisher nicht ausreichend Langzeitstudien zur Verwendung von Gülleseparat gibt (Leach *et al.*, 2015). Trotz der kleinen Studienlage, ist Gülleseparat aufgrund der sehr guten Verfügbarkeit und der Möglichkeit einer Kreislaufwirtschaft eine vermehrt angewandte Alternative zu Stroh, Mist, Sägespänen oder Sand (Pelzer *et al.*, 2012; Bewley *et al.*, 2017).

Die Wahl der Einstreu ist nicht nur von den bereits genannten Eigenschaften wie guter Feuchtigkeitsaufnahme und Verformbarkeit abhängig, sondern auch von Verfügbarkeit, Preis, Haltbarkeit und der hygienischen Unbedenklichkeit (Pelzer *et al.*, 2012; Dimov und Marinov, 2021). Besonders letztere birgt verschiedene Risiken, für die Tiergesundheit aber auch die Lebensmittelsicherheit entlang der Lebensmittelkette, die bei der Wahl des Einstreumaterials beachtet werden sollten. Durch den Kontakt des Euters und der Klauen und Beine der Kuh mit der Einstreu können diese Körperteile mit Krankheitserregern kontaminiert werden (Rowbotham und Ruegg, 2016; Dias *et al.*, 2024). Die Kontamination des Euters kann eine Mastitis verursachen und der Kontakt der Einstreu mit den Klauen und Beinen, kann eine Dermatitis digitalis begünstigen (Barberg *et al.*, 2007; Rowbotham und Ruegg, 2016; PraeRi, 2020; Dias *et al.*, 2024). Außerdem haben Studien zur Übertragung und Verbreitung von Antibiotikaresistenzen im Umfeld der Milchviehhaltung bereits einen Zusammenhang zum Einstreumaterial herstellen können (Badawy *et al.*, 2022; Wu, H. *et al.*, 2022). Diese Risiken werden in den nachfolgenden Punkten 2.2. und 2.3 näher betrachtet.

## **2.2 Kompostierungsmaterial als Alternative zu konventionellen Einstreumaterialien**

### 2.2.1 Allgemeines Management von Kompostierungs-Laufstall-Systemen

Kompostierungsställe unterscheiden sich nicht nur im verwendeten Material von konventionellen Liegeboxenställen, sondern auch im Haltungssystem. Anders als in herkömmlichen Liegeboxenställen haben Kühe in Kompostierungsställen, die zu dem Haltungssystem der Tieflaufställe gehören, eine offene Einstreufläche zum Liegen und Bewegen, anstelle von Liegeboxen und Laufgängen (Janni *et al.*, 2007; Leso *et al.*, 2020). Das bringt mit sich, dass sich Exkreme und Einstreu vermischen und Kühe über die Haut beim Liegen damit in Kontakt kommen. In Liegeboxenställen sind die Einstreu in den Liegeboxen von den Exkrementen räumlich getrennt. Als bauliche Anforderung wird empfohlen, Futter- und Wasserstellen von dem Kompostierungsbereich zu trennen, damit das Einstreumaterial nicht zu nass wird (Janni *et al.*, 2007). Zudem sollte der gesamte Stall eine gute Luftzirkulation aufweisen, damit feuchte Luft, die beim Kompostierungsprozess entsteht, regelmäßig abgeführt wird (Janni *et al.*, 2007). Ein wesentlicher Unterschied zu konventionellen Haltungssystemen ist die tägliche mehrfache Durchmischung des gesamten Einstreubereichs, sowie ein höherer Flächenbedarf pro Tier. Janni *et al.* (2007) empfehlen eine Mindestfläche von 7,4 m<sup>2</sup> pro Kuh (bei einer 540-kg-Holstein-Kuh), während Barberg *et al.* (2007a) eine durchschnittliche Fläche von 8,6 m<sup>2</sup>/Kuh berichten. In der Praxis werden häufig 9,0 m<sup>2</sup>/Kuh angewendet (Black *et al.* 2013). In einer Untersuchung von Hoy und Däumler (2019) wurde der Arbeitszeitaufwand zwischen einem Kompostierungs- und Tiefboxenlaufstall verglichen. Durch nur einmaliges Ausmisten pro Tag im Tiefboxen-Stall und dreimaliges Umgrubbern der Einstreu während den Melkzeiten im Kompostierungseinstreu konnte eine zwei bis dreifach erhöhter Arbeitsaufwand in letzterem Stallsystem festgestellt werden. Das entspricht einer Lohnerhöhung im Monat von etwa 231€ (Hoy und Däumler, 2019). Diese wirtschaftlichen Faktoren werden in dieser Arbeit nicht näher betrachtet, haben aber einen Einfluss auf die Wahl des Einstreumaterials.

### 2.2.2 Verschiedenes Komposteinstreumaterial und Ablauf des Kompostierungsprozesses

Für Kompostierungseinstreu werden überwiegend Hackschnitzel auf Holzbasis und Sägespäne verwendet (Janni *et al.*, 2007; Galama *et al.*, 2020; Leso *et al.*, 2020). Es wird angenommen, dass der hohe Ligningehalt in diesen Holzprodukten ein großes Oberflächen-Volumen-Verhältnis in der Einstreu begünstigt. Wichtig ist auch die gewählte Holzart, denn von Zedernholzprodukten wird aufgrund der antimikrobiellen Wirkung abgeraten. Dadurch wird der Kompostierungsprozess inhibiert und infolgedessen würde das Einstreu nass und kalt werden (Janni *et al.*, 2007). Es wird angenommen, dass der hohe Ligningehalt in diesen Holzprodukten ein großes Oberflächen-Volumen-Verhältnis in der

Einstreu begünstigt. Dadurch soll mehr Platz für Bakterienwachstum sein und das Material wird weniger schnell verdichtet (Janni *et al.*, 2007).

Das Beimischen von Häckselstroh und Maisstroh wird von Janni *et al.* (2007) ebenfalls nicht empfohlen. Shane *et al.* (2010) haben verschiedene Substrate wie Kieferhackschnitzel und Kiefern Sägemehl, gehackte Maiskolben und Sojabohnenstroh untersucht, mit dem Ergebnis, dass fast jedes organische Material verwendet werden kann, wenn das Einstreumanagement entsprechend angepasst wird.

Zum Management der Einstreu gehört auch, dass der Kompostierungsprozess in der Einstreu erfolgreich abläuft. Die Kompostierung ist ein aerober Prozess, bei dem komplexes organisches Material von Mikroorganismen zersetzt wird (Meena *et al.*, 2021). Der Kompostierungsprozess kann in 4 Phasen unterteilt werden. Die erste Phase, die mesophilen Phase, umfasst einen Zeitraum von 2 bis 8 Tagen. Dabei werden lösliche organische Stoffe von mesophilen Mikroorganismen zersetzt. Die bei diesem Prozess entstehende Wärme erhitzt das Material auf etwa 45°C und setzt organische Säuren frei, die den pH-Wert auf 4- 4,5 senken können (Meena *et al.*, 2021). Die zweite Phase beginnt, wenn die Temperaturen über 45°C steigen. Sie wird auch thermophile Phase genannt, da hier die thermophilen Bakterien mesophile Bakterien ablösen. In dieser Phase wird Ammoniak frei, der den pH-Wert wieder erhöht und komplexe organische Stoffe wie Zellulose, Lignin und Wachse werden zersetzt. Dabei werden Temperaturen von etwa 60°C erreicht. Die Phase wird auch Hygienisierungsphase genannt, da angenommen wird, dass bei den Temperaturen unerwünschte mikrobiologische Verunreinigungen wie pathogene Bakterienarten, Eier von Helminthen und auch Unkrautsamen abgetötet werden (Meena *et al.*, 2021). Die Effektivität der Hygienisierung während des Kompostierungsprozesses ist entscheidend für die mikrobiologische Sicherheit der Einstreu. Eine Studie von Eckelkamp *et al.* (2016) ergab, dass das Wachstum von Staphylokokken, Streptokokken und Bacillus-Spezies durch den Kompostierungsprozess gehemmt werden kann, während coliforme Bakterien begünstigt werden (Eckelkamp *et al.*, 2016; Biasato *et al.*, 2019). Allerdings sind die vorhandenen Studien zur Kompostierung von Einstreu begrenzt, während sich mehr Forschung mit der Kompostierung und dem Recycling von Gülle für die Verwendung als Einstreu beschäftigt. So wurde eine Vermehrung von *K. pneumoniae* in kompostierter Gülle nachgewiesen (Godden *et al.*, 2008). Dahingegen ergab eine Studie von Zhang *et al.* (2020) jedoch, dass nach der Kompostierung eines Stroh-Gülle-Gemisches *Salmonella*, *Shigella*, *S. aureus* und *E. coli* nicht mehr nachweisbar waren. Die dominierenden Bakteriengattungen nach der Kompostierung waren *Clostridium* und *Flavobacterium*. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Bakterien der Gattungen *Pseudomonas* und *Acinetobacter* während der Hygienisierungsphase erfolgreich eliminiert wurden (Zhang *et al.*, 2020).

Nach dem Verbrauch der wichtigsten Stickstoff- und Kohlenstoffquellen in der thermophilen Phase folgt eine zweite mesophile Phase, in der die Temperaturen wieder auf 40-45°C absinken. Der pH-Wert bleibt alkalisch und mesophile Bakterien kehren zurück, um die Zersetzung von Polymeren, wie Zellulose, fortzusetzen. Diese Phase kann mehrere Wochen dauern (Meena *et al.*, 2021). Zuletzt sinkt die Temperatur auf 20-30°C und es kommt zur Reifungsphase. Hier entstehen Inhaltsstoffe, die qualitätsbestimmend sind, um Kompostierungsmaterial als Düngemittel zu verwenden. Für den Einsatz als Einstreumaterial ist diese Phase nicht relevant (Meena *et al.*, 2021).

Durch die maßgebliche Beteiligung der Mikroorganismen am Kompostierungsprozess sind für den Erfolg vor allem die Faktoren wichtig, die das Wachstum und die Reproduktion dieser Mikroorganismen beeinflussen. Dazu gehören Belüftung, Temperatur, pH-Wert und Feuchtigkeit des Substrats (Bewley *et al.*, 2017; Meena *et al.*, 2021). Feuchtigkeit wird über Urin, flüssigen Anteil des Kots und mikrobiologische Prozesse in der Einstreu freigesetzt. Ein Feuchtigkeitsgehalt zwischen 40% und 65% wird im Allgemeinen für die Kompostierung empfohlen und kann durch regelmäßiges Umgraben oder Belüften entsprechend reguliert werden (Janni *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2019). Feuchte Einstreu, die beim Aufstehen an den Kühen haften bleibt, ist außerdem ein Indikator, dass neues Material ausgebracht werden sollte. Da es sich bei der Kompostierung um einen aeroben Prozess handelt, muss das Einstreumaterial täglich belüftet werden. Für die Belüftung existieren verschiedene Methoden, etwa das Umgraben mit einem Traktor oder Rohrleitungen, die in den Boden verbaut werden (Kuipers *et al.*, 2022). Zhang *et al.* (2019) empfehlen eine Belüftungsrate von 0,5-1,0 L/min/kg Kompost. Das Umgraben hilft dabei, Kot und Urin in das Material einzubringen und immer neue Teile der Einstreu an die Oberfläche zu bringen (Janni *et al.*, 2007; Galama *et al.*, 2020). Durch die Belüftung wird die mikrobielle Aktivität gefördert, woraufhin sich die Einstreu erwärmt und enthaltene Flüssigkeit verdampft (Bewley *et al.*, 2017). Das Ergebnis ist trockene lockere Einstreu, welche 6 bis 12 Monate lang Gülle aufnehmen kann, bis ein Austausch der Einstreu erforderlich wird. Anschließend kann die trockene Kompostierungseinstreu direkt als Dünger genutzt werden (Janni *et al.*, 2007).

### 2.2.3 Kompostierungseinstreu und Tierwohl

Seit der Einführung von Kompostierungsställen in den USA in den 1980er-Jahren mit dem Ziel, den Kuhkomfort durch ein neues Einstreumaterial zu verbessern, hat sich das Interesse an dieser Haltungform weltweit verstärkt. Laut der Landwirtschaftszählung von 2020 halten in Deutschland etwa 7.000 Betriebe ihre Milchkühe in einem Tiefstreu-Laufstall, wozu je nach verwendetem Einstreumaterial auch Kompostierungsställe gehören (Statistisches Bundesamt, 2021). Mit dem wachsenden Interesse an dieser Haltungform kommen auch Fragen zu Risiken und Vorteilen dieser neuen Einstreuart auf.



Ein häufig diskutierter Vorteil ist die positive Wirkung auf den Tierkomfort und damit das Tierwohl. Studien belegen, dass Kühe weiche und trockene Untergründe bevorzugen (Wolfe *et al.*, 2018; PraeRi, 2020). Einige Studien haben bereits längere Liegezeiten mit dem Einsatz von Kompostierungsmaterial in Verbindung bringen können (Black *et al.*, 2013; Eckelkamp *et al.*, 2016). Black *et al.* (2013) stellt zudem die These auf, dass die Erholung von verletzungsbedingten und durch unsachgemäße Stallgestaltung bedingten Störungen im Bewegungsablauf in Kompostierungsställen erleichtert wird, da die Kühe dort längere Liegezeiten aufweisen – sowohl gesunde Tiere (3-4 h/Tag mehr) als auch bereits als lahm eingestufte Kühe (5 h/Tag mehr) (Black *et al.*, 2013; Eckelkamp *et al.*, 2014). Zudem belegen Studien, dass in Kompostierungsställen seltener Knie- und Sprunggelenkläsionen auftreten (< 1%) als in Ställen mit Sägespänen und Sand (6,4-7,4%) (Costa *et al.*, 2018). Biasato *et al.* (2019) stellten zudem eine geringere Verschmutzung der Hinterbeine, ein verbessertes Gangbild sowie weniger stressbedingte Gesichtsausdrücke bei Kühen in Kompostierungsställen fest. Weitere Studien berichten von einer niedrigeren Prävalenz von Lahmheiten im Vergleich zu Boxenlaufställen (Black *et al.*, 2013; Guhl *et al.*, 2024b, 2024a).

Konsument\*innen ist das Tierwohl von Milchkühen wichtig. Kompostierungsställe werden von europäischen Verbrauchern mit höherem Tierwohl assoziiert, wodurch die Haltungsform als Marketingstrategie angewandt werden kann (Waldrop und Roosen, 2021). Die positiven Auswirkungen von Kompostierungsställen auf das Tierwohl sowie ihre Wahrnehmung durch Verbraucher machen sie zu einer vermarktungsfähigen Alternative in der Milchviehhaltung.

## **2.3 Risiken der Einstreu in Milchviehbetrieben**

### **2.3.1 Mikrobielle Risiken von Einstreu in Milchviehbetrieben**

Die Wahl der Einstreu ist nicht nur von den bereits genannten Eigenschaften wie guter Feuchtigkeitsaufnahme und Verformbarkeit abhängig, sondern auch von Verfügbarkeit, Preis, Haltbarkeit und der hygienischen Unbedenklichkeit (Pelzer *et al.*, 2012; Dimov und Marinov, 2021). Besonders letztere birgt verschiedene Risiken, für die Tiergesundheit aber auch die Lebensmittelsicherheit entlang der Lebensmittelkette, bis zum Verbraucher. So ist es möglich, dass Milch aus Kompostierungsbetrieben von Molkereien aufgrund der Angst vor einer zu hohen Keimbelastung, nicht angenommen wird (Sutter, 2020).

Einstreu bietet, abhängig von den physikalischen und chemischen Eigenschaften, ein gutes Nährsubstrat für Bakterien (Godden *et al.*, 2008). Das Wachstum begünstigende Faktoren sind dabei Feuchtigkeit, eine konstante Temperatur und genügend Nährstoffe im Einstreumaterial (Robles *et al.*,



2020). Insbesondere organische Einstreu zeigt hohe Bakterien-Zellzahlen (Alanis *et al.*, 2021). In verschiedenen Einstreumaterialien konnten bereits mit Mastitis und Digital dermatitis assoziierte Bakterien, wie *S. aureus*, *S. uberis* und *T. phagedenis* nachgewiesen werden (Zinicola *et al.*, 2015; Rowbotham und Ruegg, 2015; Ray *et al.*, 2015; Klitgaard *et al.*, 2017). Durch den Kontakt des Euters und der Klauen und Beine der Kuh mit der Einstreu können diese Körperteile mit pathogenen Bakterien kontaminiert werden (Rowbotham und Ruegg, 2016; Dias *et al.*, 2024). Die Kontamination des Euters kann eine Mastitis verursachen und der Kontakt der Einstreu mit den Klauen und Beinen, kann eine Dermatitis digitalis begünstigen (Barberg *et al.*, 2007; Rowbotham und Ruegg, 2016; PraeRi, 2020; Dias *et al.*, 2024).

Zudem haben Studien einen Zusammenhang zwischen der Verwendung bestimmter Einstreumaterialien und der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Milchviehhaltung nachgewiesen (Badawy *et al.*, 2022; Wu, H. *et al.*, 2022). Einstreu in der Nutztierhaltung kann durch hohe Bakteriendichten und den wiederholten Einsatz von Antibiotika günstige Bedingungen für die Selektion und Ausbreitung resistenter Gene schaffen. In Rohmilch aus Milchtankstellen wurden bereits ARG nachgewiesen, was auf eine potenzielle Übertragung von ARG vom Stallumfeld zum Verbraucher hinweist (Bavendamm, 2024).

Diese mikrobiellen Risiken werden in den nachfolgenden Punkten 2.3.2, 2.3.3 und 2.4 detaillierter beschrieben, wobei auch die Risiken verschiedener Einstreumaterialien verglichen und deren spezifische Bedeutung im Kontext dieser Risiken evaluiert wird.

### 2.3.2 Einstreu als Reservoir für Mastitiserreger

Bovine Mastitis wird definiert als eine intramammäre Infektion bei Rindern, die durch verschiedene bakterielle Erreger und eine Kombination aus wirtsbedingten sowie umweltbedingten Faktoren verursacht wird (Klaas und Zadoks, 2018). Mastitis ist auch heute noch eine weit verbreitete Herausforderung in der Milchviehhaltung in Deutschland. Die in der PraeRi- Studie (2020) ermittelten Prävalenzwerte zeigen, dass klinische Mastitis in deutschen Milchviehbetrieben je nach Region und Schweregrad unterschiedlich häufig auftritt. Mastitisfälle ohne Allgemeinbeeinträchtigung traten durchschnittlich bei 14,3–22,6 % der Tiere auf, während schwerere Fälle mit nur etwa 5 % seltener waren. Es bestehen große Unterschiede zwischen den besten und schlechtesten Betrieben, wobei letztere teils Prävalenzen von über 50 % aufweisen (PraeRi, 2020).

Diese Schwankungen in der Prävalenz deuten darauf hin, dass die Übertragung der Erreger eine zentrale Rolle spielt. Je nachdem, wie die Mastitiserreger übertragen werden, können sie als „direkt übertragbar“ oder „umweltassoziiert“ klassifiziert werden (Ruegg und Adkins, 2024). Direkt

übertragbare Erreger, wie *Staphylococcus (S.) aureus* verbreiten sich durch direkten Kontakt der Zitzen gesunder Kühe mit Bakterien aus den Eutern infizierter Tiere. Im Gegensatz dazu werden umweltassoziierte Erreger, wie *Escherichia (E.) coli* oder *Klebsiella (K.)* spp., über kontaminierte Flächen und Reservoirs im Stallumfeld übertragen. Diese Klassifikationen sind nicht absolut, da es viele verschiedene Übertragungswege gibt und einige Bakterien, wie *Streptococcus (S.) uberis* und *S. dysgalactiae*, auch auf mehreren verschiedenen Wegen übertragen werden können (Patel *et al.*, 2019; Ruegg und Adkins, 2024). Schmenger und Krömker (2020) haben in ihrer Studie die wichtigsten Mastitiserreger in Deutschland identifiziert: Am häufigsten haben *S. uberis* (20,2%), coliforme Bakterien (11,6%), koagulase negative Staphylokokken (KNS) (6%), *S. aureus* (3,7%) und *S. dysgalactiae* (3,0%) eine Mastitis verursacht, wobei Infektionen mit coliformen Bakterien am häufigsten schwere Verläufe zeigten (Schmenger und Krömker, 2020).

Die Prävention von Mastitis erfordert daher gezielte Maßnahmen. Handlungsempfehlungen zielen unter anderem auf die Eutergesundheit und -hygiene ab. Diese werden durch die Melkhygiene des Betriebs aber auch von der Sauberkeit der Liegeflächen beeinflusst (PraeRi, 2020). Durch fäkale Kontaminationen gelangen umweltassoziierte Erreger in die Einstreu auf den Liegeflächen, welche dann als Nährboden dient und so ein Reservoir für Mastitiserreger schafft (Klaas und Zadoks, 2018; Ray *et al.*, 2022). Organische Einstreumaterialien wie Gülleseparat zeigen in verschiedenen Studien eine höhere bakterielle Belastung im Vergleich zu anderer, nicht auf Exkrementen basierender, organischer Einstreu oder anorganischer Einstreu wie Sand (Patel *et al.*, 2019; Alanis *et al.*, 2021). Diese Unterschiede können nach Godden *et al.* (2008) durch die unterschiedlichen physikalischen und biochemischen Eigenschaften des Einstreumaterials auftreten. So haben ein hoher pH-Wert und ein hoher Kohlenstoffgehalt das Wachstum des Mastitiserregers *K. pneumoniae* begünstigt (Godden *et al.*, 2008). Auch zeigt eine Studie von Alanis *et al.* (2021), dass Einstreu mit höherem Trockenmassegehalt geringeres Bakterienwachstum zeigt. Allerdings konnten sie keine Verbindung zwischen pH-Wert, Bakterienbelastung und Milchqualität feststellen. Das ist möglicherweise auf große Schwankungen innerhalb und zwischen der Einstreuproben zurückzuführen (Alanis *et al.*, 2021).

Trotz dieser Erkenntnisse bleibt die genaue Rolle des Einstreumaterials in der Mastitisprävention unklar. Nach Rowe *et al.* (2019) hat, je nach Einstreumaterial, ein höheres Bakterienaufkommen in der Einstreu die Prävalenz von Umweltmastitis erhöht. Dieser Zusammenhang wurde allerdings nur bei Stroh und Sand gefunden und konnte für recyceltes Stroh nicht hergestellt werden (Rowe *et al.*, 2019). In einer Studie von Rowbotham und Ruegg (2016) wurde eine signifikante Korrelation des Bakterienvorkommens in der Einstreu mit der Bakterienzahl auf den Zitzen der Kühe festgestellt. Allerdings konnte kein direkter Zusammenhang zwischen der Inzidenzrate von Mastitis und der

Einstreuart hergestellt werden. Weiterhin vermuten sie, dass unterschiedliche Arten von Einstreu im Stall zu verschiedenen Zusammensetzungen von Mastitiserregern führen können. Diese Unterschiede in der Erregerverteilung könnten beeinflussen, welche spezifischen Bakterienarten klinische Mastitis auslösen. Damit hat das Einstreumaterial möglicherweise einen indirekten Einfluss darauf, welche Mastitiserreger in einem Betrieb dominieren, selbst wenn die generelle Häufigkeit der Mastitisfälle dadurch nicht unbedingt verändert wird (Rowbotham und Ruegg, 2016).

Ein direkter Zusammenhang zwischen der Bakterienkonzentration in der Einstreu und der Eutergesundheit wurde in mehreren Studien untersucht. Patel *et al.* (2019) stellten einen Zusammenhang zwischen der Bakterienzahl von *Klebsiella* spp., coliformen Bakterien, *Staphylococcus* spp. und „Streptococcus-ähnlichen Bakterien“ in der Einstreu und der Eutergesundheit fest. Dennoch ergaben einige Studien, dass eine hohe Bakterienzellzahl in Komposteinstreu keinen Einfluss auf die somatische Zellzahl der Milch oder die Mastitis-Prävalenz hatte (Barberg *et al.*, 2007; Black *et al.*, 2013; Eckelkamp *et al.*, 2016; Leso *et al.*, 2020). Barberg *et al.* (2007) beobachteten sogar eine niedrigere Mastitis-Prävalenz nach einem Wechsel zu Kompostierungseinstreu. Auch die Milchqualität wurde in verschiedenen Studien untersucht. So zeigte Käse aus der Milch von Kühen in Kompostierungsställen eine niedrigere somatische Zellzahl und eine geringere Gesamtbakterienzahl als Käse aus Milch konventionell gehaltener Kühe (Biasato *et al.*, 2019). Eckelkamp *et al.* (2016) fanden keine signifikanten Unterschiede in der somatischen Zellzahl und der Inzidenz klinischer Mastitis zwischen Kühen, die in Sand- oder Kompostierungsställen gehalten wurden. Demgegenüber berichteten Emanuelson *et al.*, (2022) von einer etwas schlechteren Eutergesundheit in Kompostierungsställen im Vergleich zu anderen Haltungssystemen. Die Unterschiede waren jedoch relativ gering (Emanuelson *et al.*, 2022).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein Zusammenhang zwischen Einstreu und der Prävalenz von Umweltmastitis, vorallem auf Grundlage der Bakterienzellzahl, besteht. Es bleibt unklar, ob die Prävalenz von Umweltmastitis direkt von der Wahl des Einstreumaterials beeinflusst wird, was weitere Untersuchungen notwendig macht.

### 2.3.3 Einstreu als Risikofaktor für Dermatitis digitalis

Dermatitis digitalis (DD) ist eine polymikrobielle, infektiöse Hautläsion im Zwischenklauenbereich von Rindern, die häufig mit Lahmheit einhergeht (Bell *et al.*, 2024). Zu den am häufigsten aus DD-Wunden isolierten Erregern zählen *Treponema* (*T.*) -Arten wie *T. phagedenis*, *T. medium*, *T. pedis* und *T. denticola* (Beninger *et al.*, 2018; Caddey *et al.*, 2021). Weitere relevante Mikroorganismen wie *Mycoplasma*, *Porphyromonas* und *Fusobacterium* (*F.*) werden ebenfalls mit DD in Verbindung gebracht (Nielsen *et al.*, 2016; Caddey und De Buck, 2021). Studien zum Hautmikrobiom erkrankter Kühe legen

nahe, dass *Treponema*-Arten Hauptpathogene sind (Nielsen *et al.*, 2016). Spezies wie *M. fermentans*, *F. necrophorum* und *P. levii* wurden sowohl im Mikrobiom gesunder als auch erkrankter Tiere gefunden (Nielsen *et al.*, 2016). Die Rolle dieser Spezies in der Ätiologie von DD ist noch nicht abschließend geklärt (Nielsen *et al.*, 2016).

In Deutschland liegt die Lahmheitsprävalenz in Betrieben mit Boxenlaufstallhaltung bei etwa 24–25 % in Nord- und Süddeutschland, während sie in Ostdeutschland mit 41 % deutlich höher ausfällt (PraeRi, 2020). Dieser regionale Unterschied wird unter anderem mit mehr Möglichkeiten zum Weidegang im Norden und Süden erklärt (PraeRi, 2020). Neben Weidegang identifiziert die PraeRi-Studie (2020) auch eine Haltung mit Tief- und Hochtiefboxen als möglichen Schutzfaktor, da hier drei mal weniger Veränderungen an den Sprunggelenken beobachtet wurden als in Betrieben mit Hochboxen. Als Hochtiefbox (oder hochverlegte Tiefbox) wird dabei eine kombinierte Zwischenform der Hoch- und Tiefbox verstanden, bei der die Hochbox in der Höhe reduziert wird (Pelzer *et al.*, 2012). Die Tief- und Hochtiefboxen sollen den Liegekomfort erhöhen, das Risiko für Sprunggelenkläsionen senken sowie die Liegezeit generell verlängern, was wiederum die Klauengesundheit fördert (PraeRi, 2020). Sowohl bei Betrieben, die ihre Kühe ausschließlich auf der Weide halten als auch bei Betrieben, die Stroh einstreuen wurden nur sehr wenig (<1%) schwerwiegende Verletzungen an den Sprunggelenken detektiert (PraeRi, 2020). Weitere Studien belegen, dass weiche Einstreumaterialien in Liegeboxen zu einer signifikant niedrigeren Lahmheitsrate führen (Kara *et al.*, 2011; PraeRi, 2020).

Die Ausbildung von Läsionen ist ein zentraler Faktor für die Persistenz von DD in Herden. Läsionen weisen hohe Bakterienbelastungen auf und Kühe mit fortgeschrittenen Läsionen tragen stärker zur Krankheitsausbreitung bei als solche mit frühen Stadien (Corlevic und Beggs, 2022; Dias *et al.*, 2024). Einige mit DD assoziierte Bakterien wurden bereits auf der Euterhaut, der Sprunggelenkshaut und auch in kleinen Mengen im Speichel gefunden (Dias *et al.*, 2024). Auch Urin und Gülle wurden untersucht und die Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese keine Hauptquellen für DD-assoziierte Bakterien sind. Anders haben es Zinicola *et al.* (2015) in ihrer Studie festgestellt: Hier wurden sowohl im Darmmikrobiom als auch in der Gülle DD-assoziierte Bakterien detektiert. Daher wird das Darmmikrobiom als weiterer Ort für ein Reservoir vermutet (Zinicola *et al.*, 2015a).

Die Rolle des Einstreu-Mikrobioms in der Übertragung von DD oder als Reservoir für DD-assoziierte Bakterien ist umstritten und die Studienlage dazu begrenzt. Dias *et al.* (2024) konnten bereits DD-assoziierte Bakterien in Einstreuproben nachweisen, allerdings nicht in Exkrementen (Dias *et al.*, 2024). Die Ergebnisse der PraeRi-Studie (2020) sprechen für eine untergeordnete Rolle der Einstreu. Sie beziehen sich dabei auf die Hygiene und Sauberkeit, welche die Beinhygiene beeinflusst. Stark verschmutzte Beine, die nicht durch Weidegang zu erklären waren, stehen im Zusammenhang mit

einer höheren DD-Prävalenz. Dieser Zusammenhang wird allerdings in der Studie als weniger wichtiger Risikofaktor eingeordnet. Auch Evans *et al.* (2012) vermuten, dass bei schlechtem Einstreumanagement die Feuchtigkeit in der Einstreu die Haut der Klauen schwächen und so das Risiko für Läsionen erhöht. Diese Bedingungen könnten das Eindringen von Bakterien erleichtern und die Heilung von Mikrotraumata verlangsamen (Evans *et al.*, 2012). Bell *et al.* (2023) untersuchten das Überleben von *Treponema*-Arten unter verschiedenen Umweltbedingungen und in verschiedenen Einstreumaterialien. Während *T. phagedenis* in Sand über die gesamte Dauer des Versuchs, sieben Tage lang, überlebten und in Gülleseparat fünf Tage lang nachweisbar waren, war die Überlebensdauer in Stroh auf lediglich 15 Minuten begrenzt. Die Zugabe von Kalk (5%) zu Sand reduzierte die Überlebenszeit ebenfalls auf 15 Minuten, was eine potenzielle Strategie zur Verbesserung der Hygienisierung von Einstreu darstellt (Bell *et al.*, 2023). Ihre Studie zeigt auch, dass die untersuchte Spezies *T. medium* nur in frisch abgeschiedenem Kot (bis zu 15 Minuten) lebensfähig ist. Unter diesen Bedingungen kann *T. medium* etwa 24 Stunden überleben. Ebenso konnte *T. phagedenis* durch Inkubation frischer Exkreme bei 45°C und 60°C reduziert werden (Bell *et al.*, 2023). Bell *et al.* (2023) schlussfolgern, dass diese begrenzte Überlebenszeit durch die aeroben Bedingungen und nicht die Faeces als Matrix verursacht wird. Je nach Management der Einstreu könnte auch diese kurze Zeit schon ausreichen für eine Übertragung der *Treponema* im Stallumfeld (Bell *et al.*, 2023). Weitere Forschung ist erforderlich, um den genauen Zusammenhang zwischen dem Mikrobiom der Einstreu und der Entstehung von DD zu klären.

## **2.4 Antibiotikaresistenzen im Umfeld der Milchviehhaltung**

### 2.4.1 Einsatz von Antibiotika in der Milchviehhaltung

Der Einsatz von Antibiotika, die das Wachstum von Mikroorganismen entweder reversibel (bakteriostatisch) oder irreversibel hemmen (bakterizid), stellt eine wichtige Therapiemöglichkeit für Mastitis- oder DD-Erkrankungen bei Milchkühen dar (Suerbaum *et al.*, 2020; Lardé *et al.*, 2021). Im Allgemeinen werden antimikrobielle Mittel nur zur Behandlung einzelner Tiere oder, bei klinisch bestätigten Krankheiten einer kleineren Anzahl von Tieren, als metaphylaktisches Mittel in Gruppen und Herden eingesetzt (Woolhouse *et al.*, 2015). Der prophylaktische Einsatz und der Einsatz als wachstumsförderndes Mittel sind in Deutschland untersagt (Aarestrup, 2005; Bundestierärztekammer, 2015).

Dabei gibt es eine Vielzahl verschiedener Antibiotika, die für den Einsatz in der Tierwirtschaft nur begrenzt zugelassen sind, mit unterschiedlichen Wirkmechanismen:  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, wie

Penicilline, unterbinden die Zellwandbiosynthese, indem sie die Transpeptidase hemmen, die für die Quervernetzung der Mureinstränge verantwortlich ist. Das Fehlen einer stabilen Zellwand führt dazu, dass die Zelle lysiert und abstirbt. Neben den Penicillinen zählen auch Cephalosporine wie Cefoxitin und Cefotaxim sowie die Carbapeneme zu dieser Antibiotikagruppe. Auch Fosfomycin greift in die Zellwandsynthese ein, indem es die Bildung von Peptidoglycan stört (Ito *et al.*, 2017; Suerbaum *et al.*, 2020). wie Tetracycline, Aminoglykoside und Makrolide inhibieren die bakterielle Proteinbiosynthese. Tetracycline verhindern die Anlagerung der tRNA an die 30S-Untereinheit der Ribosomen, während Aminoglykoside an die 30S-Untereinheit binden und eine fehlerhafte Proteinsynthese induzieren. Makrolide sowie strukturell verwandte Lincosamide und Streptogramine (MLS) hemmen hingegen die Elongation der Peptidkette durch Bindung an die 50S-Untereinheit (Suerbaum *et al.*, 2020).

Um den Antibiotikaeinsatz in der landwirtschaftlichen Tierhaltung transparenter zu gestalten, sind pharmazeutische Unternehmen, Handelsunternehmen und Tierärzt\*innen in Deutschland seit 2011 verpflichtet, die Abgabemengen von antibakteriellen Tierarzneimitteln an das zentrale „Tierarzneimittelabgabemengenregister“ (TAR) melden (§ 47 Abs. 1 TAMG, BGBl. I S. 3394, 2005). Mit Inkrafttreten des Tierarzneimittelgesetzes (TAMG) am 28. Januar 2022 wurde diese Meldepflicht auf Herstellfirmen ausgeweitet (§ 45 Absatz 6 Nr. 1 TAMG). Seit 2023 müssen Tierärzt\*innen die Anwendung von Antibiotika auch in Milchviehbetrieben dokumentieren (§ 56 TAMG, BGBl. I S. 4530, 2021). Diese Maßnahmen dienen dem Monitoring und der Erhebung von Daten zum Antibiotikaeinsatz in der Landwirtschaft (BMEL (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft), 2022).

Die Analyse dieser Daten zeigt einen deutlichen Rückgang des Antibiotikaeinsatzes in Deutschland. Die Gesamtmenge abgegebener antibakterieller Wirkstoffe für Nutztiere sank von 1.705,7 t im Jahr 2011 auf 539,9 t im Jahr 2022, was einer Reduktion von 68,4 % entspricht (Arbeitsgruppe Antibiotikaresistenz des BVL und BfR, 2024). Besonders stark war der Rückgang bei Tetracyclinen (-84 %), Penicillinen (-56,9 %), Sulfonamiden (-70,7 %) und Makroliden (-73,2 %) (Arbeitsgruppe Antibiotikaresistenz des BVL und BfR, 2024). Erste Daten zum Antibiotikaeinsatz in Milchviehbetrieben zeigen, dass im Jahr 2023 insgesamt 35,347 t Antibiotika in Milchviehbetrieben verbraucht wurden. Penicilline (26,26 t), Sulfonamide (2,81 t) und Tetracycline (2,949 t) machen dabei den größten Anteil aus (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2024). Die populationsweite Therapiehäufigkeit (gesamt 6,6 Tage) wird vor allem von Penicillinen (2,9 Tage) und Aminoglykosiden (1,6 Tage) dominiert, gefolgt von Tetracyclinen (0,43 Tage), Cephalosporinen der 1., 3. und 4. Generation (0,48, 0,37 und 0,27 Tage) sowie Fluorchinolonen (0,4 Tage) (BfR, 2024).

Die WHO (World Health Organisation) stuft bestimmte antimikrobielle Wirkstoffe, die für die Behandlung spezifischer Infektionen beim Menschen essenziell sind, als besonders prioritär ein. Dazu

gehören Makrolide, Fluorchinolone, Cephalosporine der 3. und 4. Generation sowie Glykopeptid-Antibiotika. Auch Polymyxine werden genannt, da sie oft letzte Behandlungsoptionen für multiresistente Infektionen sind. Aufgrund des Risikos der Resistenzbildung und der möglichen Übertragung resistenter Erreger von Tieren auf Menschen sollte der Einsatz dieser Wirkstoffe in der Tierhaltung nur in Ausnahmefällen erfolgen (WHO, 2024).

#### 2.4.2 Einstreu als Reservoir für Resistenzen

Die strikteren Regulierungen wurden eingeführt, um der weiteren Entwicklung und Verbreitung von Antibiotikaresistenzen entgegenzuwirken. Die Entwicklung von Resistenzen in Bakterien ist ein natürliches Phänomen und hat schon stattgefunden, bevor Menschen Antibiotika in der Therapie von Infektionen eingesetzt haben (Antão und Wagner-Ahlf, 2018). Die Bedeutung von Antibiotika für die Medizin heutzutage ist enorm, der Umgang mit den Mitteln nicht immer verantwortungsbewusst und daher werden Resistenzen immer mehr zur Bedrohung des Gesundheitssystems. Besonders die immer häufiger auftretenden multiresistenten Krankheitserreger gefährden die erfolgreiche Behandlung von Infektionskrankheiten (Antão und Wagner-Ahlf, 2018). Aufgrund dieser Entwicklungen stuft die WHO antimikrobielle Resistenzen als eine der 10 größten Gefährdungen der globalen Gesundheit ein (WHO, 2020).

Resistenzgene sind in Umweltbakterien weit verbreitet und können über verschiedene Wege in Krankheitserreger gelangen. Die Weitergabe von Resistenzen kann durch horizontalen Gentransfer erfolgen, wie etwa Transformation mit freier Desoxyribonukleinsäure (DNA), Transduktion durch Bakteriophagen, oder Konjugation mit Plasmiden. Ein erhöhter Selektionsdruck, beispielsweise durch Antibiotikarückstände in der Umwelt, fördert diesen Prozess (Bengtsson-Palme *et al.*, 2018). Die besten Bedingungen für diesen horizontalen Gentransfer sind gegeben, wenn phylogenetisch nah verwandte Spezies im selben Habitat aufeinandertreffen und ein Selektionsdruck durch zum Beispiel Antibiotika herrscht (Bengtsson-Palme *et al.*, 2018). Die Nutztierhaltung bietet aufgrund hoher Bakteriendichten und wiederholtem Antibiotikaeinsatz optimale Bedingungen für die Selektion und Verbreitung resistenter Gene (Bengtsson-Palme *et al.*, 2018; Jauregi *et al.*, 2021). Der langjährige, teils unspezifische Einsatz in Human- und Tiermedizin hat diesen Prozess erheblich beschleunigt (Antão und Wagner-Ahlf, 2018).

In Deutschland konnten bereits resistente Bakterien, wie *E. coli*, in Betrieben der Rinder- und Milchviehhaltung nachgewiesen werden (Schmid *et al.*, 2013; Dahms *et al.*, 2015). In sechs der elf in dieser Studie beprobten Betriebe konnten Extended spectrum  $\beta$ -Laktamase (ESBL)- *E. coli* nachgewiesen werden. Grundsätzlich gilt ein Bakterienstamm dann als resistent, wenn die minimale Hemmkonzentration so hoch ist, dass selbst die maximal zugelassene Dosis keine Wirkung mehr zeigt



(Suerbaum *et al.*, 2020). Bakterielle Resistenzmechanismen beruhen auf der Modifikation der Zielstruktur, der Inaktivierung des Wirkstoffs oder dem aktiven Abtransport des Antibiotikums aus der Zelle (Sahm *et al.*, 2013). ESBL inaktivieren den Wirkstoff durch Hydrolysierung des  $\beta$ -Lactam-Rings, wozu diese spezifischen Laktamasen auch bei Cephalosporinen der dritten und vierten Generation fähig sind (Bush und Bradford, 2020). Bekannte Laktamase Varianten sind TEM, eine Plasmid-vermittelte Laktamase oder AmpC-Laktamasen (Tooke *et al.*, 2019). Anders als ESBL sind AmpC-Enzyme in der Lage, sowohl Breitspektrum-Cephalosporine als auch Cephalosporine mit erweitertem Wirkungsspektrum zu hydrolysieren, während sie durch  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren kaum oder gar nicht gehemmt werden (Hsieh *et al.*, 2015).

Auch gegen Aminoglykoside können Bakterien ARG besitzen, mit denen sie Enzyme bilden, welche den Wirkstoff modifizieren und unschädlich machen. Ein weiterer Mechanismus, der gegen Aminoglykosid-Antibiotika wirksam ist, sind Effluxpumpen (Zhang *et al.*, 2023). Hier wird der Wirkstoff vor Eintreten in die Zelle mithilfe von Protonenantriebskraft wieder in den Extrazellarraum gepumpt. Verschiedene Protein-Pumpen und Efflux-Systeme können so ein großes Spektrum an Antibiotika und antibiotisch wirkender Stoffe in ihrer Wirkung einschränken (Mohanty *et al.*, 2021).

In Untersuchungen von Jauregi *et al.* (2021) wurden in Kuhexkrementen insbesondere Resistenzen gegen  $\beta$ -Laktame, Fluorchinolone und Tetracycline nachgewiesen. Einstreuproben anderer Studien enthielten zudem Bakterienstämme mit Resistenzen gegen  $\beta$ -Laktame, Tetracycline und Makrolide sowie Enzyme, die Aminoglykoside modifizieren, Sulfonamid-resistente Dihydropteroat-Synthasen und Carbapenemasen (Tarrach *et al.*, 2024). Jauregi *et al.* (2021) haben auch die Kontaminationskette von der Gülle aufs Feld untersucht. Dabei wiesen frische Exkremente eine höhere Resistenzbelastung auf als gelagerte Gülle oder Mist. Besonders Exkremente mit Antibiotikarückständen begünstigten aufgrund des Selektionsdrucks die Etablierung resistenter Stämme (Jauregi *et al.*, 2021). Auch multiresistente pathogene Bakterien wie *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* und *Salmonella* wurden bereits aus Einstreuproben und dem weiteren Stallumfeld isoliert (Cobbold *et al.*, 2006; Badawy *et al.*, 2022; Wu, X. *et al.*, 2022). Wang *et al.* (2015) zeigten, dass Antibiotika während der Kompostierung in Schweinegülle zwar abgebaut werden, dass jedoch in Gegenwart von Antibiotika eine verstärkte Weitergabe von Resistenzgenen erfolgte. Nach der Kompostierung war ein erhöhter Anteil an Genen nachweisbar, die für Effluxpumpen sowie enzymatische Inaktivierungsmechanismen kodieren (Wang *et al.*, 2015). Zhang *et al.* (2020) berichteten, dass die Menge an ARG nach einer 14-tägigen Kompostierung um über 83 % reduziert wurde. Der Vergleich dieser und weiterer Ergebnisse zum Vorkommen von ARG in kompostiertem Material ist allerdings recht schwer, da die Kompostierungsmethoden variieren. Während Zhang *et al.* (2020) eine 14-tägige Kompostierung



untersuchten, setzte Wang *et al.* (2015) eine 32-tägige Kompostierung mit einer thermophilen Phase von 3,5 Tagen ein.

Die Studienlage zeigt auf, dass antibiotikaresistente Bakterien in Einstreu vorkommen. Weitere Forschung mit ist erforderlich, um die genauen Verbreitungsrouten und Risiken besser zu verstehen und vergleichbare und auf die Praxis anwendbare Daten zu generieren.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Probenahme**

Insgesamt wurden 26 Milchviehbetriebe in Deutschland beprobt und dem Einstreumaterial entsprechend in eine der drei Gruppen „Kompostierung“, „Exkremente“ oder „Stroh und Kalk“ kategorisiert. Die Proben der Kompostierungsbetriebe wurden vom Friedrich-Loeffler-Institut aus einem anderen Projekt für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Gruppe „Exkremente“ umfasst recycelte organische Einstreu (OE), dazu gehören Betriebe mit Mist-Einstreu und recycelten Gülleseparat (RMS). Die Gruppe „Stroh und Kalk“ wurde gebildet aus Betrieben, die Häckselstroh als „nicht-Mist organische Einstreu“ (NMOE) verwenden und verschieden häufig zusätzlich Kalken. Die Liegefläche der „Kompostierungs“ Betriebe wurde an verschiedenen Stellen stichprobenartig zwischen vier und sechs mal pro Betrieb beprobt. In den Betrieben der „Exkremente“ und „Stroh und Kalk“ Gruppen wurden je drei Proben des Einstreumaterial aus den Liegeboxen genommen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Liegeboxen nicht frisch eingestreut waren. Die beiden Gruppen „Exkremente“ und „Stroh und Kalk“ wurden weiter unterteilt in die Gruppen Mist und Gülle sowie Stroh ohne Kalk und Stroh mit Kalk.

In Tab. 1 sind grundlegende Informationen der Betriebe; wie Standort und Größe zusammengefasst. Die Betriebe, welche mit Kompostierungsmaterial eingestreut haben, haben ihren Standort in Süddeutschland und gehören mit Betriebsgrößen von <100 Kühen (n=7) und 100-200 Kühen (n=2) zu den kleineren Betrieben in dieser Arbeit. Zudem wurden in den Kompostierungsbetrieben sehr unterschiedliche Materialien in verschiedenen Anteilen eingestreut. Hauptkomponenten waren dabei Sägespäne, Hackschnitzel, Absiebmaterial und Dinkelspelzen. Auch beigemischt wurden Miscanthus (n=1), Pferdemit (n=1), Rapsstroh (n=1) und Pelletstaub (n=1).

Tab. 1: Standort, Betriebsgröße und Einstreumaterial der beprobten Betriebe (n=26)

	„Kompostierung“		„Stroh und Kalk“		„Exkremente“	
<b>Einstreumaterial</b>	K: Vorallem Sägespäne, Hackschnitzel, Absiebmaterial und Dinkelspelzen		SK: Stroh, zusätzlich alle 2-3 Wochen gekalkt (n=5) S: Stroh, seltener als alle 4 Wochen gekalkt (n=4)		M: Pferde- oder Kälbermist (n=4) G: Güllesubstrat (n=4)	
<b>Betriebsgröße</b>						
<100, n = 7						
100-199, n = 2			n = 4			
200-499,			n = 5		n = 2	
500-999,					n = 3	
>1000					n = 3	
<b>Standort nach</b>	BY	n=8	MV	n = 3	MV	n= 8
<b>Bundesland<sup>a</sup></b>	BW	n = 1	SH	n = 3		
			NRW	n = 3		

<sup>a</sup>BY: Bayern, BW: Baden-Württemberg, MV: Mecklenburg-Vorpommern, NRW: Nordrhein Westfalen, SH: Schleswig-Holstein

### 3.2 DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion wurde 2g jeder Probe eingewogen und mit 20 mL phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) aufgeschwemmt. Anschließend wurde die Probe gevortext, zentrifugiert (8000 x g für 10 Minuten), der Überstand sowie mögliche Strohreste entfernt und 0,4 g des Bodensatzes für die DNA-Extraktion mit dem QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit 50 (QIAGEN, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Für eine höhere DNA Quantität von sowohl Gram-negativen als auch Gram-positiven Taxa wurde das beiliegende Protokoll wie folgt nach Knudsen *et al.* (2016) optimiert: Ein weiterer Extraktionsschritt mit dem Tissueanalyse (QIAGEN, Hilden, Deutschland) wurde ergänzt und bei der Lyse die Temperatur auf 95 °C erhöht, sowie die Menge der Proteinase K verdoppelt. Nach der Extraktion wurde die DNA-Konzentration der Proben mit dem QuBit Fluorometer (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) überprüft und nur Proben mit mindestens 10 ng/µL im nächsten Schritt sequenziert.

### 3.3 Metagenomsequenzierung

Die Illumina-Sequenzierung, die Library Preparation<sup>1</sup> und die erste Datenaufarbeitung wurden von SeqCenter (SeqCenter, Pittsburgh, USA) durchgeführt. Für die Sequenzierung wurde nach Angaben von SeqCenter der Illumina NovaSeq X Plus Sequenzer (Illumina Inc., San Diego, USA) verwendet, wobei 2x151bp paired-end Reads<sup>2</sup> generiert wurden. Für die Erstellung der Sequencing libraries<sup>3</sup> kamen das Illumina DNA Prep Kit (Illumina Inc., San Diego, USA), das auf Tagmentierung und PCR-Amplifikation basiert, sowie benutzerdefinierte IDT 10bp Unique Dual Indices<sup>4</sup> mit einer Ziel-Insertgröße von 280 bp zum Einsatz. Von SeqCenter wurden keine zusätzlichen DNA-Fragmentierungs- oder Größenauswahlschritte angewandt. Für das Demultiplexing, die Qualitätskontrolle und das Adapter-Trimming<sup>5</sup> wurde bcl-convert1 (v4.2.4) verwendet. Die anschließende Analyse der Sequenzierdaten jeder Probe erfolgte mithilfe spezifischer Pipelines<sup>6</sup> und ist nachfolgend dargestellt.

### 3.4 Analyse der Metagenomdaten

#### 3.4.1 Charakterisierung des Mikrobioms

Zur Charakterisierung der Mikrobiome der Einstreuproben wurden die Metagenomdaten mit der Kraken2 Pipeline mit Standardeinstellungen analysiert (Wood *et al.*, 2019). Für die Visualisierung des Mikrobioms mit Microsoft Excel (Version 2501, Microsoft Corporation, Redmond, USA) wurde die taxonomische Ebene der Phyla gewählt. Diese und die weiteren Analyseschritte wurden unter Verwendung von R (Version 4.3.3) und R Studio (RStudio 2024.12.0+467) mit den R-Paketen dplyr, readr, taxize, purrr, reshape2, vegan berechnet. Vorbereitend für die Visualisierung wurden für jede Probe die bakteriellen Phyla herausgefiltert sowie die Abundanzen der Reads<sup>7</sup> auf die Menge der dem Taxon Bakterien zugeordneten Reads berechnet (SkriptR 1). Anschließend wurden mit SkriptR 2 für jeden Betrieb arithmetische Mittelwerte jedes Phylum berechnet. Aufgrund der hohen Menge an Phyla, die sehr niedrige Abundanzwerte zeigten, wurden alle Phyla mit <1% Abundanz in der Probe für die anschließende grafische Darstellung zur Gruppe ‚Andere Phyla‘ zusammengefasst (SkriptR 2). Zudem wurden alle Abundanzen in Microsoft Excel auf 100% reskaliert.

---

<sup>1</sup> engl. für Vorbereitung der DNA für die Sequenzierung durch u.a. Fragmentierung und Adapteranlagerung

<sup>2</sup> engl. für Sequenzierung beider Enden eines DNA-Fragments

<sup>3</sup> engl. für aufbereitete DNA- Proben mit angehängten Adaptern

<sup>4</sup> engl. für einzigartige Barcode Sequenzen an beiden Enden einer sequencing library

<sup>5</sup> engl. für das Entfernen künstlicher Sequenzadapter von den Rohdaten

<sup>6</sup> engl. für automatisierte bioinformatische Programme, die Sequenzdaten Schritt für Schritt analysieren

<sup>7</sup> engl. für kurze DNA-Sequenzabschnitte, die während der Sequenzierung erzeugt werden

Zudem wurden die Kraken-Report Dateien nach den in Tab. 2 aufgeführten, mit Mastitis und DD assoziierten Bakteriengattungen und -spezies durchsucht sowie deren Abundanz berechnet. Dabei wurde ähnlich verfahren, wie bei der Auswertung nach Phyla, jedoch mit der Änderung, dass in Skript 1 die Liste der Bakterienphyla durch die Liste pathogener Spezies und Gattungen ersetzt wurde. Nach der Anwendung von SkriptR 2 zur Berechnung der Abundanzen, wurden die Abundanzen der Betriebe in Microsoft Excel importiert und dort die arithmetischen Mittelwerte pro Einstreugruppe gebildet. Dafür wurden in SkriptR 2 nur Begriffsänderungen vorgenommen.

Tab. 2: Zur Mikrobiom-Analyse ausgewählte, mit Mastitis und DD assoziierte Spezies und Gattungen

Bakterienspezies oder -Gattung	Referenz
<b>Mastitis-assoziiert</b>	
<i>S. aureus</i>	(Schmenger und Krömker, 2020; Krebs <i>et al.</i> , 2023)
<i>Streptococcus</i> spp.	(AG „Eutergesundheit“ DVG, 2024; Krebs <i>et al.</i> , 2023)
- <i>S. uberis</i>	(Ruegg und Adkins, 2024; Schmenger und Krömker, 2020)
- <i>S. dysgalactiae</i>	(Ruegg und Adkins, 2024; Schmenger und Krömker, 2020)
<i>Klebsiella</i> spp.	(Ruegg und Adkins, 2024; Krebs <i>et al.</i> , 2023)
<i>Mycoplasma bovis</i>	(Ruegg und Adkins, 2024)
<i>E. coli</i>	(Ruegg und Adkins, 2024; Krebs <i>et al.</i> , 2023)
<i>Corynebacterium</i> spp.	(Krebs <i>et al.</i> , 2023)
<i>Clostridium</i> spp.	(Krebs <i>et al.</i> , 2023)
<b>DD assoziiert</b>	
<i>Treponema</i> spp.	(Nielsen <i>et al.</i> , 2016; Beninger <i>et al.</i> , 2018; Caddey und De Buck, 2021; Bell <i>et al.</i> , 2023)
- <i>T. phagedensis</i>	(Zinicola <i>et al.</i> , 2015a; Nielsen <i>et al.</i> , 2016; Beninger <i>et al.</i> , 2018)
- <i>T. medium</i>	(Zinicola <i>et al.</i> , 2015a; Beninger <i>et al.</i> , 2018)
- <i>T. pedis</i>	(Beninger <i>et al.</i> , 2018)
- <i>T. denticola</i>	(Zinicola <i>et al.</i> , 2015a; Beninger <i>et al.</i> , 2018)
- <i>T. putidum</i>	(Zinicola <i>et al.</i> , 2015a)
- <i>T. paraluisuniculi</i>	(Zinicola <i>et al.</i> , 2015a)
<i>Fusobacterium</i>	
- <i>F. necrophorum</i>	(Nielsen <i>et al.</i> , 2016; Caddey und De Buck, 2021)
- <i>F. moritferum</i>	
<i>Mycoplasma</i> spp.	(Nielsen <i>et al.</i> , 2016; Caddey und De Buck, 2021)
<i>Porphyromonas</i>	(Nielsen <i>et al.</i> , 2016; Caddey und De Buck, 2021)

### 3.4.2 Untersuchung des Resistoms

Zur Untersuchung des Resistoms der Proben wurden die Sequenzdaten mit der Pipeline AMR++ und der MEGARes v2.0-Datenbank (Lakin *et al.*, 2017a; Doster *et al.*, 2020) mit Standardeinstellungen analysiert. Vor der Resistomanalyse (ResistomeAnalyzer, Chris Dean, 2018) wurden minderwertige Basen und Sequenzen entfernt (TonyBolger und BjoernUsadel, 2021), sowie Resistenzgene identifiziert, indem ein Mapping<sup>8</sup> der Reads mit der MEGAREes Datenbank stattfand (Lakin *et al.*, 2017a). Die Ergebnisse der AMR++ Pipeline umfassen Trefferzahlen der ARG-Sequenzen auf Ebene der Antibiotikaklassen, Informationen zum Wirkmechanismus sowie die Ebene der Resistenzgene. Es wurden insgesamt 18 Antibiotikaresistenzgruppen ausgewertet, dazu gehören: Aminocumarine, Aminoglykoside, Bacitracin,  $\beta$ -Laktame, kationische antimikrobielle Peptide (kaP), Elfamycin, Fluorchinolone, Fosfomycin, Fusidinsäure, Glykopeptide, MLS, Multiresistenz, *Mycobacterium tuberculosis* spezifische Resistenzen, Phenicol, Rifampin, Sulfonamide, Tetrazykline, Trimethoprim und auch die Gesamtsumme der ARG-Reads. Weiterhin wurde die METAXA2 v. 2.2.3 Pipeline (Bengtsson-Palme *et al.*, 2015) verwendet, um die Anzahl der Reads in den Fastq-Rohdaten zu bestimmen, die auf bakterielle 16S-rRNA-Gene zurückzuführen sind. Die Ergebnisse beider Pipelines wurden verwendet, um für jede Antibiotikaresistenzgruppe die normalisierte Abundanz in jeder Probe zu bestimmen. Dafür wurde die von Li *et al.* (2015) veröffentlichte Formel verwendet:

$$Abundanz = \sum_1^n \frac{N(AMRseq) * L(reads) / L(AMRrefseq)}{N(16seq) * L(reads) / L(16Srefseq)}$$

- |              |   |  |
|--------------|---|--|
| n            | - | individuelles antibiotikaresistenz-Gen in der MEGARes-Datenbank  |
| N(AMRseq)    | - | Anzahl der mit der AMR++ identifizierten Reads   |
| N(16seq)     | - | Anzahl der Reads, die dem 16S rRNA-Gen zugeordnet werden konnten   |
| L(reads)     | - | Länge der Reads (Länge von ARG Reads ist gleich zur Länge der 16S Reads, wird daher aus Gleichung rausgekürzt) |
| L(AMRrefseq) | - | Länge des AR-Referenzgens in der MEGARes-Datenbank   |
| L(16Srefseq) | - | Länge der 16S rRNA-Gen-Sequenz (entspricht nach Greengenes Datenbank durchschnittlich 1432 bp)                 |

Formel 1: Abundanzberechnung von Antibiotikaresistenz-Genen mittels 16S rRNA-Normalisierung nach Li *et al.* (2015)

---

<sup>8</sup> Abgleich von Sequenz-Reads mit einer Referenzdatenbank

Die Berechnung der Abundanzen wurde mit Microsoft Excel (Version 2501, Microsoft Corporation, Redmond, USA) durchgeführt. Aus den Abundanzen jeder Probe wurden Mittelwerte für jeden Betrieb gebildet. In diese Berechnungen wurden Proben nicht einbezogen, die aufgrund ihrer niedrigen Gesamtzahl von Resistenzgenen (Summe ARG <0,05) als Ausreißer identifiziert wurden.

### 3.4.3 Statistisches Vorgehen

Für alle statistischen Analysen wurden durchgehend zweiseitige Signifikanzen verwendet und ein Signifikanzniveau a priori auf  $\leq 0,05$  festgelegt. Die statistischen Analysen wurden, wenn nicht anders beschrieben, mithilfe der Software IBM SPSS Statistics (Version 25, New York, USA) sowie Microsoft Excel durchgeführt.

Zur Charakterisierung des Mikrobiom wurden die Unterschiede des Vorkommens verschiedener Phyla, sowie der mit Mastitis und DD assoziierten Bakteriengattungen und -spezies zwischen den Einstreugruppen untersucht. Dabei konnten nur Phyla und Bakteriengattungen oder -spezies einbezogen werden, die in jeder der drei Einstreugruppen in mehr als einem Betrieb auftraten. Zuerst wurde geprüft, ob sich die Untergruppen „Stroh“ und „Stroh mit Kalk“ sowie „Mist“ und „Gülle“ signifikant unterschieden. Dies diente dazu, sicherzustellen, dass diese Untergruppen in den weiteren Analysen zu ihren jeweiligen Hauptgruppen zusammengefasst werden konnten. Hierfür wurde ein T-Test für unabhängige Stichproben verwendet oder, bei nicht normalverteilten Daten, der Mann-Whitney-U-Test. Die Normalverteilung wurde mittels Shapiro-Wilk-Test überprüft, während der Levene-Test zur Prüfung der Varianzhomogenität eingesetzt wurde. Falls keine Varianzgleichheit vorlag, wurde die Welch-Korrektur angewandt. Um signifikante Unterschiede der Mikrobiome zwischen den Einstreugruppen „Kompostierung“, „Exkrement“ und „Stroh und Kalk“ festzustellen, wurden entweder eine Varianzanalyse (ANOVA) oder, bei nicht normalverteilten Daten, der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test verwendet. Die Wahl der Methode erfolgte basierend auf der Normalverteilung des Vorkommens der Phyla in diesen Gruppen. Auch das Vorkommen von Resistenzen und die Unterschiede in der Summe aller detektierten Resistenzgen-Abundanzen (Summe ARG) je Betrieb wurden mit der gleichen Vorgehensweise analysiert.

Zusätzlich wurden Diversitätsindizes auf taxonomischer Ebene der Familien bestimmt. Die Berechnungen wurden mit R und R Studio sowie den oben benannten Paketen durchgeführt. Um nur Familien der Domäne Bakterien in die Diversitätsberechnungen zu inkludieren, wurden zunächst, exemplarisch für eine Kraken2-Report-Datei einer Probe, alle bakteriellen Familien identifiziert. Dies erfolgte durch einen Abgleich der Familiennamen mit der NCBI-Taxonomiedatenbank mit Skript3. Die Liste der Bakterienfamilien wurde dann als Filterkriterium für alle Proben angewandt und anschließend die Abundanzen der Bakterienfamilien berechnet (Skript 4). Im Anschluss wurden für jeden Betrieb der

Mittelwert der Bakterienfamilienabundanzen berechnet (Skript 5) und die Betriebe den drei Einstreugruppen zugeordnet. Zur Erfassung der inneren Diversität ( $\alpha$ -Diversität) jeder Einstreugruppe wurden der Shannon-Diversitätsindex sowie die Pielou'sche Gleichmäßigkeit ermittelt (Skript 6). Diese Maße ermöglichen es, nicht nur die Anzahl der Bakterienfamilien, sondern auch deren relative Häufigkeiten zu berücksichtigen. Um die Unterschiede in der Zusammensetzung der Bakterienfamilien in den verschiedenen Einstreugruppen ( $\beta$ -Diversität) zu analysieren, wurde die Bray-Curtis-Dissimilarität berechnet (Skript 6). Dieses Maß vergleicht sowohl das Vorkommen als auch die Häufigkeit der Bakterienfamilien in den Einstreugruppen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 DNA Extraktion und Metagenomsequenzierung

Die DNA Konzentration war bei einer Probe des Betriebs S4 nicht  $> 10 \text{ ng}/\mu\text{L}$  und daher wurde mit dieser Probe nicht weitergearbeitet. Die Sequenziertiefe der Proben war unterschiedlich, wobei die niedrigste Probe  $9,54 \cdot 10^7$  gesamte Reads aufwies und die Probe mit der höchsten Sequenziertiefe  $2,37 \cdot 10^8$  Reads aufwies.

### 4.2 Mikrobiom

#### 4.2.1 Mikrobiom Charakterisierung auf Phylumebene

Zunächst wurde die Homogenität der Untergruppen Stroh, Stroh mit Kalk sowie Mist und Gülle in den jeweiligen Einstreugruppen „Stroh und Kalk“ sowie „Exkrement“ geprüft. Der T-Test der Einstreugruppe „Stroh und Kalk“ ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untergruppen Stroh und Stroh mit Kalk für alle untersuchten Phyla (Tab. A 1, Tab. A 2). In der Einstreugruppe „Exkrement“ zeigten der T-Test und der für das Phylum *Bacillota* durchgeführte Mann-Whitney-U-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untergruppen (Tab. A 3, Tab. A 4, Tab. A 5). Jedoch lag der p-Wert bei dem Phylum *Actinomycetota* mit 0,057 knapp oberhalb der Signifikanzschwelle (Tab. A 4). Insgesamt zeigten die Untergruppen keine signifikanten Unterschiede untereinander, sodass sie in den weiteren Analysen in die jeweiligen Einstreugruppen zusammengefasst wurden.

In den Abbildungen Abb. 1, Abb. 2 und Abb. 3 sind die Mikrobiome der einzelnen Betriebe auf der taxonomischen Ebene der Phyla dargestellt. Zur besseren Visualisierung wurde ein cut off- Wert von 0,5% Abundanz der Phyla festgelegt.

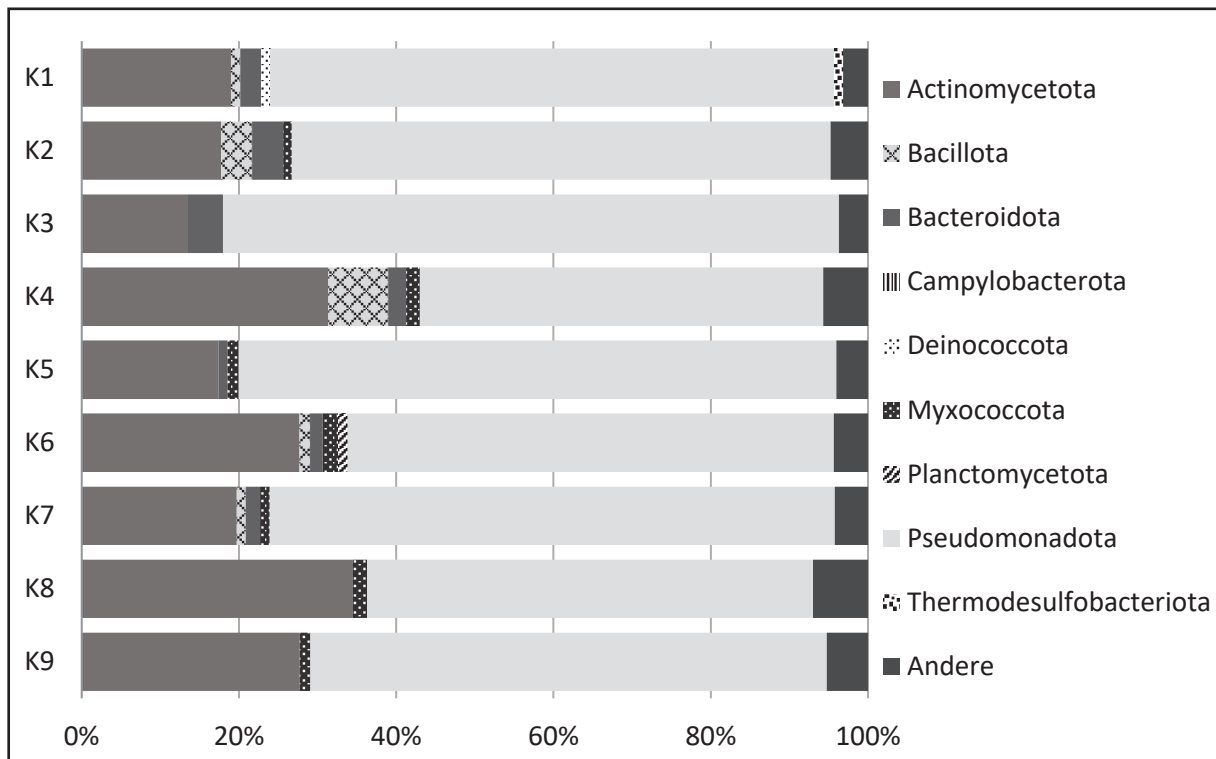


Abb. 1: Relative Abundanz der bakteriellen Phyla (cut off < 0,5%) als Teil des Mikrobioms in der Einstreu von Betrieben der Kompostgruppe (K1–K9)



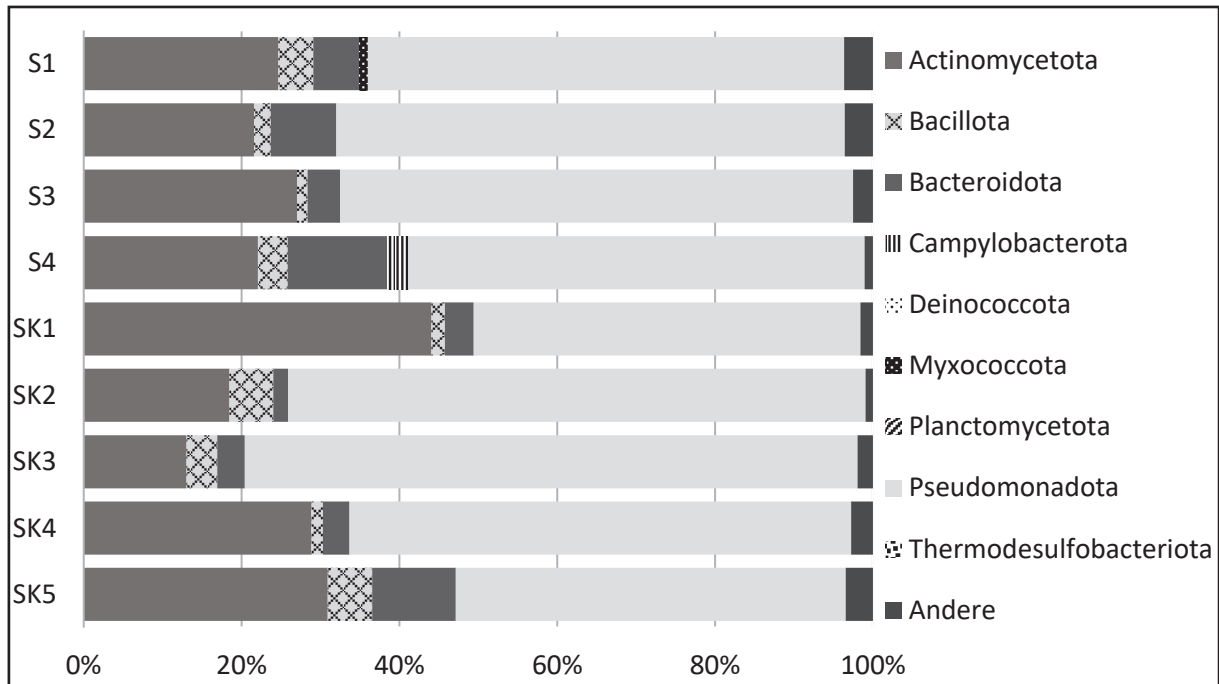


Abb. 2: Relative Abundanz der bakteriellen Phyla (cut off < 0,5%) als Teil des Mikrobioms in der Einstreu von Betrieben der „Stroh und Kalk“ Gruppe (Stroh ohne Kalk: S1-S4; Stroh mit Kalk: SK1-5)

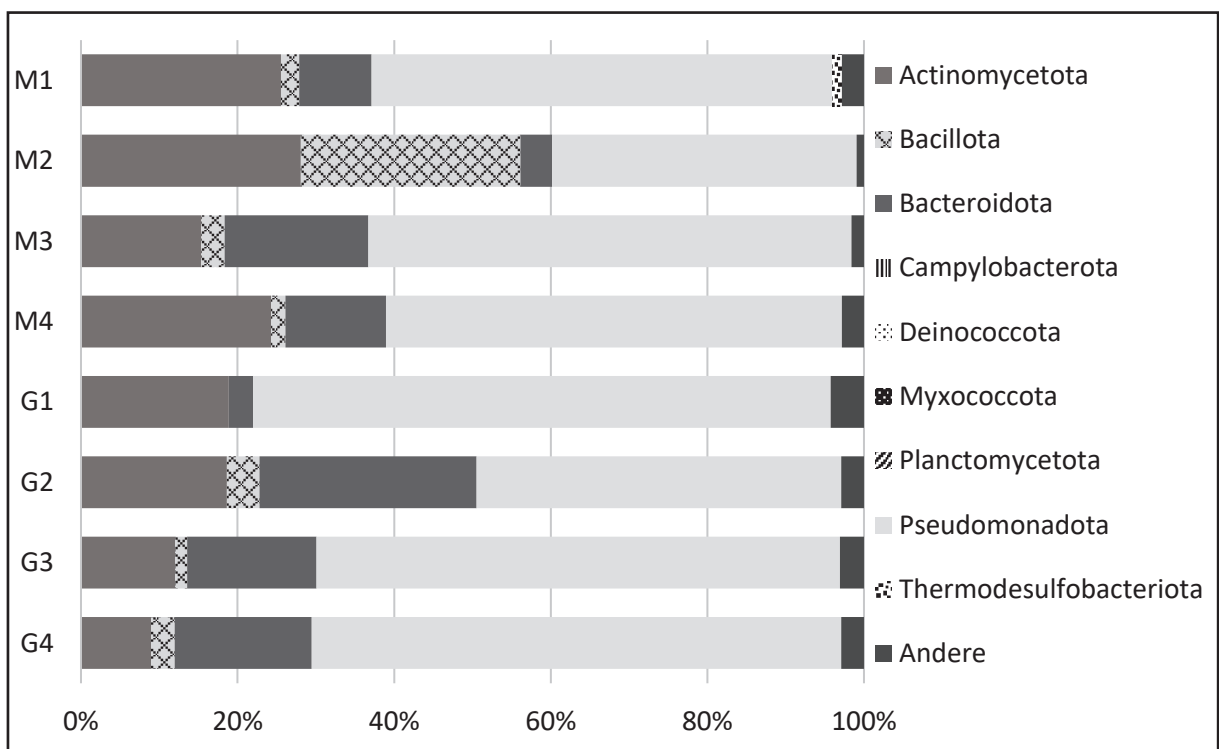


Abb. 3: Relative Abundanz der bakteriellen Phyla (cut off < 0,5%) als Teil des Mikrobioms in der Einstreu von Betrieben der Exkrement Gruppe (Mist: M1-4; Gülleseparat: G1-4)

In den Proben mit Komposteinstreu (Abb. 1) war das Phylum *Pseudomonadota* in allen Betrieben mit Anteilen zwischen 51 % und 78 % das dominierende Phylum. Daneben wurden mittlere bis hohe Anteile von *Actinomycetota* beobachtet (13 % bis 34 %). Die Anteile von *Bacillota* und *Bacteroidota* waren insgesamt geringer und nur in einzelnen Proben nennenswert vertreten. In Abb. 2 ist zu sehen, dass auch in der „Stroh und Kalk“ Gruppe das Phylum *Pseudomonadota* dominiert (49 % bis 77 %). Allerdings zeigten diese Proben einen insgesamt höheren Anteil an *Actinomycetota*, insbesondere im Betrieb SK1 (44 %). Zudem traten *Bacillota* und *Bacteroidota* in dieser Gruppe etwas häufiger auf, wobei *Bacteroidota* im Mikrobiom von Betrieb S4 mit einem Anteil von etwa 12,7 % besonders hervortritt. Die Betriebe der Gruppe „Exkrement“ (Abb. 3) wiesen ebenfalls eine Dominanz von *Pseudomonadota* auf, jedoch mit geringeren Anteilen (38 % bis 73 %) im Vergleich zu den anderen Einstreuarten. Gleichzeitig waren hier erhöhte Anteile von *Bacteroidota* sichtbar, die bis zu 27 % erreichten (Betrieb G2). Besonders waren in dieser Gruppe die teils hohen Anteile von *Bacillota* in den Betrieben M2 und M1, wo dieses Phylum über 25 % des Mikrobioms ausmachte.

Die ANOVA zur Analyse möglicher Unterschiede zwischen den drei Einstreugruppen „Kompostierung“, „Exkrement“ und „Stroh und Kalk“ zeigte, dass nur das Vorkommen des Phylum *Bacteroidota* signifikant unterschiedlich zwischen den Einstreuarten war (

Tab. A 6, Tab. A 7, Tab. A 8). Für das Vorkommen der Phyla *Actinomycetota* und *Pseudomonadota* konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Einstreugruppen festgestellt werden (Tab. A 8). Der Kruskal-Wallis-Test mit Post-hoc-Test zum Vorkommen des Phylum *Bacillota* (Tab. A 11) ergab jeweils einen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe „Kompostierung“ zu den Einstreugruppen „Exkrement“ ( $p = 0,031$ ) und „Stroh und Kalk“ ( $p = 0,027$ ). Die Gruppen „Exkrement“ und „Stroh und Kalk“ waren in diesem Fall untereinander nicht signifikant unterschiedlich (Tab. A 11).

Da der Test auf Normalverteilung beim Phylum *Bacteroidota* nicht eindeutig war, wurde hier sowohl eine ANOVA mit post-hoc-Test nach Games-Howell (Tab. A 9) als auch zusätzlich der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt (Tab. A 12). Beide ergaben auch hier, dass die Gruppe „Kompostierung“ signifikant unterschiedlich zu den beiden anderen Einstreugruppen ist. Weiterhin ergab die ANOVA auch einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,001$ ) zwischen den Einstreugruppen „Exkrement“ und „Stroh und Kalk“ (Tab. A 9). Dieser Vergleich wurde jedoch beim Kruskal-Wallis-Test als nicht signifikant festgestellt (Tab. A 12).

#### 4.2.2 Diversitätsindizes: Analyse des Mikrobioms auf Familienebene

Die Diversitätsindizes der Gruppen „Kompostierung“, „Exkrement“ und „Stroh und Kalk“, berechnet auf der taxonomischen Ebene der Familien, sind in den Tabellen Tab. 3 ( $\alpha$ -Diversität) und Tab. 4 ( $\beta$ -Diversität) dargestellt. Die  $\alpha$ -Diversität, gemessen am Shannon-Diversitätsindex, ist in der Gruppe „Kompostierung“ am höchsten (3,88) und bei der Gruppe „Exkrement“ (3,67) am niedrigsten. Der Wert der Gruppe „Stroh und Kalk“ liegt mit 3,77 nur etwas höher als die Gruppe „Exkrement“. Beim Pielou's Evenness-Index zeigen die Einstreugruppen „Exkrement“ und „Stroh und Kalk“ ähnliche hohe Werte im Vergleich zur Gruppe „Kompostierung“, die „Stroh und Kalk“ einige Familien dominanter vertreten sind als andere.

Tab. 3: Shannon-Index und Pielou's Evenness der  $\alpha$ -Diversität für Einstreugruppen „Kompostierung“, „Stroh und Kalk“ und Exkrement

	„Kompostierung“	„Stroh und Kalk“	„Exkrement“
<b>Shannon-Diversität</b>	3,88	3,77	3,67
<b>Pielou's Evenness</b>	0,74	0,73	0,71

Die  $\beta$ -Diversität, gemessen am Bray-Curtis-Index, ist mit 0,282 und 0,276 am höchsten bei den Vergleichen der Gruppe „Kompostierung“ zu den beiden anderen Einstreugruppen (Tab. 4). Der Bray-Curtis-Wert zwischen der Gruppe „Exkrement“ und „Stroh und Kalk“ Gruppe ist mit 0,178 niedriger, was auf eine relativ hohe Ähnlichkeit des Mikrobioms in diesen beiden Gruppen hinweist.

Tab. 4:  $\beta$  -Diversität (Bray-Curtis-Index) zwischen den Einstreugruppen „Kompostierung“, „Stroh und Kalk“ und Exkrement

<b>Gruppenvergleich</b>	<b>Bray-Curtis Wert</b>
„Kompostierung“ zu „Exkrement“	0,282
„Kompostierung“ zu „Stroh und Kalk“	0,276
„Exkrement“ zu „Stroh und Kalk“	0,178

#### 4.2.3 Vorkommen von pathogenen Spezies

Die Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung, der Kruskal-Wallis-Tests und der Post-hoc-Tests sind in den Tabellen Tab. A 13 bis Tab. A 25 aufgeführt. In den Abbildungen Abb. 4, Abb. 5 und Abb. 6 sind die Abundanzen pathogener Bakteriengattungen und -spezies in den drei Einstreugruppen dargestellt.

Im Vergleich der Abundanzen auf Gattungslevel (Abb. 4) weisen *Corynebacterium* und *Clostridium* die höchsten Abundanzen auf. Die Abundanz beider Gattungen ist in der Einstreugruppe „Stroh und Kalk“ am höchsten. Im Vergleich dazu sind die Abundanzen in den Gruppen „Kompostierung“ und „Exkrementen“ deutlich niedriger. Die übrigen untersuchten pathogenen Gattungen wie *Mycoplasma*, *Porphyromonas*, *Treponema*, und *Klebsiella* zeigen insgesamt nur sehr geringe Abundanzen, die zwischen den Einstreugruppen wenig variieren. Die statistischen Analysen zeigen, dass signifikante Unterschiede zwischen der „Kompost“ und „Exkrementen“ Gruppen in den Abundanzen bei den Gattungen *Corynebacterium* ( $p = 0,011$ ), *Mycoplasma* ( $p = 0,023$ ) und *Porphyromonas* ( $p = 0,014$ ) bestehen. Zusätzlich wurden signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen „Kompostierung“ und „Stroh und Kalk“ bei den Gattungen *Clostridium* ( $p = 0,004$ ), *Corynebacterium* ( $p < 0,001$ ), sowie *Porphyromonas* ( $p = 0,004$ ). Zwischen den Gruppen „Exkrementen“ und „Stroh und Kalk“ konnten keine signifikanten Unterschiede in den Abundanzen dieser Gattungen festgestellt werden.

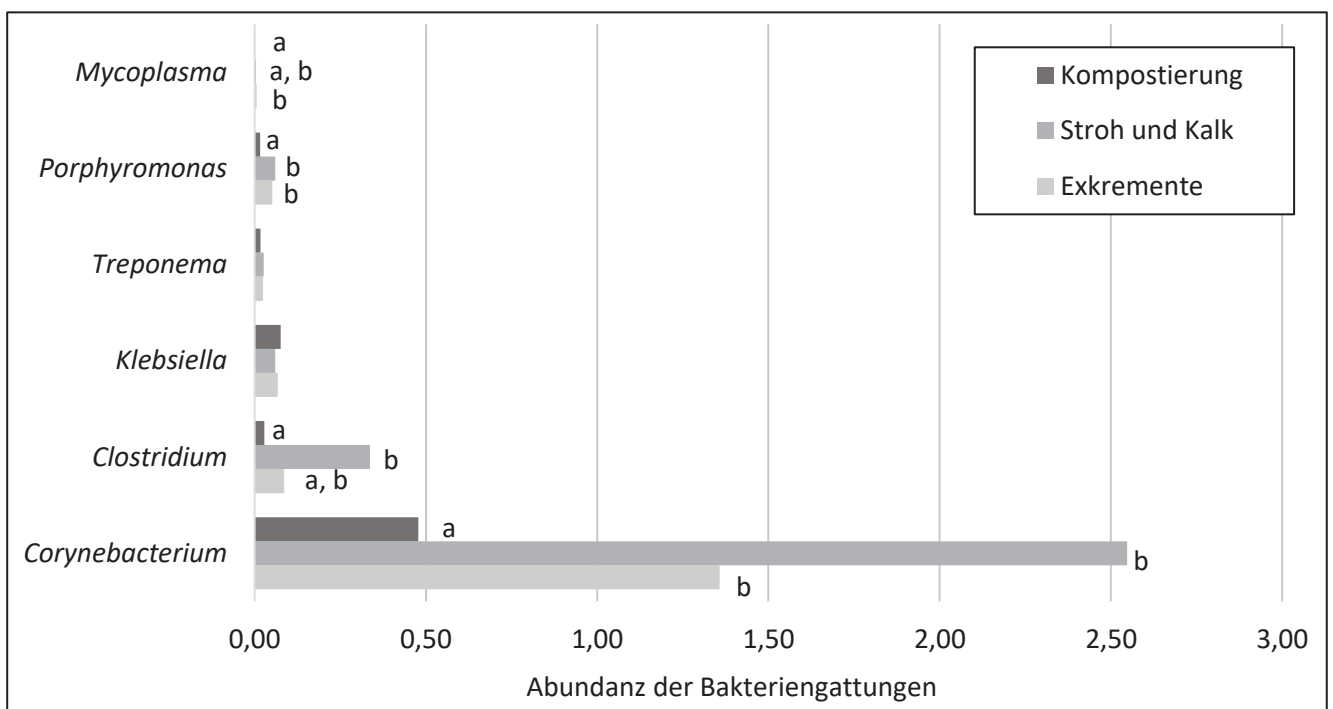


Abb. 4: Abundanz der mit Mastitis und DD assoziierten Bakteriengattungen in den Einstreugruppen „Kompostierung“, „Exkrementen“ und „Stroh und Kalk“, mit Signifikanzwerten: *Corynebacterium*  $p < 0,001$ , *Clostridium*  $p = 0,013$ , *Porphyromonas*  $p = 0,009$ , *Mycoplasma*  $p = 0,023$ , eingeteilt nach Signifikanz in Gruppen a und b

In Abb. 5 und Abb. 6 sind die Abundanzen der Mastitis und DD assoziierten Arten auf Spezieslevel dargestellt. *E. coli* wies die höchste Abundanz auf, insbesondere in der Gruppe „Stroh und Kalk“, gefolgt von *S. aureus*, das ebenfalls vor allem in dieser Gruppe vorkam, jedoch in deutlich geringeren Mengen. In der statistischen Analyse zeigte sich, dass das Vorkommen von *E. coli* jeweils zwischen der Gruppe „Kompostierung“ zu den anderen beiden Einstreugruppen signifikant war ( $p = 0,044$ ). Die Abundanzen von *S. aureus* waren ebenfalls zwischen den Gruppen „Kompostierung“ und „Stroh und Kalk“ signifikant unterschiedlich ( $p = 0,011$ ), allerdings auch zwischen „Exkrementen“ und „Stroh und Kalk“. Damit ist *S. aureus* die einzige Spezies oder Gattung, bei der ein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen festgestellt werden konnte.

Die Spezies der Gattung *Treponema* zeigten insgesamt geringe Abundanzen (Abb. 6). Am häufigsten konnte *T. denticola* nachgewiesen werden. *T. paraluisuniculi* wurde in keiner Probe nachgewiesen. Sowohl *T. denticola* ( $p = 0,006$ ), als auch *T. phagedenis* ( $p = 0,002$ ) zeigen signifikante Unterschiede in den Abundanzen zwischen den Gruppen „Kompostierung“ und „Exkrementen“ (Tab. A 20). Auch *Streptococcus* spp. wiesen geringe Abundanzen auf. Die höchsten Werte waren in den Gruppen „Stroh und Kalk“ sowie „Exkrementen“ zu finden, während die Gruppe „Kompostierung“ deutlich niedrigere Werte aufwies. Dieser Unterschied war nur bei *S. uberis* signifikant ( $p = 0,028$ , Tab. A 18). *F. necrophorum* und *F. mortiferum* zeigten nur geringe Abundanzen, wobei die höchsten Werte in der Einstreugruppe „Exkrementen“ ermittelt wurden. Jedoch ist dieser Unterschied bei *F. necrophorum* nicht signifikant (Tab. A 15). Da die Abundanz bei *F. mortiferum* in keinem Betrieb der Gruppe Kompostierung  $> 0$  war, wurde hier kein Test auf Signifikanz durchgeführt.

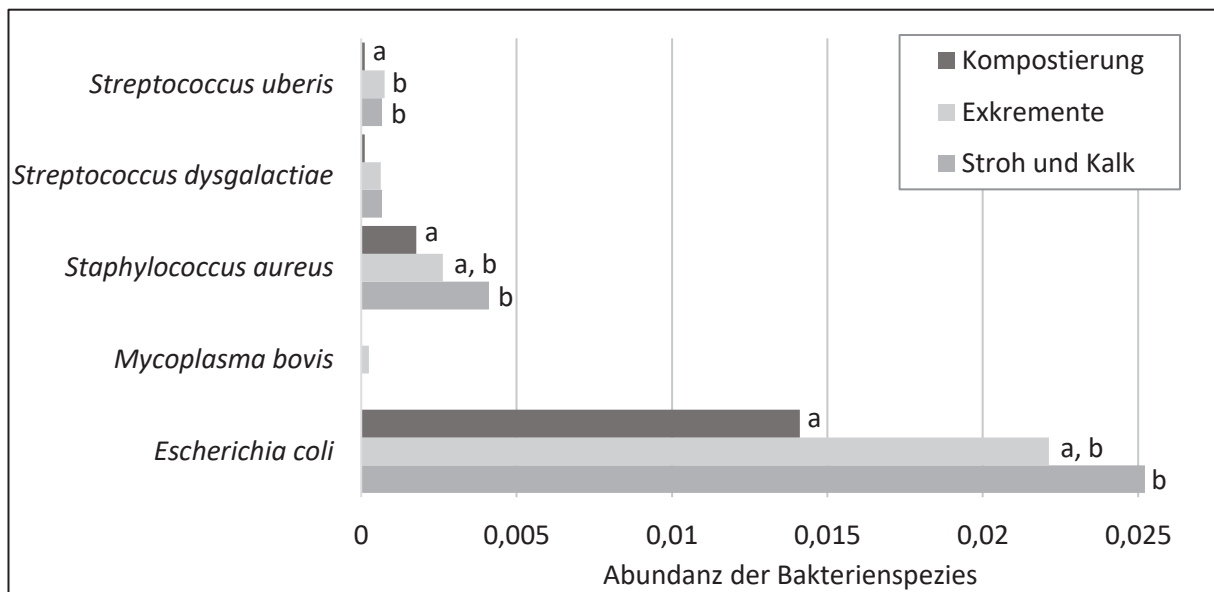


Abb. 5: Abundanz der mit Mastitis assoziierten Bakterienspezies in den Einstreugruppen „Kompostierung“, „Exkreme“ und „Stroh und Kalk“, mit Signifikanzwerten: *E. coli*  $p = 0,044$ , *S. aureus*  $p = 0,011$ , *S. uberis*  $p = 0,028$ , eingeteilt nach Signifikanz in Gruppen a und b

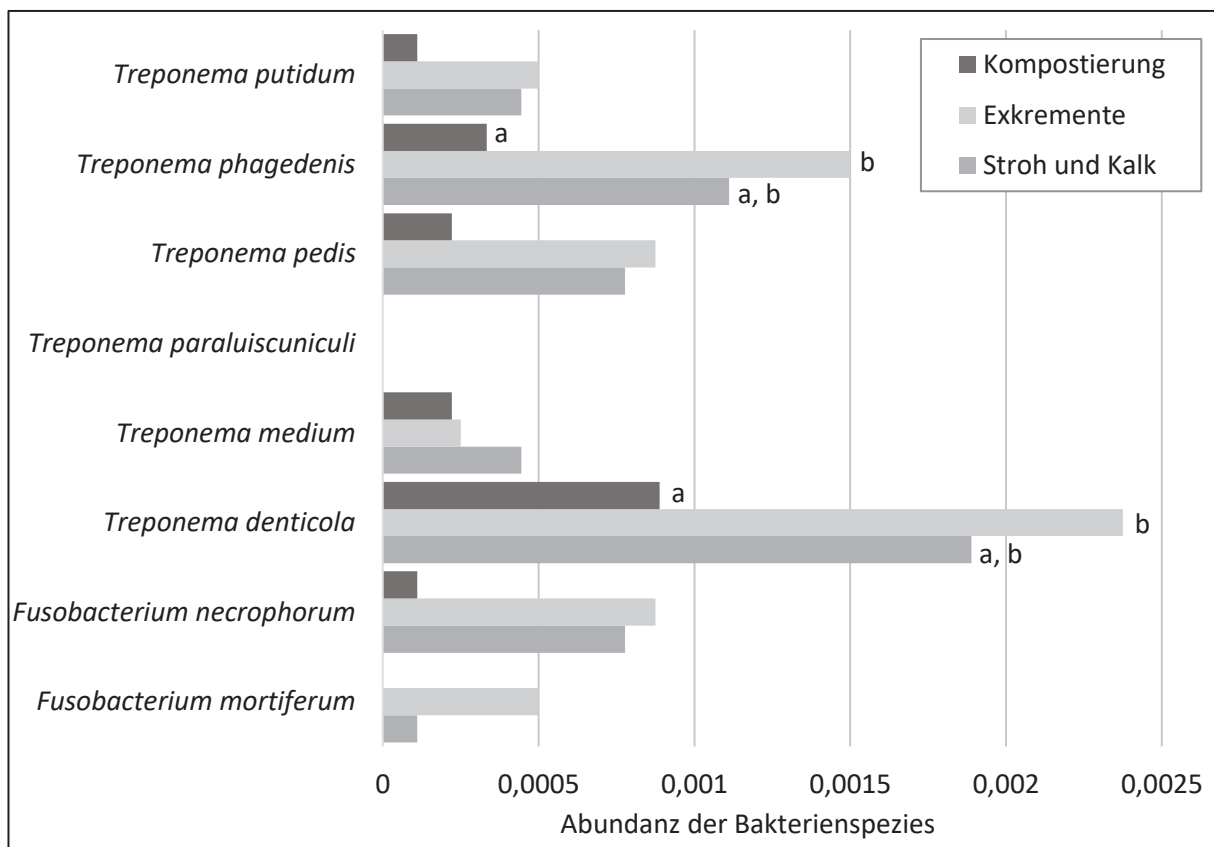


Abb. 6: Abundanz der mit DD assoziierten Bakterienspezies in den Einstreugruppen „Kompostierung“, „Exkreme“ und „Stroh und Kalk“, mit Signifikanzwerten: *T. phagedenis*  $p = 0,010$ , *T. denticola*  $p = 0,022$ , eingeteilt nach Signifikanz in Gruppen a und b

### 4.3 Resistom

Die gemittelten Abundanzen jedes Betriebs sind in den Tabellen Tab. A 40, Tab. A 41, Tab. A 42 zusammengefasst. Die Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung, der Kruskal-Wallis-Tests und ANOVA sowie und der post-hoc Tests sind in den Tabellen Tab. A 26 bis Tab. A 39 aufgeführt. Bei den Resistenzgruppen Aminocumarine, Bacitracin, Fluorchinolone, Fusidinsäure, Rifampin, Sulfonamide, Fosfomycin, Elfamycin und *Mycobacterium tuberculosis* spezifische Resistenzen, sowie dem Auftreten von Multiresistenzen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Einstreugruppen festgestellt werden.

Die SummeARG der drei Einstreugruppen ist in Abb. 7 dargestellt. Die Abbildung zeigt höhere SummeARG Werte in den Betrieben der Gruppen „Exkrement“ und „Stroh und Kalk“, als bei Betrieben der Gruppe „Kompostierung“. Dieser Unterschied wird von den statistischen Analysen als signifikant bestätigt.

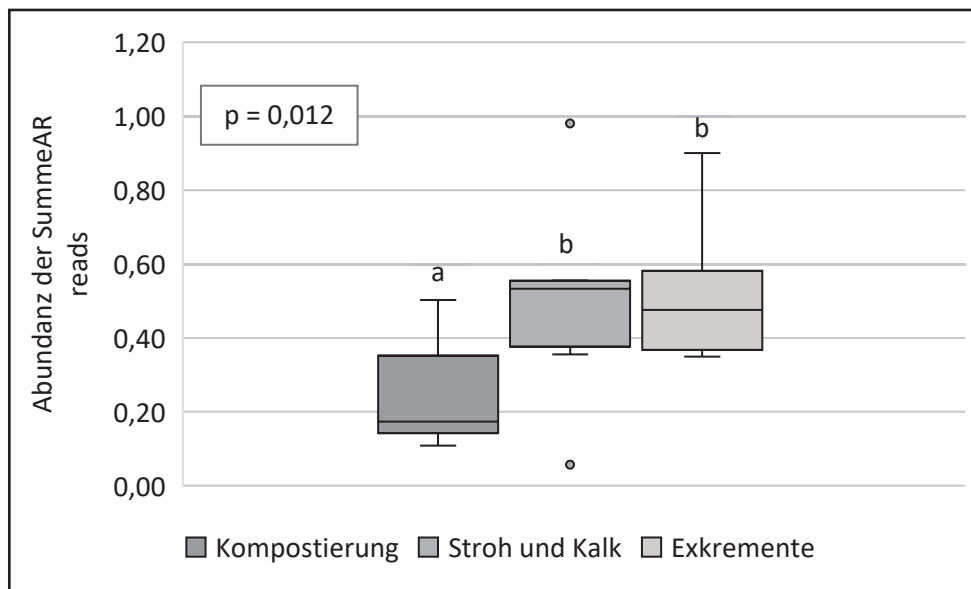


Abb. 7: Abundanzen der SummeARG Reads für die Einstreugruppen „Kompostierung“, „Exkrement“ und „Stroh und Kalk“ mit Signifikanz nach Gruppen a und b, Signifikanzniveau der ANOVA  $p = 0,012$

Die gemittelten Abundanzen je Einstreugruppe und Resistenzgruppe sind in Abb. 8 dargestellt. Die Abundanzen der Resistenzgruppen Aminoglykoside und MLS zeigten bei allen Betrieben die höchsten Abundanzen. Bei beiden Resistenzgruppen ist das Vorkommen der Resistenzen in der Gruppe „Kompostierung“ jeweils signifikant niedriger zu den Gruppen „Stroh und Kalk“ (Aminoglykoside  $p = 0,016$ ; MLS  $p = 0,006$ ) und „Exkrement“ (Aminoglykoside  $p = 0,018$ ; MLS  $p = 0,006$ ). Die Abundanzen der Resistenzgruppen Phenicol und  $\beta$ -Laktam sind insgesamt niedriger, verglichen mit

Aminoglykosid und MLS Abundanzen. Dabei zeigt die Einstreuerguppe „Exkremente“ signifikant höhere Abundanzen bei Phenicol Resistenzen (zu „Kompostierung“  $p = 0,006$ ; zu „Stroh und Kalk“  $p = 0,022$ ), bei  $\beta$ -Laktam Resistenzen besteht nur zur „Stroh und Kalk“ Gruppe ein solcher signifikanter Unterschied ( $p = 0,041$ ). Mit sehr niedrigen Abundanzen wurden kaP und Glykopeptid Resistenzen nachgewiesen. Bei beiden Resistenzgruppen sind die Abundanzen der Gruppe „Kompostierung“ signifikant niedriger, verglichen zur Gruppe „Stroh und Kalk“ (kaP  $p = 0,039$ ; Glykopeptide  $p = 0,026$ ).

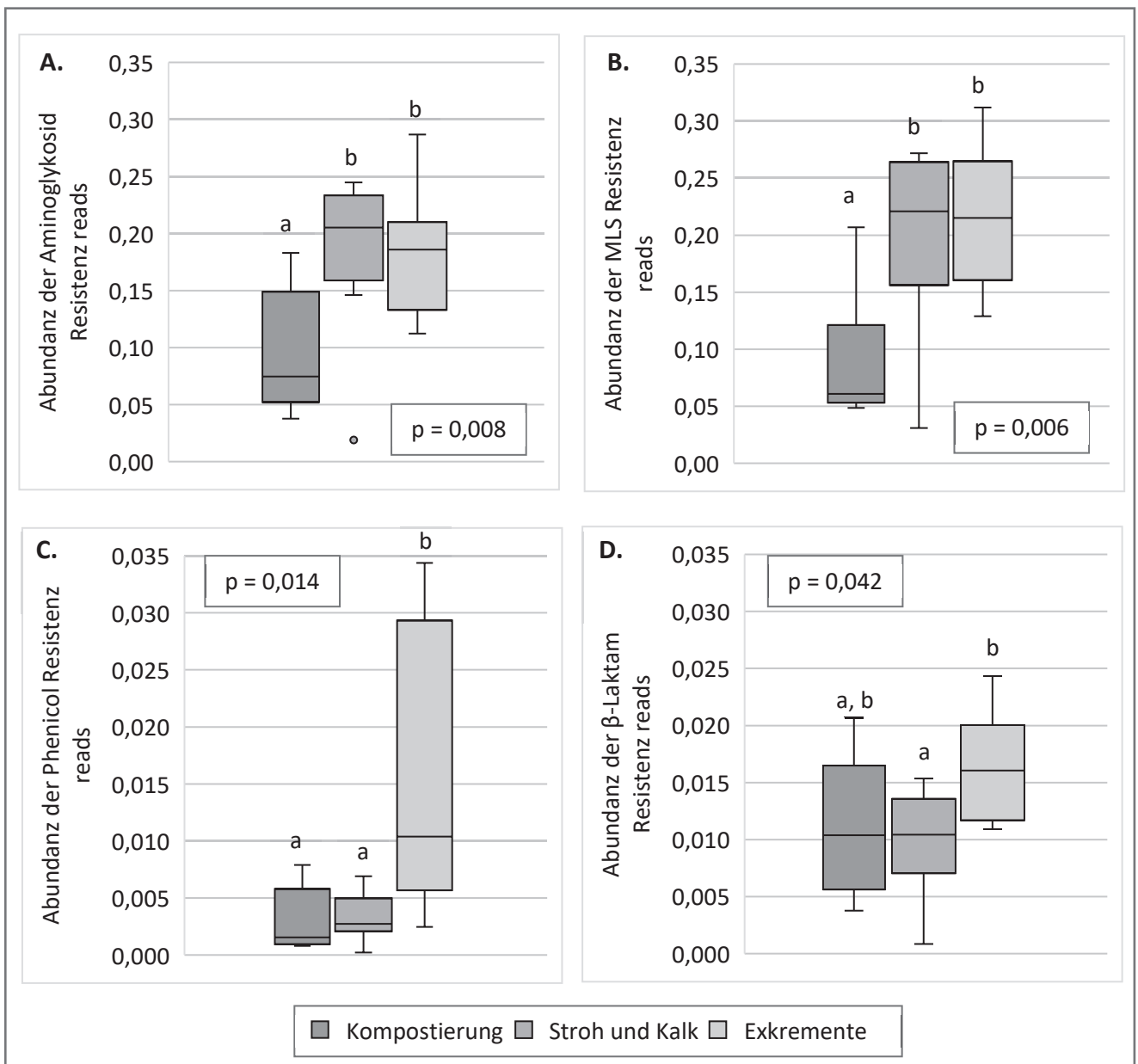
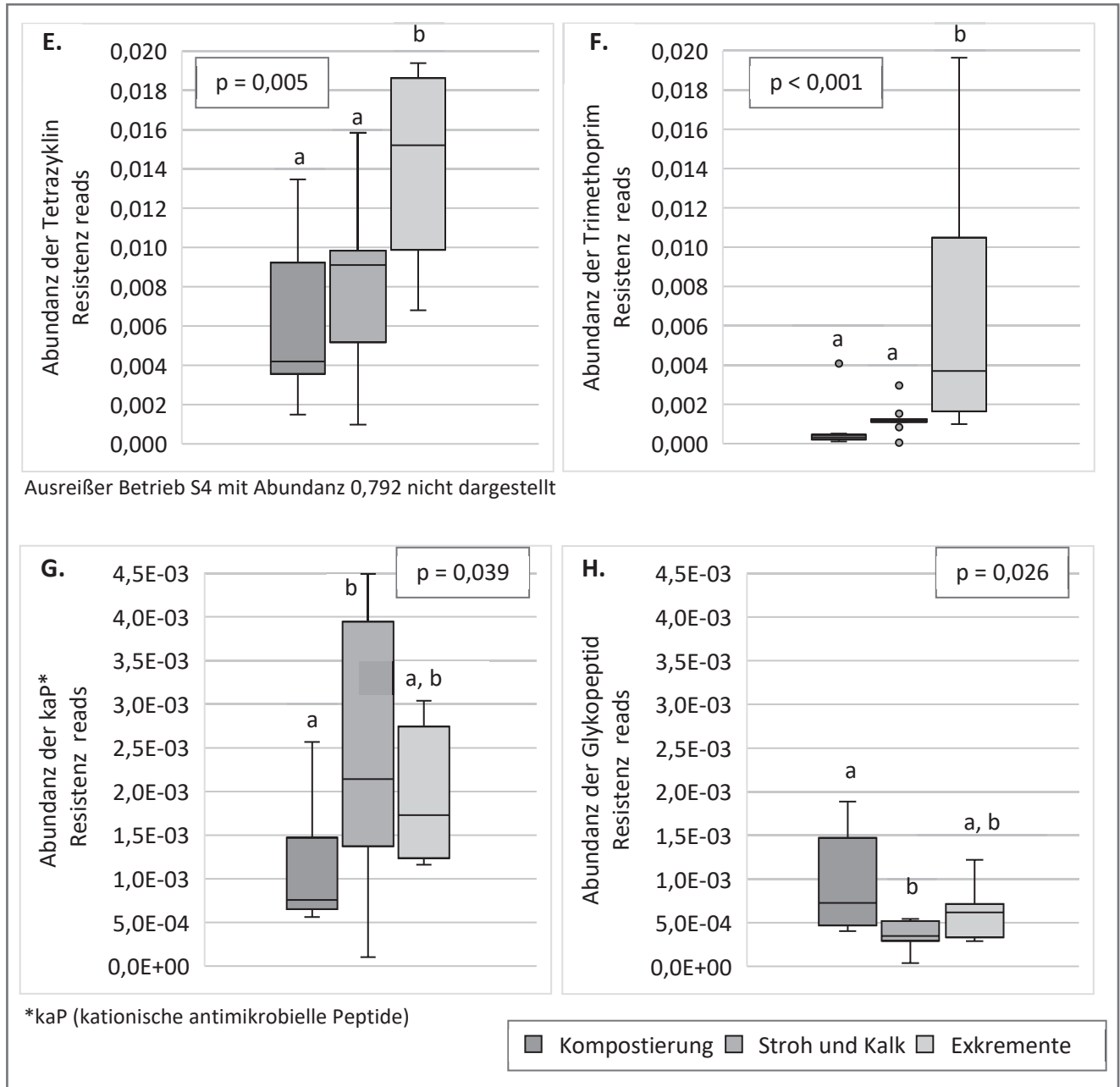


Abb. 8: Abundanzen von Antibiotikaresistenzgruppen (A. bis H.) mit signifikanten Unterschieden zwischen den Einstreuerguppen „Kompostierung“, „Exkremente“ und „Stroh und Kalk“, eingeteilt nach Signifikanz in Gruppen a und b





## 5 Diskussion

### 5.1 Mikrobiom Ergebnisse

#### 5.1.1 Vorkommen verschiedener Phyla im Mikrobiom der Einstreu

Das Mikrobiom in Einstreu-Materialien ist bislang wenig erforscht. In mehreren Studien konnten Phyla wie *Pseudomonadota*, *Actinomycetota*, *Bakteroidota* und *Bacillota* so, wie auch in dieser Arbeit als dominierende Phyla im Mikrobiom von RMS und weiteren organischen Einstreumaterialien

identifiziert werden (Zhang *et al.*, 2019; Wu, X. *et al.*, 2022; Ray *et al.*, 2022). Auch die weniger häufig vertretenen Phyla *Deinococcota* und *Planctomycetota* wurden bereits in Einstreumaterial detektiert (Zhang *et al.*, 2019; Wu, X. *et al.*, 2022).

Ray *et al.* (2022) beobachteten einen signifikanten Anstieg im Vorkommen des Phylum *Bacillota* in NMOE bei Benutzung der Einstreu im Stallumfeld, während der Anteil an *Pseudomonadota* zurückging. Sie konnten in allen untersuchten Einstreumaterialien (RMS, Sand, NMOE, recycelter Sand) signifikante Unterschiede zwischen benutzter und unbenutzter Einstreu finden, wobei RMS die geringsten Veränderungen aufwies. Sie schlussfolgern, dass sich das Mikrobiom durch den Kontakt mit Kühen verändert und fanden heraus, dass die Zusammensetzung des Mikrobioms mit der Nutzung zunehmend ähnlicher wird (Ray *et al.*, 2022). Weiterhin zeigt sich in den Ergebnissen beider Arbeiten der Trend, dass das Einstreu-Mikrobiom vom Einstreumaterial abhängig ist. Ray *et al.* (2022) fanden heraus, dass die Art der Einstreu einen stärkeren Einfluss (erklärt 9,6-14,1% der Variabilität) auf die Mikrobiom-Zusammensetzung hat als der Einstreustatus (vor und nach Benutzung durch Kühe mit 5,1-6,6% der Variabilität). Gleichzeitig zeigt sich, dass ein Großteil der Variabilität mit keinem der beiden Faktoren erklärt werden kann und so andere, in der Studie nicht weiter betrachtete Faktoren eine große Rolle für die Mikrobiom-Zusammensetzung in der Einstreu spielen (Ray *et al.*, 2022). Da der Anteil von *Pseudomonadota* mit der Nutzung sinkt, kann angenommen werden, dass dieses Phylum zur natürlichen Einstreumikrobiota gehört. Gleichzeitig könnte der von Ray *et al.* (2022) detektierte, mit der Nutzung steigende Anteil von *Bacillota* erklären, warum in den Einstreugruppen „Exkrement“ und „Stroh und Kalk“ signifikant höhere Werte für *Bacillota* gemessen wurden als in der Gruppe „Kompostierung“.

Auch das erhöhte Vorkommen von *Bakteroidota* in der Gruppe „Kompostierung“ wird durch frühere Studien gestützt. In Kompostproben waren *Pseudomonadota* und *Bakteroidota* die dominanten Phyla mit einer Abundanz von bis zu 54,1 % (Sun *et al.*, 2020). Im Vergleich dazu zeigten RMS- und NMOE-Proben aus anderen Studien zwar ebenfalls eine hohe Abundanz von *Bakteroidota*, jedoch mit geringeren Werten von 17,95 % (Zhang *et al.*, 2019) und  $28,5 \% \pm 2,7 \%$  (Ray *et al.*, 2022). Arten des Phylum *Bakteroidota* sind unter anderem bekannt dafür, den Abbau und die Verfügbarkeit von komplexen Kohlenhydraten zu fördern und das Genus *Flavobacterium*, welches zu den *Bakteroidota* gehört, spielt eine Rolle in der Denitrifikation während des Kompostierungsprozesses (Partanen *et al.*, 2010; Bhatia *et al.*, 2013). Die Studie von Sun *et al.* (2020) zeigte zudem, dass das Vorkommen von *Bakteroidota* während des Kompostierungsprozesses zeitabhängig variiert. Die Abundanz nahm ab einem Zeitraum von zwei Tagen und länger signifikant zu (Sun *et al.*, 2020). Diese Ergebnisse stützen

die in dieser Arbeit beobachtete erhöhte Präsenz von *Bakteroidota* in den Proben der „Kompostierungs“ Gruppe.

Genauer könnte eine Charakterisierung des Mikrobioms auf der taxonomischen Ebene der Bakterienfamilien sein. Dies war jedoch in dieser Arbeit aufgrund des großen Umfangs der Daten und des Vorkommens vieler Bakterienfamilien mit sehr niedrigen Abundanzen nicht möglich. Um die Dynamik des Mikrobioms in als Einstreu genutztem Kompostmaterial besser zu verstehen, sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich, sowohl vor als auch während der Nutzung als Einstreu.

#### 5.1.2 Diversität des Mikrobioms in der Einstreu

Die ermittelten Diversitätsindizes zeigen, dass Kompostierungsmaterial als Einstreu die vielfältigste mikrobielle Umgebung mit einer gleichmäßigen Verteilung der Mikroorganismen bieten. Die „Stroh und Kalk“-Gruppe wies eine moderate Diversität auf, während die geringste innere Diversität und Gleichmäßigkeit in der Gruppe „Exkrement“ gemessen wurde. In der Literatur finden sich teilweise ähnliche Zusammenhänge. So zeigten Ray *et al.* (2022), dass NMOE eine niedrigere Diversität aufweist als Sand, recycelter Sand oder RMS. In ihrer Untersuchung wies RMS auf verschiedenen taxonomischen Ebenen die höchste Alpha-Diversität, gemessen am Inverse-Simpson-Index, sowie eine höhere Gleichmäßigkeit auf. Dass dieser Trend in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte, kann auf die etwas anderen Einstreumaterialien zurückzuführen sein. Ray *et al.* (2022) haben Güllesubstrat untersucht, während in dieser Arbeit die Gruppe „Exkrement“ sowohl Güllesubstratproben als auch mit Stroh vermengten Mist betrachtet hat. Zudem haben Ray *et al.* (2022) die Alpha-Diversität auf Basis linearer gemischter Modelle und mit anderen Diversitätsindizes ermittelt, die auf der Dominanz von verschiedenen Arten basiert. Beide Arbeiten kommen jedoch zu dem Schluss, dass recycelte Einstreumaterialien tendenziell ein diverseres Mikrobiom besitzen als NMOE wie gekalktes Stroh (Ray *et al.*, 2022).

Die Studie von Sun *et al.* (2020) identifizierte zudem eine zeitliche Variation der Diversität während des Kompostierungsprozesses. Der Shannon-Index stieg innerhalb der ersten 24 Stunden von 4,27 auf 4,59, fiel am zweiten Tag auf 3,82, erreichte nach neun Tagen mit 4,75 ein Maximum und sank nach 20 Tagen auf 3,66 (Sun *et al.*, 2020). Dies deutet darauf hin, dass die Diversität von Kompostmaterial als Einstreu nicht statisch ist, sondern sich über die Zeit erheblich verändert (Sun *et al.*, 2020). Zukünftige Studien sollten deshalb verstärkt die zeitliche Entwicklung des Mikrobioms berücksichtigen. Insgesamt sollten für eine umfassende Bewertung des Einstreu-Mikrobioms und seiner Diversität künftig weitere Parameter zum Status der Einstreu, zur Art und Zusammensetzung sowie bio- und physikochemische Parameter der Einstreu bestimmt werden, um die Daten einer Diversitätsanalyse

umfassend auswerten und mit anderen Studien vergleichbar machen zu können (Dundore-Arias *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2020; Ray *et al.*, 2022).

### 5.1.3 Vorkommen von mit Mastitis assoziierten Bakterienspezies und Gattungen

Die Ergebnisse der Metagenomsequenzierung zeigen, dass im Kompostierungseinstreu die Abundanz von *Corynebacterium* als auch *Clostridium*, *E. coli*, *S. aureus* und *S. uberis* signifikant niedriger gegenüber den anderen Einstreugruppen ausfällt, während es zwischen den Gruppen „Stroh und Kalk“ und „Exkrementen“ keine signifikanten Unterschiede gab.

Diese Spezies und Gattungen wurden ebenfalls bereits in anderen Studien in RMS, Sand, Stroh und holzbasierter Einstreumaterialien detektiert (Eckelkamp *et al.*, 2016; Rowbotham und Ruegg, 2016; Patel *et al.*, 2019; Robles *et al.*, 2020; Ray *et al.*, 2022). Die Abundanz der mit Mastitis assoziierten Arten passt zu der Studienlage, dass coliforme Bakterien während der Hygienisierungsphase begünstigt werden, *Clostridium* nach der Kompostierung im Mikrobiom zu finden war und Staphylokokken und Streptokokken durch die hohen Temperaturen reduziert oder abgetötet wurden (Eckelkamp *et al.*, 2016; Biasato *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020). Dahingegen haben Black *et al.* (2014) Wachstum dieser und weiterer Mastitis-Erreger in Kompostmaterial nachweisen können, auch im Temperaturbereich zwischen 55 bis 65 °C. Sie betonen, dass das Überleben oder Hemmen von Mastitis-Erregern neben der Temperatur auch von weiteren Faktoren abhängig ist, wie dem Feuchtigkeitsgehalt, dem Kohlenstoff-Stickstoff Verhältnis und dem Platz pro Kuh. Ein gutes Einstreumanagement ist entscheidend, um das mikrobiologische Risiko und das Risiko der Mastitis einzudämmen (Black *et al.*, 2014).

Zum Vorkommen von *Corynebacterium* in der Einstreu ist, obwohl die Art bereits in Einstreu detektiert werden konnte, wenig bekannt (Ray *et al.*, 2022). Bekannt ist, dass *Staphylococcus*, *Streptococcus* und *Corynebacterium* in benutzter Einstreu im Vergleich zu unbenutzter Einstreu eine erhöhte Abundanz aufweisen (Ray *et al.*, 2022). Daher wäre es möglich, dass auch *Corynebacterium* durch den Kompostierungsprozess, etwa die hohen Temperaturen oder sich ändernden chemischen Eigenschaften in der Einstreu im Wachstum gehemmt wird. Nach Ridaura *et al.* (2018) ist *Corynebacterium* eine dominante Spezies im Hautmikrobiom, die sowohl schützende als auch entzündungsverstärkende Eigenschaften aufweisen kann. Beide Studien lassen vermuten, dass die hohe Abundanz dieser Bakteriengattungen und -Spezies in den untersuchten Einstreuproben auf den Kontakt der Haut der Tiere mit der Einstreu zurückzuführen ist (Ridaura *et al.*, 2018; Ray *et al.*, 2022). Die hohe Abundanz von *E. coli* ist auf das ubiquitäre Vorkommen der Vertreter dieser Art zurückzuführen sowie auf das Vorkommen im Gastrointestinaltrakt und daher auf den Kontakt von Exkrementen mit dem Einstreu (Klaas und Zadoks, 2018; Newell und La Ragione, 2018).

Die Gründe dafür, dass sich die Abundanzen der betrachteten Spezies und Gattungen zwischen NMOE und RMS Einstreu nicht signifikant unterschieden, haben Ray *et al.* (2022) näher untersucht. Ihre statistischen Analysen ergaben, dass das Vorkommen pathogener Bakterien nicht signifikant vom Einstreumaterial, sondern vielmehr vom Nutzungsstatus der Einstreu (benutzt oder unbenutzt) abhing (Ray *et al.*, 2022). Da in der Gruppe „Exkrement“ sowohl nicht recycelter Mist als auch recyceltes, teils kompostiertes Gülleseparat verwendet wird und im Gegensatz zu den Betrieben der „Kompostierungs“ Gruppe keine wiederholten hohen Temperaturen in der Einstreu erreicht werden, sind die Abundanzen pathogener Arten in den Kompostierungsgruppen niedriger.

Die Kompostierungseinstreu zeigt signifikant niedrige Abundanzen bei den häufig als Mastitis-Erreger identifizierten Spezies *S. aureus* und Coliformen, wie *E. coli*. Weitere Coliforme, wie *Klebsiella* wurden in allen Einstreuarten nur in geringer Abundanz nachgewiesen. *S. uberis*, welcher nach Schmenger und Krömker (2020) ein wichtiger umweltassoziierter Mastitis-Erreger ist und in Deutschland häufig klinische Mastitis verursacht, hatte eine niedrigere Abundanz als andere betrachtete Mastitis assoziierte Spezies. Von der Abundanz der mit Mastitis assoziierten Arten lässt sich nicht direkt auf eine Prävalenz bei verschiedenen Einstreuarten schließen. Andererseits ist bekannt, dass die Reduktion von Umweltpathogenen eine wichtige Strategie zur Prävention von Umweltmastitis darstellt, dass wie die Ergebnisse der Mikrobiomanalyse zeigen, Kompostierungseinstreu signifikant niedrigere Abundanzen von Mastitis-Erregern aufweist und, dass ein Wechsel zu Kompostierungseinstreu die Prävalenz von Mastitis senken kann (Barberg *et al.*, 2007; Klaas und Zadoks, 2018).

#### 5.1.4 Vorkommen von mit DD assoziierten Bakterienspezies und Gattungen

Auch bei den mit DD assoziierten Bakterienspezies und Gattungen zeigt sich eine signifikant niedrigere Abundanz in der Kompostierungseinstreu gegenüber den anderen Einstreu-Gruppen. Die Gattungen *Porphyromonas*, *Treponema* und *Mycoplasma* wiesen über alle Einstreugruppen hinweg eine eher geringe Abundanz auf. Im Vergleich zu den mastitisassozierten Spezies *E. coli* und *S. aureus* traten *Treponema spp.* in allen Einstreuarten in noch geringeren Mengen auf. Dennoch wurden im Kompostierungseinstreu signifikant niedrigere Abundanzen von *T. phagedenis* und *T. denticola* im Vergleich zur Gruppe „Stroh und Kalk“ festgestellt. Ebenso war das Vorkommen der Gattungen *Porphyromonas* und *Mycoplasma* in der Kompostierungseinstreu signifikant reduziert. Zwischen den Gruppen „Exkrement“ und „Stroh und Kalk“ konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Andere Studien haben gezeigt, dass der Nachweis von *Treponema* Spezies in Umwelt- und Exkrementproben methodische Herausforderungen mit sich bringt (Evans *et al.*, 2012a; Zinicola *et al.*,

2015b; Klitgaard *et al.*, 2017). Evans *et al.* (2012) berichten über Schwierigkeiten bei der Kultivierung, insbesondere bei Exkrementproben und durch die anspruchsvollen und anaeroben Kultivierungsbedingungen. In ihrer Studie konnten Evans *et al.* (2012) in Proben des Gastrointestinaltraktes (GI) und in Exkrement Proben keine mit DD assoziierten *Treponema* spp. mittels PCR nachweisen. Allerdings fiel die PCR für das *Treponema* Genus in diesen Proben positiv aus. Zinicola *et al.* (2015) haben *T. denticola*, *T. medium* und *T. phagedenis* im GI und in Exkrementproben nachweisen können und gehen daher davon aus, dass diese Spezies ubiquitär im Verdauungstrakt von Wiederkäuern sowie in Exkrementen vorkommen. Eine andere Studie von Evans *et al.* (2011) stimmt diese teilweise zu. Dort konnten auch *Treponema*-Spezies aus dem Gastrointestinaltrakt und Fäzes isoliert werden, diese waren jedoch phylogenetisch deutlich von den für DD verantwortlichen Stämmen unterschiedlich waren (Evans *et al.*, 2011). Sie schlussfolgern aus ihren Ergebnissen, dass *Treponema* in Exkrementen und dem Gastrointestinaltrakt möglicherweise nur für eine begrenzte Zeit überleben kann, wodurch dennoch ein potenzielles Infektionsrisiko von Exkrementen im Stallumfeld resultieren kann (Evans *et al.*, 2011, 2012). Auch Klitgaard *et al.* (2017) bestätigen, dass Gülle und Exkremente kein primäres Reservoir für *Treponema* darstellen, jedoch konnten sie *T. denticola*, *T. medium* und *T. phagedenis* mittels Sequenzierung in Proben aus dem Stallumfeld nachweisen.

Mit der Anwendung Sequenz-basierter Methoden greifen sie die von Evans *et al.* (2012) festgestellten Problem bei der Anwendung anderer Nachweismethoden auf (Evans *et al.*, 2012; Klitgaard *et al.*, 2017). Sie empfehlen zum Nachweis von Treponemen DNA aus Umweltproben die Anwendung gezielter Deep-Sequencing<sup>9</sup> Methoden. Bei der Anwendung dieser Methoden ist allerdings zu beachten, dass die Abundanz von DNA-Reads analysiert wird, welche nicht gleichzusetzen ist mit der Menge lebensfähiger Organismen, wie sie mit Kultivierungsmethoden bestimmt werden.

Die signifikant niedrigere Abundanz von *T. phagedenis* und *T. denticola* in der Kompostierungseinstreu im Vergleich zur Gruppe „Exkremente“ kann mit den hohen Temperaturen während der Kompostierung erklärt werden. Bell *et al.* (2023) zeigten, dass die während des Kompostierungsprozesses erreichten Temperaturen zu einer signifikanten Reduktion von *T. phagedenis* führen. Weiterhin können die in verschiedenen Studien aufgetretenen positiven Befunde von *Treponema* Spezies in Exkrementen können die signifikant höheren Abundanzen gegenüber der Kompostierungsgruppe erklären. Weiterhin wurde bereits gezeigt, dass *T. phagedenis* nur einige Minuten in Stroh überlebt, während die Spezies in Sand oder Gülleseparat Tage bis Wochen überleben (Bell *et al.*, 2023). Zudem reduziert der Einsatz von Kalk die Überlebensdauer noch weiter

---

<sup>9</sup> Sequenziermethode, bei der große Mengen genetischen Materials mit hoher Tiefe analysiert werden

(Bell *et al.*, 2023). Dass der Unterschied zwischen „Stroh und Kalk“ und „Exkrement“ Gruppen im Vorkommen der *Treponema* Spezies nicht signifikant war, kann an den in beiden Gruppen heterogenen Einstreumaterialien liegen. Durch die nur teilweise häufige Verwendung von Kalk in den Betrieben der „Stroh und Kalk“ Gruppe, sowie das Zusammenfassen von Gülleseparat und Mist mit variierendem Stroh Anteil in die Gruppe „Exkrement“ kann die Daten zu sehr gestreut haben. Weitere Forschung mit mehr Betrieben und je Gruppe ähnlicheren Einstreumaterialien könnten eindeutiger Ergebnisse erzielen.

Trotz dem nachgewiesenen Vorkommen pathogener *Treponema* Spezies in Einstreuproben in dieser Arbeit und anderen Studien, scheinen andere Faktoren eine größere Bedeutung für die DD-Prävalenz zu haben. So wurden in Betrieben mit akuten DD-Problemen pathogene *Treponema* Spezies in höheren Mengen nachgewiesen (Klitgaard *et al.*, 2017). Die Abundanzen der mit DD assoziierten *Treponema* Spezies in der Einstreu sind daher wahrscheinlich auch von der Seuchenlage zum Zeitpunkt der Probenahme bedingt. Klitgaard *et al.* (2017) wiesen pathogene *Treponema*-Spezies in sehr niedrigen Abundanzen (0–0,6 % der *Treponema*-Amplikons) in Exkrementproben nach. Das Vorkommen dieser Spezies stand signifikant ( $p < 0,001$ ) im Zusammenhang mit der DD-Herdenprävalenz. Die in ihrer Studie sowie in dieser Arbeit festgestellten generell niedrigen Abundanzen der *Treponema* Spezies weisen darauf hin, dass ein kurzzeitiges Überleben in Gülle und Einstreu möglich ist, jedoch andere Übertragungswege, wie direkter Hautkontakt oder Kontamination über Klauenbearbeitungswerkzeuge, eine größere Rolle für die Prävalenz von DD spielen könnten (Klitgaard *et al.*, 2017).

## 5.2 Resistom Ergebnisse

Die Untersuchung der ARG in verschiedenen Einstreuarten ergab deutliche Unterschiede in der Resistenzbelastung der Materialien. Über alle Einstreugruppen konnten Resistenzen zu den in 2023 vorwiegend in Milchviehbetrieben angewandten Antibiotikaklassen Penicilline, Aminoglykoside, Sulfonamide und Tetrazykline detektiert werden (Arbeitsgruppe Antibiotikaresistenz des BVL und BfR, 2024). Diese Resistenzgruppen wiesen in allen untersuchten Einstreugruppen hohe Abundanzen auf. So erreichten Aminoglykosid-Resistenzen einen Höchstwert in der Abundanz der Resistenzgen-reads von 0,288, gefolgt von Sulfonamid- (0,077), Tetrazyklin- (0,065) und  $\beta$ -Laktam-Resistenzen (0,024). Multiresistenzen traten zwar auf, jedoch ohne signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Einstreuarten. Da bis zu 75 % eines verabreichten Antibiotikums ausgeschieden werden, kann die Resistenzbelastung stark in Abhängigkeit zur antibiotischen Behandlung im Milchviehbetrieb stehen (Amarakoon *et al.*, 2016; Spielmeyer, 2018). Weiterhin könnte das die sehr hohen Abundanzen in den



auf Exkrementen basierenden Einstreuproben erklären. Die Einstreugruppe "Exkremente" wies signifikant höhere Abundanzen von Phenicol-, Tetrazyklin- und Trimethoprim-Resistenzen gegenüber den anderen Gruppen auf. Zudem zeigte diese Gruppe eine erhöhte  $\beta$ -Laktam-Resistenz im Vergleich zu „Stroh und Kalk“. In einer Studie wurde bereits gezeigt, dass einige Resistenzgene, die Resistenzen für Aminoglykoside und Tetrazykline codieren, durch Kompostierung oder Lagerung von Exkrementen reduziert werden können (Zalewska *et al.*, 2024). Nicht reduziert haben sich die Abundanzen von Sulfonamid-, Phenicol- und Trimethoprim ARG. Auch Jauregi *et al.* (2021) haben beobachtet, dass frische Exkremente eine höhere Resistenzbelastung aufweisen, als gelagerte Gülle oder Mist. Besonders Exkremente mit Antibiotikarückständen begünstigten aufgrund des Selektionsdrucks die Etablierung resistenter Stämme (Jauregi *et al.*, 2021). Die Eliminierung durch Kompostierung scheint bei den Proben der Kompostierungsbetriebe die Abundanz der ARG signifikant gesenkt zu haben gegenüber den hauptsächlich frischen und nur teilweise bearbeiteten Exkrementen auf denen die Einstreu der „Exkremente“ Gruppe basiert.

Die Kompostbetriebe wiesen nicht nur eine niedrigere Summe der ARG auf, sondern auch signifikant niedrigeren Abundanzen der Resistenz-reads bei unter anderem den Aminoglykosid und MLS Resistenzen. Eine weitere Studie, in der nach 14 Tagen aerober Kompostierung mehr als 83 % der ARG eliminiert werden konnte, stützen die These, dass der im Kompoststall andauernde Kompostierungsprozess die vorherrschenden ARG eindämmt (Zhang *et al.*, 2019). Allerdings zeigen andere Studien auch, dass diese Reduktion nicht absolut ist. So wurde in kompostiertem Schweinemist in der Studie von Wang *et al.* (2015) sogar höhere Abundanzwerte nach der Kompostierung bei Genen, die Effluxpumpen codieren und Sulfonamid Resistenzgenen festgestellt. Sie erklären das durch einen vermehrt stattfindenden Integron-basierten horizontalen Gentransfer in der mesophilen Phase. Auch Zalewska *et al.* (2024) hat festgestellt, dass die Abundanzen der ARG mit den Kompostierungsphasen schwanken.

Weitere Faktoren stehen im Zusammenhang mit dem Vorkommen und der Weitergabe von ARG in verschiedenen Umgebungen. So begünstigt die Co-Existenz von Resistenzgenen und mobilen genetischen Elementen die Übertragung von ARG und trägt somit zur langfristigen Persistenz von Resistenzen in Einstreumaterialien bei (Oliver *et al.*, 2020). Dazu beeinflussen auch Nährstoffverfügbarkeit und Schwermetallkonzentrationen das Wachstum sowie die Fitness resistenter Bakterienstämme und können deren Vermehrung erheblich begünstigen (Oliver *et al.*, 2020). Weiterhin hängt die Eliminierung von ARG wie auch die Eliminierung pathogener Spezies während des Kompostierungsprozesses von Parametern im Einstreu ab, wie Temperatur, pH-Wert und Feuchtigkeit (Pezzolla *et al.*, 2021). Die Betriebe der „Stroh und Kalk“ Gruppe zeigen im Vergleich zu den anderen



Einstreuarten moderate ARG Abundanzen. Der niedrige Feuchtigkeitsgehalt in Stroh und der zusätzlich höhere pH-Wert in gekalktem Stroh, sowie die niedrige Exposition durch weniger Kontakt zu Exkrementen im Vergleich zu den anderen Einstreugruppen lässt daher vermuten, dass auch eine moderate Entwicklung und Persistenz von ARG und ARG-tragenden Bakterien in diesem Einstreu stattfindet.

### 5.3 Kritik der verwendeten Methoden

#### 5.3.1 Probenahme und DNA-Extraktion

Die Probenahme ist ein zentraler Faktor, der die Ergebnisse dieser Arbeit beeinflusst, da alle Analysen auf der in den Proben enthaltenen DNA aufbauen. Vorherige Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass sich das Mikrobiom in der Einstreu saisonal verändern kann (Nguyen et al., 2020). Die Proben für diese Arbeit wurden nur zu einem Zeitpunkt im Jahr entnommen, sodass saisonale Unterschiede nicht berücksichtigt werden können und die Ergebnisse eine Momentaufnahme der Mikrobiome und Resistome in den Betrieben darstellen.

Weiterhin können die Ergebnisse nicht eindeutig der Art des Einstreumaterials zugeordnet werden. So kann das Haltungssystem, in den Gruppen „Exkremente“ und „Stroh und Kalk“ der Liegeboxenstall und der Tiefstreulaufstall in der Gruppe „Kompostierung“ die Ergebnisse zum Mikrobiom und Resistom auch beeinflussen. Jedoch spiegelt diese Methodik die Praxisbedingungen realitätsnäher wider. Auch die, wie in Abschnitt 2.1 und 2.4.1 beschrieben, der Praxis nahen unterschiedliche Betriebsgröße und die in der Haltung mit Kompostierungsbetrieben niedrigere Anzahl der Tiere pro Fläche beeinflussen wahrscheinlich die erhobenen Daten. Wenn diese Faktoren bei der Interpretation der Daten dieser Arbeit bedacht werden, können daraus praxisorientierte Empfehlungen zur Verbesserung betrieblicher Abläufe abgeleitet werden.

Auch die DNA-Extraktion kann die Sequenzierungsergebnisse beeinflussen. Eine Studie von Seethalakshmi *et al.* (2024) zur DNA Extraktion mittels verschiedener Kits aus Rinderexkrementen hat gezeigt, dass unterschiedliche DNA-Extraktionskits zu Verzerrungen führen können, indem bestimmte mikrobielle Gemeinschaften über- oder unterrepräsentiert werden. Das in dieser Arbeit verwendete Kit zeigte in der Studie von Seethalakshmi *et al.* (2024) eine selektiv geringere Abundanz von gram-positiven Bakterien wie *Planococcaceae* und *Spirochaetaceae*. Dies wird auf das Fehlen eines Bead-Beating<sup>10</sup>-Schrittes zum effektiven Zellaufschluss zurückgeführt (Seethalakshmi *et al.*, 2024). Um

---

<sup>10</sup> mechanische Methode zum Zellaufschluss mittels Metall- oder Glaskugeln

diesem Bias entgegenzuwirken, wurde in dieser Arbeit das Protokoll des DNA-Extraktion Kits nach Knudsen *et al.* (2016) ein zusätzliches Bead-Beating im TissueLyser mit Metallkugeln ergänzt. Nach Mott *et al.* (2022) werden durch den zusätzlichen Bead-Beating Schritt mehr als doppelt so hohe DNA-Konzentrationen (ohne Beads  $86,6 \pm 3,4$  ng/ $\mu$ L; mit Beads  $247,65 \pm 3,25$  ng/ $\mu$ L) erreicht, als ohne diesen zusätzlichen Schritt.

### 5.3.2 Anwendung der Metagenomsequenzierung zur Charakterisierung von Mikrobiom und Resistom

In dieser Arbeit wurde eine Shotgun-Metagenomsequenzierung angewandt. Dabei wird die DNA fragmentiert, amplifiziert und einer Hochdurchsatz-Sequenzierung (Illumina) unterzogen. Die so generierten Reads wurden bioinformatisch ausgewertet und teils mit Referenzdatenbanken verglichen, zur taxonomischen Identifikation oder Detektion von Resistenzgenen (Quince *et al.*, 2017). Diese Sequenzierungsmethoden bieten bedeutende Vorteile gegenüber kulturbasierten Methoden, welche nur wachstumsfähige Bakterien und deren AR-Gene erfassen. Boolchandani *et al.* (2019) betonen, dass die kontinuierliche Weiterentwicklung der Technik die Verfügbarkeit von Referenzsequenzen bereits erhöht hat und die Kosten weiter senken wird. Limitationen der Methode entstehen durch unzureichende Qualität der Sequenzierdaten und unvollständige Referenzdatenbanken, die in der weiteren Analyse der Sequenzierdaten angewandt werden Boolchandani *et al.* (2019). Die Sequenziertiefe ist ein entscheidender Faktor für die Qualität der Ergebnisse der Metagenomsequenzierung. Gweon *et al.* (2019) empfehlen eine Sequenziertiefe von mindestens 80 Millionen Reads pro Probe um die gesamte Vielfalt der ARG in einer Probe abzudecken. Die Probe mit der niedrigsten Sequenziertiefe in dieser Arbeit liegt mit  $9,54 \cdot 10^7$  Reads bereits knapp über dieser Empfehlung.

Weiterhin wurden Datenbanken zur Analyse der Metagenomdaten gewählt, die möglichst aktuell und umfassend sind. So wurde die Kraken2 Version der Kraken Pipeline verwendet, die eine präzisere Klassifikation erlaubt, durch ein anderes Algorithmus Design und eine umfassendere Referenzdatenbank (Wood *et al.*, 2019). Zudem können falsch positive Treffer besser gefiltert werden (Wood *et al.*, 2019). Für die Detektion der Resistenzgene wurde die Datenbank MEGARes ausgewählt. Die Datenbank ist, anders als andere Referenzbanken für Resistenzgene, für groß angelegte, umweltbezogene Metagenomsequenzensätze konzipiert (Lakin *et al.*, 2017). Daher kann hierbei die Auswertung auch statt auf Gen-Ebene direkt auf höheren Ebenen wie Resistenzmechanismen oder -Klassen durchgeführt werden (Lakin *et al.*, 2017). So wird das Risiko von fehlerhafter Charakterisierung der Mikrobiome und Resistome in den Einstreugruppen reduziert.

## 6 Zusammenfassung

Die vorliegende Masterarbeit untersucht das Mikrobiom und Resistom in unterschiedlichen Einstreumaterialien, die in der Milchviehhaltung in Liegeboxenställen und Tiefstreuställen verwendet werden. Ziel der Arbeit war es, herauszufinden, inwiefern sich das Mikrobiom und das Vorkommen von Antibiotikaresistenzgenen zwischen den Einstreumaterialien Mist und Gülleseparat, gekalktes Stroh und Kompostierungsmaterial unterscheiden und, erste Erkenntnisse zu sammeln, um das mikrobielle Risiko, das vom noch wenig erforschten Kompostierungsmaterial ausgehen kann, besser einschätzen zu können.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden an 26 Milchviehbetrieben Proben aus den jeweiligen Einstreuarten entnommen, die DNA extrahiert und eine Metagenomsequenzierung durchgeführt. In der anschließenden bioinformatischen Analyse der Sequenzdaten wurden verschiedenen Pipelines eingesetzt, um das Mikrobiom und vorhandene Antibiotikaresistenzgene zu detektieren.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Phyla *Pseudomonadota*, *Actinomycetota*, *Bacteroidota* und *Bacillota* in allen Einstreuarten die Mikrobiome dominieren. Gleichzeitig zeigten die Proben der „Kompostierungs“ Gruppe eine höhere Diversität (Shannon-Index: 3,88) und höhere Abundanz an *Bacteroidota* ( $p < 0,001$ ) und niedrigere Abundanz von *Bacillota* ( $p = 0,038$ ) gegenüber den anderen Einstreugruppen. Diese Ergebnisse decken sich mit der Studienlage, dass kompostierte Materialien eine höhere Diversität zeigen. Darüber hinaus wurden signifikant niedrigere Abundanzen der mit DD und Mastitis assoziierten Bakterienspezies *S. aureus* ( $p = 0,011$ ), *S. uberis* ( $p = 0,028$ ), *T. phagedenis* ( $p = 0,010$ ) und *T. denticola* ( $p = 0,022$ ) in den Kompostierungs-Proben detektiert, was möglicherweise auf die Hygienisierung während der Kompostierung zurückzuführen ist. Zwischen den Proben der Gruppen „Exkrement“ und „Stroh und Kalk“ wurden keine signifikanten Unterschiede in dem Vorkommen pathogener Spezies und Gattungen festgestellt. Auch zeigten die Mikrobiome der Einstreugruppen „Exkrement“ und „Stroh und Kalk“ in dieser Arbeit mehr Gemeinsamkeiten untereinander als zur Einstreugruppe „Kompostierung“. Das kann durch die heterogene Zusammensetzung der Einstreuarten in der Exkrement-basierten Gruppe bedingt sein, die Gülleseparat und mit Stroh vermengten Mist umfasst und damit auch in der Diversität und im Mikrobiom der Gruppe „Stroh und Kalk“ ähnlicher ist als der Kompostierungs-Gruppe.

Die Analyse des Resistoms ergab, dass die Exkrement-basierte Einstreugruppe signifikant höhere Abundanzen an Resistenzgenen für Phenicole ( $p = 0,014$ ), Tetracycline ( $p = 0,005$ ), und Trimethoprim ( $p < 0,001$ ), im Vergleich zu den anderen Gruppen aufwies. Das kann darauf begründet sein, dass Antibiotika zu großen Teilen über Exkimente wieder ausgeschieden werden. Über alle Einstreuarten

hinweg wurden die höchsten Abundanzen bei Resistenzgenen gegen Aminoglykoside sowie gegen Makrolide, Lincosamide und Streptogramine beobachtet. Betriebe der Kompostierungsställe zeigten insgesamt die niedrigsten Abundanzen an ARG ( $p = 0.012$ ) im Vergleich zu den anderen Einstreugruppen, was auf eine effektive Reduktion der ARG durch den Kompostierungsprozess hindeuten kann.

Das Kompostierungseinstreu zeigte in dieser Arbeit niedrigere ARG Abundanzen, sowie Abundanzen potenzieller pathogener Bakterien und scheint daher ein niedrigeres mikrobielles Risiko darzustellen als die Einstreumaterialien Stroh und Kalk oder Mist und Güllesubstrat. Weitere Forschung sollte sich mit dem Vorkommen von Bakterien in der Einstreu und dem Zusammenhang mit Prävalenzen infektiöser Krankheiten befassen.

## Literaturverzeichnis

- Aarestrup, F.M. (2005) 'Veterinary Drug Usage and Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin', *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 96(4), pp. 271–281. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2005.pto960401.x>.
- AG „Eutergesundheit“ Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (2024) 'Zur Prävalenz von Mastitiserregern in Milchproben in Deutschland -Update 2022', in: *Tagung der AG Eutergesundheit der DVG*, Schwäbisch Gmünd. Verfügbar unter: [https://www.dvg.de/wp-content/uploads/2024/04/24-03-19\\_AG-Euter\\_Praevalenz-Mastitiserreger2022.pdf](https://www.dvg.de/wp-content/uploads/2024/04/24-03-19_AG-Euter_Praevalenz-Mastitiserreger2022.pdf) (Letzter Zugriff: 25 Januar 2025).
- Alanis, V.M., Zurakowski, M., Pawloski, D., Tomazi, T., Nydam, D.V. und Ospina, P.A. (2021) 'Description of the Characteristics of Five Bedding Materials and Association With Bulk Tank Milk Quality on Five New York Dairy Herds', *Frontiers in Veterinary Science*, 8, p. 636833. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.636833>.
- Amarakoon, I.D., Zvomuya, F., Sura, S., Larney, F.J., Cessna, A.J., Xu, S. und McAllister, T.A. (2016) 'Dissipation of Antimicrobials in Feedlot Manure Compost after Oral Administration versus Fortification after Excretion', *Journal of Environmental Quality*, 45(2), pp. 503–510. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.2134/jeq2015.07.0408>.
- Antão, E.-M. und Wagner-Ahlfs, C. (2018) 'Antibiotikaresistenz: Eine gesellschaftliche Herausforderung', *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 61(5), pp. 499–506. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s00103-018-2726-y>.
- Arbeitsgruppe Antibiotikaresistenz des BVL und BfR (2024) *Lagebild zur Antibiotikaresistenz im Bereich Tierhaltung und Lebensmittelkette*. Verfügbar unter: [https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/\\_Tiere/Tiergesundheit/Tierarzneimittel/lagebild-antibiotikaeinsatz-bei-tieren-2024.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=3](https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/_Tiere/Tiergesundheit/Tierarzneimittel/lagebild-antibiotikaeinsatz-bei-tieren-2024.pdf?__blob=publicationFile&v=3) (Letzter Zugriff: 30 Januar 2025).
- Arzneimittelgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 12. Dezember 2005 (BGBl. I S. 3394), das zuletzt durch Artikel 2 des Gesetzes vom 23. Oktober 2024 (BGBl. 2024 I Nr. 324) geändert worden ist.
- Badawy, B., Gwida, M., Sadat, A., EL-Toukhy, M., Sayed-Ahmed, M., Alam, N., Ahmad, S., Ali, M.S. und Elafify, M. (2022) 'Prevalence and Antimicrobial Resistance of Virulent *Listeria monocytogenes* and *Cronobacter sakazakii* in Dairy Cattle, the Environment, and Dried Milk with the In Vitro Application of Natural Alternative Control', *Antibiotics*, 11(8), p. 1087. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081087>.
- Barberg, A.E., Endres, M.I., Salfer, J.A. und Reneau, J.K. (2007) 'Performance and Welfare of Dairy Cows in an Alternative Housing System in Minnesota', *Journal of Dairy Science*, 90(3), pp. 1575–1583. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71643-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71643-0).
- Bavendamm, D.J. (2024) *Prävalenz von ESBL / AmpC tragende Escherichia coli in Rohmilch von norddeutschen Milchtankstellen*. Bachelorarbeit. Hochschule Neubrandenburg Verfügbar unter: Auf Anfrage bei Prof'in Lisa Bachmann (HS NB) zur Verfügung.
- Bell, J., Crosby-Durrani, H.E., Blowey, R.W., Carter, S.D. und Evans, N.J. (2023) 'Survival of bovine digital dermatitis treponemes in conditions relevant to the host and farm environment', *Anaerobe*, 82, p. 102766. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2023.102766>.

- Bell, N.J., Pedersen, S.I.L., Randall, L.V., Remnant, J.G. und Wilson, J.P. (2024) 'Lameness in Cattle', in J.J. Gross (ed.) *Production Diseases in Farm Animals*. Cham: Springer International Publishing, pp. 377–404. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1007/978-3-031-51788-4\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-031-51788-4_17).
- Bengtsson-Palme, J., Hartmann, M., Eriksson, K.M., Pal, C., Thorell, K., Larsson, D.G.J. und Nilsson, R.H. (2015) 'METAXA 2: improved identification and taxonomic classification of small and large subunit rRNA in metagenomic data', *Molecular Ecology Resources*, 15(6), pp. 1403–1414. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12399>.
- Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E. und Larsson, D.G.J. (2018) 'Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance', *FEMS Microbiology Reviews*, 42(1). Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1093/femsre/fux053>.
- Beninger, C., Naqvi, S.A., Naushad, S., Orsel, K., Luby, C., Derakhshani, H., Khafipour, E. und De Buck, J. (2018) 'Associations between digital dermatitis lesion grades in dairy cattle and the quantities of four *Treponema* species', *Veterinary Research*, 49(1), p. 111. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0605-z>.
- Bewley, J.M., Robertson, L.M. und Eckelkamp, E.A. (2017) 'A 100-Year Review: Lactating dairy cattle housing management', *Journal of Dairy Science*, 100(12), pp. 10418–10431. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13251>.
- Bhatia, A., Madan, S., Sahoo, J., Ali, M., Pathania, R. und Kazmi, A.A. (2013) 'Diversity of bacterial isolates during full scale rotary drum composting', *Waste Management*, 33(7), pp. 1595–1601. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.03.019>.
- Biasato, I., D'Angelo, A., Bertone, I., Odore, R. und Bellino, C. (2019) 'Compost bedded-pack barn as an alternative housing system for dairy cattle in Italy: effects on animal health and welfare and milk and milk product quality', *Italian Journal of Animal Science*, 18(1), pp. 1142–1153. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1080/1828051X.2019.1623095>.
- Black, R.A., Taraba, J.L., Day, G.B., Damasceno, F.A. und Bewley, J.M. (2013) 'Compost bedded pack dairy barn management, performance, and producer satisfaction', *Journal of Dairy Science*, 96(12), pp. 8060–8074. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6778>.
- Black, R.A., Taraba, J.L., Day, G.B., Damasceno, F.A., Newman, M.C., Akers, K.A., Wood, C.L., McQuerry, K.J. und Bewley, J.M. (2014) 'The relationship between compost bedded pack performance, management, and bacterial counts', *Journal of Dairy Science*, 97(5), pp. 2669–2679. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6779>.
- BLE (2024) 'Haltungsformen für Milchkühe'. Verfügbar unter: <https://www.landwirtschaft.de/tier-und-pflanze/tier/rinder/haltungsformen-fuer-milchkuehe> (Letzter Zugriff: 26 Februar 2025).
- Boolchandani, M., D'Souza, A.W. und Dantas, G. (2019) 'Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance', *Nature Reviews Genetics* [Preprint]. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0108-4>.
- Bundesinstitut für Risikobewertung (2024) 'Antibiotika-Verbrauchsmengen und Therapiehäufigkeit 2023: Wissenschaftsbericht des BfR vom 30. August 2024'. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.17590/20240830-135348-0>.

- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) (2022) 'Änderung des Tierarzneimittelgesetzes tritt am 01.01.2023 in Kraft', *Pressemitteilung Nr. 180/2022*, 16 December. Verfügbar unter: <https://www.bmel.de/SharedDocs/Pressemitteilungen/DE/2022/180-tamg.html> (Letzter Zugriff: 4 Februar 2025).
- Bundestierärztekammer (2015) 'Leitlinie für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln'. 3. Aufl., Schlütersche Verlagsgesellschaft, Hannover. Verfügbar unter: <https://www.bundestieraerztekammer.de/tieraerzte/leitlinien> (Letzter Zugriff: 18 Februar 2025).
- Bush, K. und Bradford, P.A. (2020) 'Epidemiology of  $\beta$ -Lactamase-Producing Pathogens', *Clinical Microbiology Reviews*, 33(2), pp. e00047-19. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1128/CMR.00047-19>.
- Caddey, B., Orsel, K., Naushad, S., Derakhshani, H. und De Buck, J. (2021) 'Identification and Quantification of Bovine Digital Dermatitis-Associated Microbiota across Lesion Stages in Feedlot Beef Cattle', *mSystems*. Edited by J.L. Metcalf, 6(4), p. 10.1128/msystems.00708-21. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1128/msystems.00708-21>.
- Caddey, B. und De Buck, J. (2021) 'Meta-Analysis of Bovine Digital Dermatitis Microbiota Reveals Distinct Microbial Community Structures Associated With Lesions', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, p. 685861. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.685861>.
- Chris Dean (cdeanj) (2018) 'ResistomeAnalyzer'. Verfügbar unter: <https://github.com/cdeanj/resistomeanalyzer>.
- Cobbold, R.N., Rice, D.H., Davis, M.A., Besser, T.E. und Hancock, D.D. (2006) 'Long-term persistence of multi-drug-resistant Salmonella enterica serovar Newport in two dairy herds', *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228(4), pp. 585–591. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.2460/javma.228.4.585>.
- Corlevic, A.T. und Beggs, D.S. (2022) 'Host Factors Impacting the Development and Transmission of Bovine Digital Dermatitis', *Ruminants*, 2(1), pp. 90–100. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/ruminants2010005>.
- Costa, J.H.C., Burnett, T.A., Von Keyserlingk, M.A.G. und Hötzel, M.J. (2018) 'Prevalence of lameness and leg lesions of lactating dairy cows housed in southern Brazil: Effects of housing systems', *Journal of Dairy Science*, 101(3), pp. 2395–2405. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13462>.
- Dahms, C., Hübner, N.-O., Kossow, A., Mellmann, A., Dittmann, K. und Kramer, A. (2015) 'Occurrence of ESBL-Producing Escherichia coli in Livestock and Farm Workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany', *PLOS ONE*. Edited by M. Lierz, 10(11), p. e0143326. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143326>.
- Dias, A.P., Orsel, K. und De Buck, J. (2024) 'Quantifying and mapping digital dermatitis-associated bacteria in lesion and nonlesion body sites and dairy farm environment', *Journal of Dairy Science*, 107(5), pp. 3252–3268. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3168/jds.2023-24160>.
- Dimov, D. und Marinov, I. (2021) 'Factors determining the choice of bedding for freestall housing system in dairy cows farming - A review', *Journal of Central European Agriculture*, 22(1), pp. 1–13. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.5513/JCEA01/22.1.2778>.



- Doster, E., Lakin, S.M., Dean, C.J., Wolfe, C., Young, J.G., Boucher, C., Belk, K.E., Noyes, N.R. und Morley, P.S. (2020) 'MEGARes 2.0: a database for classification of antimicrobial drug, biocide and metal resistance determinants in metagenomic sequence data', *Nucleic Acids Research*, 48(D1), pp. D561–D569. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1010>.
- Dundore-Arias, J.P., Eloie-Fadrosh, E.A., Schriml, L.M., Beattie, G.A., Brennan, F.P., Busby, P.E., Calderon, R.B., Castle, S.C., Emerson, J.B., Everhart, S.E., Eversole, K., Frost, K.E., Herr, J.R., Huerta, A.I., Iyer-Pascuzzi, A.S., Kalil, A.K., Leach, J.E., Leonard, J., Maul, J.E., Prithiviraj, B., Potrykus, M., Redekar, N.R., Rojas, J.A., Silverstein, K.A.T., Tomso, D.J., Tringe, S.G., Vinatzer, B.A. und Kinkel, L.L. (2020) 'Community-Driven Metadata Standards for Agricultural Microbiome Research', *Phytobiomes Journal*, 4(2), pp. 115–121. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-09-19-0051-P>.
- Eckelkamp, E.A., Taraba, J.L., Akers, K.A., Harmon, R.J. und Bewley, J.M. (2016) 'Understanding compost bedded pack barns: Interactions among environmental factors, bedding characteristics, and udder health', *Livestock Science*, 190, pp. 35–42. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.05.017>.
- Emanuelson, U., Brügemann, K., Klopčič, M., Leso, L., Ouweltjes, W., Zentner, A. und Blanco-Penedo, I. (2022) 'Animal Health in Compost-Bedded Pack and Cubicle Dairy Barns in Six European Countries', *Animals*, 12(3), p. 396. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/ani12030396>.
- Evans, N.J., Brown, J.M., Murray, R.D., Getty, B., Birtles, R.J., Hart, C.A. und Carter, S.D. (2011) 'Characterization of Novel Bovine Gastrointestinal Tract *Treponema* Isolates and Comparison with Bovine Digital Dermatitis Treponemes', *Applied and Environmental Microbiology*, 77(1), pp. 138–147. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1128/AEM.00993-10>.
- Evans, N.J., Timofte, D., Isherwood, D.R., Brown, J.M., Williams, J.M., Sherlock, K., Lehane, M.J., Murray, R.D., Birtles, R.J., Anthony Hart, C. und Carter, S.D. (2012) 'Host and environmental reservoirs of infection for bovine digital dermatitis treponemes', *Veterinary Microbiology*, 156(1–2), pp. 102–109. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.09.029>.
- Fournel, S., Godbout, S., Ruel, P., Fortin, A., G  n  reux, M., Côté, C., Landry, C. und Pellerin, D. (2019) 'Production of recycled manure solids for bedding in Canadian dairy farms: I. Solid–liquid separation', *Journal of Dairy Science*, 102(2), pp. 1832–1846. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14966>.
- Galama, P.J., Ouweltjes, W., Endres, M.I., Sprecher, J.R., Leso, L., Kuipers, A. und Klopčič, M. (2020) 'Symposium review: Future of housing for dairy cattle', *Journal of Dairy Science*, 103(6), pp. 5759–5772. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17214>.
- Godden, S., Bey, R., Lorch, K., Farnsworth, R. und Rapnicki, P. (2008) 'Ability of Organic and Inorganic Bedding Materials to Promote Growth of Environmental Bacteria', *Journal of Dairy Science*, 91(1), pp. 151–159. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0415>.
- Guhl, P.A., Bachmann, L., Steiner, A. und Heppelmann, M. (2024a) 'Claw health and lameness in dairy cows in German compost bedded pack barns', in: *32nd World Buiatrics Congress*, Cancun, Mexiko.
- Guhl, P.A., Bachmann, L., Steiner, A. und Heppelmann, M. (2024b) 'Claw health and lameness in German compost bedded pack barns', in: *22nd International Symposium and 14th International Conference on Lameness in Ruminants*, Venedig, Italien.



- Gweon, H.S., Shaw, L.P., Swann, J., De Maio, N., AbuOun, M., Niehus, R., Hubbard, A.T.M., Bowes, M.J., Bailey, M.J., Peto, T.E.A., Hoosdally, S.J., Walker, A.S., Sebra, R.P., Crook, D.W., Anjum, M.F., Read, D.S. und Stoesser, N. (2019) 'The impact of sequencing depth on the inferred taxonomic composition and AMR gene content of metagenomic samples', *Environmental Microbiome*, 14(1), p. 7. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1186/s40793-019-0347-1>.
- Hoy, S. und Däumler, T. (2019) 'Der Kompostierungsstall für Milchkühe – gut für die Kühe, aber aufwändig: Kompostierungsstall für Milchkühe'. top agrar. Verfügbar unter: <https://www.topagrar.com/heftplus/der-kompostierungsstall-fuer-milchkuehe-gut-fuer-die-kuehe-aber-aufwaendig-11534523.html> (Letzter Zugriff: 23 Februar 2025).
- Hsieh, W.-S., Wang, N.-Y., Feng, J.-A., Weng, L.-C. und Wu, H.-H. (2015) 'Identification of DHA-23, a novel plasmid-mediated and inducible AmpC beta-lactamase from Enterobacteriaceae in Northern Taiwan', *Frontiers in Microbiology*, 6. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00436>.
- Ito, R., Mustapha, M.M., Tomich, A.D., Callaghan, J.D., McElheny, C.L., Mettus, R.T., Shanks, R.M.Q., Sluis-Cremer, N. und Doi, Y. (2017) 'Widespread Fosfomycin Resistance in Gram-Negative Bacteria Attributable to the Chromosomal *fosA* Gene', *mBio*. Edited by K. Bush, 8(4), pp. e00749-17. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1128/mBio.00749-17>.
- Jambor, T., Drotar, Z. und Bires, J. (2022) 'Microbial aspects of recycled manure used in dairy cows bedding - review', *Bacterial Empire*, 5(4), p. e584. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.36547/be.584>.
- Jauregi, L., Epelde, L., González, A., Lavín, J.L. und Garbisu, C. (2021) 'Reduction of the resistome risk from cow slurry and manure microbiomes to soil and vegetable microbiomes', *Environmental Microbiology*, 23(12), pp. 7643–7660. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15842>.
- K. A. Janni, M. I. Endres, J. K. Reneau, und W. W. Schoper (2007) 'Compost Dairy Barn Layout and Management Recommendations', *Applied Engineering in Agriculture*, 23(1), pp. 97–102. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.13031/2013.22333>.
- Kara, N.K., Galic, A. und Koyuncu, M. (2011) 'Effects of stall type and bedding materials on lameness and hygiene score and effect of lameness on some reproductive problems in dairy cattle', *Journal of Applied Animal Research*, 39(4), pp. 334–338. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1080/09712119.2011.607890>.
- Klaas, I.C. und Zadoks, R.N. (2018) 'An update on environmental mastitis: Challenging perceptions', *Transboundary and Emerging Diseases*, 65, pp. 166–185. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/tbed.12704>.
- Klitgaard, K., Strube, M.L., Isbrand, A., Jensen, T.K. und Nielsen, M.W. (2017) 'Microbiota Analysis of an Environmental Slurry and Its Potential Role as a Reservoir of Bovine Digital Dermatitis Pathogens', *Applied and Environmental Microbiology*. Edited by E.G. Dudley, 83(11), pp. e00244-17. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1128/AEM.00244-17>.
- Knudsen, B.E., Bergmark, L., Munk, P., Lukjancenko, O., Priemé, A., Aarestrup, F.M. und Pamp, S.J. (2016) 'Impact of Sample Type and DNA Isolation Procedure on Genomic Inference of Microbiome Composition', *mSystems*. Edited by J.K. Jansson, 1(5), pp. e00095-16. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1128/mSystems.00095-16>.
- Krebs, I., Zhang, Y., Wente, N., Leimbach, S. und Krömker, V. (2023) 'Severity of Clinical Mastitis and Bacterial Shedding', *Pathogens*, 12(9), p. 1098. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/pathogens12091098>.

- Kuipers, A., Galama, P., Leso, L., Bruegemann, K. und Klopčič, M. (2022) 'A Composting Bedding System for Animals as a Contribution to the Circular Economy', *Processes*, 10(3), p. 518. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/pr10030518>.
- Lakin, S.M., Dean, C., Noyes, N.R., Dettenwanger, A., Ross, A.S., Doster, E., Rovira, P., Abdo, Z., Jones, K.L., Ruiz, J., Belk, K.E., Morley, P.S. und Boucher, C. (2017) 'MEGARes: an antimicrobial resistance database for high throughput sequencing', *Nucleic Acids Research*, 45(D1), pp. D574–D580. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1009>.
- Lardé, H., Dufour, S., Archambault, M., Massé, J., Roy, J.-P. und Francoz, D. (2021) 'An observational cohort study on antimicrobial usage on dairy farms in Quebec, Canada', *Journal of Dairy Science*, 104(2), pp. 1864–1880. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18848>.
- Leach, K.A., Archer, S.C., Breen, J.E., Green, M.J., Ohnstad, I.C., Tuer, S. und Bradley, A.J. (2015) 'Recycling manure as cow bedding: Potential benefits and risks for UK dairy farms', *The Veterinary Journal*, 206(2), pp. 123–130. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.08.013>.
- Leso, L., Barbari, M., Lopes, M.A., Damasceno, F.A., Galama, P., Taraba, J.L. und Kuipers, A. (2020) 'Invited review: Compost-bedded pack barns for dairy cows', *Journal of Dairy Science*, 103(2), pp. 1072–1099. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16864>.
- Li, B., Yang, Y., Ma, L., Ju, F., Guo, F., Tiedje, J.M. und Zhang, T. (2015) 'Metagenomic and network analysis reveal wide distribution and co-occurrence of environmental antibiotic resistance genes', *The ISME Journal*, 9(11), pp. 2490–2502. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.59>.
- Liang, D., Arnold, L.M., Stowe, C.J., Harmon, R.J. und Bewley, J.M. (2017) 'Estimating US dairy clinical disease costs with a stochastic simulation model', *Journal of Dairy Science*, 100(2), pp. 1472–1486. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11565>.
- Meena, A.L., Karwal, M., Dutta, D., und R P Mishra (2021) 'Composting: Phases and Factors Responsible for Efficient and Improved Composting'. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.13546.95689>.
- Mohanty, H., Pachpute, S. und Yadav, R.P. (2021) 'Mechanism of drug resistance in bacteria: efflux pump modulation for designing of new antibiotic enhancers', *Folia Microbiologica*, 66(5), pp. 727–739. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s12223-021-00910-z>.
- Mott, A.C., Schneider, D., Hünerberg, M., Hummel, J. und Tetens, J. (2022) 'Bovine Rumen Microbiome: Impact of DNA Extraction Methods and Comparison of Non-Invasive Sampling Sites', *Ruminants*, 2(1), pp. 112–132. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/ruminants2010007>.
- Newell, D.G. und La Ragione, R.M. (2018) 'Enterohaemorrhagic and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): Where are we now regarding diagnostics and control strategies?', *Transboundary and Emerging Diseases*, 65, pp. 49–71. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/tbed.12789>.
- Nguyen, T.T., Wu, H. und Nishino, N. (2020) 'An investigation of seasonal variations in the microbiota of milk, feces, bedding, and airborne dust', *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 33(11), pp. 1858–1865. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.5713/ajas.19.0506>.
- Nielsen, M.W., Strube, M.L., Isbrand, A., Al-Medrasi, W.D.H.M., Boye, M., Jensen, T.K. und Klitgaard, K. (2016) 'Potential bacterial core species associated with digital dermatitis in cattle herds identified by molecular profiling of interdigital skin samples', *Veterinary Microbiology*, 186, pp. 139–149. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.03.003>.

- Oliver, J.P., Gooch, C.A., Lansing, S., Schueler, J., Hurst, J.J., Sassoubre, L., Crossette, E.M. und Aga, D.S. (2020) 'Invited review: Fate of antibiotic residues, antibiotic-resistant bacteria, and antibiotic resistance genes in US dairy manure management systems', *Journal of Dairy Science*, 103(2), pp. 1051–1071. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16778>.
- Partanen, P., Hultman, J., Paulin, L., Auvinen, P. und Romantschuk, M. (2010) 'Bacterial diversity at different stages of the composting process', *BMC Microbiology*, 10(1), p. 94. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-94>.
- Patel, K., Godden, S.M., Royster, E., Crooker, B.A., Timmerman, J. und Fox, L. (2019) 'Relationships among bedding materials, bedding bacteria counts, udder hygiene, milk quality, and udder health in US dairy herds', *Journal of Dairy Science*, 102(11), pp. 10213–10234. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16692>.
- Pelzer, A., Büscher, W. und Hermann, H.-J. (2012) *DLG-Merkblatt 379: Planungshinweise zur Liegeboxengestaltung für Milchkühe*. 2. Auflage, Stand 10/2012, Überarbeitung des DLG-Merkblattes 341. DLG e. V. Fachzentrum Land- und Ernährungswirtschaft, Ausschuss für Technik in der tierischen Produktion. Verfügbar unter: [https://www.dlg.org/fileadmin/downloads/Merkblaetter/dlg-merkblatt\\_379.pdf](https://www.dlg.org/fileadmin/downloads/Merkblaetter/dlg-merkblatt_379.pdf) (Letzter Zugriff: 11 Februar 2025).
- Petersson-Wolfe, C.S., Leslie, K.E. und Swartz, T.H. (2018) 'An Update on the Effect of Clinical Mastitis on the Welfare of Dairy Cows and Potential Therapies', *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 34(3), pp. 525–535. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2018.07.006>.
- Pezzolla, D., Cucina, M., Proietti, P., Calisti, R., Regni, L. und Gigliotti, G. (2021) 'The Use of New Parameters to Optimize the Composting Process of Different Organic Wastes', *Agronomy*, 11(10), p. 2090. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/agronomy11102090>.
- PraeRi (2020) *Tiergesundheit, Hygiene und Biosicherheit in deutschen Milchkuhbetrieben – eine Prävalenzstudie (PraeRi)*. Abschlussbericht. Verfügbar unter: [https://ibei.tiho-hannover.de/praeRi/pages/69#\\_AB](https://ibei.tiho-hannover.de/praeRi/pages/69#_AB) (Letzter Zugriff: 21 Januar 2025).
- Quince, C., Walker, A.W., Simpson, J.T., Loman, N.J. und Segata, N. (2017) 'Shotgun metagenomics, from sampling to analysis', *Nature Biotechnology*, 35(9), pp. 833–844. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/nbt.3935>.
- Ray, T., Gaire, T.N., Dean, C.J., Rowe, S., Godden, S.M. und Noyes, N.R. (2022) 'The microbiome of common bedding materials before and after use on commercial dairy farms', *Animal Microbiome*, 4(1), p. 18. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1186/s42523-022-00171-2>.
- Ridaura, V.K., Bouladoux, N., Claesen, J., Chen, Y.E., Byrd, A.L., Constantinides, M.G., Merrill, E.D., Tamoutounour, S., Fischbach, M.A. und Belkaid, Y. (2018) 'Contextual control of skin immunity and inflammation by *Corynebacterium*', *Journal of Experimental Medicine*, 215(3), pp. 785–799. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1084/jem.20171079>.
- Robles, I., Kelton, D.F., Barkema, H.W., Keefe, G.P., Roy, J.P., Von Keyserlingk, M.A.G. und DeVries, T.J. (2020) 'Bacterial concentrations in bedding and their association with dairy cow hygiene and milk quality', *Animal*, 14(5), pp. 1052–1066. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1017/S1751731119002787>.
- Rowbotham, R.F. und Ruegg, P.L. (2016) 'Bacterial counts on teat skin and in new sand, recycled sand, and recycled manure solids used as bedding in freestalls', *Journal of Dairy Science*, 99(8), pp. 6594–6608. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10674>.

- Rowe, S.M., Godden, S.M., Royster, E., Timmerman, J., Crooker, B.A. und Boyle, M. (2019) 'Cross-sectional study of the relationships among bedding materials, bedding bacteria counts, and intramammary infection in late-lactation dairy cows', *Journal of Dairy Science*, 102(12), pp. 11384–11400. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17074>.
- Ruegg, P.L. und Adkins, P.R.F. (2024) 'Mastitis in Dairy Cows', in J.J. Gross (ed.) *Production Diseases in Farm Animals*. Cham: Springer International Publishing, pp. 339–365. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1007/978-3-031-51788-4\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-031-51788-4_15).
- Sahm, H., Antranikian, G., Stahmann, K.-P. und Takors, R. (eds) (2013) *Industrielle Mikrobiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-3040-3>.
- Schmenger, A. und Krömker, V. (2020) 'Characterization, Cure Rates and Associated Risks of Clinical Mastitis in Northern Germany', *Veterinary Sciences*, 7(4), p. 170. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/vetsci7040170>.
- Schmid, A., Hörmansdorfer, S., Messelhäusser, U., Käsbohrer, A., Sauter-Louis, C. und Mansfeld, R. (2013) 'Prevalence of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Escherichia coli on Bavarian Dairy and Beef Cattle Farms', *Applied and Environmental Microbiology*, 79(9), pp. 3027–3032. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1128/AEM.00204-13>.
- Schmidt, M. (2020) *Kalk im Stall: gesunde Milchkühe - hochwertige Gülle - optimales Futter*. 2., überarbeitete Auflage. Frankfurt am Main: DLG Verlag (AgrarPraxis kompakt).
- Seethalakshmi, P.S., Kumaresan, T.N., Vishnu Prasad Nair, R.U., Prathiviraj, R., Seghal Kiran, G. und Selvin, J. (2024) 'Comparative analysis of commercially available kits for optimal DNA extraction from bovine fecal samples', *Archives of Microbiology*, 206(7), p. 314. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s00203-024-04047-8>.
- Shane, E.M., Endres, M.I., Johnson, D.G. und Reneau, J.K. (2010) 'Bedding Options for an Alternative Housing System for Dairy Cows: A Descriptive Study', *Applied Engineering in Agriculture*, 26(4), pp. 659–666. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.13031/2013.32062>.
- Spielmeyer, A. (2018) 'Occurrence und fate of antibiotics in manure during manure treatments: A short review', *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 9, pp. 76–86. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.scp.2018.06.004>.
- Statistisches Bundesamt (Destatis) (2021) 'Stallhaltung, Weidehaltung-2020. Einzelveröffentlichung zur Landwirtschaftszählung 2020'. Verfügbar unter: [https://www.destatis.de/DE/Themen/Branchen-Unternehmen/Landwirtschaft-Forstwirtschaft-Fischerei/Produktionsmethoden/Publikationen/Downloads-Produktionsmethoden/stallhaltung-weidehaltung-tb-5411404209005.xlsx?\\_\\_blob=publicationFile&v=4](https://www.destatis.de/DE/Themen/Branchen-Unternehmen/Landwirtschaft-Forstwirtschaft-Fischerei/Produktionsmethoden/Publikationen/Downloads-Produktionsmethoden/stallhaltung-weidehaltung-tb-5411404209005.xlsx?__blob=publicationFile&v=4) (Letzter Zugriff: 20 Januar 2025).
- Suerbaum, S., Burchard, G.-D., Kaufmann, S.H.E. und Schulz, T.F. (eds) (2020) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/978-3-662-61385-6>.
- Sun, L., Han, X., Li, J., Zhao, Z., Liu, Y., Xi, Q., Guo, X. und Gun, S. (2020) 'Microbial Community and Its Association With Physicochemical Factors During Compost Bedding for Dairy Cows', *Frontiers in Microbiology*, 11, p. 254. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00254>.

- Sutter, E. (2020) 'Einstreu Liegeboxen'. strickhof. Verfügbar unter: <https://redaktion.strickhof.ch/server/api/Dokument/GetDokument?id=660> (Letzter Zugriff: 26 Februar 2025).
- Tarrah, A., Zhang, D., Darvishzadeh, P. und LaPointe, G. (2024) 'The Contribution of Dairy Bedding and Silage to the Dissemination of Genes Coding for Antimicrobial Resistance: A Narrative Review', *Antibiotics*, 13(9), p. 905. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/antibiotics13090905>.
- Tergast, H., Hansen, H. und Weber, E.-C. (2022) *Steckbriefe zur Tierhaltung in Deutschland: Milchkühe*. Braunschweig: Thünen-Institut für Betriebswirtschaft. Verfügbar unter: [https://literatur.thuenen.de/digbib\\_extern/dn065685.pdf](https://literatur.thuenen.de/digbib_extern/dn065685.pdf) (Letzter Zugriff: 19 Januar 2025).
- Tierarzneimittelgesetz vom 27. September 2021 (BGBl. I S. 4530), das zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 14. März 2024 (BGBl. 2024 I Nr. 97) geändert worden ist.
- TonyBolger und BjoernUsadel (2021) 'Trimmomatic v0.39'. Usadellab. Verfügbar unter: <https://github.com/usadellab/Trimmomatic>.
- Tooke, C.L., Hinchliffe, P., Bragginton, E.C., Colenso, C.K., Hirvonen, V.H.A., Takebayashi, Y. and Spencer, J. (2019) 'β-Lactamases and β-Lactamase Inhibitors in the 21st Century', *Journal of Molecular Biology*, 431(18), pp. 3472–3500. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>.
- Waldrop, M.E. und Roosen, J. (2021) 'Consumer acceptance and willingness to pay for cow housing systems in eight European countries', *Q Open*, 1(1), p. qoab001. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1093/qopen/qoab001>.
- Wang, J., Ben, W., Zhang, Y., Yang, M. und Qiang, Z. (2015) 'Effects of thermophilic composting on oxytetracycline, sulfamethazine, and their corresponding resistance genes in swine manure', *Environmental Science: Processes & Impacts*, 17(9), pp. 1654–1660. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1039/C5EM00132C>.
- WHO (World Health Organization) (2020) *10 global health issues to track in 2021*. Verfügbar unter: <https://www.who.int/news-room/spotlight/10-global-health-issues-to-track-in-2021>. (Letzter Zugriff: 31 Januar 2025).
- WHO (World Health Organization) (2024) *WHO List of medically important antimicrobials (MIA)*. World Health Organization. Verfügbar unter: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/gcp/who-mia-list-2024-lv.pdf?sfvrsn=3320dd3d\\_2](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/gcp/who-mia-list-2024-lv.pdf?sfvrsn=3320dd3d_2) (Letzter Zugriff: 4 Februar 2025).
- Wolfe, T., Vasseur, E., DeVries, T.J. und Bergeron, R. (2018) 'Effects of alternative deep bedding options on dairy cow preference, lying behavior, cleanliness, and teat end contamination', *Journal of Dairy Science*, 101(1), pp. 530–536. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12358>.
- Wood, D.E., Lu, J. und Langmead, B. (2019) 'Improved metagenomic analysis with Kraken 2', *Genome Biology*, 20(1), p. 257. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>.
- Woolhouse, M., Ward, M., Van Bunnik, B. und Farrar, J. (2015) 'Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1670), p. 20140083. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0083>.



- Wu, H., Wang, Y., Du, B., Li, H., Dong, L., Hu, H., Meng, L., Zheng, N. und Wang, J. (2022) 'Influence of Dairy Cows Bedding Material on the Microbial Structure and Antibiotic Resistance Genes of Milk', *Frontiers in Microbiology*, 13, p. 830333. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.830333>.
- Wu, X., Liu, J., Feng, J., Shabbir, M.A.B., Feng, Y., Guo, R., Zhou, M., Hou, S., Wang, G., Hao, H., Cheng, G. und Wang, Y. (2022) 'Epidemiology, Environmental Risks, Virulence, and Resistance Determinants of *Klebsiella pneumoniae* From Dairy Cows in Hubei, China', *Frontiers in Microbiology*, 13, p. 858799. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.858799>.
- Zalewska, M., Błażejewska, A., Szadziul, M., Ciuchciński, K. und Popowska, M. (2024) 'Effect of composting and storage on the microbiome and resistome of cattle manure from a commercial dairy farm in Poland', *Environmental Science and Pollution Research*, 31(21), pp. 30819–30835. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s11356-024-33276-z>.
- Zhang, L., Li, L., Sha, G., Liu, C., Wang, Z. und Wang, L. (2020) 'Aerobic composting as an effective cow manure management strategy for reducing the dissemination of antibiotic resistance genes: An integrated meta-omics study', *Journal of Hazardous Materials*, 386, p. 121895. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121895>.
- Zhang, Q., Liu, J., Guo, H., Li, E. und Yan, Y. (2019) 'Characteristics and optimization of dairy manure composting for reuse as a dairy mattress in areas with large temperature differences', *Journal of Cleaner Production*, 232, pp. 1053–1061. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.05.397>.
- Zhang, Y., Zhang, N., Wang, M., Luo, M., Peng, Y., Li, Z., Xu, J., Ou, M., Kan, B., Li, X. und Lu, X. (2023) 'The prevalence and distribution of aminoglycoside resistance genes', *Biosafety and Health*, 5(1), pp. 14–20. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2023.01.001>.
- Zinicola, M., Lima, F., Lima, S., Machado, V., Gomez, M., Döpfer, D., Guard, C. und Bicalho, R. (2015) 'Altered Microbiomes in Bovine Digital Dermatitis Lesions, and the Gut as a Pathogen Reservoir', *PLOS ONE*. Edited by L.L. Guan, 10(3), p. e0120504. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120504>.

## Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Relative Abundanz der bakteriellen Phyla (cut off < 0,5%) als Teil des Mikrobioms in der Einstreu von Betrieben der Kompostgruppe (K1–K9) .....	27
Abb. 2: Relative Abundanz der bakteriellen Phyla (cut off < 0,5%) als Teil des Mikrobioms in der Einstreu von Betrieben der „Stroh und Kalk“ Gruppe (Stroh ohne Kalk: S1-S4; Stroh mit Kalk: SK1-5) ...	28
Abb. 3: Relative Abundanz der bakteriellen Phyla (cut off < 0,5%) als Teil des Mikrobioms in der Einstreu von Betrieben der Exkrement Gruppe (Mist: M1-4; Gülleseparat: G1-4).....	28
Abb. 4: Abundanz der mit Mastitis und DD assoziierten Bakteriengattungen in den Einstreugruppen „Kompostierung“, „Exkrement“ und „Stroh und Kalk“, mit Signifikanzwerten: <i>Corynebacterium</i> $p < 0,001$ , <i>Clostridium</i> $p = 0,013$ , <i>Porphyromonas</i> $p = 0,009$ , <i>Mycoplasma</i> $p = 0,023$ , eingeteilt nach Signifikanz in Gruppen a und b.....	31
Abb. 5: Abundanz der mit Mastitis assoziierten Bakterienspezies in den Einstreugruppen „Kompostierung“, „Exkrement“ und „Stroh und Kalk“, mit Signifikanzwerten: <i>E. coli</i> $p = 0,044$ , <i>S. aureus</i> $p = 0,011$ , <i>S. uberis</i> $p = 0,028$ , eingeteilt nach Signifikanz in Gruppen a und b.....	33
Abb. 6: Abundanz der mit DD assoziierten Bakterienspezies in den Einstreugruppen „Kompostierung“, „Exkrement“ und „Stroh und Kalk“, mit Signifikanzwerten: <i>T. phagedenis</i> $p = 0,010$ , <i>T. denticola</i> $p = 0,022$ , eingeteilt nach Signifikanz in Gruppen a und b.....	33
Abb. 7: Abundanzen der SummeARG Reads für die Einstreugruppen „Kompostierung“, „Exkrement“ und „Stroh und Kalk“ mit Signifikanz nach Gruppen a und b, Signifikanzniveau der ANOVA $p = 0,012$ .....	34
Abb. 8: Abundanzen von Antibiotikaresistenzgruppen (A. bis H.) mit signifikanten Unterschieden zwischen den Einstreugruppen „Kompostierung“, „Exkrement“ und „Stroh und Kalk“, eingeteilt nach Signifikanz in Gruppen a und b.....	35

## Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1: Standort, Betriebsgröße und Einstreumaterial der beprobten Betriebe (n=26).....	21
Tab. 2: Zur Mikrobiom-Analyse ausgewählte, mit Mastitis und DD assoziierte Spezies und Gattungen .....	23
Tab. 3: Shannon-Index und Pielou's Evenness der $\alpha$ -Diversität für Einstreugruppen „Kompostierung“, „Stroh und Kalk“ und Exkrement“ .....	30
Tab. 4: $\beta$ -Diversität (Bray-Curtis-Index) zwischen den Einstreugruppen „Kompostierung“, „Stroh und Kalk“ und Exkrement“ .....	30

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist und ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Textstellen, die wörtlich oder annähernd wörtlich aus Veröffentlichungen entnommen wurden, sind durch Zitate als solche gekennzeichnet. Ich erkläre weiterhin, dass die abgegebene digitale Version mit der eingereichten schriftlichen Arbeit übereinstimmt.

Neubrandenburg, der 28.02.2025

Ort, Datum

\_\_\_\_\_

Unterschrift



## Verzeichnis der Anlagen

Tab. A 1: Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk bei der Einstreuerguppe „Stroh und Kalk“ .....	63
Tab. A 2: Levene-Test und T-Test der Einstreuerguppe „Stroh und Kalk“ .....	63
Tab. A 3: Test auf Normalverteilung der Phyla nach Shapiro-Wilk bei der Einstreuerguppe „Exkrement“ .....	63
Tab. A 4: Levene-Test und T-Test der Einstreuerguppe „Exkrement“ .....	64
Tab. A 5: Hypothesenübersicht des Mann-Whitney-U Tests bei unabhängigen Stichproben zum Vorkommen des Phylum <i>Bacillota</i> in der Einstreuerguppe „Exkrement“ .....	64
Tab. A 6: Test auf Normalverteilung über alle Proben und nach Einstreuerguppen .....	64
Tab. A 7: Test auf Varianzhomogenität der Phyla <i>Actinomycetota</i> , <i>Bacteroidota</i> und <i>Pseudomonadota</i> .....	65
Tab. A 8: Signifikanzwerte der ANOVA zwischen den Gruppen der Phyla <i>Actinomycetota</i> , <i>Bacteroidota</i> und <i>Pseudomonadota</i> .....	65
Tab. A 9: Vergleiche der Einstreuerguppen im Post hoc Test nach Games-Howell mit dem Vorkommen des Phylum <i>Bacteroidota</i> als abhängige Variable .....	65
Tab. A 10: Hypothesenübersicht des Kruskal-Wallis-Tests über die Einstreuerguppen zum Vorkommen der Phyla <i>Bacillota</i> und <i>Bacteroidota</i> bei unabhängigen Stichproben .....	65
Tab. A 11: Paarweise Vergleiche des Vorkommens vom Phylum <i>Bacillota</i> in den Einstreuerguppen im Test nach Kruskal-Wallis bei unabhängigen Stichproben .....	66
Tab. A 12: Paarweise Vergleiche des Vorkommens vom Phylum <i>Bacteroidota</i> in den Einstreuerguppen im Test nach Kruskal-Wallis bei unabhängigen Stichproben .....	66
Tab. A 13: Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk der mit DD und Mastitis assoziierten Spezies .....	66
Tab. A 14: Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk der mit DD und Mastitis assoziierten Gattungen.....	67
Tab. A 15: Hypothesenübersicht des Vorkommens der mit Mastitis und DD assoziierten Spezies über die Einstreuerguppen im Test nach Kruskal-Wallis bei unabhängigen Stichproben.....	67
Tab. A 16: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von <i>E. coli</i> über die Einstreuerguppen im Test nach Kruskal-Wallis .....	68
Tab. A 17: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von <i>S. aureus</i> über die Einstreuerguppen im Test nach Kruskal-Wallis .....	68
Tab. A 18: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von <i>S. uberis</i> über die Einstreuerguppen im Test nach Kruskal-Wallis über die Einstreuerguppen .....	68

Tab. A 19: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von <i>T. denticola</i> über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis .....	68
Tab. A 20: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von <i>T. phagedenis</i> über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis .....	69
Tab. A 21: Hypothesenübersicht des Vorkommens der mit Mastitis und DD assoziierten Gattungen über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis bei unabhängigen Stichproben.....	69
Tab. A 22: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von <i>Porphyromonas</i> über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis.....	69
Tab. A 23: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von <i>Clostridium</i> über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis .....	70
Tab. A 24: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von <i>Corynebacterium</i> über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis.....	70
Tab. A 25: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von <i>Mycoplasma</i> über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis über die Einstreugruppen .....	70
Tab. A 26: Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk der Resistenzgruppen und der SummeARG	71
Tab. A 27: Hypothesenübersicht des Vorkommens der mit Mastitis und DD assoziierten Spezies über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis bei unabhängigen Stichproben.....	72
Tab. A 28: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von ARG gegen kationische antimikrobielle Peptide in den Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis.....	73
Tab. A 29: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von Glykopeptid-ARG über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis.....	73
Tab. A 30: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von MLS-ARG über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis .....	73
Tab. A 31: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von Phenicol-ARG über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis .....	73
Tab. A 32: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von Tetracyclin-ARG über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis.....	74
Tab. A 33: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von Trimethoprim-ARG über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis.....	74
Tab. A 34: ANOVAxx Signifikanz zwischen den Gruppen .....	74
Tab. A 35: Vergleiche der Einstreugruppen im Post hoc Test nach Tukey HSD mit dem Vorkommen der Aminoglykosid-ARG als abhängige Variable.....	74
Tab. A 36: Vergleiche der Einstreugruppen im Post hoc Test nach Tukey HSD mit dem Vorkommen der $\beta$ -Laktam-ARG als abhängige Variable .....	75

Tab. A 37: Vergleiche der Einstreugruppen im Post hoc Test nach Tukey HSD mit dem Vorkommen der Efavmycin-ARG als abhängige Variable.....	75
Tab. A 38: Vergleiche der Einstreugruppen im Post hoc Test nach Tukey HSD mit dem Vorkommen der <i>Mycobacterium tuberculosis</i> spezifischen Resistenzgene als abhängige Variable .....	75
Tab. A 39: Vergleiche der Einstreugruppen im Post hoc Test nach Tukey HSD mit der SummeARG als abhängige Variable.....	76
Tab. A 40: Gemittelte Abundanzen der ARG aller Resistenzgruppen der „Kompostierung“ Betriebe (K1-K9).....	77
Tab. A 41: Gemittelte Abundanzen der ARG aller Resistenzgruppen der „Stroh und Kalk“ Betriebe (SK1-SK5, S1-S4).....	78
Tab. A 42: Gemittelte Abundanzen der ARG aller Resistenzgruppen der „Exkrement“ Betriebe (M1-M4, G1-G4).....	79
SkriptR 1: Filtern nach Phylum und bakterielle Abundanzberechnung .....	80
SkriptR 2: Berechnung arithmetisches Mittel der Phyla .....	87
SkriptR 3: Bakterienfamilien mit NCBI Taxonomie finden .....	91
SkriptR 4: Filter Bakterienfamilien mit Referenz und Berechnung Abundanz .....	94
SkriptR 5: Berechnung arithmetisches Mittel der Bakterienfamilienabundanz jedes Betrieb .....	100
SkriptR 6: Berechnung Diversitätsindizes.....	102

## Anhang

### Statistische Berechnungen Mikrobiom

Tab. A 1: Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk bei der Einstreuerguppe „Stroh und Kalk“

	Signifikanz <sup>a</sup>
<i>Actinomycetota</i>	0,646
<i>Bacillota</i>	0,184
<i>Bacteroidota</i>	0,167
<i>Pseudomonadota</i>	0,667

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 2: Levene-Test und T-Test der Einstreuerguppe „Stroh und Kalk“

		Levene-Test der Varianzgleichheit	T-Test
		Signifikanz <sup>a</sup>	Signifikanz <sup>a</sup> Zweiseitiges p
<i>Actinomycetota</i>	Varianzen sind gleich	0,071	0,620
	Varianzen sind nicht gleich		0,589
<i>Bacillota</i>	Varianzen sind gleich	0,330	0,550
	Varianzen sind nicht gleich		0,533
<i>Bacteroidota</i>	Varianzen sind gleich	0,810	0,229
	Varianzen sind nicht gleich		0,237
<i>Pseudomonadota</i>	Varianzen sind gleich	<b>0,030*</b>	0,925
	Varianzen sind nicht gleich		0,918

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 3: Test auf Normalverteilung der Phyla nach Shapiro-Wilk bei der Einstreuerguppe „Exkrement“

Phyla	Signifikanz <sup>a</sup>
<i>Actinomycetota</i>	0,669
<i>Bacillota</i>	<b>&lt;0,001***</b>
<i>Bacteroidota</i>	0,921
<i>Pseudomonadota</i>	0,298

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 4: Levene-Test und T-Test der Einstreugruppe „Exkremente“

		Levene-Test der Varianzgleichheit Signifikanz <sup>a</sup>	T-Test Signifikanz Zweiseitiges p
<i>Actinomyces</i>	Varianzen sind gleich	0,932	0,057
	Varianzen sind nicht gleich		0,058
<i>Bacteroides</i>	Varianzen sind gleich	0,593	0,421
	Varianzen sind nicht gleich		0,428
<i>Pseudomonas</i>	Varianzen sind gleich	0,856	0,284
	Varianzen sind nicht gleich		0,284

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 5: Hypothesenübersicht des Mann-Whitney-U Tests bei unabhängigen Stichproben zum Vorkommen des Phylum *Bacillota* in der Einstreugruppe „Exkremente“

Nullhypothese	Sig. <sup>a,b,c</sup>	Entscheidung
Die Verteilung von <i>Bacillota</i> ist über die Untergruppen Mist und Gülleseparat identisch.	1,000 <sup>c</sup>	Nullhypothese beibehalten

a. Asymptotische Signifikanz wird angezeigt.

b. Exakte Signifikanz wird für diesen Test angezeigt.

c. Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 6: Test auf Normalverteilung über alle Proben und nach Einstreugruppen

		Signifikanz <sup>a</sup>
Über alle Proben	<i>Actinomyces</i>	0,647
	<i>Bacillota</i>	<b>&lt;0,001***</b>
	<i>Bacteroides</i>	<b>&lt;0,001***</b>
	<i>Pseudomonas</i>	0,614
„Kompostierung“	<i>Actinomyces</i>	0,390
	<i>Bacillota</i>	<b>0,002**</b>
	<i>Bacteroides</i>	0,670
	<i>Pseudomonas</i>	0,777
„Stroh und Kalk“	<i>Actinomyces</i>	0,814
	<i>Bacillota</i>	0,118
	<i>Bacteroides</i>	0,202
	<i>Pseudomonas</i>	0,505
„Exkremente“	<i>Actinomyces</i>	0,669
	<i>Bacillota</i>	<b>&lt;0,001***</b>
	<i>Bacteroides</i>	0,921
	<i>Pseudomonas</i>	0,298

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 7: Test auf Varianzhomogenität der Phyla *Actinomycetota*, *Bacteroidota* und *Pseudomonadota*

		Signifikanz <sup>a</sup>
<i>Actinomycetota</i>	Basiert auf dem Mittelwert	0,839
	Basiert auf dem Median	0,921
<i>Bacteroidota</i>	Basiert auf dem Mittelwert	<b>0,003**</b>
	Basiert auf dem Median	<b>0,009**</b>
<i>Pseudomonadota</i>	Basiert auf dem Mittelwert	0,880
	Basiert auf dem Median	0,864

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 8: Signifikanzwerte der ANOVA zwischen den Gruppen der Phyla *Actinomycetota*, *Bacteroidota* und *Pseudomonadota*

Phylum	Signifikanz <sup>a</sup>
<i>Actinomycetota</i>	0,221
<i>Bacteroidota</i>	<b>&lt;0,001***</b>
<i>Pseudomonadota</i>	0,284

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 9: Vergleiche der Einstreugruppen im Post hoc Test nach Games-Howell mit dem Vorkommen des Phylum *Bacteroidota* als abhängige Variable

Gruppe	Gruppe	Signifikanz <sup>a</sup>
„Kompostierung“	„Stroh und Kalk“	<b>&lt;0,001***</b>
	„Exkrement“	<b>&lt;0,001***</b>
„Stroh und Kalk“	„Kompostierung“	<b>&lt;0,001***</b>
	„Exkrement“	<b>&lt;0,001***</b>
„Exkrement“	„Kompostierung“	<b>&lt;0,001***</b>
	„Stroh und Kalk“	<b>&lt;0,001***</b>

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 10: Hypothesenübersicht des Kruskal-Wallis-Tests über die Einstreugruppen zum Vorkommen der Phyla *Bacillota* und *Bacteroidota* bei unabhängigen Stichproben

	Nullhypothese	Sig. <sup>a,b,c</sup>	Entscheidung
	Die Verteilung von <i>Bacillota</i> ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	<b>0,038*</b>	Nullhypothese ablehnen
	Die Verteilung von <i>Bacteroidota</i> ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	<b>0,001**</b>	Nullhypothese ablehnen

a. Asymptotische Signifikanz wird angezeigt.

b. Exakte Signifikanz wird für diesen Test angezeigt.

c. Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 11: Paarweise Vergleiche des Vorkommens vom Phylum *Bacillota* in den Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis bei unabhängigen Stichproben

	Signifikanz <sup>a</sup>
„Kompostierung“-„Stroh und Kalk“	<b>0,027*</b>
„Kompostierung“-„Exkrement“	<b>0,031*</b>
„Stroh und Kalk“-„Exkrement“	0,928

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 12: Paarweise Vergleiche des Vorkommens vom Phylum *Bacteroidota* in den Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis bei unabhängigen Stichproben

	Signifikanz <sup>a</sup>
„Kompostierung“-„Stroh und Kalk“	<b>0,029*</b>
„Kompostierung“-„Exkrement“	<b>&lt;0,001***</b>
„Stroh und Kalk“-„Exkrement“	0,118

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 13: Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk der mit DD und Mastitis assoziierten Spezies

	Signifikanz <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>	<b>&lt;0,001***</b>
<i>F. necrophorum</i>	<b>&lt;0,001***</b>
<i>S. aureus</i>	<b>0,005**</b>
<i>S. dysgalactiae</i>	<b>&lt;0,001***</b>
<i>S. uberis</i>	<b>&lt;0,001***</b>
<i>T. denticola</i>	<b>0,001**</b>
<i>T. medium</i>	<b>&lt;0,001***</b>
<i>T. pedis</i>	<b>&lt;0,001***</b>
<i>T. phagedenis</i>	<b>&lt;0,001***</b>
<i>T. putidum</i>	<b>&lt;0,001***</b>

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 14: Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk der mit DD und Mastitis assoziierten Gattungen

	Signifikanz <sup>a</sup>
<i>Clostridium</i>	<b>&lt;0,001***</b>
<i>Corynebacterium</i>	<b>&lt;0,001***</b>
<i>Klebsiella</i>	<b>&lt;0,001***</b>
<i>Mycoplasma</i>	<b>0,001**</b>
<i>Porphyromonas</i>	<b>0,001**</b>
<i>Treponema</i>	<b>0,001**</b>

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 15: Hypothesenübersicht des Vorkommens der mit Mastitis und DD assoziierten Spezies über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis bei unabhängigen Stichproben

	Signifikanz <sup>a,b,c</sup>	Entscheidung
Die Verteilung von <i>E. coli</i> ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	<b>0,044*</b>	Nullhypothese ablehnen
Die Verteilung von <i>F. necrophorum</i> ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	0,125	Nullhypothese beibehalten
Die Verteilung von <i>S. aureus</i> ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	<b>0,011*</b>	Nullhypothese ablehnen
Die Verteilung von <i>S. dysgalactiae</i> ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	0,102	Nullhypothese beibehalten
Die Verteilung von <i>S. uberis</i> ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	<b>0,028*</b>	Nullhypothese ablehnen
Die Verteilung von <i>T. denticola</i> ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	<b>0,022*</b>	Nullhypothese ablehnen
Die Verteilung von <i>T. medium</i> ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	0,348	Nullhypothese beibehalten
Die Verteilung von <i>T. pedis</i> ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	0,089	Nullhypothese beibehalten
Die Verteilung von <i>T. phagedenis</i> ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	<b>0,010*</b>	Nullhypothese ablehnen
Die Verteilung von <i>T. putidum</i> ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	0,251	Nullhypothese beibehalten

a. Asymptotische Signifikanz wird angezeigt.

b. Exakte Signifikanz wird für diesen Test angezeigt.

c. Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001



Tab. A 16: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von *E. coli* über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis

	Signifikanz <sup>a</sup>
„Kompostierung“-„Stroh und Kalk“	<b>0,021*</b>
„Kompostierung“-„Exkrementen“	<b>0,046*</b>
„Stroh und Kalk“-„Exkrementen“	1,000

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 17: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von *S. aureus* über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis

	Signifikanz <sup>a</sup>
„Kompostierung“-„Stroh und Kalk“	<b>0,003**</b>
„Kompostierung“-„Exkrementen“	0,210
„Stroh und Kalk“-„Exkrementen“	0,090

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 18: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von *S. uberis* über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis über die Einstreugruppen

	Signifikanz <sup>a</sup>
„Kompostierung“-„Stroh und Kalk“	<b>0,029*</b>
„Kompostierung“-„Exkrementen“	<b>0,014*</b>
„Stroh und Kalk“-„Exkrementen“	0,737

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 19: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von *T. denticola* über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis

	Signifikanz <sup>a</sup>
„Kompostierung“-„Stroh und Kalk“	0,078
„Kompostierung“-„Exkrementen“	<b>0,006**</b>
„Stroh und Kalk“-„Exkrementen“	0,299

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 20: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von *T. phagedenis* über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis

	Signifikanz <sup>a</sup>
„Kompostierung“-„Stroh und Kalk“	0,069
„Kompostierung“-„Exkrement“	<b>0,002**</b>
„Stroh und Kalk“-„Exkrement“	0,195

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 21: Hypothesenübersicht des Vorkommens der mit Mastitis und DD assoziierten Gattungen über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis bei unabhängigen Stichproben

	Signifikanz <sup>a,b,c</sup>	Entscheidung
Die Verteilung von <i>Clostridium</i> ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	<b>0,013*</b>	Nullhypothese ablehnen
Die Verteilung von <i>Corynebacterium</i> ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	<b>&lt;0,001***</b>	Nullhypothese ablehnen
Die Verteilung von <i>Klebsiella</i> ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	0,116	Nullhypothese beibehalten
Die Verteilung von <i>Mycoplasma</i> ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	<b>0,023*</b>	Nullhypothese ablehnen
Die Verteilung von <i>Porphyromonas</i> ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	<b>0,009**</b>	Nullhypothese ablehnen
Die Verteilung von <i>Treponema</i> ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	0,253	Nullhypothese beibehalten

a. Asymptotische Signifikanz wird angezeigt.

b. Exakte Signifikanz wird für diesen Test angezeigt.

c. Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 22: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von *Porphyromonas* über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis

	Signifikanz <sup>a</sup>
„Kompostierung“-„Stroh und Kalk“	<b>0,004**</b>
„Kompostierung“-„Exkrement“	<b>0,014*</b>
„Stroh und Kalk“-„Exkrement“	0,756

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 23: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von *Clostridium* über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis

	Signifikanz <sup>a</sup>
„Kompostierung“-„Stroh und Kalk“	<b>0,004**</b>
„Kompostierung“-„Exkrementen“	0,072
„Stroh und Kalk“-„Exkrementen“	0,287

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 24: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von *Corynebacterium* über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis

	Signifikanz <sup>a</sup>
„Kompostierung“-„Stroh und Kalk“	<b>&lt;0,001***</b>
„Kompostierung“-„Exkrementen“	<b>0,011*</b>
„Stroh und Kalk“-„Exkrementen“	0,114

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 25: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von *Mycoplasma* über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis über die Einstreugruppen

	Signifikanz <sup>a</sup>
„Kompostierung“-„Stroh und Kalk“	0,063
„Kompostierung“-„Exkrementen“	<b>0,007**</b>
„Stroh und Kalk“-„Exkrementen“	0,357

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 26: Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk der Resistenzgruppen und der SummeARG

	Signifikanz <sup>a</sup>
Aminocumarine	<b>&lt;0,001***</b>
Aminoglykoside	0,536
Bacitracin	<b>&lt;0,001***</b>
Betalaktame	0,972
Kationische_antimikrobielle_Peptide	<b>0,013*</b>
Elfamycine	0,063
Fluorchinolone	<b>&lt;0,001***</b>
Fusidinsäure	<b>0,004**</b>
Glykopeptide	<b>&lt;0,001***</b>
MLS	<b>&lt;0,001***</b>
Multiresistenz	<b>&lt;0,001***</b>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> spezifische Resistenz	0,356
Phenicole	<b>&lt;0,001***</b>
Rifampicin	<b>0,002**</b>
Sulfonamide	<b>&lt;0,001***</b>
Tetrazykline	<b>&lt;0,001***</b>
Trimethoprim	<b>&lt;0,001***</b>
Fosfomycin	<b>&lt;0,001***</b>
SummeARG	0,128

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 27: Hypothesenübersicht des Vorkommens der mit Mastitis und DD assoziierten Spezies über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis bei unabhängigen Stichproben

	Signifikanz <sup>a,b,c</sup>	Entscheidung
Die Verteilung von Aminocumarine ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	0,159	Nullhypothese beibehalten
Die Verteilung von Bacitracin ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	0,216	Nullhypothese beibehalten
Die Verteilung von kaP ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	<b>0,039*</b>	Nullhypothese ablehnen
Die Verteilung von Fluorchinolone ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	0,233	Nullhypothese beibehalten
Die Verteilung von Fusidinsäure ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	0,171	Nullhypothese beibehalten
Die Verteilung von Glykopeptide ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	<b>0,026*</b>	Nullhypothese ablehnen
Die Verteilung von MLS ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	<b>0,006**</b>	Nullhypothese ablehnen
Die Verteilung von Multiresistenz ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	0,055	Nullhypothese beibehalten
Die Verteilung von Phenicole ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	<b>0,014*</b>	Nullhypothese ablehnen
Die Verteilung von Rifampicin ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	0,352	Nullhypothese beibehalten
Die Verteilung von Sulfonamide ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	0,240*	Nullhypothese beibehalten
Die Verteilung von Tetrazykline ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	<b>0,005**</b>	Nullhypothese ablehnen
Die Verteilung von Trimethoprim ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	<b>0,001**</b>	Nullhypothese ablehnen
Die Verteilung von Fosfomycin ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	0,740	Nullhypothese beibehalten

a. Asymptotische Signifikanz wird angezeigt.

b. Exakte Signifikanz wird für diesen Test angezeigt.

c. Signifikanzniveau: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

Tab. A 28: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von ARG gegen kationische antimikrobielle Peptide in den Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis

	Signifikanz <sup>a</sup>
„Kompostierung“-„Stroh und Kalk“	<b>0,014*</b>
„Kompostierung“-„Exkrementen“	0,078
„Stroh und Kalk“-„Exkrementen“	0,626

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 29: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von Glykopeptid-ARG über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis

	Signifikanz <sup>a</sup>
„Kompostierung“-„Stroh und Kalk“	<b>0,007**</b>
„Kompostierung“-„Exkrementen“	0,313
„Stroh und Kalk“-„Exkrementen“	0,111

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 30: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von MLS-ARG über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis

	Signifikanz <sup>a</sup>
„Kompostierung“-„Stroh und Kalk“	<b>0,006**</b>
„Kompostierung“-„Exkrementen“	<b>0,006**</b>
„Stroh und Kalk“-„Exkrementen“	0,949

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 31: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von Phenicol-ARG über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis

	Signifikanz <sup>a</sup>
„Kompostierung“-„Stroh und Kalk“	0,630
„Kompostierung“-„Exkrementen“	<b>0,006**</b>
„Stroh und Kalk“-„Exkrementen“	<b>0,022*</b>

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 32: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von Tetracyklin-ARG über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis

	Signifikanz <sup>a</sup>
„Kompostierung“-„Stroh und Kalk“	0,307
„Kompostierung“-„Exkrement“	<b>0,001**</b>
„Stroh und Kalk“-„Exkrement“	<b>0,029*</b>

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 33: Paarweise Vergleiche des Vorkommens von Trimethoprim-ARG über die Einstreugruppen im Test nach Kruskal-Wallis

	Signifikanz <sup>a</sup>
„Kompostierung“-„Stroh und Kalk“	0,117
„Kompostierung“-„Exkrement“	<b>&lt;0,001***</b>
„Stroh und Kalk“-„Exkrement“	<b>0,031*</b>

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 34: Signifikanzwerte der ANOVA zwischen den Einstreugruppen der Antibiotikaresistenzgruppen und der SummeARG

Resistenzgruppe	Signifikanz <sup>a</sup>
Aminoglykoside	<b>0,008**</b>
β-Laktame	<b>0,042*</b>
Elfamycin	0,989
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> spezifische Resistenz	0,184
SummeARG	<b>0,012*</b>

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 35: Vergleiche der Einstreugruppen im Post hoc Test nach Tukey HSD mit dem Vorkommen der Aminoglykosid-ARG als abhängige Variable

Gruppe	Gruppe	Signifikanz <sup>a</sup>
„Kompostierung“	„Stroh und Kalk“	<b>0,016*</b>
	„Exkrement“	<b>0,018*</b>
„Stroh und Kalk“	„Kompostierung“	<b>0,016*</b>
	„Exkrement“	1,000
„Exkrement“	„Kompostierung“	<b>0,018*</b>
	„Stroh und Kalk“	1,000

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 36: Vergleiche der Einstreugruppen im Post hoc Test nach Tukey HSD mit dem Vorkommen der  $\beta$ -Laktam-ARG als abhängige Variable

Gruppe	Gruppe	Signifikanz <sup>a</sup>
„Kompostierung“	„Stroh und Kalk“	0,819
	„Exkrementen“	0,132
„Stroh und Kalk“	„Kompostierung“	0,819
	„Exkrementen“	<b>0,041*</b>
„Exkrementen“	„Kompostierung“	0,132
	„Stroh und Kalk“	<b>0,041*</b>

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 37: Vergleiche der Einstreugruppen im Post hoc Test nach Tukey HSD mit dem Vorkommen der Efmamycin-ARG als abhängige Variable

Gruppe	Gruppe	Signifikanz <sup>a</sup>
„Kompostierung“	„Stroh und Kalk“	0,988
	„Exkrementen“	0,997
„Stroh und Kalk“	„Kompostierung“	0,988
	„Exkrementen“	0,998
„Exkrementen“	„Kompostierung“	0,997
	„Stroh und Kalk“	0,998

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 38: Vergleiche der Einstreugruppen im Post hoc Test nach Tukey HSD mit dem Vorkommen der *Mycobacterium tuberculosis* spezifischen Resistenzgene als abhängige Variable

Gruppe	Gruppe	Signifikanz <sup>a</sup>
„Kompostierung“	„Stroh und Kalk“	0,159
	„Exkrementen“	0,594
„Stroh und Kalk“	„Kompostierung“	0,159
	„Exkrementen“	0,665
„Exkrementen“	„Kompostierung“	0,594
	„Stroh und Kalk“	0,665

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001



Tab. A 39: Vergleiche der Einstreugruppen im Post hoc Test nach Tukey HSD mit der SummeARG als abhängige Variable

Gruppe	Gruppe	Signifikanz <sup>a</sup>
„Kompostierung“	„Stroh und Kalk“	<b>0,027*</b>
	„Exkremente“	<b>0,021*</b>
„Stroh und Kalk“	„Kompostierung“	<b>0,027*</b>
	„Exkremente“	0,982
„Exkremente“	„Kompostierung“	<b>0,021*</b>
	„Stroh und Kalk“	0,982

<sup>a</sup>Signifikanzniveau: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Tab. A 40: Gemittelte Abundanzen der ARG aller Resistenzgruppen der „Kompostierung“ Betriebe (K1-K9)

	Aminocumarine	Aminoglykoside	Bacitracin	B-laktame	Kationische antimikrobielle Peptide	Elfamycine	Fluor- chinolone	Fusidin- säure	Glyko- peptide	MLS *
K1	0,004	0,172	4,55E-05	0,019	0,002	0,005	0,008	1,60E-04	0,001	0,134
K2	5,37E-04	0,038	1,41E-05	0,004	7,24E-04	0,001	0,002	3,64E-05	4,62E-04	0,049
K3	9,98E-04	0,126	0,00E+00	0,010	0,001	0,003	0,002	2,35E-05	4,05E-04	0,109
K4	9,63E-04	0,050	2,20E-05	0,014	7,58E-04	0,002	0,003	1,46E-04	0,001	0,058
K5	9,63E-04	0,075	1,49E-05	0,007	6,66E-04	0,003	0,003	1,38E-04	5,29E-04	0,058
K6	0,002	0,078	4,93E-05	0,013	0,001	0,004	0,005	1,56E-04	0,002	0,102
K7	0,007	0,183	8,58E-05	0,021	0,003	0,009	0,012	1,96E-04	0,002	0,207
K8	0,001	0,055	4,22E-05	0,008	6,37E-04	0,002	0,003	5,56E-05	7,26E-04	0,048
K9	7,17E-04	0,061	1,08E-05	0,004	5,62E-04	0,003	0,002	6,69E-05	4,76E-04	0,061

\*(Makrolide, Lincosamide und Streptogramine)

Tab.A 39 Fortsetzung

	Multi-resistenz	Tuberkulostatika	Phenicole	Rifampicin	Sulfonamide	Tetrazykline	Trimethoprim	Fosfomycin	SummeARG
K1	0,004	0,001	0,006	0,006	0,024	0,010	3,87E-04	0,001	0,397
K2	7,82E-04	2,73E-04	0,002	0,001	0,006	0,003	2,74E-04	2,28E-04	0,108
K3	0,001	3,84E-04	0,006	0,003	0,033	0,006	0,004	6,55E-04	0,307
K4	0,002	7,47E-04	8,04E-04	0,003	0,005	0,004	2,34E-04	8,11E-04	0,147
K5	0,002	4,89E-04	0,001	0,002	0,012	0,008	3,20E-04	5,73E-04	0,174
K6	0,003	0,001	0,002	0,004	0,008	0,004	5,21E-04	0,001	0,232
K7	0,004	0,001	0,008	0,009	0,021	0,013	3,88E-04	0,002	0,503
K8	0,002	8,91E-04	0,001	0,003	0,008	0,004	1,12E-04	4,54E-04	0,139
K9	0,001	4,60E-04	8,32E-04	0,002	0,005	0,001	1,84E-04	3,04E-04	0,145

Tab. A 41: Gemittelte Abundanzen der ARG aller Resistenzgruppen der „Stroh und Kalk“ Betriebe (SK1-SK5, S1-S4)

	Aminocumarine	Aminoglykoside	Bacitracin	B-laktame	Kationische antimikrobielle Peptide	Elfamycine	Fluor- chinolone	Fusidin- säure	Glyko- peptide	MLS *
SK1	0,002	0,205	5,55E-04	0,012	0,004	0,006	0,004	6,22E-05	5,20E-04	0,271
SK2	5,34E-04	0,159	1,33E-05	0,007	0,002	0,005	0,003	4,36E-05	2,68E-04	0,150
SK3	9,56E-04	0,233	4,35E-05	0,015	0,003	0,004	0,002	4,75E-05	3,24E-04	0,237
SK4	0,001	0,237	2,10E-05	0,015	0,001	0,004	0,003	6,07E-05	5,44E-04	0,204
SK5	4,75E-05	0,011	0	8,46E-04	1,02E-04	1,62E-04	1,20E-04	1,88E-05	3,86E-05	0,016
S1	6,04E-04	0,168	1,02E-05	0,010	0,002	0,003	0,002	5,65E-05	3,49E-04	0,176
S2	8,01E-04	0,233	2,82E-05	0,008	0,004	0,004	0,002	3,73E-05	4,68E-04	0,272
S3	9,10E-04	0,245	6,90E-06	0,011	0,002	0,004	0,003	6,41E-05	5,35E-04	0,242
S4	1,99E-04	0,146	1,07E-05	0,008	0,004	0,003	8,55E-04	1,07E-04	2,93E-04	0,792

\*(Makrolide, Lincosamide und Streptogramine)

Fortsetzung Tab.A 40

	Multi-resistenz	Tuberkulostatika	Phenicol	Rifampicin	Sulfonamide	Tetrazykline	Trimethoprim	Fosfomycin	SummeARG
SK1	0,003	8,53E-04	0,003	0,004	0,009	0,008	0,001	0,008	0,543
SK2	0,001	4,61E-04	0,006	0,003	0,013	0,004	0,001	2,50E-04	0,355
SK3	9,64E-04	3,45E-04	0,007	0,002	0,018	0,007	0,001	5,85E-04	0,533
SK4	0,001	6,17E-04	0,004	0,003	0,022	0,010	0,002	6,97E-04	0,509
SK5	1,22E-04	5,31E-05	2,27E-04	1,43E-04	0,001	9,90E-04	5,48148E-05	0	0,032
S1	0,001	4,27E-04	0,002	0,002	0,018	0,010	0,001	5,33E-04	0,397
S2	0,001	6,09E-04	0,002	0,003	0,012	0,009	8,34E-04	6,42E-04	0,555
S3	0,002	6,29E-04	0,003	0,003	0,026	0,009	0,003	0,002	0,555
S4	3,59E-04	8,49E-05	0,002	0,001	0,005	0,016	0,001	1,41E-04	0,980

Tab. A 42: Gemittelte Abundanzen der ARG aller Resistenzgruppen der „Exkrement“ Betriebe (M1-M4, G1-G4)

	Aminocumarine	Aminoglykoside	Bacitracin	B-laktame	Kationische antimikrobielle Peptide	Elfamycine	Fluor- chinolone	Fusidin- säure	Glyko- peptide	MLS *
M1	9,84E-04	0,188	1,72E-04	0,013	0,003	0,004	0,003	4,91E-05	6,07E-04	0,248
M2	8,73E-04	0,152	1,37E-05	0,017	0,001	0,003	0,003	4,20E-05	4,44E-04	0,172
M3	9,01E-04	0,287	4,95E-05	0,024	0,002	0,003	0,003	4,72E-05	6,26E-04	0,249
M4	0,001	0,195	9,11E-05	0,011	0,002	0,005	0,004	7,90E-05	7,08E-04	0,312
G1	0,002	0,183	3,81E-05	0,017	0,001	0,005	0,005	1,29E-04	0,001	0,129
G2	4,34E-04	0,127	2,93E-05	0,021	0,001	0,002	5,60E-04	5,01E-05	2,88E-04	0,157
G3	0,001	0,215	9,62E-05	0,015	0,003	0,005	0,004	1,18E-04	7,17E-04	0,270
G4	5,27E-04	0,112	6,35E-06	0,011	0,002	0,002	0,002	2,23E-05	2,94E-04	0,182

\*(Makrolide, Lincosamide und Streptogramine)

Fortsetzung Tab.A 41

	Multi-resistenz	Tuberkulostatika	Phenicole	Rifampicin	Sulfonamide	Tetrazykline	Trimethoprim	Fosfomycin	SummeARG
M1	0,002	5,71E-04	0,014	0,003	0,022	0,016	0,003	0,003	0,524
M2	0,002	5,49E-04	0,034	0,003	0,025	0,011	0,002	3,69E-04	0,427
M3	0,007	4,18E-04	0,159	0,003	0,077	0,065	0,020	8,58E-04	0,900
M4	0,003	8,23E-04	0,014	0,004	0,012	0,015	0,002	0,001	0,584
G1	0,003	9,52E-04	0,002	0,005	0,018	0,007	0,001	5,46E-04	0,382
G2	0,001	2,89E-04	0,005	0,002	0,023	0,010	0,012	2,92E-04	0,363
G3	0,002	6,43E-04	0,007	0,004	0,019	0,019	0,004	0,001	0,573
G4	0,001	2,83E-04	0,006	0,002	0,006	0,016	0,005	5,85E-04	0,349

## SkriptR 1: Filtern nach Phylum und bakterielle Abundanzberechnung

### **SkriptR 1: Filtern nach Phylum und bakterielle Abundanzberechnung**

```
1  # Umgebung zurücksetzen - alle Objekte löschen
2  rm(list = ls())
3
4  # Notwendige Pakete laden
5  library(dplyr)      # Für die Datenmanipulation
6  library(readr)      # Zum Lesen von .txt-Dateien
7  library(purrr)      # Für funktionale Programmierung und Batch-Verarbeitung
8
9  # Arbeitsverzeichnis festlegen, in dem sich die Kraken2-Berichtsdateien befinden
10 setwd("")
11
12 # Alle .txt-Dateien im Verzeichnis auflisten
13 kraken_files <- list.files(pattern = "\\\\.txt$")
14
15 ## Checkpoint: Anzahl der Dateien überprüfen
16 length(kraken_files)
17
18 # Funktion, um Spaltennamen hinzuzufügen
```

```

19 process_file_add_headers <- function(file) {
20   # Datei einlesen, die erste Zeile der Daten bleibt unverändert
21   data <- read_tsv(file, col_names = FALSE)
22   # col_names = FALSE stellt sicher, dass keine automatischen Spaltenüberschriften gesetzt werden
23
24   # Spaltennamen hinzufügen
25   colnames(data) <- c("Percentage of reads covered by the clade rooted at this taxon",
26                       "Number of reads covered by the clade rooted at this taxon",
27                       "Number of reads assigned directly to this taxon",
28                       "Rank code",
29                       "NCBI taxonomy ID",
30                       "Indented scientific name")
31   return(data)
32 }
33
34 # Funktion zum Hinzufügen von Kopfzeilen anwenden
35 kraken_data_list <- map(kraken_files, process_file_add_headers)
36
37 ## Checkpoint: Die Anzahl der Dateien sollte mit der Anzahl der Datenrahmen in der Liste übereinstimmen
38 if (length(kraken_files) == length(kraken_data_list)) {

```

```

39     message("Erfolg: Die Anzahl der Dateien stimmt mit der Anzahl der Datenrahmen überein.")
40 } else {
41     stop("Fehler: Die Anzahl der Dateien stimmt nicht mit der Anzahl der Datenrahmen in der Liste überein.")
42 }
43
44 ## "Bakterien-Abundanz" auf Phylum-Ebene berechnen
45 calculate_phylum_abundance <- function(data) {
46     # Die Anzahl der Lesevorgänge der "Bakterien"-Reihe extrahieren (Rangcode = 'D' und Name = "Bakterien")
47     bacteria_reads <- data %>%
48         filter(`Rank code` == "D", `Indented scientific name` == "Bacteria") %>%
49         pull(`Number of reads covered by the clade rooted at this taxon`)
50
51     # Falls keine "Bakterien"-Reihe gefunden wird, auf NA setzen und warnen
52     if (length(bacteria_reads) == 0) {
53         warning("Keine 'Bakterien'-Reihe im Datensatz gefunden.")
54         bacteria_reads <- NA
55     }
56
57     # "Bakterien-Abundanz"-Spalte für Zeilen mit Rangcode 'P' hinzufügen
58     data <- data %>%

```

```

59     mutate(
60       `bacteria abundance` = ifelse(
61         `Rank code` == "P", # Nur für Phylumebene hinzufügen
62         round((`Number of reads covered by the clade rooted at this taxon` / bacteria_reads) * 100, 3),
63         NA
64       )
65     )
66
67   return(data)
68 }
69
70 ## Die spezifischen wissenschaftlichen Namen festlegen, nach denen gefiltert werden soll
71 scientific_names_to_filter <- c("Actinomycetota", "Acidobacteriota",
72                                "Aquificota", "Armatimonadota",
73                                "Atribacterota", "Bacillota",
74                                "Bacteroidota", "Bdellovibrionota",
75                                "Balneolota", "Campylobacterota",
76                                "Candidatus Absconditabacteria",
77                                "Candidatus Bipolaricaulota",
78                                "Candidatus Cloacimonadota",

```



79 "Candidatus Feravidibacteria",  
80 "Candidatus Omnitrophota",  
81 "Candidatus Saccharibacteria",  
82 "Caldisericota", "Calditrichota",  
83 "Chlorobiota", "Chloroflexota",  
84 "Chlamydiota", "Chrysiogenota",  
85 "Cyanobacteriota", "Deferribacterota",  
86 "Deinococcota", "Dictyoglomota",  
87 "Elusimicrobiota", "Fibrobacterota",  
88 "Fusobacteriota", "Gemmatimonadota",  
89 "Ignavibacteriota", "Lentisphaerota",  
90 "Mycoplasmata", "Myxococcota",  
91 "Nitrospirota", "Nitrospinota",  
92 "Planctomycetota", "Pseudomonadota",  
93 "Rhodothermota", "Spirochaetota",  
94 "Synergistota", "Thermodesulfobacteriota",  
95 "Thermomicrobiota", "Thermotogota",  
96 "Verrucomicrobiota",  
97 "Candidatus Cloacimonadota",  
98 "Candidatus Saccharibacteria")

```

99
100 # Die Funktion zur Berechnung der Phylum-Abundanz auf jedes Datenframe anwenden
101 kraken_data_list <- map(kraken_data_list, calculate_phylum_abundance)
102
103 # Funktion zum Filtern basierend auf spezifischen wissenschaftlichen Namen
104 filter_scientific_names <- function(data) {
105   # Entfernen von führenden/nachgestellten Leerzeichen und Umwandeln in Kleinbuchstaben für einen
106   fallunabhängigen Vergleich
107   data <- data %>%
108     mutate(`Indented scientific name` = trimws(`Indented scientific name`)) # Entfernen von Leerzeichen
109
110   # Nach den wissenschaftlichen Namen filtern, die in der Liste enthalten sind
111   filtered_data <- data %>%
112     filter(`Indented scientific name` %in% scientific_names_to_filter)
113
114   return(filtered_data)
115 }
116
117 # Die Filterfunktion auf alle Dateien anwenden
118 kraken_taxa_list <- map(kraken_data_list, filter_scientific_names)

```

```

119
120  ## Checkpoint: gefilterte Daten für die erste Datei
121  head(kraken_taxa_list[[1]])
122
123  # Gefilterte Daten speichern
124  output_directory <- "C:"
125
126  # Sicherstellen, dass das Ausgabeverzeichnis existiert
127  if (!dir.exists(output_directory)) {
128      dir.create(output_directory)
129  }
130
131  # Jede gefilterte Datenframe als .txt-Datei exportieren
132  map2(kraken_taxa_list, kraken_files, ~{
133      output_file <- file.path(output_directory, paste0("phylum_abundance_",
134      tools::file_path_sans_ext(basename(.y)), ".txt"))
135      write_tsv(.x, output_file)
136  })
137
138  # Nachricht zur Bestätigung des Exports

```

```
139 message("Phylum-Level Abundanz-Dateien wurden erfolgreich exportiert nach: ", output_directory)
```

## SkriptR 2: Berechnung arithmetisches Mittel der Phyla

### Skript 2: Berechnung arithmetisches Mittel der Phyla

```
1 # Umgebung zurücksetzen - alle Objekte löschen
2 rm(list = ls())
3
4 # Lade erforderliche Bibliotheken
5 library(dplyr)      # For data manipulation
6 library(readr)      # Zum Lesen von .txt-Dateien
7 library(purrr)      # Für funktionale Programmierung
8
9 # Arbeitsverzeichnis festlegen, in dem die gefilterten Dateien gespeichert sind
10 setwd("C:")
11
12 # Den Namen des letzten Ordners im Arbeitsverzeichnis extrahieren, um die Ausgabedateien zu benennen
13 directory_name <- basename(getwd())
14
15 # Alle .txt-Dateien im Verzeichnis auflisten
16 filtered_files <- list.files(pattern = "\\\\.txt$")
```

```

17
18  ## Checkpoint: Überprüfe die Anzahl der Dateien
19  length(filtered_files)
20
21  # Alle .txt-Dateien in eine Liste von Dataframes einlesen
22  filtered_data_list <- map(filtered_files, ~read_tsv(.x))
23
24  # Alle Dataframes zu einem kombinieren
25  combined_data <- bind_rows(filtered_data_list, .id = "source_file")
26
27  ## Checkpoint: Überprüfen der kombinierten Daten
28  head(combined_data)
29
30  # Ausgabeverzeichnisse definieren
31  output_dir_1 <- "C:"
32  output_dir_2 <- "C:"
33
34  # Schritt 1: Nach Phylum gruppieren und Vorkommen sowie mittlere Abundanz berechnen
35  mean_abundance_results <- combined_data %>%
36    group_by(`Indented scientific name`) %>%

```

```

37     summarize(
38         occurrences = n(), # Zähle die Vorkommen in allen Dateien
39         mean_abundance = round(mean(`bacteria abundance`, na.rm = TRUE), 3) # Berechnen des arithmetischen
40 Mittelwerts und auf 3 Dezimalstellen runden
41     ) %>%
42     ungroup() # Sicherstellen, dass keine Gruppierung im Output bleibt
43
44 # Schritt 2: Erste Ausgabedatei mit allen Phyla speichern (vor dem Cut-Off)
45 first_output_file <- paste0(output_dir_1, "/phyla_vor_cut-off_", directory_name, ".txt")
46 write_tsv(mean_abundance_results, first_output_file)
47
48 # Schritt 3: Cut-Off-Wert anwenden und Phyla mit niedriger Abundanz zu "Other phyla" zusammenfassen"
49 low_abundance <- mean_abundance_results %>%
50     filter(mean_abundance < 1) # Zeilen unterhalb des Cut-Off identifizieren
51
52 low_abundance_sum <- sum(low_abundance$mean_abundance, na.rm = TRUE) # Phyla mit niedriger Abundanz summieren
53 mean_abundance_results_with_other <- mean_abundance_results %>%
54     filter(mean_abundance >= 1) %>% # Behalte Zeilen oberhalb des Cut-Off
55     bind_rows(tibble(
56         `Indented scientific name` = "Other phyla",

```

```

57     occurrences = sum(low_abundance$occurrences, na.rm = TRUE),
58     mean_abundance = round(low_abundance_sum, 3) # Zeile für "Other Phyla" hinzufügen
59 ))
60
61 # Schritt 4: Alle Zeilen mit mittlerer Abundanz < 1 entfernen (außer "Other phyla")
62 final_mean_abundance_results <- mean_abundance_results_with_other %>%
63   filter(`Indented scientific name` == "Other phyla" | mean_abundance >= 1)
64
65 # Schritt 5: Eine Zeile mit der "Gesamtsumme" aller `mean_abundance`-Werte hinzufügen
66 total_sum <- sum(final_mean_abundance_results$mean_abundance, na.rm = TRUE) # Werte summieren
67
68 final_mean_abundance_results <- final_mean_abundance_results %>%
69   bind_rows(tibble(
70     `Indented scientific name` = "Total sum",
71     occurrences = NA, # Vorkommen als NA belassen
72     mean_abundance = round(total_sum, 3)
73   ))
74
75 # Schritt 6: Zweite Ausgabedatei mit den verbleibenden Phyla, "Other phyla" und "Total sum" speichern
76 second_output_file <- paste0(output_dir_2, "/phyla_mit_cut-off_", directory_name, ".txt")

```

```

77 write_tsv(final_mean_abundance_results, second_output_file)
78
79 # Nachricht zur Bestätigung des Exports
80 message("Both pre-cutoff and final results with 'Total sum' have been successfully exported.")

```

### SkriptR 3: Bakterienfamilien mit NCBI Taxonomie finden

#### **Skript 3: Bakterienfamilien mit NCBI Taxonomie finden**

```

1  # Umgebung zurücksetzen - alle Objekte löschen
2  rm(list = ls())
3
4  # Lade erforderliche Bibliotheken
5  library(taxize)    # Für die Abfrage taxonomischer Informationen
6  library(dplyr)     # Für Datenmanipulation
7  library(readr)     # Zum Lesen von Dateien
8
9  # Pfad der Eingabedatei definieren
10 input_file <- "C:"
11
12 # Laden der Kraken2-Ausgabedatei
13 kraken_data <- read_tsv(input_file, col_names = c(

```



```

14     "Percentage_of_reads", "Reads_covered", "Reads_assigned",
15     "Rank_code", "NCBI_taxonomy_ID", "Indented_scientific_name"
16 ))
17
18 # Filtere die Daten für Familien (Rank Code "F")
19 filtered_families <- kraken_data %>%
20   filter(Rank_code == "F") %>%
21   select(Indented_scientific_name) %>%
22   distinct()      # Entfernt Duplikate
23
24 # Extrahieren der Familiennamen als Vektor
25 family_names <- filtered_families$Indented_scientific_name
26
27 # Verwenden von taxize, um taxonomische Informationen für die Familien abzurufen
28 cat("Fetching taxonomic information...\n")
29 tax_info <- classification(family_names, db = "ncbi")
30
31 # Ergebnis-Dataframe mit Familien- und Königreich-Informationen erstellen
32 result <- data.frame(Family = family_names, Kingdom = NA)
33

```

```

34 # Schleife über jede Familie und das zugehörige Königreich basierend auf dem Superreich oder Domänen-Rang
35 for (i in seq_along(tax_info)) {
36   or (i in seq_along(tax_info)) {
37     if (!is.null(tax_info[[i]])) {
38       # Überprüfen, ob tax_info[[i]] ein data.frame oder tibble ist
39       if (is.data.frame(tax_info[[i]]) || is.list(tax_info[[i]])) {
40         # Rang mit "superkingdom" (oder "domain" in einigen Fällen) finden
41         kingdom_row <- tax_info[[i]][tax_info[[i]]$rank == "superkingdom", ]
42         if (nrow(kingdom_row) == 0) {
43           # Wenn "superkingdom" nicht gefunden wird, überprüfen von "domain"
44           kingdom_row <- tax_info[[i]][tax_info[[i]]$rank == "domain", ]
45         }
46
47         # Königreich aus dem Superreich- oder Domänen-Rang zuweisen
48         result$Kingdom[i] <- ifelse(nrow(kingdom_row) > 0, kingdom_row$name, NA)
49       } else {
50         # Wenn tax_info[[i]] kein data.frame oder Liste ist, NA zuweisen
51         result$Kingdom[i] <- NA
52       }
53     }

```

```
54 }  
55  
56 # Zeige das Ergebnis an  
57 print(head(result))  
58  
59 # Ergebnis in einer CSV-Datei speichern  
60 filtered_output_file <- "filtered_families_with_kingdom.csv"  
61 write.csv(result, filtered_output_file, row.names = FALSE)  
62 cat("Filtered families with Kingdom information have been saved to:", filtered_output_file, "\n")
```

SkriptR 4: Filter Bakterienfamilien mit Referenz und Berechnung Abundanz

**SkriptR 4: Filter Bakterienfamilien mit Referenz und Berechnung Abundanz**

```

1  # Umgebung zurücksetzen - alle Objekte löschen
2  rm(list = ls())
3
4  # Erforderliche Pakete laden
5  library(dplyr)      # Für Datenmanipulation
6  library(readr)      # Für das Lesen von .txt-Dateien
7  library(purrr)      # For funktionale Programmierung und Batch-Verarbeitung
8
9  # Arbeitsverzeichnis festlegen, in dem die Kraken2-Berichtsdateien gespeichert sind
10 setwd("C:")
11
12 # Alle .txt-Dateien im Verzeichnis auflisten
13 kraken_files <- list.files(pattern = "\\\\.txt$")
14
15 # Anzahl der Dateien überprüfen
16 length(kraken_files)
17
18 # Funktion zum Hinzufügen von Spaltennamen
19 process_file_add_headers <- function(file) {
20   data <- read_tsv(file, col_names = FALSE) # Read file without headers
21   colnames(data) <- c("Percentage of reads covered by the clade rooted at this taxon",

```

```

22         "Number of reads covered by the clade rooted at this taxon",
23         "Number of reads assigned directly to this taxon",
24         "Rank code",
25         "NCBI taxonomy ID",
26         "Indented scientific name")
27     return(data)
28 }
29
30 # Funktion zur Verarbeitung von Dateien mit Kopfzeilen anwenden
31 kraken_data_list <- map(kraken_files, process_file_add_headers)
32
33 # Checkpoint: Die Anzahl der Dateien sollte mit der Anzahl der Datensätze in der Liste übereinstimmen
34 if (length(kraken_files) == length(kraken_data_list)) {
35     message("Erfolg: Die Anzahl der Dateien stimmt mit der Anzahl der Datensätze überein.")
36 } else {
37     stop("Fehler: Die Anzahl der Dateien stimmt nicht mit der Anzahl der Datensätze in der Liste überein.")
38 }
39
40 # Referenzdatei mit Familien, die als 'Bakterien' gekennzeichnet sind, laden
41 reference_file <- "C: "
42 reference_data <- read_csv(reference_file)

```

```

43
44 # Referenzdaten filtern, um nur Familien mit 'Bakterien' einzuschließen
45 bacteria_families <- reference_data %>%
46   filter(Kingdom == "Bacteria") %>%
47   pull(Family)
48
49 # Funktion zum Filtern von Familien in den Kraken-Daten basierend auf den Referenzdaten
50 filter_bacteria_families <- function(data) {
51   # Filtern nach Zeilen, die in der Liste der Bakterienfamilien aus der Referenzdatei enthalten sind
52   filtered_data <- data %>%
53     filter(`Indented scientific name` %in% bacteria_families |
54            (`Rank code` == "D" & `Indented scientific name` == "Bacteria")) # Behalten der Zeile mit
55   Bakterien auf Rang 'D'
56
57   return(filtered_data)
58 }
59
60 # Filterfunktion auf jeden Kraken-Bericht anwenden
61 kraken_data_list_filtered <- map(kraken_data_list, filter_bacteria_families)
62
63 # Funktion zur Berechnung der Bakterienabundanz auf Familienebene

```

```

64 calculate_family_abundance <- function(data) {
65   bacteria_reads <- data %>%
66     filter(`Rank code` == "D", `Indented scientific name` == "Bacteria") %>%
67     pull(`Number of reads covered by the clade rooted at this taxon`)
68
69   if (length(bacteria_reads) == 0) {
70     warning("Keine 'Bakterien'-Zeile im Datensatz gefunden.")
71     bacteria_reads <- NA
72   }
73
74   # Relative Abundanz als Anteil (0 bis 1) anstelle von Prozent berechnen
75   data <- data %>%
76     mutate(
77       `bacteria abundance` = ifelse(
78         `Rank code` == "F", # Nur für Zeilen auf Familienebene berechnen
79         `Number of reads covered by the clade rooted at this taxon` / bacteria_reads,
80         NA
81       )
82     )
83
84   return(data)

```

```

85  }
86
87  # Funktion zur Berechnung der Bakterienabundanz anwenden
88  kraken_data_list_abundance <- map(kraken_data_list_filtered, calculate_family_abundance)
89
90  # Ausgabeverzeichnis angeben
91  output_directory <- "C:"
92
93  # Ausgabeverzeichnis erstellen, falls es nicht existiert
94  if (!dir.exists(output_directory)) {
95    dir.create(output_directory)
96  }
97
98  # Jede gefilterte und mit Abundanz berechnete Datenbank als .txt-Datei exportieren
99  map2(kraken_data_list_abundance, kraken_files, ~{
100    output_file <- file.path(output_directory, paste0("family_filtered_",
101    tools::file_path_sans_ext(basename(.y)), ".txt"))
102    write_tsv(.x, output_file)
103  })
104
105  # Nachricht zur Bestätigung des Exports

```



```
106 message("Gefilterte Familiendaten mit Bakterienabundanz wurden erfolgreich exportiert nach: ",
107 output_directory)
```

SkriptR 5: Berechnung arithmetisches Mittel der Bakterienfamilienabundanz jedes Betrieb

**SkriptR 5: Berechnung arithmetisches Mittel der Bakterienfamilienabundanz jedes Betrieb**

```
1  # Umgebung zurücksetzen - alle Objekte löschen
2  rm(list = ls())
3
4  # Erforderliche Pakete laden
5  library(dplyr)      # Für Datenmanipulation
6  library(readr)      # Für das Lesen von .txt-Dateien
7  library(purrr)      # For funktionale Programmierung und Batch-Verarbeitung
8
9  # Arbeitsverzeichnis festlegen, in dem gefilterte Dateien gespeichert sind
10 setwd("C: ")
11
12 # Den Namen des letzten Ordners im Arbeitsverzeichnis extrahieren, um die Ausgabedateien zu benennen
13 directory_name <- basename(getwd())
14
15 # Alle .txt-Dateien im Verzeichnis auflisten
```

```

16 filtered_files <- list.files(pattern = "\\\\.txt$")
17
18 ## Checkpoint: Anzahl der Dateien überprüfen
19 length(filtered_files)
20
21 # Alle .txt-Dateien in eine Liste von Datenrahmen einlesen
22 filtered_data_list <- map(filtered_files, ~read_tsv(.x))
23
24 # Alle Datenrahmen in einen kombinieren
25 combined_data <- bind_rows(filtered_data_list, .id = "source_file")
26
27 ## Checkpoint: Kombinierte Daten überprüfen
28 head(combined_data)
29
30 # Ausgabeverzeichnis definieren
31 output_dir <- "C:"
32
33 # Nach Familie gruppieren und Vorkommen sowie mittlere Abundanz berechnen
34 mean_abundance_results <- combined_data %>%
35   group_by(`Indented scientific name`) %>%
36   summarize(

```

```

37     occurrences = n(), # Vorkommen über alle Dateien hinweg zählen
38     mean_abundance = round(mean(`bacteria abundance`, na.rm = TRUE), 3) # Arithmetisches Mittel berechnen
39     und auf 3 Dezimalstellen runden
40 ) %>%
41 ungroup() # Sicherstellen, dass keine Gruppierung im Ergebnis bleibt
42
43 # Ausgabedatei mit Statistiken auf Familienebene speichern
44 output_file <- paste0(output_dir, "/families_mean_abundance_", directory_name, ".txt")
45 write_tsv(mean_abundance_results, output_file)
46
47 # Nachricht zur Bestätigung des Exports
48 message("Family-level mean abundance results have been successfully exported.")

```

## SkriptR 6: Berechnung Diversitätsindizes

### SkriptR 6: Berechnung Diversitätsindizes

```

1 # Umgebung zurücksetzen - alle Objekte löschen
2 rm(list = ls())
3
4 # Arbeitsverzeichnis festlegen, in dem die gefilterten Dateien gespeichert sind
5 setwd("C:/Users/Karin/Desktop/MasterarbeitD/Datenanlyase mit
6 R/Diversitätsindizes_23_12/Output_fambetrmean_final")

```

```

7
8 # Erforderliche Pakete laden
9 if (!requireNamespace("vegan", quietly = TRUE)) install.packages("vegan")
10 if (!requireNamespace("reshape2", quietly = TRUE)) install.packages("reshape2")
11 library(vegan)
12 library(reshape2)
13
14 # Pfad zu den Dateien in Gruppenordnern
15 group_path <- "C:/Users/Karin/Desktop/MasterarbeitD/Datenanlyase mit
16 R/Diversitätsindizes_23_12/Output_fambetrmean_final"
17
18 # Dateien aus allen Gruppenordnern importieren
19 file_list <- list.files(group_path, pattern = "*.txt", full.names = TRUE, recursive = TRUE)
20
21 # Gruppennamen aus Ordnernamen extrahieren (nach "Import_")
22 files_with_groups <- data.frame(
23   File = file_list,
24   Gruppe = sapply(dirname(file_list), function(x) sub("Import_", "", basename(x)))
25 )
26 print("File-to-group mapping:")
27 print(files_with_groups)

```

```

28
29 # Eine Liste aller Spaltennamen aus den Dateien erstellen
30 all_columns <- unique(unlist(lapply(1:nrow(files_with_groups), function(i) {
31     temp_data <- read.table(files_with_groups$File[i], header = TRUE, sep = "\t")
32     colnames(temp_data)
33 })))
34
35 # Daten einlesen und kombinieren
36 combined_data <- do.call(rbind, lapply(1:nrow(files_with_groups), function(i) {
37     temp_data <- read.table(files_with_groups$File[i], header = TRUE, sep = "\t")
38     missing_columns <- setdiff(all_columns, colnames(temp_data)) # Fehlende Spalten mit NA hinzufügen
39     for (col in missing_columns) temp_data[[col]] <- NA
40     temp_data$Gruppe <- files_with_groups$Gruppe[i] # Gruppennamen hinzufügen
41     return(temp_data)
42 })))
43
44 # Struktur der kombinierten Daten überprüfen
45 head(combined_data)
46 colnames(combined_data)
47
48 # Kombinierte Daten zur Überprüfung speichern

```

```

49 output_file <- "C:/Users/Karin/Desktop/MasterarbeitD/Datenanlyase mit
50 R/Diversitätsindizes_23_12/combined_data_output.txt"
51 write.table(combined_data, output_file, sep = "\t", row.names = FALSE, quote = FALSE)
52 cat("Combined table saved as", output_file, "\n")
53
54 # Abundanzmatrix erstellen (taxonomische Einheiten als Spalten, Gruppen als Zeilen)
55 abundance_matrix <- dcast(combined_data, Gruppe ~ `Indented.scientific.name`, value.var = "mean_abundance",
56 fill = 0, fun.aggregate = mean)
57 rownames(abundance_matrix) <- abundance_matrix$Gruppe # Gruppennamen als Zeilenamen benennen
58 abundance_matrix <- abundance_matrix[,-1] # Gruppenspalte aus Matrix entfernen
59
60 # Struktur der Abundanzmatrix überprüfen
61 str(abundance_matrix)
62 any(is.na(abundance_matrix)) # Prüfen, ob NAs vorhanden sind
63 abundance_matrix[is.na(abundance_matrix)] <- 0 # NAs durch 0 ersetzen
64
65 ## Diversitäten berechnen
66 shannon <- diversity(abundance_matrix, index = "shannon") # Shannon-Index
67 pielou <- shannon / log(rowSums(abundance_matrix > 0)) # Pielou's-Evenness
68 bray_curtis <- vegdist(abundance_matrix, method = "bray") # Bray-Curtis-Dissimilarität
69

```

```

70 # Ergebnisse formatieren
71 alpha_results <- data.frame(
72   Gruppe = rownames(abundance_matrix),
73   Shannon_Diversity = shannon,
74   Pielou_Evenness = pielou
75 )
76 beta_results <- as.matrix(bray_curtis)
77
78 # Ergebnisse anzeigen
79 print("Alpha diversity:"); print(alpha_results)
80 print("Beta diversity (Bray-Curtis):"); print(beta_results)
81
82 # Ergebnisse speichern
83 output_path <- group_path
84 write.table(alpha_results, file.path(output_path, "alpha_diversity_results.txt"), sep = "\t", row.names =
85 FALSE, quote = FALSE)
86 write.table(beta_results, file.path(output_path, "beta_diversity_results.txt"), sep = "\t", quote = FALSE)

```

