

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Weihenstephan

Lehrstuhl für Tierernährung

Experimentelle Untersuchungen zum Einfluss  
unterschiedlicher Rationsgestaltungen auf die mikrobielle  
Fermentation und die Zusammensetzung der Mikroflora im  
Pansen von Rindern

Elisabeth Johanna Zißler

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Agrarwissenschaft genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Prof. Angelika Schnieke, Ph.D.

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Wilhelm Windisch
2. Prof. Dr. Michael Schloter

Die Dissertation wurde am 08.09.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
am 11.01.2017 angenommen.

Vom Fachbereich Agrarwissenschaften der  
Technischen Universität München als Dissertation angenommen.

Dekanin: Prof. Dr. Angelika Schnieke

1. Gutachter: Prof. Dr. Wilhelm Windisch

2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Schloter

Vorsitzende: Prof. Angelika Schnieke, Ph.D.

Datum der Disputation: 17.03.2017

Wissenschaft ist nur eine Hälfte, Glauben ist die andere.

(Novalis)

Allen meinen Lieben

---

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	3
Abkürzungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	7
Abbildungsverzeichnis.....	9
Zusammenfassung .....	12
Abstract .....	14
1 Einleitung.....	15
2 Zielsetzung .....	22
3 Methodenoptimierung.....	23
3.1 Einleitung.....	23
3.2 Material und Methoden.....	24
3.2.1 Extraktion der DNA.....	24
3.2.2 SYBR Green.....	27
3.2.3 Bedingungen Primer-Test.....	28
3.2.4 Verdünnung der DNA .....	31
3.2.5 Herstellung des Standards zur absoluten Quantifizierung der mirkobiellen DNA mittels qPCR.....	31
3.2.6 Erstellung eines Standards aus einem probeninternen Standard .....	33
3.2.7 Quantitativer Nachweis der Mikroorganismen mittels qPCR...	33
3.2.8 Berechnung der Kopienzahl der Ziel-DNA .....	34
3.3 Ergebnisse .....	34
3.4 Diskussion .....	40
3.5 Schlussfolgerung.....	42
4 Zusammensetzung der ruminalen Mikroflora sowie der biochemischen Endprodukte der ruminalen Fermentation bei unterschiedlicher Versorgung mit Kohlenhydraten .....	45
4.1 Einleitung.....	45

---

4.2	Material und Methoden.....	46
4.2.1	Probennahme und Probenvorbereitung .....	47
4.2.2	Bestimmung der Ammoniakkonzentration im Pansensaft.....	48
4.2.3	Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren (VFA) .....	48
4.2.4	DNA Extraktion .....	49
4.2.5	Primer .....	50
4.2.6	qPCR Bedingungen.....	51
4.2.7	Next-Generation-Sequencing .....	51
4.2.8	Statistik .....	53
4.3	Ergebnisse .....	54
4.4	Diskussion .....	63
4.5	Schlussfolgerung.....	70
5	Einfluss einer Fütterung von unterschiedlichen Strukturanteilen in der Rindermast auf die ruminale Mikroflora sowie den biochemischen Endpunkten.....	71
5.1	Einleitung.....	71
5.2	Material und Methoden.....	74
5.2.1	Probennahme und Aufbereitung.....	75
5.2.2	Primer .....	76
5.2.3	Clusteranalyse.....	76
5.2.4	Statistik .....	77
5.3	Ergebnisse .....	77
5.4	Diskussion .....	111
5.5	Schlussfolgerung.....	117
6	Generaldiskussion .....	118
7	Ausblick .....	121
8	Literaturverzeichnis.....	123
	Anhang .....	135
	Danksagung .....	147

---

Eidesstattliche Erklärung ..... 151

## Abkürzungsverzeichnis

Neben den Abkürzungen des Dudens (21. Auflage, Dudenverlag 1996), den Einheiten des internationalen Einheitensystems sowie den Symbolen für chemische Elemente und Verbindungen wurden folgende Abkürzungen verwendet:

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
DEPC	Diethyldicarbonat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
bp	Basenpaare
qPCR	Quantitative Polymerase Kettenreaktion
nm	Nanometer
rpm	Umdrehungen pro Minute
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
PCR	Polymerase Kettenreaktion
MW	Mittelwert
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler der Mittelwerte
TM	Trockenmasse
SW	Strukturwert
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
mL	Milliliter
Mmol	Millimol

---

## Tabellenverzeichnis

### Tabellen im Text

Tabelle 1: Standard-Temperaturprogramm der qPCR .....	29
Tabelle 2: Vergleich der Extraktionsmethoden	35
Tabelle 3: Vergleich der Annealing-Temperaturen	40
Tabelle 4: Rationszusammensetzung und Futtermittelanalytik einer hoch stärke- und hoch faserreichen Ration .....	47
Tabelle 5: Spezifikation der qPCR Primerpaare .....	50
Tabelle 6: Zeitlicher Verlauf von Trockenmassen, pH, flüchtige Fettsäuren und Ammoniak Konzentration im Pansensaft nach Fütterung einer faserreichen (HF) und stärke- (HS) Ration .....	56
Tabelle 7: Zeitlicher Verlauf der ruminalen Mikroflora im Pansensaft (log <sub>10</sub> (Kopienzahl/gTM)) nach Fütterung einer faserreichen (HF) und stärke- (HS) Ration .....	58
Tabelle 8: Zeitlicher Verlauf der Verhältnisse funktioneller Hauptgruppen im Bezug auf die Gesamtheit der Bakterien (%) im Pansensaft nach Fütterung einer faserreichen (HF) und stärke- (HS) Ration .....	60
Tabelle 9: Rationszusammensetzung und kalkulierte Rohrnährstoff- und Energiegehalte der Rationen nach Ettle et al. 2014 .....	75
Tabelle 10: Spezifikation der qPCR Primerpaare .....	76
Tabelle 11: Einfluss von strukturwirksamer Faser auf das Stallendgewicht und Schlachthofgewicht der Mastbullen nach Ettle et al. (Ettle 2014) .....	78
Tabelle 12: Einfluss von strukturwirksamer Faser auf Trockenmasse, pH, flüchtige Fettsäuren und Ammoniak Konzentration im Pansensaft .....	79
Tabelle 13: Einfluss des Strukturwertes (SW) auf die ruminale Mikroflora des Pansensaftes (log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g TM)	80
Tabelle 14: Einfluss des Strukturwertes (SW) auf die Verhältnisse der funktionellen Hauptgruppen in Bezug auf die Gesamtheit der Bakterien (%) im Pansensaft	83
Tabelle 15: Einfluss des Strukturwertes (SW) auf die ruminale Mikroflora in der Pansenmatte (log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g TM)	85
Tabelle 16: Einfluss des Strukturwertes (SW) auf die Verhältnisse der funktionellen Hauptgruppen in Bezug auf die Gesamtheit der Bakterien (%) in der Pansenmatte	86

---

Tabelle 17: Einfluss des Strukturwertes (SW) auf die ruminale Mikroflora am Pansenepithel (log <sub>10</sub> (Kopienzahl/g TM)	87
Tabelle 18: Einfluss des Strukturwertes (SW) auf die Verhältnisse der funktionellen Hauptgruppen in Bezug auf die Gesamtheit der Bakterien (%) am Pansenepithel	88
Tabelle 19: Unterschiede zwischen Pansensaft, Pansenmatte und Pansenepithel der ruminalen Mikroflora (log <sub>10</sub> (Kopienzahl/g TM) .....	89
Tabelle 20: Häufigkeitsverteilung der Clusterung gleicher Stallnummer im Pansen .	104
Tabelle 21: Häufigkeitsverteilung der Clusterung gleicher Stallnummer am Pansenepithel .....	108
<b><u>Tabellen im Anhang</u></b>	
Tabelle 22: Kongressbeiträge .....	137
Tabelle 23: Laborgeräte .....	142
Tabelle 24: Verbrauchsmaterialien .....	143
Tabelle 25: Chemikalien und Biochemikalien .....	144
Tabelle 26: Verwendete Softwareprogramme und Datenbanken .....	146

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Symbiose des ruminalen Verdauungssystems und der mikrobiellen Gemeinschaft sowie den Verdauungs- und Fermentationsabläufen im Vormagensystem des Wiederkäuers.....	17
Abbildung 2: Abbauwege der mikrobiellen Kohlenhydratverdauung im Pansen.....	18
Abbildung 3: NanoDrop™ Messung eines DNA-Extrakts aus Pansensaft.....	27
Abbildung 4: SYBR-Green.....	28
Abbildung 5: Schmelzkurvenanalyse für 16S RNA Totale Bakterien (A), <i>Ruminococcus flavefaciens</i> (B) und <i>Fibrobacter succinogenes</i> (C). ....	30
Abbildung 6: Gelelektrophorese eines Primertests..	32
Abbildung 7: Verdünnungsstufen der Proben zur Inhibitionsvermeidung .....	36
Abbildung 8: Verlauf des Standards vor Optimierung. ....	37
Abbildung 9: Verlauf des Standards nach zusätzlicher Auftrennung durch Gelelektrophorese.....	38
Abbildung 10: Verlauf des Standards nach zusätzlicher Auftrennung durch Gelelektrophorese und nachgeschalteter Reamplifizierung des Zielprodukts. ...	39
Abbildung 11: Chromatogramm der flüchtigen Fettsäuren im Pansensaft.....	49
Abbildung 12: Hierarchische Clusteranalyse von Summe aller Bakterien ( $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ) im Pansen (Saft und Matte) zur Untersuchung eines Fütterungseffektes.....	91
Abbildung 13: Hierarchische Clusteranalyse von Archaea ( $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ) im Pansen (Saft und Matte) zur Untersuchung eines Fütterungseffektes.....	92
Abbildung 14: Hierarchische Clusteranalyse der anaeroben Pilze ( $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ) im Pansen (Saft und Matte) zur Untersuchung eines Fütterungseffektes ...	93
Abbildung 15: Hierarchische Clusteranalyse der Protozoen ( $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ) im Pansen (Saft und Matte) zur Untersuchung eines Fütterungseffektes.....	94
Abbildung 16: Hierarchische Clusteranalyse von <i>Fibrobacter succinogenes</i> ( $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ) im Pansen (Saft und Matte) zur Untersuchung eines Fütterungseffektes.....	95
Abbildung 17: Hierarchische Clusteranalyse von <i>Ruminococcus flavefaciens</i> ( $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ) im Pansen (Saft und Matte) zur Untersuchung eines Fütterungseffektes.....	96

---

Abbildung 18: Hierarchische Clusteranalyse der $\alpha$ -Proteobakterien (log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g TM) im Pansen (Saft und Matte) zur Untersuchung eines Fütterungseffektes.....	97
Abbildung 19: Hierarchische Clusteranalyse der Summe aller Bakterien (log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g TM) am Pansenepithel zur Untersuchung eines Fütterungseffektes.....	98
Abbildung 20: Hierarchische Clusteranalyse von Archaea (log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g TM) am Pansenepithel zur Untersuchung eines Fütterungseffektes.....	99
Abbildung 21: Hierarchische Clusteranalyse der anaeroben Pilze (log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g TM) am Pansenepithel zur Untersuchung eines Fütterungseffektes .....	100
Abbildung 22: Hierarchische Clusteranalyse der Protozoen (log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g TM) am Pansenepithel zur Untersuchung eines Fütterungseffektes.....	101
Abbildung 23: Hierarchische Clusteranalyse der $\alpha$ -Proteobakterien (log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g TM) am Pansenepithel zur Untersuchung eines Fütterungseffektes.....	102
Abbildung 24: Hierarchische Clusteranalyse der Summe aller Bakterien (log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g TM) im Pansen (Saft und Matte) zur Untersuchung eines Stalleffektes.....	104
Abbildung 25: Hierarchische Clusteranalyse von Archaea (log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g TM) im Pansen (Saft und Matte) zur Untersuchung eines Stalleffektes.....	105
Abbildung 26: Hierarchische Clusteranalyse der Anaeroben Pilze (log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g TM) im Pansen (Saft und Matte) zur Untersuchung eines Stalleffektes.....	105
Abbildung 27: Hierarchische Clusteranalyse der Protozoen (log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g TM) im Pansen (Saft und Matte) zur Untersuchung eines Stalleffektes .....	106
Abbildung 28: Hierarchische Clusteranalyse von <i>Fibrobacter succinogenes</i> (log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g TM) im Pansen (Saft und Matte) zur Untersuchung eines Stalleffektes.....	106
Abbildung 29: Hierarchische Clusteranalyse von <i>Ruminococcus flavefaciens</i> (log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g TM) im Pansen (Saft und Matte) zur Untersuchung eines Stalleffektes.....	107
Abbildung 30: Hierarchische Clusteranalyse der $\alpha$ -Proteobakterien (log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g TM) im Pansen (Saft und Matte) zur Untersuchung eines Stalleffektes.....	107
Abbildung 31: Hierarchische Clusteranalyse der Summe aller Bakterien (log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g TM) am Pansenepithel zur Untersuchung eines Stalleffektes.....	108

---

Abbildung 32: Hierarchische Clusteranalyse von Archaea (log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g TM) am Pansenepithel zur Untersuchung eines Stalleffektes .....	109
Abbildung 33: Hierarchische Clusteranalyse der Anaeroben Pilze (log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g TM) am Pansenepithel zur Untersuchung eines Stalleffektes.....	109
Abbildung 34: Hierarchische Clusteranalyse der Protozoen (log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g TM) am Pansenepithel zur Untersuchung eines Stalleffektes .....	110
Abbildung 35: Hierarchische Clusteranalyse der α-Proteobakterien (log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g TM) am Pansenepithel zur Untersuchung eines Stalleffektes	110

**Abbildungen im Anhang:**

Abbildung 36: Nähere Betrachtung des Musters der Mikrobiota mittels Next-Generation-Sequencing bei stärkerreicher und faserreicher Ration.. .....	135
Abbildung 37: Hierarchische Clusteranalyse der Summe aller Bakterien im Pansen zur Untersuchung eines Fütterungseffektes.....	136

## Zusammenfassung

Die besondere Fähigkeit von Rindern, eine Transformation von nicht essbarer, faserreicher Biomasse hin zu hochwertigen Nahrungsmitteln zu vollziehen, liegt im komplexen mikrobiellen Ökosystem ihrer Vormägen, insbesondere des Pansen. Diese Mikroflora im Pansen setzt sich aus Eukaryoten, Bakterien und Archaeen zusammen. Dabei enthält ein Gramm Panseninhalt ungefähr  $10^9$  bis  $10^{11}$  Bakterien,  $10^6$  Protozoen und bis zu  $10^5$  anaerobe Pansen-Pilze. Allerdings ist eine vollkommene funktionelle Charakterisierung des ruminalen Mikrobioms bisher noch nicht durchgeführt. Herkömmliche Untersuchungsmethoden, wie mikrobielle Kultivierung oder Analyse biochemischer Endpunkte der ruminalen Fermentation werden durch neuartige, molekularbiologische Methoden wie z.B. die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) und Next-Generation-Sequencing (NGS) abgelöst. In der vorliegenden Arbeit sollte eine funktionelle Charakterisierung des ruminalen Mikrobioms mittels qPCR und NGS unter verschiedener Rationsgestaltung untersucht werden.

Dabei wurde in der vorliegenden Promotionsarbeit der Einfluss einer stärkereichen gegenüber einer faserreichen Ration auf die ruminale Mikroflora bei acht fistulierten Rindern der Rasse *Frisians* untersucht. Dafür wurden Pansensaftproben im zeitlichen Verlauf nach der Fütterung (0h, 1,5h, 3h und 6h) über eine Pansenfistel entnommen und anschließend aus den gewonnenen Proben die mikrobielle DNA extrahiert. Analysen mittels qPCR sowie NGS zeigten signifikante Unterschiede im Muster der ruminalen Mikroflora in Abhängigkeit von der gefütterten Ration.

Im Weiteren wurde der Einfluss strukturwirksamer Faser auf die Mikroflora im Pansen bei Mastbullen untersucht. Dieser Versuch lief an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) in Poing/Grub. Hierbei wurden 67 Mastbullen im Alter von 500 Tagen mit einer durchschnittlichen Lebendmasse von 800kg mit unterschiedlichen Strukturwerten versorgt und anschließend die Mikroflora mittels qPCR analysiert. Hierbei zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Einfluss der Fütterung auf die biochemischen Endpunkte der Pansenfermentation, im Besonderen die flüchtigen Fettsäuren im Pansen,

---

sowie auf das Muster der ruminalen Mikroflora. Ebenso konnte mittels einer Clusteranalyse ein Einfluss historischer Gemeinsamkeiten der Tiere wie Herkunft und Aufstallung einen langfristigen Effekt auf die Diversität und das Muster der Mikroflora verdeutlicht werden.

Die vorliegende Arbeit konnte anhand mehrerer Fütterungsversuche sowie neuartiger Analysemethoden zeigen, dass diese molekularbiologischen Methoden neue Wege in der Charakterisierung der ruminalen Mikroflora ermöglichen. Ebenso konnte verdeutlicht werden, dass neben fütterungsbedingten Einflüssen auch herkunfts- sowie umweltbedingte Einflüsse das Muster der Pansenflora nachhaltig prägen.

---

## Abstract

The particular ability of cattle to transform non-edible, fiber-rich biomass to high-value food products is located in the complex microbial ecosystem of the rumen. The microflora in the rumen consists of *eukaryotes*, *bacteria* and *archaea*. One gram of rumen content contains approximately up to  $10^5$  anaerobic rumen fungi,  $10^6$  protozoa and  $10^9$ - $10^{11}$  bacteria. However, a complete characterization of the rumen microbiome is not completely known. Conventional methods of investigation, such as the analysis of the biochemical endpoints of the rumen fermentation, can be replaced by novel molecular biological methods such as quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and next-generation sequencing (NGS). In the present work a characterization of the rumen microbiome by qPCR and NGS should be examined under different diets. For this purpose, the influence of a starch-rich versus a fiber-rich diet on the ruminal microbiome was contributed on eight fistulated Holstein Frisians. Rumen fluid samples were taken in the temporal course of the day after feeding (0h, 1.5h, 3h and 6h) and microbial DNA was extracted. Analysis at the level of qPCR and NGS showed significant differences in the pattern of the rumen microbiome between the two different diets.

In addition, the impact of structure effective fiber on the rumen microflora of beef bulls was investigated in the present thesis. The experiments were conducted using 67 Fleckvieh bulls (live body weight 800 kg) in Grub/Poing at the Institute for Animal Nutrition and Feed management of the Bavarian State Research Center for Agriculture.

A significant treatment effect was observed for the biochemical endpoints of rumen fermentation as well as the pattern of the rumen microbiome. Surprisingly also an influence of historical commonalities of animals (origin, stabling) on the diversity of the rumen microorganisms was demonstrated.

The present thesis was able to characterize the ruminal microbiome under various feeding conditions by using new molecular biological methods. In Addition, diet-based influences as well as environmental impacts on the pattern of the rumen microorganisms were observed.

## 1 Einleitung

In den letzten Jahrzehnten steigt die Weltbevölkerung exponentiell an (UNPD 2012). So werden nach aktuellen Schätzungen der UNO im Jahr 2050 ca. zehn Milliarden Menschen auf der Erde leben (UNPD 2012). In Folge dieses Bevölkerungswachstums wird eine Nahrungsmittelknappheit in vielen Teilen der Welt zu einem immer größeren Problem werden (Godfray 2010). Als direkte Folge daraus steigt der Bedarf an Biomasse zur energetischen und stofflichen Verwertung ebenfalls, wodurch große Flächen an nutzbarem Land belegt werden (Godfray 2010). Auf Grund der begrenzt zur Verfügung stehenden Agrarflächen wächst deshalb die Konkurrenz zwischen den verschiedenen Produktionsrichtungen um diese Flächen stark an (Smith 2010). Eine mögliche Erleichterung für diese Probleme stellt hierbei die Nutzung von Wiederkäuern da. Sie besitzen die Eigenschaft, nicht essbare Biomasse in hochwertige Lebensmittel umzuwandeln. Dies liegt vor allem an dem komplexen mikrobiellen Ökosystem ihrer Vormägen, welches aus dem Pansen, dem Blättermagen und dem Netzmagen besteht.

Der Pansen nimmt mit bis zu 230 Litern das größte Volumen im komplexen Verdauungssystem des Rindes ein (Spann 1993). Anatomisch wird der Pansen in einen dorsalen und einen ventralen Pansensack gegliedert (Abb. 1). Der danach folgende Netzmagen trennt die bereits fermentierten Futterstoffe vom Pansensaft ab. Diese wandern dann in den Blättermagen, der hauptsächlich zur Wasserrückgewinnung dient. Der Labmagen, der dem Drüsenmagen der Monogastrier sehr ähnlich ist, stellt den Ort der Verdauung von Proteinen dar, die dort gespalteten Aminosäuren werden anschließend im Dünndarm aufgenommen (Hungate 1985) (Abb. 1).

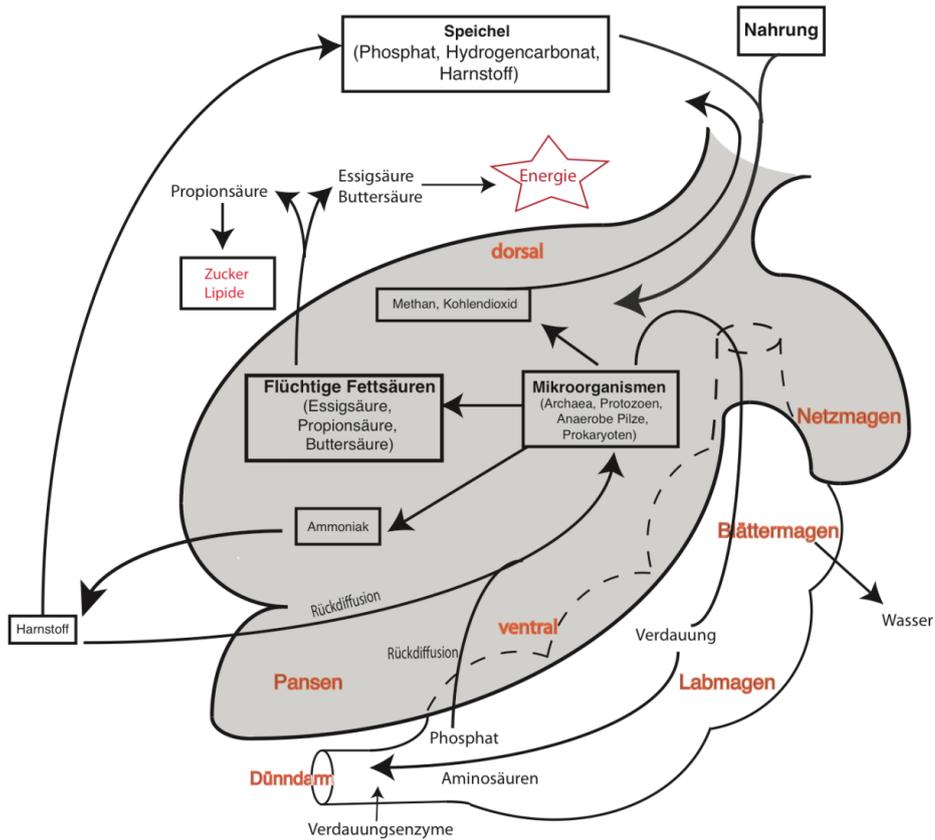
Neben diesen Vorgängen spielt das mikrobielle Ökosystem im Pansen eine wichtige Rolle bei der Verdauung. Es besteht aus einer Mischkultur von Eukaryoten (Protozoen und Pilze), Bakterien und Archaeen. Man geht davon aus, dass ein Gramm Panseninhalt etwa  $1 \times 10^6$  Protozoen und bis zu  $1 \times 10^5$  anaerobe Pilze sowie rund  $1 \times 10^9$  bis  $1 \times 10^{11}$  Bakterien beinhaltet (Jeroch 1999). Der Anteil an *Archaea* an Bakterien in der Mikroflora wird aufgrund von

ruminalen RNA Analysen zwischen 0,3 und 3,3% beziffert (Lin 1997, Sharp 1998, Ziemer 2000).

Allerdings sind bisher schätzungsweise nur 10% aller Pansen-Mikroben bekannt (Michalet-Doreau 2002). Die ruminale Mikroflora ist bei den Verdauungsvorgängen im Pansen neben dem Abbau von Proteinen auch an der Aufspaltung von Pflanzenmaterial beteiligt. Von zentraler Bedeutung ist jedoch vor allem die Faserverdauung der Wiederkäuer, die nur durch die Mikrobiota möglich ist (Creevey 2014). Eine Änderung der Zusammensetzung und der Zahl der Mikroflora im Pansen kann durch das Alter sowie der Fütterung der Tiere beeinflusst werden (Russel 2002, Welkie 2010).

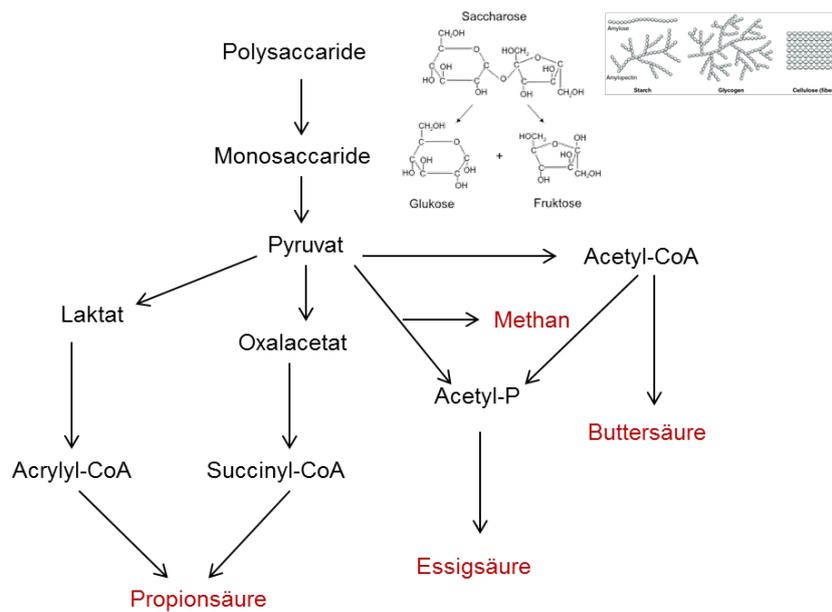
Die Leistung der im Pansen vorkommenden Mikroorganismen ist enorm, sie bauen etwa 65 – 85% der Nahrung zu flüchtigen Fettsäuren (Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure), Ammoniak, Kohlendioxid und Methan ab (Gürtler 1989). Hierbei stellen die flüchtigen Fettsäuren für die Wiederkäuer die Hauptenergiequelle dar (Kirchgessner 2011). Zur Pufferung der organischen Säuren, die durch den mikrobiellen Nährstoffabbau entstehen, dient Hydrogencarbonat aus dem Speichel, das beim Wiederkauen in den Pansen gelangt (Abb. 1).

Ammoniak wird als Nebenprodukt vor allem beim Proteinabbau, der Harnstoffwiederverwertung oder den mikrobiellen Verdauungsprozessen gebildet (Wichern 2011). Ammoniakstickstoff dient hauptsächlich den Bakterien als Stickstoffquelle und wird unter Energieaufwand in Mikrobenprotein umgewandelt (Krause 1996). Dieses gelangt zusammen mit dem nicht abgebauten Rest des Futterproteins in den Dünndarm und steht damit dem Wiederkäuer als Proteinquelle zur Verfügung.



**Abb. 1: Schematische Darstellung der Symbiose des ruminalen Verdauungssystems und der mikrobiellen Gemeinschaft sowie den Verdauungs- und Fermentationsabläufe im Vormagensystem des Wiederkäuers.**

Ein viel diskutiertes Nebenprodukt in der Synthese von flüchtigen Fettsäuren ist Methan. Dieses wird von *Archaeen* über den Pyruvat-Formiatlyse-Weg bei der Essigsäureproduktion gebildet (Abb. 2). Dabei entstehen jedoch Verluste von 6 bis 10% der Gesamtenergie für den Wiederkäuer und stellen damit eine Ineffizienz bei der ruminalen Verwertung von Biomasse hin zum Lebensmittel dar. Neben diesem Energieverlust stehen auch die Auswirkungen von Methan als Co-Faktor der globalen Erderwärmung im Fokus der Wissenschaft (Johnson 1995, Moss 2000).



**Abb. 2: Abbauwege der mikrobiellen Kohlenhydratverdauung im Pansen**

### *Entwicklung des Nachweises der ruminalen Mikroflora*

Die Zusammensetzung und Funktion der ruminalen Mikroflora steht schon seit Jahrzehnten im Fokus der Wissenschaft. Zu Beginn wurden neben kultur-basierten Techniken erstmals die Messung der Fermentationsparameter durch Robert Hungate zur Erforschung der Mikroorganismen angewendet (Hungate 1966, Krause 2013). Dabei stand die Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren sowie der ruminalen Verdaulichkeit des Futters im Vordergrund. Durch die methodische Limitierung konnten zu dieser Zeit die Mikroorganismen im Pansen lediglich über eine klassische Zählung der Kolonien im Lichtmikroskop differenziert werden (Leedle 1982). Durch diese Methoden war es möglich, isolierte Kulturen, Substrate und Endprodukte von Bakterien näher zu beschreiben (Counotte 1981, Russell 1985). Diese Erkenntnisse erweiterten das Grundlagenwissen über die Zusammensetzung und grundlegenden Funktionen der Bakterien im Pansen enorm. Im Jahr 1988 beschrieben Stahl et al. als Erste die Extraktion von Nukleinsäuren aus dem Panseninhalt. Dabei wurden die Bakterien *ex vivo* vermehrt, d.h. außerhalb des geschlossenen Systems im Pansen. Erste Möglichkeiten der Differenzierung unterschiedlicher

Bakterienspezies im Pansen wurden mittels eines radioaktiven Phosphor-Assays durchgeführt. Der Fokus dieser Untersuchungen lag jedoch ausschließlich auf den faserabbauenden Bakterien.

Im Jahre 1975 gelang es der Gruppe um Orpin, mit der ersten Beschreibung anaerober ruminaler Pilze einen großen Fortschritt in der Untersuchung der Mikroflora des Pansens zu erzielen (Orpin 1975). Weiter konnten Orpin und Joblin 1997 erstmals die zentrale Rolle der Pilze beim Faserabbau im Pansen dokumentierten (Orpin 1997).

Ein weiterer bedeutsamer Entwicklungsschritt in der Erforschung des ruminalen Mikrobioms gelang durch den Einsatz neuartiger molekularbiologischer Methoden. Mit der Messung der mikrobiellen DNA aus Panseninhalt unter der Anwendung von spezifischen Primern in der quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) wurden erstmals Informationen in hoher zeitlicher Auflösung ermöglicht (Freemann 1999, Tajima 2001, Ouwerkerk 2002, Klieve 2003). Die aktuelle Entwicklung hin zur Hochdurchsatz-Analyse mittels Next-Generation Sequencing (NGS) erlaubt es, mikrobielle Populationen auf genetischer Ebene sehr genau zu charakterisieren und auf die Fütterung von Wiederkäuern anzuwenden (McCann 2014).

### *Hauptvertreter der Mikroflora im Pansen*

Als Hauptvertreter der cellulolytischen Bakterien im Pansen werden *Fibrobacter succinogenes* sowie *Ruminococcus flavefaciens* angesehen (Koike 2001). *Fibrobacter succinogenes* bindet mittels Adhäsion bei der Faserverdauung fest an die Oberfläche des Pflanzenmaterials und perforiert dadurch die Zellwände (Mironov 1979, Miron 1989, Miron 1993). Vor allem Endoglucanasen, die Gruppe der fibrolytischen Enzyme von *Fibrobacter succinogenes* stehen dabei aktuell im Fokus der Wissenschaft. Das faserabbauende Bakterium besitzt zwei Endoglucanasen, Endoglucanase 2 (EG2) und Endoglucanase F (EGF) sowie eine Cellobiosidase M (CBM), die gemeinsam die Adhäsion an die Cellulosestruktur bedingen (Huang 1988, McGavin 1996).

Bei *Ruminococcus flavefaciens* hingegen erfolgt der Abbau der Zellwände in einer vergleichsweise kurzen Zeitspanne (Latham 1978, Miron 1994). Dies läuft

über zwei Mechanismen ab, einerseits einem Cellulosome-ähnlichen Komplex (Multiproteinaggregat) und andererseits einem Kohlenhydrat-Epitop in der Schleimhautschicht des Pansenepithels. Dies hat zur Folge, dass *Ruminococcus flavofaciens* fester an die im Pansen vorhandenen Faserpartikel bindet und diese somit zügig abbauen kann (Latham 1978).

Neben den Bakterien sind anaerobe Pilze ebenfalls am Faserabbau im Pansen beteiligt. Zu den Hauptvertretern im Pansen zählen *Neocallimastix frontalis*, *Piromyces sp.* und *Caecomyces sp.*, die alle der Familie der Neocallimastigaceae angehören (Krause 2003). Anaerobe Pilze siedeln sich am Pflanzenmaterial an und bauen dort Lignin-haltige Teile ab, die von anderen Mikroorganismen nicht verdaut werden können (Lowe 1987). Allerdings ist das Wachstum und die Abbaugeschwindigkeit bei anaeroben Pilzen deutlich langsamer als bei bakteriellen Vertretern (Krause 2003). Dies stellt ein Problem für die Verweildauer der Pilze im Pansen dar, da somit ihre Wachstumsrate deutlich geringer als die Passagerate im Pansen ist (Krause 2003). Jedoch besitzen anaerobe Pilze im Pansen die besondere Eigenschaft, mittels ihrer einzigartigen Exo-Cellulase Aktivität bis zu 34% des Ligninanteils im Pansen abzubauen (Forsberg 1997). Eine weitere Besonderheit ist die Interaktion der Pilze mit anderen Mikroorganismen (Dehority 2000). Einige Spezies der im Pansen befindlichen Pilze, wie zum Beispiel *N. frontalis* hemmen das Wachstum von *Fibrobacter succinogenes*. *Caecomyces* hingegen fördern das Wachstum von *Fibrobacter succinogenes* (Joblin 2002).

Die ebenfalls im Pansen vorkommenden *Archaea* sind meist strikt anaerob lebenden Methanogene. Sie sind für die ruminalen Abbauprozesse im Pansen von großer Bedeutung. *Archaea* sind hauptsächlich an der Produktion von Essigsäure und der damit verbundenen Methanproduktion beteiligt (Pitta 2010). Die Hauptvertreter in der Gruppe der *Archaea* sind *Methanobrevibacter*, *Methanomicrobium*, *Methanobacterium* und *Methanosarcina* (Whitford 2001).

Als weitere Hauptvertreter im Pansen können Protozoen genannt werden. Sie bilden mit rund 50% den größten Anteil des ruminalen Mikrobioms. Protozoen ernähren sich hauptsächlich von Bakterien und anderen Mikroorganismen, sodass sie das übermäßige Wachstum der Bakterien im Pansen stark eindämmen können (Ozutsumi 2005). Vor allem der Anteil an cellulolytischen

sowie amylolytischen Bakterien im Pansen nehmen unter dem Einfluss von Protozoen stark ab (Ozutsumi 2005). Häufige Vertreter der Protozoen des ruminalen Mikrobioms sind *Entodinium spp.*, *Dasytricha sp.* sowie *Polyplastron sp.* (Ozutsumi 2005).

Für den Proteinabbau im Pansen ist hauptsächlich die Gruppe der Proteobakterien zu nennen. Sie zeichnet sich vor allem durch ihre Metabolisierung von Futterproteinen in Ammoniak aus (McSweeney 2012). Der dabei entstehende Stickstoff dient als Quelle für faserabbauende Bakterien (McSweeney 2012). Die Vertreter der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien sind die drei wichtigsten im Pansen vorkommenden Subgruppen (Kang 2013).

## **2 Zielsetzung**

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollte der Einfluss einer unterschiedlichen Rationsgestaltung auf die ruminale Fermentation und die Charakterisierung der Mikroflora im Pansen untersucht werden. Daneben sollten längerfristige Einflüsse wie Aufstallung oder Herkunft auf die ruminale Mikroflora untersucht werden. Die Arbeit gliederte sich in zwei Abschnitte:

### **Optimierung der Extraktionsmethode von Pansenmaterial sowie der Analyse von Mikroorganismen im Pansen**

1. Optimierung der DNA-Extraktionsmethode
2. Optimierung des Standards für die absolute Quantifizierung mittels PCR
3. Optimierung der qPCR-Bedingungen sowie der Probenvorbereitung

### **Anwendung der Techniken der Mikroflora-Messung bei verschiedener Rationsgestaltung**

1. Charakterisierung der Mikroflora unter stärkereicher und faserreicher Ration sowie die Umstellung zwischen den Rationen auf Ebene der biochemischen Endpunkte sowie absolute Quantifizierung aller Hauptvertreter der Mikrobiota mit nachgeschaltetem Next-Generation-Sequencing
2. Untersuchung des Einflusses von strukturwirksamer Faser auf die ruminale Fermentation sowie die Mikroflora bei Mastbullen durch absolute Quantifizierung.
3. Als Nebeneffekt sollte der Einfluss von gemeinsamen Lebensabschnitten der Tiere (Herkunft, Bucht und Umgebung) auf die Entwicklung der ruminale Mikroflora über den zeitlichen Verlauf eines Versuchs hinweg untersucht werden.

## 3 Methodenoptimierung

### 3.1 Einleitung

Im Gegensatz zu anderen biologischen Materialien ist die Untersuchung von Panseninhalt ein schwierig zu analysierendes Material, da z.B. Fettsäuren, Salze, Lipide oder Inhibitoren aus dem Futtermittel enthalten sind. Diese können die Analyse von Mikroorganismen aus dem Pansen mittels molekularbiologischer Techniken inhibieren oder anderweitig negativ beeinflussen. Präliminäre Untersuchungen von Panseninhalt-Proben zeigten, dass in silagebasierten Proben die Messung der Gesamtheit an Bakterien im Pansen durch Huminsäuren stark inhibiert wurde (Zipper 2004). Aus diesem Grund ist eine optimale Extraktion des Probenmaterials von großer Bedeutung, denn durch eine erfolgreiche Extraktion der mikrobiellen DNA wird die Grundlage für die Analyse der ruminalen Mikroflora mittels molekularbiologischer Methoden gelegt. Daher sollte in der vorliegenden Doktorarbeit die Extraktionsmethode von mikrobieller DNA aus Pansenproben optimiert werden, um bereits vor Beginn der Analysen den Gehalt an fütterungsbedingten, inhibitorischen Mediaten wie der Huminsäure im Pansenextrakt zu minimieren. Dazu wurde die weitverbreitete Extraktionsmethode von Yu und Morrison (2004) validiert. Hierbei zeigte sich, dass Hemmstoffe bei der Extraktion nicht ausgeschlossen werden konnten und somit eine Optimierung der Extraktion zwingend notwendig ist. Durch das Austesten verschiedenster Extraktionskits konnte mittels Umstieg auf den MP FastDNA Spin Kit for Feces der Firma MP Biomedicals die Reinheit und Spezifität des DNA-Extrakts deutlich verbessert werden. Ebenso musste in Zuge dessen auch das angeschlossene Analyseverfahren optimiert und validiert werden, da sich bei der Optimierung der Extraktionsmethode zeigte, dass weitere Einflussfaktoren wie Probenverdünnung einen Einfluss auf die Analyse der Mikroflora im Pansen haben. Ebenso zeigte sich im Verlauf der Optimierung, dass die Annealing-Temperatur, Annealing-Dauer und Qualität des absoluten Standards eine große Rolle in der Effizienz und dem Erfolg der Messungen mittels quantitativer Real-Time Polymerasekettenreaktion (qPCR) spielen. Dies führte zu einer Optimierung der Annealing-Dauer, der

Probenverwendung vor der Messung sowie der Herstellung des Standards. Der Verlauf der Methodenoptimierung sowie das endgültige Protokoll werden im nachfolgenden Kapitel näher erläutert.

## 3.2 Material und Methoden

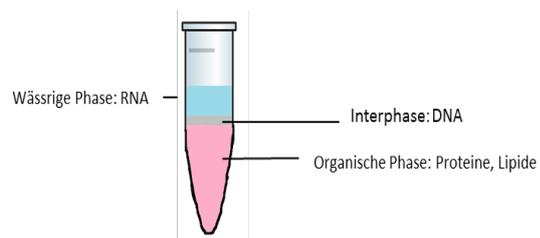
### 3.2.1 Extraktion der DNA

#### Phenol-Chloroform-Fällung

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde eine bereits am Lehrstuhl etablierte Methode zur Extraktion mikrobieller DNA aus Panseninhalt angewendet. Hierbei handelte es sich um die Extraktionsmethode nach Yu und Morrison (Yu 2004). Das nachfolgende Schema zeigt den genauen Ablauf der Extraktion:

Hierbei wurde die mikrobielle DNA aus gefriergetrocknetem und homogenisiertem Panseninhalt unter der Phenol-Chloroform-Fällung nach Yu und Morrison (2004) extrahiert. Hierzu wurden 0,2 g der gefriergetrockneten Proben mit 0,2 g Maxim Keramik Beads und 900  $\mu$ L Lysispuffer versetzt. Die Proben wurden gevortext und im MP FastPrep® 24 Homogenisator bei 6,0 m/S für 15 Sekunden homogenisiert. Es folgte eine Zentrifugation der Proben bei 12000 x g für 5 Minuten. Die Überstände wurden in ein neues 2 mL Tube überführt und mit 500  $\mu$ L Qiazol versetzt. Die Proben wurden nun vorsichtig gevortext und für 10 Minuten bei Raumtemperatur

inkubiert. Danach wurden 200  $\mu$ L Chloroform dazugegeben. Die Proben wurden daraufhin bei 12000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Die



mittlere Phase (siehe Abbildung) wurde vorsichtig mit der Pipette abgenommen und mit 500  $\mu$ L Isopropanol sowie 50  $\mu$ L zehn-molarer Ammoniumacetatlösung versetzt. Anschließend wurde die DNA bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über Nacht ausgefällt. Darauf folgte wieder ein Zentrifugationsschritt bei 7500 x g für 15 Minuten und der Überstand wurde verworfen. Das DNA-Pellet wurde zweimal mit 1 mL 70% Ethanol gewaschen und anschließend für drei Minuten luftgetrocknet. Um

abschließend das Pellet und somit die DNA zu lösen, wurde 200 µL dnasefreies Wasser (DEPEC) hinzugegeben. Somit lag nun die elutierte DNA vor.

### **Extraktion mittels Kit**

Hierbei wurde die mikrobielle DNA aus gefriergetrocknetem und homogenisiertem Pansensaft und Pansenmatte sowie Pansenepithelgewebe unter Verwendung des MP FastDNA Spin Kit for Feces (MP Biomedicals, Santa Ana; USA) extrahiert. Hierzu wurden 0,1 g der gefriergetrockneten Proben vorab mit 500 µL Sodium Phosphate Buffer versetzt, zur besseren Vermischung der Proben. Danach wurden diese Mischung in ein 2 mL Lysing Matrix E Tube überführt und mit weiteren 825 µL Sodium Phosphate Buffer und 275 µL PLS Solution versetzt. Das Ganze wurde für 10 Sekunden gevortext. Danach wurden die Proben bei 14000 x g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Weitere 978 µL Sodium Phosphate Buffer wurden hinzugegeben sowie 122 Sodium Phosphate Buffer MT Buffer. Die Proben wurden erneut gevortext und im MP FastPrep® 24 Homogenisator bei 6,0 m/S für 40 Sekunden homogenisiert. Es folgte eine Zentrifugation der Proben bei 14000 x g für 15 Minuten. Die Überstände wurden in ein neues 2 mL Tube überführt und mit 250 µL PPS Solution versetzt. Die Proben wurden nun vorsichtig vermischt und für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurden sie für 2 Minuten bei 14000 x g zentrifugiert.

Die Überstände wurden nun zusammen mit 1 mL Binding Matrix Solution in ein 5 mL Tube überführt und durch Schwenken vermischt. Danach wurden die Proben für 5 Minuten auf einem Rüttler geschüttelt. Darauf folgte wieder ein Zentrifugationsschritt bei 14000 x g für 2 Minuten. Die Überstände wurden verworfen und das Pellet vorsichtig mit 1 mL Wash Buffer 1 resuspendiert. Diese Lösung wurde nun in zwei Schritten in ein SPIN Filter Tube überführt, zuerst 600 µL der Lösung mit einer nachfolgenden Zentrifugation von 14000 x g für 1 Minute, dann die restlichen 400 µL mit einer erneuten Zentrifugation. Danach wurden 500 µL Wash Buffer 2 hinzugegeben und das Pellet am Filter vorsichtig damit resuspendiert. Die Proben wurden daraufhin bei 14000 x g für 2

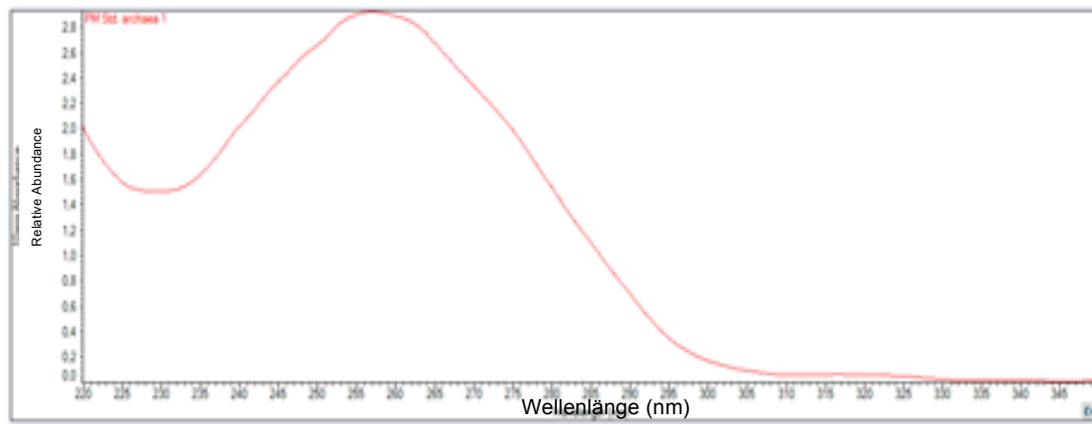
Minuten zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um das gesamte Ethanol zu entfernen und die Proben zu trocknen, wurden die Proben nochmals unter gleichen Bedingungen für 2 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der SPIN Filter in ein neues 1,9 mL Catch Tube überführt und 100  $\mu$ L TES hinzugegeben. Um das Pellet zu lösen, wurde vorsichtig gegen das Tube geschnippt. Abschließend wurden die Proben bei 14000 x  $g$  für 2 Minuten zentrifugiert. Somit lag nun die elutierte DNA vor.

### **PowerSoil<sup>®</sup> DNA Isolation Kit**

Als weitere Extraktionsmethode wurde der PowerSoil<sup>®</sup> Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, USA) ausgetestet und nach Herstellerangaben verwendet. Hierbei werden die Proben mittels einer Bead beating Methode aufgeschlossen und anschließend die mikrobielle DNA mittels eines Silica-Membran Verfahrens extrahiert.

Die DNA-Konzentration und Reinheit aller DNA-Extrakte wurde mittels Nano Drop<sup>™</sup> (PeqLab Laboratories, Erlangen, Deutschland) ermittelt (Abb. 4). Die Qualität und Reinheit der DNA wurden über die Verhältnisse von  $A_{260/280}$  und  $A_{280/230}$  entsprechend der MIQE Guidelines bestimmt. Das Verhältnis (Ratio) der Absorption bei 260nm und 280nm kann zur Bestimmung der Reinheit von DNA herangezogen werden.

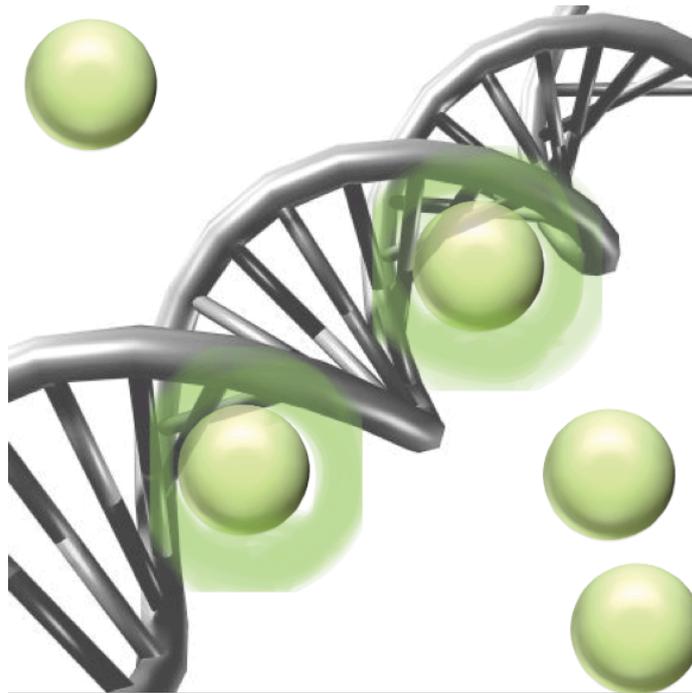
Die vier elementaren Nukleotide, aus denen die DNA besteht, besitzen folgende 260/280 Ratios für Guanin (1,15), Adenin (4,50), Cytosin (1,51) und Thymin (1,47). Die resultierende 260/280 Ratio für DNA entspricht dem gewichteten Durchschnitt der vorhandenen 260/280 Werten der vier Nukleotide. Üblicherweise sollte dieses Verhältnis für reine DNA bei ca. 1,8 liegen, was jedoch von der Zusammensetzung der Nukleinsäuren abhängig ist. Liegt die Ratio deutlich unter diesem Wert, indiziert dies eine Verunreinigung durch Protein, Phenol oder andere Kontaminationen, die bei 280nm absorbiert werden. Das Verhältnis von 260nm zu 230nm ist ein zweiter Marker für die Reinheit der DNA. Dieser sollte bei reiner DNA bei ca. 0,2 liegen, ein Wert deutlich unter 0,2 würde für eine Kontamination sprechen. Anschließend wurde die DNA bei -20°C gelagert.



**Abb. 3: NanoDrop™ Messung eines DNA-Extrakts aus Pansensaft.** Die hier gezeigte DNA-Konzentrationsbestimmung spiegelt die beiden Reinheitsparameter 260/280 nm sowie 260/230 nm wider. Die Y-Achse zeigt dabei Verhältnisse der einzelnen Nukleinsäuren der gemessenen DNA bei unterschiedlicher Wellenlänge.

### 3.2.2 SYBR-Green

Der heute üblicherweise für qPCRs verwendete sensitive Farbstoff für doppelsträngige DNA (dsDNA) ist SYBR-Green I, welcher Charakteristika eines unsymmetrischer Cyaninfarbstoff hat. SYBR-Green I ist interkalierend und bindet weitgehend sequenz-unspezifisch in der kleinen Furche der dsDNA. So gebunden fluoresziert SYBR-Green I nach Anregung etwa eintausend Mal stärker als der freie Farbstoff, weshalb SYBR Green I sehr gut geeignet ist, um die Akkumulation doppelsträngiger PCR-Produkte in der qPCR sichtbar zu machen. Es lässt sich in Gegenwart von dsDNA mit Blaulicht der Wellenlänge 480 nm anregen.



**Abb. 4: SYBR-Green.** Generierung eines Fluoreszenzsignals während der qPCR durch SYBR-Green I. Das Anregungslicht wird von freiem SYBR-Green I nicht absorbiert, ausschließlich der in der kleinen Furche der dsDNA gebundene Farbstoff fluoresziert nach Anregung.

### 3.2.3 Bedingungen Primer-Test

Zur Bestimmung der Annealing-Temperaturen der Primer und zur Überprüfung, ob der Primer das gewünschte Produkt amplifiziert, wurde eine Gradienten-PCR am Eppendorf Mastercycler® Gradient S durchgeführt. Hierzu wurde für jedes Primer-Paar folgender PCR-Ansatz pro Reaktion erstellt:

SYBR Green	7,5 µL
Primer forward	0,6 µL
Primer reverse	0,6 µL
Wasser	4,8 µL
Probe	1,5 µL
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>15 µL</b>

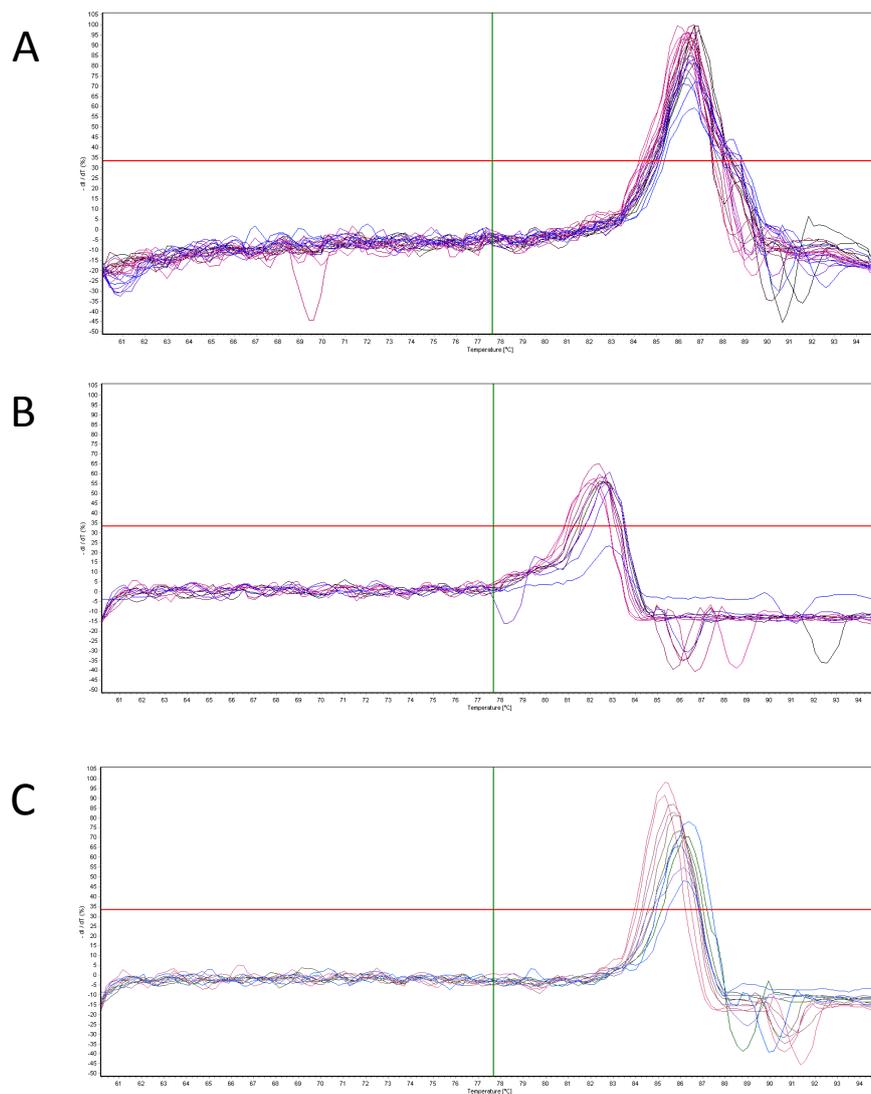
Tabelle 1: Standard-Temperaturprogramm der qPCR

<b>Programm</b>	<b>Zyklenzahl</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Zeit [min]</b>
Hot-Start	1	95	05:00
Denaturierung		95	00:20
Annealing	30	55,2-65	01:00
Elongation		72	00:30
Schmelzkurve	1	60-95	20:00

Um in jedem Well die gleichen Probenbedingungen zu gewährleisten, wurde aus allen Proben ein Probenmix erstellt. Zur Aktivierung der Hot-Start Polymerase wurden die Proben für fünf Minuten auf 95°C erhitzt. Anschließend erfolgte die Denaturierung der Doppelstränge bei 95°C für 20 Sekunden. Für das Annealing wurde hierbei ein Gradient von 55°C bis 65°C verwendet, bei dem eine Steigerung von jeweils 0,8°C pro Well stattfand. Die Elongation bei 72°C schloss sich für 1 Minute an.

Dieser Zyklus der aufeinanderfolgenden Denaturierung, Annealing und Elongation wurde 30 Mal wiederholt. Anschließend erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse zur Charakterisierung entstandener PCR-Produkte. Dazu wurde die DNA mittels eines Temperaturgradienten von 60°C auf 95°C erhitzt und dadurch aufgeschmolzen. Wird dabei die Primer-spezifische Schmelztemperatur erreicht, denaturiert der Doppelstrang, wodurch SYBR-Green freigesetzt wird und die Fluoreszenz abnimmt. Da bei Doppelstrang-DNA (dsDNA) der Schmelzpunkt höher liegt als bei Einzelstrang-DNA (ssDNA), lassen sich spezifische Produkte von unspezifischen Produkten, wie Primer-Dimer und Hair-Pin-Loops unterscheiden. Abbildung 5C zeigt beispielhaft einen

Verlauf der Schmelzkurvenanalyse des spezifischen Primer-Paares für *Fibrobacter succinogenes*. Um das Temperaturoptimum der jeweiligen Primer zu bestimmen, wurden die einzelnen Schmelzkurven mit unterschiedlichen Temperaturstufen verglichen. Die Kurve mit dem eindeutigsten Peak wurde als Annealing-Temperatur für die Primer festgelegt.



**Abb. 5: Schmelzkurvenanalyse für 16S RNA Totale Bakterien (A), *Ruminococcus flavefaciens* (B) und *Fibrobacter succinogenes* (C).** Über diese Analyse ist es möglich, die Korrektheit der amplifizierten Produkte zu überprüfen sowie eine Bildung von Primer-Dimeren und Hairpin-Loops auszuschließen. Ebenso ist es dadurch möglich unspezifische Neben-PCR-Produkte auszuschließen.

### 3.2.4 Verdünnung der DNA

Neben der Optimierung der Extraktionsmethode sollte auch durch eine Änderung der Verdünnungsverhältnisse eine inhibierende Wirkung vermieden werden. Hierzu wurden für jeden Primer verschiedene Verdünnungsstufen von 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 und 1/1280 erstellt. Dazu wurde 1 µL des Extraktes mit 19 µL Rnase-freiem Wasser vermischt und gevortext. Danach wurden aus dieser Lösung 10 µL entnommen und wiederum mit 10 µL Wasser vermischt. Dies wurde fortgeführt bis zu einer Verdünnung von 1:1280 des Ursprungsextraktes. Zur Bestimmung der optimalen Verdünnung wurde eine qPCR am Eppendorf Mastercycler® Gradient S durchgeführt.

### 3.2.5 Herstellung des Standards zur absoluten Quantifizierung der mikrobiellen DNA mittels qPCR

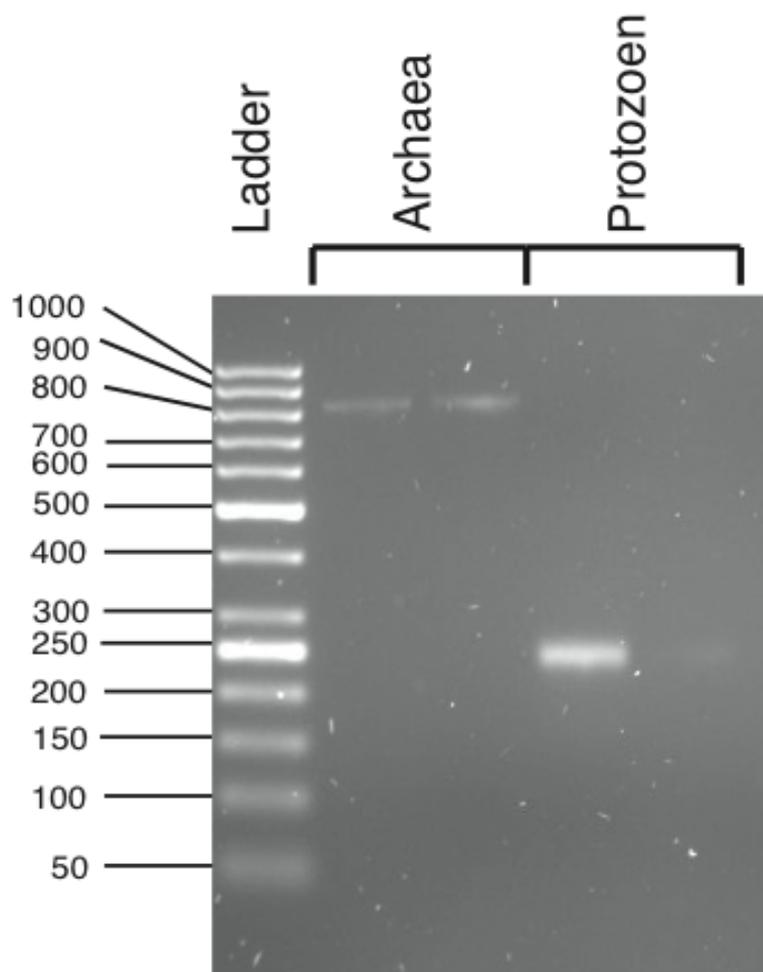
Um die DNA von Mikroorganismen quantitativ bestimmen zu können, wurde aus der unter 3.2.3 beschriebenen Gradienten-PCR ein probeninterner Standard für jedes Primerpaar erstellt. Hierzu wurde die Reaktion mit der optimalen Annealing-Temperatur mit dem MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde mittels Nano Drop™ bestimmt.

Danach wurden die Produkte zur zusätzlichen Überprüfung der Spezifität und zur besseren Auftrennung des Zielprodukts auf ein 2-prozentiges Agarosegel aufgetragen. Da die DNA-Moleküle negativ geladenen sind, bewegen sich diese durch die angelegte Spannung zur Anode hin. Kleine DNA-Fragmente können hierbei schneller durch die Maschen des Gels wandern als große Fragmente.

Zur Herstellung des 2-prozentigen Agarosegels wurden 100 mL TAE-Puffer (Rezept siehe Anhang) mit 2 g Agarose in der Mikrowelle aufgeköcht und dabei mehrmals bis zur vollständigen Auflösung der Agarose geschwenkt. Anschließend wurde das Gel im Wasserbad unter Rühren abgekühlt und mit je 6 µL GelRed (SYBR Safe DNA Gel Stain, Invitrogen; Karlsbad, USA) pro 100 mL versetzt. Der Farbstoff GelRed interagiert mit der DNA und ermöglicht somit

eine Visualisierung der DNA-Fragmente. Er ähnelt in seiner Struktur Ethidiumbromid, ist jedoch aufgrund seiner Protein-Caps nicht gesundheitsgefährdend.

Das noch flüssige Gel wurde in den Gelschlitten gegossen und ein Kamm mit 12 Zinken eingesetzt. Nach etwa 20 Minuten war das Gel auspolymerisiert und es wurde in die mit TAE-Puffer gefüllte Kammer gegeben. Die Taschen wurden mit jeweils entweder 8  $\mu\text{L}$  der Probe oder 10  $\mu\text{L}$  des Markers (50bp) beladen. Die Auftrennung erfolgte bei 100 Volt für 60 Minuten. Der Marker 50bp von PeqLab (PeqLab, Deutschland) diente zur Einordnung der Fragmentgrößen. Abschließend wurden die Banden mittels UV-Licht sichtbar gemacht und photodokumentiert.



**Abb. 6: Gelelektrophorese eines Primertestes** für *Archaea* und Protozoen; (die hier gezeigten Proben stammen aus dem Pansensaft) Das Bild zeigt die Zielprodukte der qPCR mit einer Fragmentlänge von 826 bp für *Archaea* und 223 bp für Protozoen.

Darauffolgend wurden die Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mittels Analytik Jena innuPREP Gel Extraction Kit (Analytik Jena, Jena, Deutschland) nach Herstellerangaben aus dem Gel extrahiert. Es erfolgte eine weitere Konzentrationsbestimmung der DNA mittels Nano Drop™ (siehe Abschnitt 3.2.1).

Zur Erhöhung der Konzentration des aus den Proben erstellten Standards schloss sich eine weitere Vervielfältigung des Zielprodukts mittels PCR im ThermoCycler T100 (Biorad, München, Deutschland) an. Der Reaktionsansatz sowie das Temperaturprogramm entsprachen den bereits beschriebenen Bedingungen des Primertests.

Abschließend wurde der Reaktionsmix nach Herstellerangaben mit dem MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und die Bestimmung der Endkonzentration des Standards mittels Nano Drop™ durchgeführt. Der Standard wurde dann aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur Messung gelagert.

### **3.2.6 Erstellung einer Standardreihe aus einem probeninternen Standard**

Um eine Standardreihe aus dem internen Standard erstellen zu können, wurde mittels einer Matrix die Kopienanzahl errechnet (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>). Die errechneten Kopienanzahlen wurden mittels Verdünnung auf eine Konzentration von  $1 \times 10^8$  Kopien eingestellt. Durch eine weitere dezimale Verdünnungsreihe von  $1 \times 10^8$  bis  $1 \times 10^1$  wurde eine Standardreihe erstellt. Die Standardreihe ermöglichte bei der Auswertung der qPCRs eine absolute Quantifizierung der Amplifikate.

### **3.2.7 Quantitativer Nachweis der Mikroorganismen mittels qPCR**

Die qPCR ermöglicht es die Produktanreicherung in Echtzeit zu verfolgen und mittels einer Standardkurve die PCR-Produkte absolut zu quantifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die Messungen mittels des Eppendorf Mastercycler

Gradient realplex S Detektions-Systeme (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) durchgeführt. Der Reaktionsansatz lag bei 15 µL auf 96 Well Reaktionsplatten. Der Mastermix für eine Reaktion sowie das Temperaturprogramm wurden, wie bereits in 3.2.3 beschrieben, verwendet. Die Messung erfolgte im Duplikat.

### **3.2.8 Berechnung der Kopienzahl der Ziel-DNA**

Bei der absoluten Quantifizierung der ruminalen Mikroflora werden die Veränderungen über die Messung bestimmter DNA-Sequenzen der Bakterien aufgezeigt. Die Software des Eppendorf Realplex errechnet aus der quantifizierten DNA-Sequenz eine Kopienzahl der gemessenen Mikroorganismen. Diese Kopienzahl der Ziel-DNA wurde pro Gramm Trockenmasse des Pansensaftes berechnet.

## **3.3 Ergebnisse**

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Extraktionskits und -methoden speziell für die Isolierung mikrobieller DNA getestet. Neben der standardmäßig eingesetzten Phenol-Chloroform-Fällung wurden der MP Biomedicals FastDNA Spin Kit for Feces (MP Biomedicals, Santa Ana; USA) sowie der Power Soil® DNA Isolation Kit (Mo BIO Laboratories, Carlsbad, USA) getestet. Bei Verwendung des MP Biomedicals FastDNA Spin Kits waren die Reinheit der DNA sowie die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse am besten, jedoch lag die extrahierte Menge an Nukleinsäuren fünffach unter der Menge der Phenol-Chloroform-Fällung. Der Power Soil® DNA Isolation Kit wurde nicht weiter verwendet, da eine zu geringe Ausbeute und zu geringe Reinheit der DNA für weitere molekularbiologische Analysen vorlag. Im Gegensatz dazu wies der FastDNA Spin Kit for Feces eine hohe DNA-Qualität sowie DNA-Menge auf. So wurde letztlich der FastDNA Spin Kit for Feces als optimierte Standardmethode der mikrobiellen DNA-Isolation nun am Lehrstuhl eingesetzt.

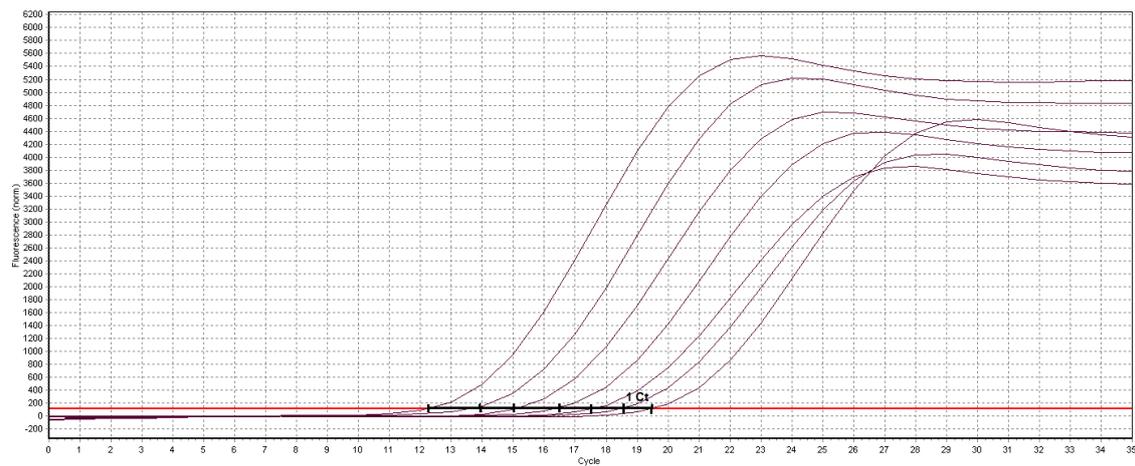
Die folgende Tabelle zeigt die unterschiedlichen DNA-Ausbeuten der drei getesteten Extraktionsmethoden.

Tabelle 2: Vergleich der Extraktionsmethoden

	Extraktionsmethode					
	Phenol-Chloroform		FastDNA Spin Kit		PowerSoil	
<b>DNA-Gehalt [ng/μl]</b>						
Probe 1	1853,6		171,3		47,8	
Probe 2	1746,5		125,6		31,0	
<b>Reinheit</b>	260/280	260/230	260/280	260/230	260/280	260/230
Probe 1	1,46	0,52	1,91	0,22	1,19	0,48
Probe 2	1,61	0,82	1,94	0,14	1,38	0,66

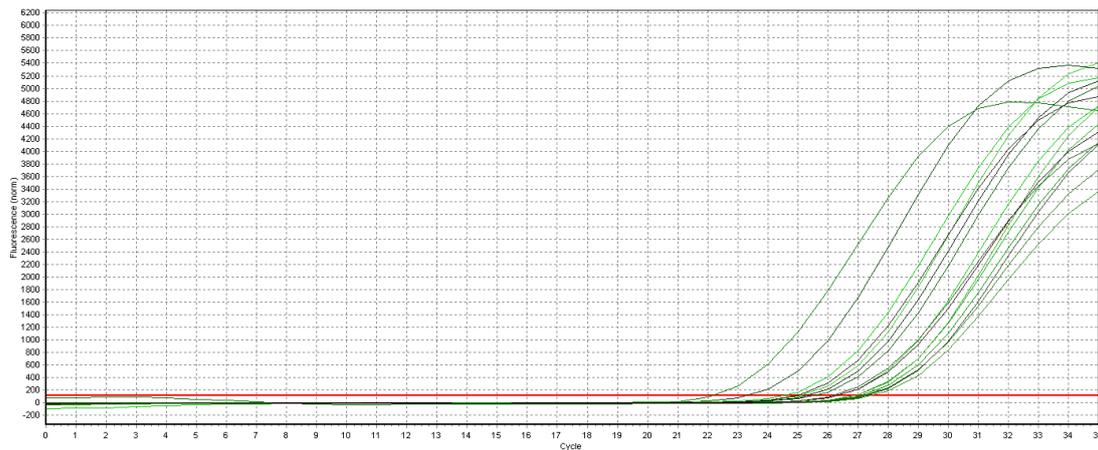
Neben der Optimierung der Extraktionsmethode zeigte sich ebenfalls, dass durch eine zusätzliche Anpassung der Verdünnungsverhältnisse der mikrobiellen DNA eine inhibierende Wirkung vermieden werden konnte. Hierzu wurden für jeden Primer verschiedene Verdünnungsstufen von 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 und 1/1280 getestet. In der folgenden Abbildung ist der Verlauf einer solchen Verdünnungsreihe dargestellt (Abb. 7). Bei einer optimalen Verdünnung der Proben sollte zwischen zwei Verdünnungsstufen ein Amplifikationszyklus liegen. Wie in der folgenden Abbildung des 16S rRNA Primers zu sehen, ist dies zwischen den Verdünnungsstufen 1/640 und 1/1280 der Fall.

Die nachfolgende Abbildung zeigte, dass durch eine zusätzliche Verdünnung der Proben der Anteil an inhibitorischen Produkten zusätzlich reduziert werden konnte und somit ein optimaler Verlauf der Messung ermöglicht wurde.



**Abb. 7: Verdünnungsstufen der Proben zur Inhibitionsvermeidung.** Um die optimale Probenverdünnung zu ermitteln, ist hier exemplarisch eine Probenverdünnung dargestellt. Die Verdünnungsstufen sind hier von links nach rechts von 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 und 1/1280 dargestellt.

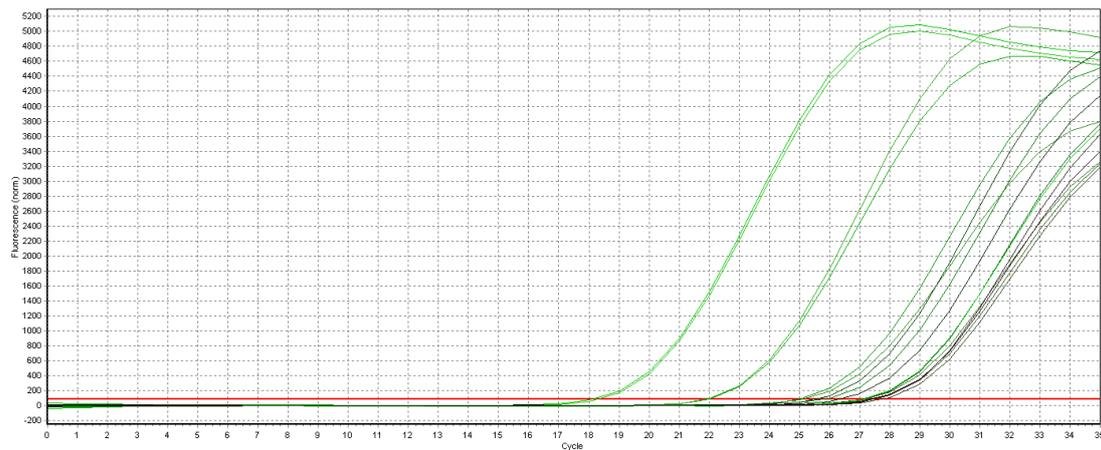
Zur Detektion einer exakten Kopienzahl bestimmter Mikroorganismen im Panseninhalt wurde eine Standardreihe mit bekannten Kopienzahlen zur absoluten Quantifizierung benötigt, welche durch einen Primertest mit nachgeschalteter Aufreinigung erstellt wurden (siehe 3.2.4). Anhand dieser eingesetzten Standardreihe kann die Software des Eppendorf Mastercycler® Gradient S die Ct-Werte des Standards mit den Ct-Werten der gemessenen Proben abgleichen und somit direkt die Kopienzahl der Proben berechnen. Allerdings zeigte sich bei bisherigen Untersuchungen von Pansenproben, dass die Erstellung und Messung einer solchen Standardreihe ein sensibles System mit hoher Anfälligkeit für äußere Einflüsse ist. Aus diesem Grund musste die Anwendung eines absoluten Standards optimiert, standardisiert und validiert werden. Um eine reproduzierbare Quantifizierung zu gewährleisten, sollten laut MIQE Guidelines (Bustin 2009) fünf aufeinanderfolgende Standardpunkte quantifiziert werden. Wie die folgende Abbildung zeigt, besaßen häufig alle bisher verwendeten Standardverdünnungen einen ähnlichen und grenzwertig hohen Ct-Wert, wodurch die Effizienz der qPCR sehr schlecht wurde.



**Abb. 8: Verlauf des Standards vor Optimierung.** Diese Abbildung zeigt exemplarisch eine Standardreihe von  $10^7$  bis  $10^0$  des 16S rRNA Primers.

Aus diesem Grund musste die Anwendung eines absoluten Standards optimiert werden. Hierfür wurde nach der bisherigen Aufreinigungsmethode des Standards mittels MinElute Purification Kits (Qiagen, Deutschland) eine Gelelektrophorese nachgeschaltet. Den MIQE Guidelines (Bustin 2009) entsprechend, wurde die Qualität und die Spezifität der qPCR-Produkte überwacht.

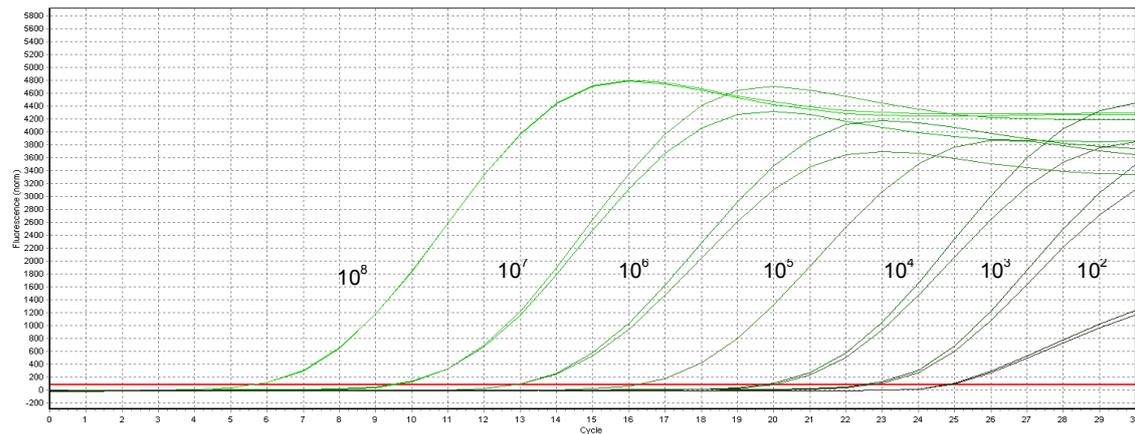
Die dabei entstandene Bande des Zielgens wurde ausgeschnitten und die DNA mittels Analytik Jena innuPREP Gel Extraction Kits aufgereinigt. Die nachfolgende Abbildung zeigt, dass durch die nachgeschaltete Gelelektrophorese zwar der Verlauf der Standardreihe verbessert werden konnte, jedoch der erste Standardpunkt erst bei Zyklus 18 den Schwellenwert überschritt.



**Abb. 9: Verlauf des Standards nach zusätzlicher Auftrennung durch Gelelektrophorese.** Abgebildet ist der Verlauf der Standardreihe von  $10^7$  bis  $10^0$  des 16S rRNA Primers.

Um nun eine Anreicherung des Zielgens zu ermöglichen, wurde zur weiteren Optimierung eine zusätzliche PCR unter Standardbedingungen der Gelelektrophorese nachgeschaltet. Dies erhöhte die Konzentration des gewünschten Zielgenes, sodass eine bessere Effizienz der qPCR dieses Standards erreicht werden konnte. Bei einer Standardreihe von  $10^7$ - $10^0$  wurde der Gehalt an Zielgen in den letzten Standardpunkten so gering, dass eine optimale Quantifizierung nicht möglich war. Aus diesem Grund wurde die Abfolge der Standardreihe hingegen von  $10^8$  bis  $10^2$  verändert.

Die nachfolgende Abbildung zeigt eine exemplarische Standardreihe des 16S rRNA Primers nach Optimierung. Es konnte somit eine Effizienzsteigerung auf nahezu 100% erreicht werden.



**Abb. 10: Verlauf des Standards nach zusätzlicher Auftrennung durch Gelelektrophorese und nachgeschalteter Reamplifizierung des Zielproduktes.** Abgebildet ist der Verlauf der Standardreihe von  $10^8$  bis  $10^2$  des 16S rRNA Primers.

Neben der Optimierung der Probenextraktion, -verdünnung und der Standardreihe wurden in der hier vorliegenden Arbeit ebenfalls die PCR-Bedingungen optimiert. Bisherige Analysen der Mikroflora mittels qPCR zeigten, dass ein Annealing von 40 Zyklen einen Einfluss auf die Negativkontrolle besaß. Die Negativkontrolle bestand aus dem Reaktionsmix sowie 1,5 µL Wasser anstatt Probe. Nach 40 Zyklen zeigte sich jedoch, dass der Primer bei höheren Zyklenzahlen (>30 Zyklen) begann, Primerdimere zu bilden. Um dies zu vermeiden und damit auch eine aussagekräftige Negativkontrolle zu gewährleisten, wurde die Zyklenzahl auf 30 Zyklen beschränkt.

Ebenso zeigten weitere Voruntersuchungen, dass die Dauer des Annealings während der qPCR einen starken Einfluss auf die Quantifizierung der Mikroorganismen hat. Zu Beginn der Arbeit wurde beim Zeitprogramm der qPCR ein Annealing von 30 Sekunden verwendet. Allerdings zeigte sich, dass bei der Produktlänge der zu analysierenden Primer-Sequenzen, eine Verlängerung der Annealingdauer auf eine Minute zu einer Optimierung der Quantifizierung führte. In der nachfolgenden Tabelle sind die Ct-Werte sowie die Kopienzahlen unter den verschiedenen Annealing-Bedingungen aufgeführt.

Tabelle 3: Vergleich der Annealing-Zeiten

	Ct	Kopienzahl [log <sub>10</sub> Kopien / mL PS]
30 sec	30,05	6,54
	28,19	10,21
60 sec	17,09	10,64
	18,66	10,44

### 3.4 Diskussion

Fettsäuren, Salze, Lipide und Inhibitoren können die Analyse von Mikroorganismen aus dem Pansen mittels molekularbiologischer Techniken behindern oder beeinflussen (Bustin 2009). Um die Untersuchungen dieses schwer zu analysierenden Materials zu standardisieren, zeigten präliminäre Untersuchungen von Panseninhalts-Proben, dass in silagebasierten Proben die Messung einiger Mikroorganismen durch Huminsäuren stark inhibiert wurde (Zipper 2004). Daher sollte in der vorliegenden Doktorarbeit die Extraktionsmethode optimiert und validiert werden, um bereits zu Beginn der Analysen den Gehalt an fütterungsbedingten, inhibitorischen Mediaten wie der Huminsäure im Pansenextrakt zu minimieren.

#### *Optimierung der Extraktionsmethode und Probenverdünnung*

Die bisher standardmäßig angewandten Extraktionsmethoden und -kits, speziell für die Isolierung mikrobieller DNA, wurden im Vergleich zu alternativen Methoden und Kits getestet. Mit der verbreiteten Phenol-Chloroform-Fällung wurden der MP Biomedicals FastDNA Spin Kit for Feces sowie der Power Soil® DNA Isolation Kit verglichen, wovon der MP Biomedicals FastDNA Spin Kit das beste Ergebnis lieferte. Bei dieser Extraktionsmethode waren die Reinheit der DNA sowie die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse am besten, jedoch lag die extrahierte Menge an Nukleinsäuren fünffach niedriger als bei den Vergleichskits. Dieser Unterschied ist jedoch zu vernachlässigen, als dass die optimierte Extraktion ein nahezu Huminsäure-freies Eluat liefert und in die qPCR-Reaktion fünfmal weniger DNA eingesetzt werden muss. Dieses Ergebnis ist von großer Bedeutung für die weitere Analyse, da durch einen zu hohen Huminsäure-Gehalt die Bestimmung der Bakterienanzahl in der qPCR

bei weitem unterschätzt werden (Zipper 2004). Durch eine zusätzliche Verdünnung der Proben, konnte der Anteil an inhibitorischen Stoffen zusätzlich reduziert werden und somit ein optimaler Verlauf der Messung ermöglicht werden. Daneben können in den Proben fünfmal mehr Analyte gemessen werden.

### *Optimierung des Standards*

Zur Detektion einer exakten Kopienzahl bestimmter Mikroorganismen im Panseninhalt wird eine Standardreihe mit bekannten Kopienzahlen zur absoluten Quantifizierung benötigt. Allerdings zeigte sich bei bisherigen Untersuchungen von Pansenproben, dass die Erstellung und Messung einer solchen Standardreihe ein äußerst sensibles System mit einer hohen Anfälligkeit auf äußere Einflüsse ist. Aus diesem Grund musste die Anwendung eines absoluten Standards optimiert, standardisiert und validiert werden. Um eine reproduzierbare Quantifizierung zu gewährleisten, sollten laut MIQE Guidelines (Bustin 2009) fünf aufeinanderfolgende Standardpunkte quantifiziert werden. Hierfür wurden in der vorliegenden Arbeit nach der bisherigen Aufreinigungsmethoden des Standards eine Gelelektrophorese und eine damit verbundene weitere Aufreinigung des Zielgens nachgeschaltet. Jedoch zeigte sich, dass dies zwar die Qualität des Standards bereits nachhaltig verbesserte, allerdings der Standard schwer quantifizierbar war. Dies lag vermutlich an der grenzwertig geringen Menge des gewünschten Zielgens (Bustin 2009). Um eine Anreicherung des Zielgens zu ermöglichen, wurde zur weiteren Optimierung eine zusätzliche PCR unter Standardbedingungen der Gelelektrophorese nachgeschaltet. Dies erhöhte die Konzentration des gewünschten Zielgenes, so dass eine höhere Effizienz der qPCR-Reaktionen erreicht werden konnte. Bei einer Standardreihe von  $10^7$ - $10^0$  wurde der Gehalt an Zielgen in den letzten Standardpunkten so gering, dass eine optimale Quantifizierung nicht möglich war. Aus diesem Grund wurde die Abfolge der Standardreihe hingegen von  $10^8$  bis  $10^2$  verändert. Es konnte dadurch eine Effizienzsteigerung auf nahezu 100% erreicht werden.

### 3.5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Arbeit die Extraktion und Analyse von ruminalem Material optimiert und validiert werden konnte. Es empfiehlt sich, die Extraktion und Analyse nach folgendem Protokoll durchzuführen:

#### Analyse mikrobieller DNA aus Pansenproben

##### A. Extraktion der Proben mittels FastDNA Spin Kit for feces:

1. 0,1 g der gefriergetrockneten Proben mit 500  $\mu$ L Natrium Phosphate Buffer
2. Mischung in ein 2 mL Lysing Matrix E Tube überführen und mit weiteren 825  $\mu$ L Natrium Phosphate Buffer und 275  $\mu$ L PLS Solution versetzen
3. für 10 Sekunden gevortext; Proben bei 14000 x g für 5 Minuten zentrifugieren und den Überstand verwerfen
4. 978  $\mu$ L Natrium Phosphate Buffer hinzugegeben sowie 122 Natrium Phosphate Buffer MT Buffer
5. Proben erneut vortexen und im MP FastPrep® 24 Homogenisator bei 6,0 m/S für 40 Sekunden homogenisieren
6. Zentrifugation der Proben bei 14000 x g für 15 Minuten
7. Überstände in ein neues 2 mL Tube überführen und mit 250  $\mu$ L PPS Solution versetzen
8. Die Proben nun vorsichtig vermischen und für 10 Minuten bei 4°C inkubieren; für 2 Minuten bei 14000 x g zentrifugiert.
9. Die Überstände nun zusammen mit 1 mL Binding Matrix Solution in ein 5 mL Tube überführen und durch Schwenken vermischen
10. Proben für 5 Minuten auf einem Rüttler schütteln
11. Zentrifugation bei 14000 x g für 2 Minuten
12. Überstände verwerfen und das Pellet vorsichtig mit 1 mL Wash Buffer 1 resuspendiert
13. Diese Lösung nun in zwei Schritten in ein SPIN Filter Tube überführen (zuerst 600  $\mu$ L der Lösung mit einer nachfolgenden Zentrifugation von 14000 x g für 1 Minute, dann die restlichen 400  $\mu$ L mit einer erneuten Zentrifugation)
14. Danach 500  $\mu$ L Wash Buffer 2 hinzugegeben und das Pellet am Filter vorsichtig damit resuspendiert; bei 14000 x g für 2 Minuten zentrifugiert und der Durchfluss verwerfen; . Um das gesamte Ethanol zu entfernen und die Proben zu trocknen nochmalige Zentrifugation
15. SPIN Filter in ein neues 1,9 mL Catch Tube überführen und 100  $\mu$ L TES hinzugegeben
16. Um das Pellet zu lösen vorsichtig gegen das Tube schnippen
17. Proben bei 14000 x g für 2 Minuten zentrifugiert
18. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA mittels Nano Drop™
19. Lagerung der DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C

B. Probenverdünnung:

Proben werden 1/1280, 1/640, 1/320, 1/160, 1/80, 1/40 und 1/20 mit DEPEC Wasser verdünnt

C. Primertest, Austestung Annealing und optimale Verdünnung:

Für jedes Primer-Paar folgenden PCR-Ansatz pro Reaktion verwenden:

SYBR Green	7,5 µL
Primer forward	0,6 µL
Primer reverse	0,6 µL
Wasser	4,8 µL
Probenmix	1,5 µL
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>15 µL</b>

<b>Programm</b>	<b>Zyklenzahl</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Zeit [min]</b>
Hot-Start	1	95	05:00
Denaturierung		95	00:20
Annealing	30	55,2-65	01:00
Elongation		72	00:30
Schmelzkurve	1	60-95	20:00

- Gradienten-qPCR von 55 - 65°C; pro Primer alle Verdünnungsstufen der Proben auftragen
- optimale Verdünnung und Annealing-Temperatur anhand Auswahlkriterien bestimmen

D. Aufreinigung qPCR Produkt mit Qiagen MiniElute PCR Purification Kit:

Aufreinigung nach Herstellerangaben

Nach Aufreinigung Standardkonzentration mit Nano Drop™ messen

E. Gelelektrophorese:

1. Für Mikroflora Analysen 2% Gel erstellen (100ml 1X TAE Puffer und 2g Agarose; mit 60-80 µl GelRed anfärben);
2. Agarose abwiegen und TAE Puffer abmessen
3. Beides in Glasflasche mischen, GelRed dazugeben

4. Emulsion in Mikrowelle erhitzen, um Agarose zu lösen
5. Magnetrührer in die Flasche zugeben und Lösung für einige Minuten im Wasserbad kaltgerühren.
6. erkaltete Gel in die Gelkammer gießen
7. Gel für 20 Min aushärten lassen
8. 8 µl Probe mit 2 µl Ladepuffer vermischen
9. 2 µl Ladder (50bp) mit 6 µl DEPEC-Wasser sowie 2 µl Ladepuffer vermischen
10. Proben und Ladder aufs Gel auftragen
11. Gel für eine Stunde bei konstanten 100V laufen lassen
12. nach Beenden des Laufes das Gel in der Fotokammer entwickeln
13. Zielbandenausschneiden und in 1,5 ml Tube überführen

#### F. Aufreinigung DNA-Zielprodukt nach Gelektrophorese:

Analytik Jena innuPREP Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben verwenden  
Konzentrationsbestimmung mittels Nano Drop™

#### G. Vervielfältigung des Zielproduktes:

Re-Amplifizierung mittels Biorad ThermoCycler (Blockcycler)  
Gleiche Bedingungen wie bei Primertest

#### H. Aufreinigung mit Qiagen MiniElute PCR Purification Kit

Aufreinigung nach Herstellerangaben  
Nach Aufreinigung Standardkonzentration mit Nano Drop™ messen  
Berechnung der Kopienzahl mittels Berechnungsmatrix nach  
<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>

#### I. Standardreihenerstellung:

Standardreihe über Verdünnungen von  $10^8$  bis  $10^1$  erstellen  
Errechnete Kopienzahl soweit verdünnen bis  $1 \times 10^8$  Konzentration vorliegt  
Höchsten Standard ( $1 \times 10^8$  Kopien) als Verdünnungsreihe

#### J. qPCR Analyse der verdünnten Proben:

qPCR Bedingungen wie bei Primertest unter Verwendung optimaler  
Annealing-Temperatur und Verdünnung  
Analyse gewünschter Primer  
Pro Messplatte Verwendung der erstellten Standardreihe

---

## **Anwendung der Optimierung bei Messung der Mikroflora bei verschiedener Rationsgestaltung**

### **4 Zusammensetzung der ruminalen Mikroflora sowie der biochemischen Endprodukte der ruminalen Fermentation bei unterschiedlicher Versorgung mit Kohlenhydraten**

#### **4.1 Einleitung**

Die bemerkenswerte Fähigkeit der Wiederkäuer, für Menschen nicht verwertbare, faserreiche Biomasse zu verdauen und diese in verwertbare Endprodukte in Form von Milch und Muskelmasse zu transformieren, beruht hauptsächlich auf einem komplexen mikrobiellen Ökosystem im Pansen. Diese Mikroflora, bestehend aus Eukaryoten (Protozoen und Pilze) sowie Bakterien und Archaeen, ist durch eine große Vielfalt der Zusammensetzung gekennzeichnet. Viele verschiedene Faktoren, wie zum Beispiel Rationszusammensetzung, Fütterungsfrequenzen oder Wiederkäuer-Wirt-Interaktionen können es nachhaltig beeinflussen (Hungate 1966, Dehority 1997, Guan 2008, Golder 2014).

Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen des ruminalen Mikrobioms mit dem Fokus auf biochemischen Endpunkten wie flüchtigen Fettsäuren, Ammoniak und Methan sowie der Abbaurate der Futtermatrix im Pansen, ist es durch neuartige molekularbiologische Methoden wie qPCR oder NGS möglich, neue Einblicke in die Abbauprozesse sowie Funktionen des ruminalen Mikrobioms zu gewinnen (McSweeney 2006, Skillman 2006, Kim 2011b). Fütterungsabhängige Veränderungen unter einer Heu-basierten Ration konnten auf Ebene der Gesamtheit der Bakterien im Pansen sowie im speziellen der cellulolytischen Bakterien gezeigt werden (Koike 2001, Monteils 2012). Bisherige Studien waren auf einzelne Bakterienspezies fokussiert (Koike 2001, Monteils 2012, Kang 2013), sodass noch kein Gesamtüberblick über die Veränderungen der verschiedenen Hauptgruppen im Pansen in Korrelation zu den biochemischen Endprodukten existiert.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte erstmals die Dynamik der biochemischen Endpunkte in Korrelation mit der Präsenz aller funktionellen Hauptgruppen der ruminalen Mikroflora sowie deren dramatische Veränderungen mittels qPCR und NGS aufgezeigt werden. Dies konnte durch verschiedene Fütterungsregime sowie eine hohe und feine zeitliche Auflösung nach der Fütterung realisiert werden. Darüber hinaus sollten in der vorliegenden Arbeit die Verhältnisse, die sogenannte Ratio, zwischen den funktionellen Gruppen sowie der Gesamtheit der Bakterien näher betrachtet werden, um dadurch Wechselwirkungen innerhalb des ruminalen Mikrobioms und somit Veränderungen in der Mikroflora aufzeigen zu können.

## 4.2 Material und Methoden

Der Versuch wurde am Lehrstuhl für Tierernährung der Technischen Universität München mit acht nicht-laktierenden, pansenfistulierten (Bar Diamond Inc., Parma, Idaho, USA mit 10 cm Durchmesser) Rindern der Rasse Holstein Friesian durchgeführt. Die Tiere hatten ein durchschnittliches Lebendgewicht von 650 kg und wurden in einem sauberen, klimatisierten Stall mit Einzeltierfütterung in Anbindehaltung gehalten. Frisches Wasser und Salzlecksteine standen *ad libitum* zur Verfügung. Die Tiere wurden zweimal täglich exakt um 7 Uhr morgens und um 16 Uhr nachmittags mit gleich großen Portionen von insgesamt 6,2 kg Trockenmasse (TM) pro Tag auf Niveau des energetischen Erhaltungsbedarfs gefüttert. Für den Versuch wurden die Rinder voll randomisiert in zwei Behandlungsgruppen (n=4) eingeteilt. Der Versuchsaufbau glich einem 2 x 2 Lateinischem Quadrat mit zwei Behandlungen und zwei Perioden. Die Gesamtdauer des Fütterungsversuchs betrug acht Wochen, wobei jedes Tier für vier Wochen die eine hoch faserreiche (HF) Behandlung und vier Wochen eine hoch stärkereiche (HS) Behandlung erhielt (Rations- und Nährstoffzusammensetzung siehe Tabelle 1). Somit spiegelt jedes Tier seine eigene Kontrolle wider (Split Plot Design). Zur Anfütterungsphase wurde bereits 4 Wochen vor dem Versuchsbeginn mit der Fütterung der Versuchsration begonnen, um eine Anpassung des ruminalen Mikrobioms an die Versuchsbedingungen zu ermöglichen. Zur Untersuchung

der Mikroflora im Pansen mittels NGS wurde diesem Versuch ein nochmaliger Wechsel der Behandlungsgruppen von 4 Wochen nachgelagert, sodass alle Versuchstiere wieder die Ausgangsbehandlung zu Beginn des Versuches bekamen.

Tabelle 4: Rationszusammensetzung und Futtermittelanalytik der hoch stärkereichen (HS) und hoch faserreichen (HF) Ration

Rationszusammensetzung	Rationszusammensetzung		Futtermittelanalyse	Futtermittelanalyse	
	HS	HF		HS	HF
Maissilage	51,9	-	<b>Energie</b> [MJ NEL/kg	6,7	5,8
Grassilage	14,9	48,8			
Körnermais	19,9	-	<b>Nährstoffgehalte</b> [g/kg TM]		
Sojaextraktionsschroth (44%)	4,9	-	NDF	364	501
Heu	8,0	50,8	Hemicellulose	169	209
Mineral-Vitamin Mix <sup>1</sup>	0,4	0,4	Cellulose	179	26,3
			Lignin	16	29
			Stärke und Zucker <sup>2</sup>	284	68
			Rohfaser (XF)	200	266
			Rohprotein (XP)	108	137
			N-freie Extrakte (NfE)	611	480
			Rohfett (XL)	35	22
			Rohasche (XA)	43	95

<sup>1</sup> enthielt (per kg Premix, TM Basis): 800.000 I.E. Vit. A., 100.000 I.E. Vit.D3, 3 g Vit.E, 12 mg Vit.B1, 50 mg Vit.B2, 25 mg Vit.B6, 250 mcg Vit.B12, 0.1 g Nicotinsäure, 90 mg Pantothenensäure, 8 g Zn, 4 g Mn, 1 g Cu, 0.1 g I, 30 mg Co, 40 mg Se

<sup>2</sup> wurde aus Tabellenwerten geschätzt

#### 4.2.1 Probennahme und Probenvorbereitung

Bei den Probennahmen an den fistulierten Rindern wurden jeweils 200 mL Pansensaft mittels einer Schlund-Magen-Sonde über die Fistel entnommen und direkt im Anschluss der pH-Wert des Pansensaftes mit einem geeichten pH-Meter (SCHOTT GC 842; Schott AG, Mainz, Deutschland) gemessen.

Ein Teil der Probe wurde sofort bei -20°C tiefgefroren, gefriergetrocknet, mittels eines Porzellanmösers homogenisiert und bis zur späteren DNA Isolation bei -20°C gelagert. Der andere Teil wurde zur Bestimmung der Konzentrationen von Ammoniak und flüchtigen Fettsäuren weiter aufgearbeitet. Hierzu wurde der

Pansensaft bei 2240 x g für 15 Minuten zentrifugiert (Hermle Z323, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland). 30 mL des Überstandes wurden abgenommen und bei -20°C in Polyethylenflaschen bis zur Ammoniakbestimmung gelagert. Zur Messung der flüchtigen Fettsäuren wurden 10 mL des Überstandes mit 1,5 mL 25%iger Phosphorsäure und 0,5 mL konzentrierter Ameisensäure vermischt, anschließend erneut bei 2240 x g für weitere 20 Minuten zentrifugiert. Die flüssige Phase wurde danach abgenommen und bei -20°C bis zur weiteren Analyse in Polyethylenflaschen gelagert.

Über den gesamten Versuch hinweg wurden wöchentlich Futterproben genommen und bei -20°C tiefgefroren. Am Ende des Versuchs wurden die Futterproben je Versuchsperiode gepoolt, bei 60°C getrocknet und auf 1 mm zur Bestimmung in der Futtermittelanalytik gemahlen.

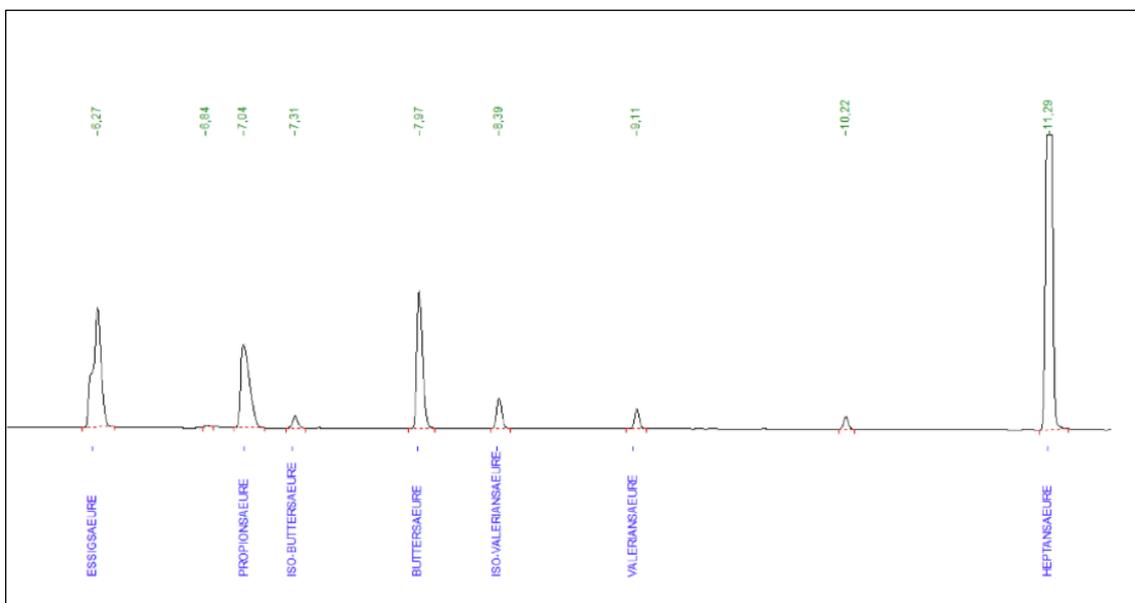
#### **4.2.2 Bestimmung der Ammoniakkonzentration im Pansensaft**

Die Ammoniakkonzentration wurde mittels des Testkits „Ammonia Enzymatic UV – Method“ (AM1015) von Randox (Laboratories Limited, Crumlin, Großbritannien) nach Herstellerangaben analysiert. Die Messung erfolgte im Duplikat mittels des UV MC<sup>2</sup> Spektrophotometers (SAFAS Monaco, Monaco), bei einer Wellenlänge von 340 nm. Als Referenzprobe diente destilliertes Wasser.

#### **4.2.3 Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren (VFA)**

Die Messung der flüchtigen Fettsäuren (VFA) Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Iso-Buttersäure, Valeriansäure sowie Iso-Valeriansäure erfolgte mittels Gaschromatographen (Clarus 580 Perkin Elmer, Waltham, USA) mit einem Flammen-Ionisationsdetektor (FID). Der kommerziell erhältliche „Free Fatty Acids Test Standard“ (Restek Corporation, Bellefonte, USA) wurde als externer Standard verwendet. Je 250 µL dieses externen Standards wurden mit 850 µL Meta-Phosphorsäure (2%) versetzt. Für die Probenanalyse wurden 850

$\mu\text{L}$  Meta-Phosphorsäure, 125  $\mu\text{L}$  Wasser sowie 125  $\mu\text{L}$  Pansensaft vermischt und durch einen Spritzenvorsatzfilter (0,2  $\mu\text{m}$  aus Teflon) gefiltert. Stickstoff diente bei der Messung als Trägergas. Die Injektortemperatur betrug 95°C, die Detektortemperatur lag bei 275°C. Als Einspritzmethode wurde die On Column Methode verwendet. Die folgende Abbildung zeigt ein beispielhaftes Chromatogramm der flüchtigen Fettsäuren (Abb.11).



**Abb. 11: Chromatogramm der flüchtigen Fettsäuren im Pansensaft.** Hier sind die Peaks von Essigsäure, Propionsäure, Iso-Buttersäure, Buttersäure, Iso-Valeriansäure sowie Heptansäure im Pansensaft zu erkennen.

#### 4.2.4 DNA-Extraktion

Die mikrobielle DNA wurde mittels einer Phenol-Chloroform-Fällung nach Yu und Morrison (2004) extrahiert (siehe 3.2.1).

## 4.2.5 Primer

Table 5: Spezifikation der qPCR Primerpaare

Spezies	Sequenz 5'-3'	Länge (bp)	Annealing (°C)	Literatur
Totale Bakterien	F: AGCAGCCGCGGTAAT R: CAGGGTATCTAATCCTGTT	280	61,9	Lettat et al. 2012
Anaerobe Pilze	F: GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGT R: CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT	120	60	Denman and McSweeney 2006
Protozoen	F: GCTTTCGWTGGTAGTGTATT R: CTGGCCCTCYAATCGTWCT	223	60	Sylvester et al. 2004
Archaea	F: ACKGCTCAGTAACACGT R: GTGCTCCCCGCCAATTCCT	826	65	Boghun et al. 2010
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	F: GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA R: CGCCTGCCCTGAACTATC	121	56	Denman and McSweeney 2006
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	F: CGAACGGAGATAATTTGAGTTACTT R: CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC	132	55,4	Denman and McSweeney 2006
α-Proteobakterien	F: ACTCCTACGGGAGGCAGCAG R: TCTACGRATTTACCCYCTAC	365	56	Fierer et al. 2005
<i>Ruminobacter amylophilus</i> H18	F: CTGGGGAGCTGCCTGAATG R: GCATCTGAATGCGACTGGTTG	101	65	Stevenson and Weimer 2007
<i>Streptococcus bovis</i> JB1	F: TTCCTAGAGATAGGAAGTTTCTTCGG R: ATGATGGCAACTAACAAATAGGGGT	127	62	Stevenson and Weimer 2007

Anmerkung: Sequenz der Primer und Produktlänge wurden aus aufgeführter Literatur entnommen; Annealing Temperatur wurde mittels Primertest ermittelt

In der vorliegenden Arbeit sollten alle Hauptvertreter der ruminalen Mikroflora im Pansen als Gruppen abgedeckt werden, somit konnte für die Gesamtheit an Bakterien, Protozoen, Anaeroben Pilzen sowie den Archaeen je ein Primer-Paar zur Widerspiegelung der entsprechenden Hauptgruppe ermöglicht werden. Für die cellulolytischen Vertreter im Pansen konnte kein repräsentativer Gruppenprimer designed werden. Die Vielzahl unterschiedlicher cellulolytischer Bakterien im Pansen machte eine komplette Abdeckung über ein Primer-Paar nicht möglich. Aus diesem Grund wurden die zwei wichtigsten Hauptvertreter der cellulolytischen Bakterien, *Fibrobacter succinogenes* und *Ruminococcus flavefaciens*, gemessen.

Für die Gruppe der Proteolyten wurde die Untergruppe der α-Proteolyten ausgewählt, da diese hauptsächlich am ruminalen Stickstoffkreislauf (Little 2009) und somit an der proteolytischen Aktivität beteiligt sind (Prins 1983). Für die Gruppe der Amyolyten konnte aufgrund der Heterogenität der funktionellen

Gruppe ebenfalls kein adäquater Übersichtsprimer designed werden. Aufgrund ihrer stärkeabbauenden Funktion wurden deshalb die Hauptvertreter *Streptococcus Bovis* und *Ruminobacter amylophylus* ausgewählt (Nozière P 2014).

#### **4.2.6 qPCR Bedingungen**

Für die Analyse der Proben mittels qPCR wurden die optimierten Bedingungen (siehe 3.2.3) der Methodenetablierung angewendet. Die Berechnung der Kopienzahl der untersuchten Mikroorganismen erfolgte pro Gramm Pansensaft. Zur Verdeutlichung einzelner Verschiebungen innerhalb des Mikrofloramusters wurden zusätzlich Ratios der Mikroorganismen zueinander ermittelt

#### **4.2.7 Next Generation Sequencing**

Das Sequenzieren der Proben wurde am Helmholtz Zentrum München von der Gruppe von Herrn Prof. Dr. Michael Schloter (Abteilung für Umweltgenomik) durchgeführt. Die Proben wurden mit dem 454 Genome Sequenzer FLX+ System von Roche (Roche, Penzberg, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers sequenziert. Als Proben dienten dazu wie bereits in 2.3 beschrieben Pansensaftproben aus dem Versuch von stärkereicher vs. faserreicher Fütterung. Allerdings wurden hier drei Versuchsperioden mit einem Rationswechsel von HS-HF-HS bzw. HF-HS-HF untersucht.

Die Amplikon-Sequenzierung wurde mittels dem 454 GS FLX+ Titanium System (Roche, Penzberg, Deutschland) modifiziert nach Giovanni Pilloni et al. durchgeführt (Pilloni 2012). Bei Pilloni et al. wurde bidirektional sequenziert, in den hier vorliegenden Analysen wurde jedoch unidirektional sequenziert. Für die Amplifizierung des 16S rRNA-Gens dienten die eubakterischen Primer 27F und 984R, die mittels einzigartigen Multiplex-Identifikatoren (MID) zur Probenerkennung verlängert wurden. MIDs besitzen jeweils einen Schlüssel von zehn Basen zur exakten Erkennung der unterschiedlichen Proben.

Eine anschließende PCR wurde mittels des T3 Thermocyclers (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) in Triplikaten pro Probe durchgeführt. Das Programm der PCR erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Programm	Zyklenzahl	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Hot-Start	1	94	05:00
Denaturierung		94	01:00
Annealing	28	52	01:00
Elongation		72	01:00
Finale Verlängerung	1	72	10:00

Jede 25 µL PCR Reaktion beinhaltete 1x PCR Puffer mit 1,8 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM dNTPs, 0,25 U High-Fidelity Polymerase (Roche, Penzberg, Deutschland), 0,5 mM von jedem Primer sowie 5ng DNA. Alle Proben wurden danach mittels Gel und PCR Cleanup Kit (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) aufgereinigt. Anschließend wurden die Fragmentgröße und Qualitätskontrolle der Proben mit dem Bioanalyser 2100 mittels eines DNA-Chips (DNA 7500 Chip; Agilent, Böblingen, Deutschland) bestimmt. Daraufhin wurden die Triplikat-Proben auf ein gleiches Verhältnis von 10<sup>9</sup> Molekülen je µL gepoolt. Eine weitere PCR sollte eine optimale Vermischung der gepoolten Proben gewährleisten. Die PCR lief unter folgenden Bedingungen: 94°C für 4 Minuten, 50 Zyklen mit 94°C für 30 Sekunden und 60°C für jeweils 10 Minuten. Abschließend wurden die Proben sequenziert und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mit MOTHUR v1.33.3 wie in Gschwendtner et al. beschrieben, wobei Distanzmatrizen basierend auf OTUs (operational taxonomic unit) mit einer Sequenzähnlichkeit von 97% erstellt wurden (Gschwendtner 2015).

#### 4.2.8 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte mit SAS (SAS 9.3, Cary USA). Für den Vergleich von stärkereicher und faserreicher Ration erfolgte eine 3-faktorielle ANOVA mit den fixen Faktoren Ration, Zeit und Tier. Folgendes Modell wurde verwendet:

$$Y_{ijkl} = R_i + T_j + ZP_l + (R*ZP)_{jl} + e_{ijkl}$$

mit

$R_i$  = fixer Effekt "Ration" ( $i = 1,2$ )

$T_j$  = fixer Effekt „Tier“ ( $j = 1,2,3,\dots,8$ )

$ZP_l$  = fixer Effekt "Zeit" ( $l = 1,2,3,4$ )

$(R*ZP)_{jl}$  = Interaktion von R und ZP

$e_{ijkl}$  = Interaktion von T und ZP, als letzter Rest

Der Faktor "Tier" wurde als fixer Effekt festgelegt, da die Streuung innerhalb der Tiere ein Ziel dieser Studie darstellte.

Im Falle einer statistischen Signifikanz der Effekte wurde ein Student-Newman-Keuls Test als Post-Hoc Test angewandt ( $p < 0,05$ ). Zusätzlich wurde der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) berechnet.

### 4.3 Ergebnisse

Der Pansen ist ein sehr komplexes, anaerobes System. Äußere Einflüsse wie Fütterung und Rationszusammensetzung können das Mikrobiom nachhaltig beeinflussen. Das Ziel dieser Untersuchung war es, den Einfluss zweier unterschiedlicher Rationen auf den zeitlichen Verlauf nach Fütterung zu analysieren. Hierzu wurden acht nicht-laktierende, pansenfistulierte *Holstein Frisians* einem 2 x 2 lateinischem Quadrat zugeordnet. Die Tiere wurden restriktiv entweder mit einer stärkereichen Ration (20% Rohfaser, 11% Rohprotein, 3,5% Rohfett und 6,7 MJ/kg TM NEL) oder einer faserreichen Ration (26,6% Rohfaser, 13,7% Rohprotein, 2,2% Rohfett und 5,8 MJ/kg TM NEL) gefüttert. Nach der Anpassungsphase von vier Wochen wurden jeweils vor der Morgenfütterung (0 h) sowie 1,5 h, 3 h und 6 h nach Fütterung Pansensaftproben genommen.

Neben den etablierten Messungen der biochemischen Endpunkte (pH, Ammoniak und flüchtige Fettsäuren) der ruminalen Fermentation lag der Fokus ebenso auf einer Untersuchung des Mikrofloramusters mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden wie qPCR.

Neben dem Aspekt der zeitlich-dynamischen Veränderungen im Expressionsmuster der ruminalen Mikroflora wurden die klassischen ruminalen Fermentationsparameter (pH-Wert, flüchtige Fettsäuren, Ammoniak) analysiert. Zusätzlich zur Auswirkung der unterschiedlichen Rationen auf Behandlungs- und Tiereffekte wurde die Interaktion zwischen Ration und Zeit betrachtet (siehe Tabelle 6).

Bei der Trockenmasse, Summe aller VFAs im Pansen sowie bei Essigsäure, Propionsäure und Ammoniak zeigten sich vor der Fütterung (Zeitpunkt 0 h) keine Unterschiede zwischen den Rationen (Tabelle 6). Die Konzentration an Buttersäure wies jedoch unter faserreicher Ration vor der Morgenfütterung einen signifikant niedrigeren Gehalt auf (5,8 vs. 10,2 mmol/L).

Im Vergleich zum Entnahmezeitpunkt vor der Fütterung konnte für alle analysierten Parameter der ruminalen Fermentation signifikante Veränderungen im Tagesverlauf gezeigt werden. Für den Trockenmassegehalt des

Pansensaftes, für alle Einzelanalyte der flüchtigen Fettsäuren, sowie den Ammoniakgehalt zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Konzentrationen auf ein Maximum bei 1,5 h nach der Fütterung mit einem darauffolgenden Absinken der Gehalte bis 6 h nach der Fütterung (TM:  $p=0,02$ ; Summe VFA:  $p\leq 0,0001$ ; Essigsäure:  $p<0,01$ ; Propionsäure:  $p\leq 0,0001$ ; Buttersäure:  $p\leq 0,0001$ ; Ammoniak:  $p\leq 0,0001$ ; Tab. 6). Ein konträres Bild ergab sich beim pH-Wert sowie dem Acetat-Propionat-Verhältnis. Der Tagesverlauf wies hierbei ein Minimum beim Zeitpunkt 1,5 h nach der Fütterung mit einem darauffolgenden signifikanten Anstieg auf (pH:  $p\leq 0,0001$ ; A/P:  $p\leq 0,0001$ ).

Tabelle 6: Zeitlicher Verlauf von Trockenmasse, pH, flüchtige Fettsäuren und Ammoniak Konzentration im Pansen nach der Fütterung einer faserreichen (HF) und stärkeichen (HS) Ration

	Ration	Zeitpunkt nach der Fütterung (h)						SEM	R	ZP	p<	RxZP	T
		0	1,5	3	6	6	T						
Trockenmasse [g/L]	HF	26,6 <sup>cd</sup>	26,5 <sup>cd</sup>	24,3 <sup>d</sup>	23,9 <sup>d</sup>	23,9 <sup>d</sup>	0,13	<0,001	0,024	0,044	<0,001	<0,001	
	HS	28,6 <sup>bcd</sup>	35,6 <sup>a</sup>	32,6 <sup>ab</sup>	30,9 <sup>bc</sup>	30,9 <sup>bc</sup>							
pH	HF	6,94 <sup>a</sup>	6,69 <sup>bc</sup>	6,79 <sup>b</sup>	6,75 <sup>b</sup>	6,75 <sup>b</sup>	0,03	0,003	<0,001	0,101	<0,001	<0,001	
	HS	6,95 <sup>a</sup>	6,61 <sup>c</sup>	6,62 <sup>c</sup>	6,69 <sup>bc</sup>	6,69 <sup>bc</sup>							
Ammoniak [mg/L]	HF	16,5 <sup>c</sup>	38,0 <sup>a</sup>	30,6 <sup>a</sup>	12,7 <sup>c</sup>	12,7 <sup>c</sup>	2,19	0,041	<0,001	0,395	0,168	0,168	
	HS	14,1 <sup>c</sup>	33,3 <sup>a</sup>	23,8 <sup>b</sup>	13,4 <sup>c</sup>	13,4 <sup>c</sup>							
Summe VFA [mmol/L]	HF	77,9 <sup>c</sup>	97,9 <sup>a</sup>	89,2 <sup>ab</sup>	95,2 <sup>a</sup>	95,2 <sup>a</sup>	2,98	0,157	<0,001	0,311	<0,001	<0,001	
	HS	80,4 <sup>bc</sup>	102,0 <sup>a</sup>	98,1 <sup>a</sup>	92,3 <sup>a</sup>	92,3 <sup>a</sup>							
Essigsäure [mmol/L]	HF	56,7 <sup>ab</sup>	62,3 <sup>a</sup>	57,4 <sup>ab</sup>	63,8 <sup>a</sup>	63,8 <sup>a</sup>	1,56	0,233	<0,010	0,042	<0,001	<0,001	
	HS	53,2 <sup>b</sup>	62,2 <sup>a</sup>	61,0 <sup>a</sup>	58,1 <sup>ab</sup>	58,1 <sup>ab</sup>							
Propionsäure [mmol/L]	HF	12,9 <sup>d</sup>	19,5 <sup>ab</sup>	16,5 <sup>bc</sup>	16,1 <sup>c</sup>	16,1 <sup>c</sup>	0,60	0,015	<0,001	0,568	<0,001	<0,001	
	HS	13,3 <sup>d</sup>	21,7 <sup>a</sup>	18,8 <sup>bc</sup>	17,0 <sup>bc</sup>	17,0 <sup>bc</sup>							
Buttersäure [mmol/L]	HF	5,8 <sup>c</sup>	11,0 <sup>ab</sup>	10,1 <sup>b</sup>	9,4 <sup>b</sup>	9,4 <sup>b</sup>	0,57	<0,001	<0,001	0,252	<0,001	<0,001	
	HS	10,2 <sup>b</sup>	12,9 <sup>a</sup>	13,0 <sup>a</sup>	12,7 <sup>a</sup>	12,7 <sup>a</sup>							
Acetat-Propionat-Ratio	HF	4,40 <sup>a</sup>	3,22 <sup>bc</sup>	3,50 <sup>b</sup>	4,02 <sup>a</sup>	4,02 <sup>a</sup>	0,09	<0,001	<0,001	0,839	0,008	0,008	
	HS	4,11 <sup>a</sup>	2,88 <sup>c</sup>	3,27 <sup>bc</sup>	3,56 <sup>b</sup>	3,56 <sup>b</sup>							

Anmerkung: SEM = standard error of means; R = Ration; ZP = Zeitpunkt nach der Fütterung; RxZP = Interaktion zwischen R und ZP, T = Tier; <sup>a, b, ...</sup> Mittelwerte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben sind signifikant unterschiedlich p<0,05

Bei der Betrachtung rationsabhängiger Unterschiede der einzelnen Zeitpunkte zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Rationen. Eineinhalb Stunden nach der Fütterung unterschieden sich der Trockenmassegehalt ( $p=0,01$ ) und das Acetat-Propionat-Verhältnis ( $p=0,01$ ) signifikant zwischen der stärkereichen (HS) und faserreichen (HF) Ration (Tab. 7).

Neben dem tagesverlauf-abhängigen Behandlungseffekt konnten ebenfalls signifikante Unterschiede im Tagesmittelwert ( $\emptyset$  0h – 6h) nach der Fütterung gezeigt werden. Dabei ließen sich beim Trockenmassegehalt, dem Gehalt an Propionsäure und Buttersäure jeweils ein signifikant höherer Gehalt unter stärkereicher Ration dokumentieren (TM:  $p\leq 0,0001$ ; Propionsäure:  $p<0,01$ ; Buttersäure:  $p\leq 0,0001$ ). Gegensätzlich hierzu konnten signifikant niedrigere Werte unter stärkereicher Ration für pH-Wert, Acetat-Propionat-Verhältnis sowie Ammoniak aufgezeigt werden (pH:  $p<0,01$ ; A/P:  $p\leq 0,0001$ ; Ammoniak:  $p=0,03$ ; Tab. 6). Abgesehen vom Ammoniak waren alle Messparameter von einem signifikanten tierindividuellen Einfluss auf die Mikroflora des Pansens charakterisiert ( $p\leq 0,001$ ). Um eine Aussage über die Veränderungen des Pansenmilieus nach der Fütterung treffen zu können, wurden die Hauptvertreter der Mikroflora untersucht (Tab. 7). Direkt vor der Fütterung zeigte sich bei der Gesamtheit der Bakterien im Pansensaft kein Unterschied zwischen beiden Rationen. Im Tagesverlauf nach der Fütterung einer faserreichen Ration ergaben für die Gesamtheit der Bakterien, die Protozoen sowie der Hauptvertreter der funktionellen Gruppen *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavofaciens*, *Streptococcus bovis* und *Ruminobacter amylophilus* keine signifikanten Unterschiede. Die anaeroben Pilze hingegen wiesen einen Anstieg um 0,4 dekadische Einheiten auf. Im Gegensatz dazu stellte sich unter stärkereichen Ration zum Zeitpunkt 1,5 h nach Fütterung ein Abfall der mikrobiellen Dichte für alle untersuchten Mikroorganismen, ausgenommen *Streptococcus bovis*, dar. Dieser Abfall zeigt sich im Tagesverlauf in bis zu 1,5 geringeren dekadischen Einheiten. Bei der Betrachtung der *Archaea* trat dieser Abfall 1,5 h nach der Fütterung in beiden Rationen auf, wobei die Ausprägung unter stärkereicher Ration deutlicher ausfällt.

Tabelle 7: Zeitlicher Verlauf der ruminalen Mikroflora im Pansensaft ( $\log_{10}$ (Kopienzahl)/g TM) nach der Fütterung einer faserreichen (HF) oder stärkereichen (HS) Ration

	Ration	Zeitpunkt nach der Fütterung (h)						SEM	R	ZP	p<	RxZP	T
		0	1,5	3	6	6	T						
Gesamtheit Bakterien [ $\log_{10}$ (Kopienzahl)/g TM]	HF	11,44 <sup>a</sup>	11,30 <sup>a</sup>	10,90 <sup>ab</sup>	10,87 <sup>ab</sup>	10,87 <sup>ab</sup>	0,119	<0,001	<0,001	<0,001	0,04	0,526	
	HS	11,34 <sup>a</sup>	10,16 <sup>c</sup>	10,48 <sup>bc</sup>	10,41 <sup>bc</sup>	10,41 <sup>bc</sup>							
<i>Fibrobacter succinogenes</i> [ $\log_{10}$ (Kopienzahl)/g TM]	HF	9,56 <sup>a</sup>	9,53 <sup>a</sup>	9,54 <sup>a</sup>	9,36 <sup>a</sup>	9,36 <sup>a</sup>	0,114	<0,001	0,003	0,007	0,701		
	HS	9,54 <sup>a</sup>	8,33 <sup>b</sup>	9,19 <sup>a</sup>	8,99 <sup>a</sup>	8,99 <sup>a</sup>							
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> [ $\log_{10}$ (Kopienzahl)/g TM]	HF	8,51 <sup>a</sup>	8,22 <sup>abc</sup>	8,31 <sup>ab</sup>	8,38 <sup>ab</sup>	8,38 <sup>ab</sup>	0,081	<0,001	0,005	0,623	0,032		
	HS	8,04 <sup>bcd</sup>	7,49 <sup>e</sup>	7,87 <sup>cde</sup>	7,76 <sup>de</sup>	7,76 <sup>de</sup>							
Anaerobe Pilze [ $\log_{10}$ (Kopienzahl)/g TM]	HF	8,51 <sup>ab</sup>	8,93 <sup>a</sup>	8,76 <sup>ab</sup>	8,22 <sup>abc</sup>	8,22 <sup>abc</sup>	0,140	<0,001	0,388	0,034	0,178		
	HS	8,13 <sup>bc</sup>	7,52 <sup>c</sup>	8,07 <sup>bc</sup>	7,98 <sup>bc</sup>	7,98 <sup>bc</sup>							
<i>Ruminobacter amylophilus</i> H18 [ $\log_{10}$ (Kopienzahl)/g TM]	HF	6,34 <sup>c</sup>	6,35 <sup>c</sup>	7,09 <sup>a</sup>	7,10 <sup>a</sup>	7,10 <sup>a</sup>	0,055	0,001	<0,001	<0,001	0,752		
	HS	7,02 <sup>a</sup>	6,60 <sup>b</sup>	6,93 <sup>a</sup>	7,08 <sup>a</sup>	7,08 <sup>a</sup>							
<i>Streptococcus bovis</i> JB1 [ $\log_{10}$ (Kopienzahl)/g TM]	HF	9,40 <sup>a</sup>	9,34 <sup>a</sup>	7,05 <sup>c</sup>	7,04 <sup>c</sup>	7,04 <sup>c</sup>	0,115	0,024	<0,001	0,001	0,470		
	HS	9,28 <sup>a</sup>	9,34 <sup>a</sup>	8,17 <sup>b</sup>	7,04 <sup>c</sup>	7,04 <sup>c</sup>							
$\alpha$ -Proteobakterien [ $\log_{10}$ (Kopienzahl)/g TM]	HF	9,99 <sup>a</sup>	9,62 <sup>abc</sup>	9,75 <sup>ab</sup>	9,83 <sup>ab</sup>	9,83 <sup>ab</sup>	0,088	<0,001	0,001	0,639	0,086		
	HS	9,79 <sup>b</sup>	9,16 <sup>d</sup>	9,27 <sup>cd</sup>	9,41 <sup>cd</sup>	9,41 <sup>cd</sup>							
Archaea [ $\log_{10}$ (Kopienzahl)/g TM]	HF	9,64 <sup>a</sup>	8,79 <sup>b</sup>	9,51 <sup>a</sup>	9,45 <sup>a</sup>	9,45 <sup>a</sup>	0,130	<0,001	<0,001	0,134	0,109		
	HS	9,45 <sup>a</sup>	8,31 <sup>b</sup>	8,49 <sup>b</sup>	8,71 <sup>b</sup>	8,71 <sup>b</sup>							
Protozoen [ $\log_{10}$ (Kopienzahl)/g TM]	HF	9,84 <sup>ab</sup>	9,98 <sup>ab</sup>	10,00 <sup>ab</sup>	9,92 <sup>ab</sup>	9,92 <sup>ab</sup>	0,147	0,015	0,006	0,001	0,066		
	HS	10,49 <sup>a</sup>	8,90 <sup>c</sup>	9,26 <sup>bc</sup>	9,72 <sup>ab</sup>	9,72 <sup>ab</sup>							

Anmerkung: SEM = standard error of means; R = Ration; ZP = Zeitpunkt nach der Fütterung; RxZP = Interaktion zwischen R und ZP, T = Tier; a, b, ... Mittelwerte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben sind signifikant unterschiedlich p<0,05

Im weiteren Tagesverlauf stellte sich 6 h nach der Fütterung wieder ein einheitliches Niveau zwischen den beiden Rationen ein. Für *Ruminococcus flavefaciens* sowie *Archaea* zeigte sich jedoch unter stärkereicher Fütterung eine geringere Konzentration zum Zeitpunkt 6 h nach der Fütterung.

Neben dem Tagesverlauf wiesen auch die Tagesmittelwerte ( $\bar{\phantom{x}}$  0h – 6h) der Mikroorganismen signifikante Unterschiede auf. Hierbei konnte unter Einfluss einer faserreichen Ration eine signifikant erhöhte Kopienzahl je Gramm Trockenmasse (TM) Pansensaft für alle untersuchten Mikroorganismen, ausgenommen *Streptococcus bovis* aufgezeigt werden (Gesamtheit Bakterien: 11,1 vs. 10,6; *Fibrobacter succinogenes*: 9,5 vs. 9,0; *Ruminococcus flavefaciens*: 8,4 vs. 7,8; anaerobe Pilze: 8,6 vs. 7,9;  $\alpha$ -Proteobakterien: 9,8 vs. 9,4; *Archaea*: 9,3 vs. 8,8; *Ruminobacter amylophilus*: 6,7 vs. 6,9; Protozoen: 9,9 vs. 9,6). Des Weiteren konnte ein signifikanter tierindividueller Einfluss für *Ruminococcus flavefaciens* ( $p < 0,05$ ; Tab. 7) verdeutlicht werden.

Neben der Untersuchung der Hauptgruppen der ruminalen Mikroflora wurden dazu noch die Ratios, der untersuchten Mikroorganismen in Bezug auf die Gesamtheit der Bakterien berechnet (Tabelle 8).

Im Tagesverlauf lagen die Ratios für *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminobacter amylophilus* und *Streptococcus bovis* auf einem einheitlichen Niveau. Die Ratios der anaeroben Pilze hingegen stiegen rationsabhängig zum Zeitpunkt 3 h nach der Fütterung unter faserreicher Ration an. Gegensätzlich dazu wies die Ratio der *Archaea* zum Zeitpunkt 1,5 h nach der Fütterung einen Abfall unter einer faserreichen Fütterung auf.

Die Ratios der Protozoen in Bezug auf die Gesamtheit der Bakterien wiesen einen vorübergehenden Anstieg unter faserreicher Ration sowie einen Abfall unter stärkereicher Ration zum Zeitpunkt 1,5 h nach der Fütterung auf.

Am Ende der Beobachtungen (6 h nach der Fütterung) erreichten alle Relationen das Ausgangsniveau der jeweiligen Rationen.

Tabelle 8: Zeitlicher Verlauf der Verhältnisse funktioneller Hauptgruppen in Bezug auf die Gesamtheit der Bakterien (%) im Pansensaft nach der Fütterung einer faserreichen (HF) oder stärke reichen (HS) Ration

	Ration	Zeitpunkt nach der Fütterung (h)						SEM	p<		
		0	1,5	3	6	R	ZP		RxZP	T	
Ratio <i>Fibrobacter succinogenes</i>	HF	1,64	1,88	5,92	4,86	0,85	0,819	0,001	0,999	0,532	
	HS	1,71	1,73	5,81	4,69						
Ratio <i>Ruminococcus flavefaciens</i>	HF	0,13	0,10	0,35	0,34	0,08	0,207	0,063	0,343	0,200	
	HS	0,06	0,47	0,36	0,47						
Ratio anaerobe Pilze	HF	0,13 <sup>b</sup>	0,62 <sup>ab</sup>	0,99 <sup>a</sup>	0,30 <sup>ab</sup>	0,13	0,783	0,005	0,287	0,581	
	HS	0,10 <sup>b</sup>	0,53 <sup>ab</sup>	0,63 <sup>ab</sup>	0,63 <sup>ab</sup>						
Ratio <i>Ruminobacter amylophilus</i>	HF	0,001	0,002	0,019	0,019	0,08	0,181	0,357	0,429	0,514	
	HS	0,007	0,065	0,049	0,333						
Ratio <i>Streptococcus bovis</i>	HF	1,02	1,95	0,02	0,02	1,03	0,085	0,205	0,282	0,502	
	HS	0,90	3,81	5,00	0,30						
Ratio $\alpha$ -Proteobakterien	HF	3,64 <sup>b</sup>	2,25 <sup>b</sup>	7,44 <sup>ab</sup>	9,28 <sup>ab</sup>	1,97	0,099	0,017	0,283	0,466	
	HS	2,99 <sup>b</sup>	10,65 <sup>ab</sup>	7,07 <sup>ab</sup>	15,14 <sup>a</sup>						
Ratio Archaea	HF	1,67 <sup>ab</sup>	0,40 <sup>b</sup>	5,27 <sup>a</sup>	4,78 <sup>a</sup>	0,67	0,270	0,055	0,027	0,466	
	HS	1,64 <sup>ab</sup>	2,78 <sup>ab</sup>	1,40 <sup>ab</sup>	3,01 <sup>ab</sup>						
Ratio Protozoen	HF	3,16 <sup>b</sup>	5,10 <sup>b</sup>	16,32 <sup>b</sup>	14,25 <sup>b</sup>	2,28	0,017	<0,01	0,016	0,363	
	HS	15,14 <sup>b</sup>	3,36 <sup>b</sup>	15,13 <sup>b</sup>	31,36 <sup>a</sup>						

Anmerkung: SEM = standard error of means; R = Ration; ZP = Zeitpunkt nach der Fütterung; RxZP = Interaktion zwischen R und ZP; T = Tier; <sup>a,b,...</sup> Mittelwerte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben zeigen signifikante Unterschiede p<0,05

Ratio (%) = Verhältnis von funktioneller Hauptgruppe zu Gesamtheit der Bakterien in Prozent

Zusammenfassend wurde deutlich, dass eine unterschiedliche Rationsgestaltung neben einem Effekt auf die Endprodukte der ruminalen Fermentation auch ein Einfluss auf das Muster und die Anzahl der Bakterien im Pansensaft besaß. Es lässt sich folglich zeigen, dass bei allen betrachteten Vertretern der ruminalen Mikroflora sowie den Ratios zur Gesamtheit der Bakterien im Pansen die stärksten Schwankungen zwischen den Zeitpunkten 1,5 h und 3 h nach der Fütterung auftraten und ein Abfall auf das Ausgangsniveau zum Zeitpunkt 6 h nach der Fütterung stattfand. Ebenso wurde deutlich, dass unter einer stärkereichen Ration das Muster der Bakterien im Pansen stets eine Abnahme aller untersuchten Bakterienspezies zum Zeitpunkt 1,5 h nach der Fütterung aufwies und unter einer faserreichen Ration ein Anstieg der Bakterienanzahl zum Zeitpunkt 1,5 h nach der Fütterung zu verzeichnen war.

### **Untersuchung mittels NGS**

Da die Untersuchung der funktionellen Hauptgruppen mittels qPCR im Verlauf der Arbeit unerwartete Ergebnisse gebracht hatte, sollten die Proben im Weiteren mit der Methode des Next-Generation-Sequencings analysiert werden. Mit dieser Methode können Änderungen im Muster der Mikrobiota auf einer sensitiveren, genomischen Ebene betrachtet und der gezeigte Einfluss unterschiedlicher Rationen auf die Zusammensetzung der Mikroorganismen im Pansen verdeutlicht werden. Zusätzlich sollte neben den in der qPCR detektierten funktionellen Hauptgruppen weitere bisher im Pansen unbeschriebene funktionelle Hauptgruppen mittels NGS charakterisiert werden. Die Sequenzierung der Proben erfolgte am Helmholtz Zentrum München von der Abteilung der Umweltgenomik von Herrn Prof. Schloter. Die daraus resultierenden Grafiken sind im Anhang abgebildet.

Ein erstes Ergebnis zeigt die Abbildung 36 (Anhang), eine bildliche Darstellung der Anteile der funktionellen Hauptgruppen *Firmicutes* (*Ruminococcus flavefaciens*; *Streptococcus bovis*), *Proteobacteria* ( $\alpha$ -*Proteobacteria*;

*Ruminobacter amylophilus*), *Bacteroidetes* (*Fibrobacter succinogenes*) sowie zusätzlich *Tenericutes*, *Spirochaetes* und *Lentisphaerae* im Pansenmikrobiom.

Hierbei ergaben sich deutliche Unterschiede in den Mustern zwischen den beiden Fütterungen (Abb. 36, Anhang). Es zeigte sich bei dieser Betrachtung, dass die Versuchstiere nach einer Umstellung von einer vierwöchigen stärkereichen (HS) auf eine vierwöchige faserreiche Ration (HF) und nach erneuter Umstellung auf eine vierwöchigen stärkereiche Fütterung (HS-HF-HS) sowie in umgekehrter Richtung, deutliche Veränderungen in der Ausprägung und Zusammensetzung der ruminalen Mikroflora zwischen beiden Versuchsrationen deutlich wurden (Abb. 36, Anhang).

Zu allen untersuchten Messpunkten über beide Fütterungsregime hinweg sowie bei allen Versuchstieren nahmen die funktionellen Hauptgruppen *Bacteroidetes* (>40%) und *Firmicutes* (≈20%) neben den nicht klassifizierten Bakterien (<30%) den größten Teil ein. Zudem konnte verdeutlicht werden, dass bei einer stärkereichen Fütterung der Anteil an *Proteobakterien* (≈1%) und *Bacteroidetes* (≈35%) signifikant höher ist als unter einer faserreichen Ration.

Um die einzelnen funktionellen Hauptgruppen in der Gruppe der nicht klassifizierten Bakterien identifizieren zu können, wurde diese Gruppe subanalysiert (Abb. 37, Anhang). Hierbei zeigte sich, dass ein großer Anteil weiter den nicht klassifizierten Bakterien zuzurechnen ist, neu subtypisiert sind die funktionellen Hauptgruppen der *Prevotellaceae* und  $\gamma$ -*Proteobacteria* in beiden Fütterungsregimen. Als weitere funktionelle Hauptgruppen konnten *Selenomonadales*, *Clostridiales*, *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Anaeroplasmataceae*, *Spirochaetales*, *Spirochaetaceae*, *Gammaproteobacteria*, *Victivallaceae*, *Sphingobacteriales*, *Bacteroidales*, *Prevotellaceae* sowie die funktionelle Hauptgruppe der *Porphyromonadaceae* subtypisiert werden. Unterschiede zwischen den beiden Rationen konnten hierbei für alle diese drei Gruppen verdeutlicht werden. Hierbei war die Bakterienlast unter stärkereicher Ration höher als unter faserreicher Ration.

Keine Unterschiede zwischen den beiden Fütterungsregimen konnten für die faserabbauenden Mikroorganismen veranschaulicht werden.

#### **4.4 Diskussion**

Ein Einfluss einer unterschiedlichen Versorgung mit Kohlenhydraten auf die biochemischen Endpunkte der ruminalen Fermentation bei trockenstehenden Milchkühen sowie der Zusammensetzung der ruminalen Mikroflora konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Signifikante Veränderungen im Tagesverlauf sowie im Muster der ruminalen Mikroflora bei den beiden unterschiedlichen Rationen wurden aufgezeigt.

##### *Einfluss der Ration und des zeitlichen Verlaufs auf die biochemischen Endpunkte der ruminalen Fermentation*

Bei der Charakterisierung der ruminalen Mikroflora besteht die Möglichkeit, neben der biochemischen Endpunkte der ruminalen Fermentation auch die Untersuchung der einzelnen Bakterienspezies zu betrachten. Bei den biochemischen Endprodukten besaß eine Änderung der Rationsgestaltung einen deutlichen Einfluss auf die Endpunkte der ruminalen Fermentation (McAllan 1994, Yang 2001, Cardozo 2005, Cantalapiedra-Hijar 2009).

Allerdings wiesen einige Punkte des vorliegenden Versuchs ein gegensätzliches Bild zu bisherigen Erkenntnissen auf. Vorangehende Studien zeigten, dass bei einer faserbasierten Ration der Substratanteil für die Mikroorganismen deutlich erhöht ist und somit vermehrt flüchtige Fettsäuren produziert werden können (Knononoff 2003). Im hier vorliegenden Versuch konnte gezeigt werden, dass unter einer stärkereichen Ration der Anteil an flüchtigen Fettsäuren höher liegt als unter einer faserreichen Ration. Dies könnte mit dem Anteil an fettsäureproduzierenden Bakterien zusammenhängen. Je mehr Energie in einer Ration enthalten ist, desto mehr Bakterien sind im Pansen vorhanden und können somit in der Summe mehr Fettsäuren produzieren (Bevans 2005). Ein weiterer Grund für den geringeren Anteil an flüchtigen Fettsäuren unter faserreicher Ration könnte sein, dass einige

Messungen vor der Fütterung zum Zeitpunkt 0 h stattgefunden haben, sodass sich die Tiere mit der faserreichen Ration im Abtransport der flüchtigen Fettsäuren aus dem Pansenlumen - gleich einem "*steady state*" - angepasst haben und die Transportrate deutlich erhöht ist (Dengler 2013). Dies kann zur Folge haben, dass der Gehalt an flüchtigen Fettsäuren bei den verschiedenen Rationen annähernd gleich ist, sich jedoch die Transportrate der flüchtigen Fettsäuren stark unterscheidet (Brugger 2016). Weiter sollte in diesem Kontext die lange Nüchternungszeit der Tiere sowie die tierindividuellen Unterschiede nicht außer Acht gelassen werden.

Neben einer Messung von flüchtigen Fettsäuren wurde ebenfalls das Verhältnis von Essigsäure zu Propionsäure bestimmt. Nach einer bisher veröffentlichten Studie von Spann et al. liegt das Actetat-Propionat-Verhältnis bei 4:1 unter einem Faseranteil von mehr als 28% (Spann 2007). Dieses Verhältnis konnte adäquat abgebildet werden, da bei der vorliegenden Untersuchung einer stärkereichen vs. einer faserreichen Ration der Anteil an Rohfaser mit 20% in der HS Ration sowie 26,6% in der HF Ration annähernd an einem Faseranteil von 28% lag.

Neben der Untersuchung eines Rationseffekts auf die biochemischen Endpunkte der ruminalen Fermentation sollten auch Unterschiede der Endpunkte im Tagesverlauf nach der Fütterung untersucht werden. Hierbei konnten in der vorliegenden Arbeit mittels hoher zeitlicher Auflösung signifikante Unterschiede im Anschluss an die Fütterung gezeigt werden. Dies entspricht dem physiologischen Verlauf der Verdauung, wobei die Futtermatrix durch die mikrobielle Aktivität der Bakterien in flüchtige Fettsäuren zersetzt wird. Diese flüchtigen Fettsäuren können als biochemische Endprodukte gemessen werden und dynamische Veränderungen verdeutlichen.

Bisher liegen nur wenige Studien zum Tagesverlauf der Endpunkte bei *Holstein Frisians* vor, es existiert nur eine Studie zum Tagesprofil zu den Zeitpunkten 0h, 2h, 4h, 6h, 8h und 10h bei Ziegen von Zhi et al., worin ein Anstieg der flüchtigen Fettsäuren und der Ammoniakkonzentration im Tagesverlauf gezeigt wurde (Zhi 2012). Lediglich einzelne Zeitpunkte nach der Fütterung wurden bereits bei Rindern untersucht. Bei diesen erfolgten die Probennahmen zu den

Zeitpunkten 0h und 2h nach der Fütterung (Singh 2014), 3h nach der Fütterung (Monteils 2012), sowie den täglichen Verlauf nach der Fütterung über 4 Zeitpunkte hinweg von Zebeli et al. (Zebeli 2008). Die große Schwäche dieser Studie war allerdings, dass die Tiere hierbei *ad libitum* gefüttert wurden (Zebeli 2008), da die ständige Substratzuführung einen unbekanntem Einfluss auf den Verlauf der Fettsäuren haben kann.

Die hier vorliegenden Ergebnisse wurden unter einer restriktiven Fütterung erhoben und stimmen dennoch mit bisherigen Studien überein, sodass die Ergebnisse bezüglich flüchtiger Fettsäuren und pH-Wert gut mit bisherigen Erkenntnisse verglichen werden können. Im Gegensatz dazu konnten keine Unterschiede im Tagesverlauf von Ammoniak detektiert werden. Der numerisch höchste Peak von Ammoniak wurde zum Zeitpunkt 1,5h nach der Fütterung gemessen. Dies deckt sich allerdings nicht mit vorherigen Untersuchungen von Scheidemann (Scheidemann 2001), der ein Tagesmaximum an Ammoniak erst 3h nach der Fütterung aufzeigen konnte. Diese Diskrepanz kann dadurch erklärt werden, dass der Gehalt an Ammoniak in der vorliegenden Arbeit bei beiden Rationen (HS und HF) große Streuungen aufwies (SEM 2,14) sowie ein signifikanter Tierereffekt bei Ammoniak sichtbar wurde. Damit müssen der Aspekt des tierindividuellen Einflusses in diesem Fall, zusätzlich zu den fütterungs- bzw. tagesverlaufsbedingten Einflüssen, in die Analyse einbezogen werden.

#### *Einfluss der Ration auf die Mikroflora*

Eine Vielzahl bisher durchgeführter Studien beschäftigte sich mit den Veränderungen innerhalb des Mikrobioms im Zusammenhang mit Rationsänderungen. Hierbei konnten Hungate et al. als erste Studie zeigen, dass unter einem Anstieg des Weizenanteils in der Ration die cellulolytischen Bakterien stark absinken und gleichzeitig ein Anstieg von gram-positiven Bakterien zu erkennen ist (Hungate 1952). Auch Koike et al. konnten einen fütterungsbedingten Anstieg der cellulolytischen Bakterien unter einer heubasierten Ration zeigen (Koike 2001). In der hier vorliegenden Arbeit konnten diese bereits gezeigten Unterschiede zwischen einer stärkereichen und einer faserreichen Ration ebenfalls bestätigt werden (Tajima 2001, Fernando

2010, Jami 2012, Singh 2014). Neben den signifikanten Unterschieden bei den cellulolytischen Bakterien über die Tagesmittelwerte zwischen den beiden Versuchsrationen konnten auch signifikante Unterschiede für anaerobe Pilze aufgezeigt werden, welche für ihre Faserabbauende Aktivität bekannt sind.

Weiter zeigte sich ein signifikanter Effekt der Ration über die Tagesmittelwerte hinweg auf die Kopienzahl der Protozoen zwischen einer stärkereichen und einer faserreichen Ration. Dies bestätigt bisherige Ergebnisse über einen Einfluss der Ration (Moir 1957, Ivan 2000, Monteils 2012). So steigt die Zahl an Protozoen im Pansen um das 6 bis 12-fache durch einen hohen Gehalt an Stärke in der Ration an und sinkt gleichzeitig unter dem Einfluss einer heubasierten Ration mit einem geringeren Stärkeanteil stark ab (Chou 1964). Protozoen werden durch das Vorhandensein von Stärke stimuliert und spielen bei der Stabilisierung des pH-Wertes im Pansen eine entscheidende Rolle (Jouany 1999). Durch den schnellen Abbau der im Pansen befindlicher Stärke durch Protozoen steht den ruminalen Bakterien als Nahrungskonkurrenz ein geringerer Anteil an fermentierbarer Stärke zur Verfügung. Durch diesen damit verringerten Stärkeanteil im Pansen können von den ruminalen Bakterien weniger flüchtige Fettsäuren produziert werden, wodurch ein zu schnelles und langfristiges Absinken des pH-Werts vermieden wird (Hobson 1997). Neben diesem Fütterungseffekt konnten Monteils et al. eine Beeinflussung der ruminalen Protozoen in Abhängigkeit von der Zeit aufzeigen (Monteils 2012). Dies erklärt, warum bei der Probenentnahme vor der Fütterung zum Zeitpunkt 0 h keine Unterschiede in der Zahl der Protozoen, jedoch im Tagesmittelwert ein signifikanter Effekt zwischen den beiden Rationen gezeigt werden konnte. Bereits bekannt ist, dass individuelle Protozoen Spezies unterschiedliche Generationszeiten besitzen (Dehority 1984), so sind bis zu 10 unterschiedliche Generationen an Protozoen gleichzeitig im Pansen vorhanden (Jouany 1999). Aus diesem Grund muss für die Untersuchung der Protozoen das Primer-Spektrum erweitert werden, um bei weiterführenden Untersuchungen die Veränderungen in der Protozoen-Population noch sensitiver und hochauflösender aufzeigen zu können.

Neben dem Einfluss einer unterschiedlichen Rationsgestaltung auf die Faserabbauenden Mikroorganismen sowie die Protozoen konnte der Einfluss

des tierindividuellen Effekts und des Fütterungseffekts auf *Archaea* und *α-Proteobacteria* im Pansen aufgezeigt werden. Der Anteil an *Archaea* im Pansen war unter faserreicher Fütterung höher als unter stärkereicher, da ein erhöhter Faseranteil die Fermentation der Essigsäure und somit ein Wachstum der *Archaea* begünstigt (Kirchgessner 2011). Auch die Anzahl an *α-Proteobacteria* war unter faserreicher Fütterung höher, da sie im Stickstoffkreislauf und somit am Proteinabbau im Pansen beteiligt sind (McSweeney 2012). Die faserreiche Versuchsration wies einen wesentlich höheren Gehalt an Rohprotein auf, womit ein besseres Substratangebot und folglich ein Wachstum der *α-Proteobacteria* verbunden ist. Dies steht im Einklang mit früheren, bereits in der Literatur beschriebenen Ergebnissen (Kim 2012).

#### *Einfluss des zeitlichen Verlaufs nach der Fütterung auf die Mikroflora*

Auch im Tagesverlauf konnten signifikante Unterschiede der ruminalen Mikroorganismen aufgezeigt werden. Die Abnahme ruminaler Bakterien nach der Fütterung ist aufgrund der Substratabnahme während der Verdauungsvorgänge physiologisch erklärbar und deckt sich mit früheren Untersuchungen (Lengowski 2015). Allerdings ist hierbei zu beachten, dass die Tiere in der Studie Lengowski et al. während des Versuches *ad libitum* gefüttert wurden und der Abstand der Zeitintervalle bei nur 4h lag. Der Vorteil in der vorliegenden Untersuchung war die restriktive Fütterung der Tiere über den gesamten Tagesverlauf, da somit zwischenzeitliche Nahrungsaufnahme vermieden und unkontrollierte Einflüsse auf das Pansenmilieu verhindert werden konnten. Des Weiteren sollten jedoch auch kurzfristige Veränderungen nach der Fütterung betrachtet werden, weshalb engere Zeitintervalle von 1,5 h und 3 h nach der Fütterung untersucht wurden.

Die Reduktion der Bakterienlast nach der Fütterung scheint in direkter Verbindung mit einem Anstieg an Protozoen zu stehen. Neben der Nahrungskonkurrenz zwischen diesen beiden funktionellen Hauptgruppen dienen ruminale Bakterien den im Pansen befindlichen Protozoen als zusätzliche Nahrung, was dem bakteriellen Wachstum im Pansen entgegenwirkt und einen Anstieg der Protozoen fördert.

Ein Anstieg zweier Vertreter der ruminalen Bakterien, *Fibrobacter succinogenes* und *Ruminococcus flavefaciens*, zum Zeitpunkt 3h nach der Fütterung zeigt deren funktionelle Rolle bei der Faserverdauung im Pansen. Zu Beginn des Verdauungsprozesses werden die leichtverdaulichen Stoffe metabolisiert, um dann später die schwerverdaulichen Faseranteile aufzuspalten (Phillipson 2008). Folglich ist der verzögerte Anstieg der faserabbauenden Bakterien in der Physiologie und der Fermentation des Pansens einzugliedern. Außerdem konnte von Ozutsumi et al. gezeigt werden, dass durch die Anwesenheit von Protozoen die Zahl der cellulolytischen Bakterien stark beeinflusst wird, da ein Anstieg der Protozoen nach der Fütterung aufgrund des "räuberischen" Fressverhaltens einen negativen Effekt auf das Wachstum von *Fibrobacter succinogenes* und *Ruminococcus flavefaciens* besitzt (Ozutsumi 2006).

Ebenso lässt sich eine starke Beteiligung der anaeroben Pilze am Faserabbau im Pansen anhand der zeitlichen Veränderungen nach Fütterung herausstellen. So zeigte sich ein signifikanter Anstieg im Nachweis der anaeroben Pilze nach der Fütterung. Wie bereits von Orpin und Joblin beschreiben, sind anaerobe Pilze neben den cellulolytischen Bakterien am Faserabbau, dabei vor allem am Ligninabbau beteiligt (Orpin und Joblin, 1975). Allerdings wurde in der Literatur beschrieben, dass das Wachstum der Pansenpilze mit einer sehr langsamen Generationszeit verbunden ist, deren direkte Folge eine sehr langsame Vermehrung der Pilze ist (Krause 2003). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit widerlegt werden, da deutliche Schwankungen der anaeroben Pilze im Tagesverlauf nach der Fütterung gemessen wurden und somit eine sensitive und kurzfristige Reaktion der Pilze auf das Substratangebot im Pansen bewiesen werden konnte. Dieser Anstieg der Pansen-Pilze kann im Zusammenhang mit dem gleichzeitigen Wachstum der Bakterienspezies *Fibrobacter succinogenes* gebracht werden, da bereits von Joblin gezeigt werden konnte, dass bestimmte Vertreter der anaeroben Pilze im Pansen mit *Fibrobacter succinogenes* interagieren und deren Wachstum fördern (Joblin 2002).

Zusammenfassend unterliegt die ruminale Mikroflora und deren biochemischen Endpunkten ständigen Schwankungen im Tagesverlauf. Somit kann der Pansen

als ein pro-aktives System mit kontinuierlichem Wachstum und Ausscheidung der Fermentationsprodukte sowie eines spezifischen, den Schwankungen unterworfenen Mikroflora bezeichnet werden.

### *Untersuchungen des ruminalen Mikrobioms mittels Next-Generation-Sequencing*

Durch aktuelle Entwicklungen hin zur Hochdurchsatz Analyse mittels Next-Generation Sequencing (NGS) ist es möglich, mikrobielle Populationen in extrem hoher und feiner Auflösung zu subtypisieren (McCann 2014). Der umfangreiche Erkenntnisgewinn mittels Sequenzierung hilft dabei, neuartige und evidenz-basierte Verfahren in der Haltung von Wiederkäuern anzuwenden und nachhaltig zu verbessern (McCann 2014). Aus diesem Grund sollte neben der Untersuchung des Mikrobioms mittels qPCR auch eine Analyse mittels NGS durchgeführt werden.

Hierbei konnten wie in der qPCR drei große funktionelle Hauptgruppen mit *Firmicutes*, *Proteobacteria* und *Bacteroidetes* im Pansen detektiert und subcharakterisiert werden. Daneben wurden mit *Tenericutes*, *Spirochaetes* sowie *Lentisphaerae* noch drei weitere funktionelle Hauptgruppen mittels NGS subtypisiert, welche im Rauschen der Gesamtheit der Bakterien in der qPCR untergegangen wären. Den größten Anteil der Hauptgruppen spiegelten *Firmicutes* und *Bacteroidetes* wider, welche wir zuvor mit der qPCR nachweisen konnten. Die kombinierten Ergebnisse aus qPCR und NGS bestätigen, dass die beiden Gruppen rund 86 % des gesamten ruminalen Mikrobioms repräsentieren, was zuvor schon in diversen Studien aufgrund der Ergebnisse aus den qPCRs vermutet wurde (Tajima 1999, Larue 2005, Yu 2006, Brulc 2009, Sadet-Bourgeteau 2010). Zudem konnte mittels NGS bestätigt werden, dass nur ein geringer Anteil von ca. 4% der Pansenmikroorganismen aus der funktionellen Hauptgruppe der *Proteobacteria* stammen (Tajima 1999, Larue 2005, Yu 2006, Brulc 2009, Sadet-Bourgeteau 2010).

Überraschenderweise zeigten sich bei der Untersuchung der verschiedenen Fütterungsregime nachhaltige Auswirkungen der Abfolge Rationen auf die ruminale Mikroflora. Nach dem Wechsel von einer faserreichen auf eine stärkereiche Ration und umgekehrt scheint sich das Muster und die

Zusammensetzung der ruminalen Mikroflora zu ändern. Dies bestätigt die bisherigen Untersuchungen mittels qPCR dieser Arbeit. Jedoch zeigte sich auch, dass sich dieser Unterschied zwischen den Versuchsrationen sich im Laufe des Versuchs (Messperiode 3) etwas abflacht und somit weniger deutlich ausgeprägt ist. Dies könnte mit der Anpassung an die Rationswechsel sowie mit den unterschiedlichen Tieren in den Versuchsgruppen zu erklären sein, sodass weitere Untersuchungen hierbei zu empfehlen sind.

#### **4.5 Schlussfolgerung**

Kombinierte Untersuchungen mittels qPCR und NGS, wie sie erstmals in dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigen neben den bereits bekannten rationsabhängigen Veränderungen auch tierindividuelle Schwankungen der ruminalen Mikroflora im Tagesverlauf nach der Fütterung. Diese Schwankungen wurden hauptsächlich in den funktionellen Hauptgruppen der *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Tenericutes*, *Spirochaetes* sowie *Lentisphaerae* sichtbar.

---

## **5 Einfluss einer Fütterung von unterschiedlichen Strukturanteilen in der Rindermast auf die ruminale Mikroflora sowie den biochemischen Endpunkten**

### **5.1 Einleitung**

Die Ansprüche an die Leistung unserer landwirtschaftlichen Nutztiere nahmen im Laufe der Jahre drastisch zu. Auch die Milchkühe sind von diesen Entwicklungen betroffen, da die Züchtung der Tiere auf immer höhere Milchleistungen abzielt. Um dabei jedoch die Energiebedürfnisse von hochlaktierenden Kühen decken zu können, benötigen die Tiere eine sehr gute Qualität an Raufutter sowie eine größere Menge an Krafffutter (De Campeneere 2002). Die Futterstruktur und die damit verbundene mechanisch-wirksame Eigenschaft eines Futtermittels spielen dabei eine immense Rolle. Diese Eigenschaften beruhen auf Partikellänge und Partikelhärte eines Futtermittels (Kirchgessner 2011). All diese Punkte unterstützen nachhaltig die Pansenmotorik und regen die Wiederkauaktivität der Tiere an. Dies steigert deutlich die Speichelproduktion, sodass die im Pansen gebildeten flüchtigen Fettsäuren durch im Speichel enthaltenes Hydrogencarbonat abgepuffert werden. Für die Wiederkäuer hat ein zu geringer Anteil an Struktur in der Ration gravierende Folgen für die Tiergesundheit, da eine fehlende Abpufferung der flüchtigen Fettsäuren eine subakute Pansenazidose (SARA) verursachen kann (Kleen 2003). Aus diesem Grund spielte die Strukturbewertung bereits in der Vergangenheit eine große Rolle im Forschungsbereich der Tierernährung. Einen Ansatzpunkt spiegelt hierbei die Einführung eines Strukturwertes nach De Brabander wider (De Brabander 1999), hierbei wird jedem Futtermittel ein Strukturwert zugewiesen, der aus einer dimensionslosen Zahl abgeleitet wird (Kirchgessner 2011). Der Strukturwert der Gesamtration wird daraufhin durch eine Aufsummierung der Einzelwerte der Futterkomponenten einer Ration ermittelt (GfE 2001). Da die Methode auf Schätzungen beruht, ist bei diesem Bewertungssystem eine Unterschätzung oder Überschätzung des Strukturwertes möglich (GfE 2001).

---

Bisherige Untersuchungen zum Strukturwert einer Ration wurden überwiegend beim Milchvieh durchgeführt. Jedoch gewinnt in Bayern neben der Milchviehwirtschaft zunehmend die Mastbullenfütterung als Hauptquelle für Fleisch an Bedeutung. Die Rationsgestaltung basiert häufig auf einem hohen Anteil an Maissilage sowie einem hohen Krafffutteranteil ohne weitere Strohzulage, womit ein schnelleres Wachstum der Tiere ermöglicht werden soll. Diese Fütterung ist jedoch aus Sicht der Tierernährung eine nicht-wiederkäuergerechte Zusammensetzung, da der geringe Strukturanteil eine Pansenazidose fördert. Campeneere et al. 2002 sprachen eine Empfehlung für Mastbullen aus, laut derer mindestens ein Strukturwert von 0,6 eingehalten werden sollte. Jedoch ist diese Studie die einzige Grundlage, sodass mehr Evidenzen geschaffen werden müssen, um internationale Richtlinien zur Verhinderung einer subakuten Pansenazidose erstellen zu können.

Man spricht von einer subakuten Pansenazidose (subacute rumen acidosis; SARA), sobald der pH-Wert für mehr als drei Stunden am Tag unter einen Wert von 5,6 absinkt (Kleen 2003, Stone 2004, Gozho 2007). Untersuchungen in den Vereinigten Staaten ergaben, dass etwa 19% der frühlaktierenden Kühe und 26% der mittellaktierenden Kühe von SARA betroffen sind (Erickson 2003). In Deutschland sind etwa 11% der frühlaktierenden und 18% der mittellaktierenden Kühe betroffen (Kleen 2004), was an einer traditionellen, strukturreicheren Fütterung liegt.

Eine SARA hängt vor allem stark von der Anreicherung von flüchtigen Fettsäuren und der fehlenden Pufferung des Pansen ab (Kleen 2003, Stone 2004, Rustomo 2006). Diese Anreicherung flüchtiger Fettsäuren beruht hauptsächlich auf der Fütterung mit leicht verdaulichen, nicht-strukturellen Kohlenhydraten. Bedingt durch diese Fütterung von leicht fermentierbaren Kohlenhydraten und einem geringen Faseranteil in der Ration wird die Wiederkauaktivität stark reduziert (Mertens 1997, Yang 2001, Maekawa 2002, Beauchemin 2003, Yang 2006, Fairfield 2007) und das Wachstum an Mikroorganismen im Pansen gefördert (Nocek 1997). Durch die Reduzierung der Wiederkauzeiten sinkt die Speichelproduktion und die damit zusammenhängende Pufferwirkung stark ab (Church 1988). Gleichzeitig führt

---

eine Vielzahl an Mikroorganismen wie *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Protozoa* und anaerobe Pilze im Pansen zu einer Steigerung der Produktion an flüchtigen Fettsäuren und eines weiteren Absinkens des pH-Wertes. Somit reicht die Pufferwirkung des Speichels nicht mehr aus und in der Folge entsteht eine SARA.

Eine langfristige Erkrankung von Wiederkäuern an SARA hat schwere gesundheitliche Auswirkungen, die sich in einem Rückgang der Futteraufnahme, der Leistung der Tiere sowie eine Reduktion des Milchfettgehalts widerspiegeln. Ebenso können Leberschäden, Euterentzündungen und weitere Entzündungsprozesse damit einhergehen (Kleen 2003, Stone 2004), welche Milch- und Fleischqualität negativ beeinflussen und somit nicht nutzbar machen. Daneben hat SARA auch einen starken Einfluss auf die Verdauungsprozesse sowie der Mikroflora im Pansen. Faserabbauende Mikroorganismen wie *Fibrobacter succinogenes* und *Ruminococcus flavefaciens* zum Beispiel können bei einem längerfristigen pH-Wert über mehrere Stunden hinweg unter 6,0 nur schwer überleben (Shi 2002). Somit reduziert sich nicht nur die Anzahl dieser Mikroben, sondern auch der Faserabbau per se im Pansen (Shi 2002). Durch das Absterben bestimmter Mikroorganismengruppen im Pansen verschiebt sich das Muster der Mikroflora in Richtung der gram-positiven Kokken, was eine Zunahme an bakteriellen Endotoxinen und ein dadurch bedingtes vermehrtes Aufkommen von Diarrhoe zur Folge hat (Nagaraja 1978, Goad 1998). Des Weiteren findet unter einem pH-Wert von 6,0 keine Anreicherung von Milchsäure statt. Dies hat starke Auswirkungen auf Propionsäure-produzierende Bakterien im Pansen wie *Megashaera elsdenii* (Plazier 2008). Neben einer Verschiebung sowie einem Ungleichgewicht der Mikroflora kann SARA ebenfalls Auswirkungen auf das Pansenepithel haben. Durch einen konstant niedrigen pH-Wert entstehen Schäden am Pansenepithel, im Speziellen an den Pansenzotten (Kleen 2003, Stone 2004, (Nocek 1997, Alzahal 2007). Die Dichte und Größe der Pansenzotten beeinflusst wiederum die Aufnahme an flüchtigen Fettsäuren aus dem Pansenlumen (Van Soest 1994), was in einem weiteren Absinken des pH-Wertes resultiert.

---

## 5.2 Material und Methoden

Mittels eines Mastbullenversuchs am Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft in Grub/Polg sollte der Einfluss unterschiedlicher Strukturversorgung auf die Gesundheit und Mastleistung untersucht werden. Dieser Modellversuch diente wiederum der vorliegenden Arbeit als Grundlage für die Untersuchung der ruminale Mikroflora sowie den Endpunkte (flüchtige Fettsäuren, pH-Wert und Ammoniak) der Pansenfermentation unter Fütterung verschiedener Strukturwerten und einer eventuell damit verbundenen subakuten Pansenazidose.

Hierbei standen 67 Mastbullen der Rasse *Fleckvieh* zur Verfügung. Die Tiere wurden in 6 Boxen auf Spaltenboden gehalten und bis zu einem Lebendgewicht von 500 kg mit einheitlichen Rationen mit einem Strukturwert 1,2 versorgt, hierbei bestand die Totale Mischration (TMR) aus Maissilage, Kraftfutter (ca. 30% der TM) und Stroh. Danach wurden die Tiere randomisiert in drei Gruppen aufgeteilt und über sieben Tage an die neuen Rationen mit unterschiedlichen Strukturwerten gewöhnt. Die Tiere der Kontrollgruppe wurden weiterhin mit einem SW von 1,2 versorgt. Die zweite Versuchsgruppe wurde über eine in den Nährstoffgehalten (außer Faserfraktion) vergleichbare Ration versorgt, jedoch ohne Strohzulage, sodass sich ein SW von 1,1 ergab. Um die Energie- und Nährstoffgehalte zur Kontrollgruppe anzugleichen, wurde der Kraftfutteranteil von 30 auf 32% der TM erhöht. Die Bullen der letzten Versuchsgruppe wurden mit einem SW von 0,6 versorgt. Sie wurden mit einer Ration mit einem Anteil von 70% Kraftfutter und 30% Maissilage in der TM gefüttert, die ebenfalls keine Strohzulage enthielt. Die unterschiedlichen Rationen waren so kalkuliert, dass eine Variation des SW durch unterschiedliche Fasergehalte erzielt wurde, jedoch der Gehalt an löslichen Kohlenhydraten in allen Rationen konstant blieb. Die jeweilige Rationszusammensetzung und die kalkulierten Rohnährstoffgehalte sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Die Schlachtung der Bullen erfolgte in einem Alter von 500 Tagen mit einer durchschnittlichen Lebendmasse von 800 kg, wobei die letzte Fütterung am Tag vor der Schlachtung stattfand. Dies bedeutete, dass die Tiere eine Nüchternungsphase von 24 Stunden vor der Probennahme durchliefen. Weitere

Informationen zur Durchführung des Fütterungsversuches wurden von Ettle et al. publiziert (Ettle 2014). Im weiteren Verlauf der Arbeit wird dieser Versuch als Strukturversuch bezeichnet.

Tabelle 9: Rationszusammensetzung und kalkulierte Rohnährstoff- und Energiegehalte der Rationen nach Ettle et al.

	SW 1,2	SW 1,1	SW 0,6
<b>Futtermittel</b>			
Maissilage	65,3	67,8	30,00
Gerstenstroh	4,32	-	-
Körnermais	5,68	5,68	10,00
Gerste	-	-	12,63
Rapsextraktionsschrot	11,6	13,6	12,30
Sojaextraktionsschrot	5,05	3,16	1,26
Trockenschnitzel	5,20	7,67	33,01
Sojaöl	1,43	0,72	-
Mineralfutter	0,55	0,55	0,82
Kohlensaurer Kalk	0,86	0,86	-
<b>kalkulierte Nährstoffgehalte</b>			
ME [MJ/kg TM]	11,4	11,4	11,7
Rohprotein [g/kg TM]	132	132	132
Rohfaser [g/kg TM]	166	157	138
NDFom [g/kg TM]	4,2	389	337
NDFom aus Grobfutter [g/kg TM]	321	298	132
Strukturindex NDFom	53	50	31
Stärke und Zucker [g/kg TM]	290	299	302
Pansenabbaubare Kohlenhydrate* [g/kg TM]	240	248	250
Pansenstabile Stärke [g/kg TM]	50	51	52
Kraffutter [% der TM]	30	32	70

\* Stärke und Zucker-pansenstabile Stärke

### 5.2.1 Probennahme und Aufbereitung

Beim Strukturversuch wurden jeweils 50 mL Pansensaft, 50g Panseninhalt sowie Pansenepithel bei der Schlachtung der Mastbullen entnommen.

Die weitere Aufarbeitung der Proben sowie die Messung des Ammoniaks, bzw. Konzentration der flüchtigen Fettsäuren erfolgte wie im Methodenteil 4.3.2 beschrieben. Die mikrobielle DNA wurde mittels des Fast DNA Spin Kit for feces (MP Biomedicals, Santa Ana; USA), wie in 3.2.1 beschrieben, gewonnen.

Das weitere Vorgehen in der Analyse der Mikroorganismen mittels qPCR erfolgte wie in der Methodenbeschreibung 3.2.3. Die Mikroorganismen wurden als Kopienzahl pro g Pansensaft, bzw, Pansenmatte oder Pansenepithel berechnet. Dazu wurden die Ratios in Bezug auf die Gesamtheit der Bakterien

sowie die Relation der Behandlungsgruppen (SW 1,1 und SW 0,6) in Bezug auf die Kontrollgruppe (SW 1,2) ermittelt.

### 5.2.2 Primer

Table 10: Spezifikation der qPCR Primerpaare

Spezies	Sequenz 5'-3'	Länge (bp)	Annealing (°C)	Literatur
16S RNA Gesamtheit Bakterien	F: GGTAGTCYAYGCMSTAAACG R: GACARCCATGCASCACCTG	263	60	Bach et al. 2002
Anaerobe Pilze	F: GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGT R: CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT	120	60	Denman and McSweeney 2006
Protozoen	F: GCTTTCGWTGGTAGTGTATT R: CTTGCCCTCYAATCGTWCT	223	60	Sylvester et al. 2004
Archaea	F: ACKGCTCAGTAACACGT R: GTGCTCCCCGCCAATTCCT	826	65	Boghun et al. 2010
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	F: GTTCGGAATTAAGTGGCGTAAA R: CGCCTGCCCTGAACCTATC	121	56	Denman and McSweeney 2006
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	F: CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTT R: CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC	132	55,4	Denman and McSweeney 2006
α-Proteobakterien	F: ACTCCTACGGGAGGCAGCAG R: TCTACGRATTTACCYCTAC	365	56	Fierer et al. 2005

Anmerkung: Sequenz der Primer und Produktlänge wurden aus aufgeführter Literatur entnommen; Annealing Temperatur wurde mittels Primertest ermittelt

### 5.2.3 Clusteranalyse

Um neben dem Einfluss der strukturwirksamen Faser auf die ruminale Mikroflora der Mastbullen auch einen Einfluss der Herkunft der Tiere zu untersuchen, wurden alle 67 Tiere zur Analyse eines Behandlungseffektes geclustert. Außerdem wurden 19 Paare geclustert, die aus dem gleichen Stall kamen, jedoch in dem vorliegenden Versuch in unterschiedlichen Behandlungsgruppen und Buchten waren. Dies erfolgte mit XLSTAT (Addinsoft, USA) für Microsoft Office Excel. Es wurde ein agglomeratives, hierarchisches Cluster nach dem Ward-Verfahren durchgeführt.

---

#### **5.2.4 Statistik**

Die statistische Analyse erfolgte mit SAS (SAS 9.3, Cary USA). Für den Vergleich eines Behandlungseffekts von unterschiedlichen Strukturwerten erfolgte eine einfaktorielle ANOVA. Anschließend wurde mittels eines Student-Newman-Keuls Tests ergänzt, um signifikant unterschiedlicher Mittelwerte zu identifizieren. Als Signifikanzniveau wurde jeweils 5% angenommen. Die Probenvariation wurde mittels des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM) angegeben.

### **5.3 Ergebnisse**

Ziel dieses Versuches war es, den Einfluss unterschiedlicher Strukturversorgungen auf die ruminale Mikroflora unter Berücksichtigung der Endpunkte der Pansenfermentation an Mastbullen zu untersuchen. Ebenso war bei diesem Versuch zu beachten, dass die Tiere vor der Schlachtung einer 24-stündigen Nüchternung ausgesetzt sind, um mögliche Interaktionen zwischen dem Mikrobiom und dem Wirtstier detektieren zu können.

Bei der Rationsgestaltung des Versuchs wurde berücksichtigt, dass alle drei Behandlungsgruppen trotz einer starken Variation im Strukturwert eine vergleichbare Versorgung mit leicht löslichen Kohlenhydraten besaßen. Dadurch sollten eine einheitliche Leistung und gleiches Wachstum der Mastbullen gewährleistet werden. Um dies zu bestätigen, wurden die Stallendgewichte der Tiere vor der Schlachtung statistisch untersucht (Ettle 2014). Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Behandlungsgruppen (Tab. 11), sodass sich durch die starke Variation des SWs keine Unterschiede im Wachstum der Tiere ergaben. Zusätzlich wurde am Tag der Schlachtung das Schlachthofgewicht ermittelt. Die Messung des Gewichtes erfolgte nach der 24-stündigen Nüchternung. Hierbei zeigten sich signifikante Unterschiede ( $p=0,03$ ). Die Tiere mit einem SW von 0,6 hatten das höchste Schlachthofgewicht von 772kg ( $\pm 65$  kg), die beiden anderen Behandlungsgruppen lagen auf gleichem Niveau mit etwa 760kg ( $\pm 68$  kg).

Weitere Informationen zur Gewichtsentwicklung der Tiere wurden von Ettle et al. publiziert (Ettle 2014).

Tabelle 11: Einfluss von strukturwirksamer Faser auf das Stallendgewicht und Schlachthofgewicht der Mastbullen nach Ettle et al. (Ettle 2014).

	Strukturversorgung			SEM	p-wert
	Kontrolle (SW 1,2)	SW 1,1	SW 0,6		
Stallendgewicht [kg]	788	787	800	12,7	0,752
Schlachthofgewicht [kg]	761	759	772	12,2	0,032

Anmerkung: SEM = standard error of means, Gewichte pro kg; Daten wurden von der LfL erhoben  
<sup>a, b, ...</sup> Mittelwerte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben sind signifikant unterschiedlich  
 p<0,05

### *Untersuchung der biochemischen Endpunkten sowie Analysen mittels qPCR*

Neben dem Einfluss von strukturwirksamer Faser auf die ruminale Mikroflora sollte der Einfluss auf die biochemischen Endpunkte der Fermentation untersucht werden. Hierbei zeigte sich für den pH-Wert ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Behandlungsgruppen (p=0,04; SEM= 0,03). Die Tiere mit einem SW von 0,6 wiesen mit 7,15 den höchsten pH-Wert auf, die Gruppen mit einem SW von 1,2 und 1,1 lagen auf demselben Niveau (SW 1,2: 7,04; SW 1,1: 7,06). Daneben zeigte sich bei den flüchtigen Fettsäuren ein konträres Bild, da die Tiere mit einem SW von 1,2 die höchsten Gehalte an flüchtigen Fettsäuren besaßen. Die Menge an gemessenen Fettsäuren nahm, wie in Tab. 13 zu erkennen ist, tendenziell mit verringertem SW ab. Statistisch konnte hierfür keine Signifikanz aufgezeigt werden, jedoch zeigte sich für die Summe der flüchtigen Fettsäuren (p=0,07) und für Essigsäure (p= 0,06) ein starker Trend. Keine signifikanten Unterschiede konnten für Ammoniak, Acetat-Propionat-Ratio und Trockenmassegehalt von Pansensaft und Pansenmatte aufgezeigt werden (Tab. 12).

Tabelle 12: Einfluss von strukturwirksamer Faser auf Trockenmasse, pH, flüchtige Fettsäuren und Ammoniak Konzentration im Pansensaft

	Strukturversorgung			SEM	p-wert
	Kontrolle (SW 1,2)	SW 1,1	SW 0,6		
Trockenmasse [g/L]	37,38	36,83	36,47	1,76	0,85
pH	7,04	7,06	7,15	0,03	0,04
Ammoniak [mg/L]	161,35	147,24	160,51	5,86	0,14
Summe VFA [mmol/L]	54,91	50,80	45,29	3,28	0,07
Essigsäure [mmol/L]	38,35	35,56	31,28	2,36	0,06
Propionsäure [mmol/L]	8,08	7,50	6,51	0,60	0,11
Buttersäure[mmol/L]	4,58	4,05	3,77	0,29	0,12
Acetat-Propionat-Ratio	4,91	4,90	4,90	0,10	0,98

Anmerkung: SEM = standard error of means, alle Konzentrationen pro L Pansensaft  
<sup>a, b, ...</sup> Mittelwerte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben sind signifikant unterschiedlich p<0,05  
 Daten publiziert in Etle et al. 2014.

Um den Einfluss unterschiedlicher Strukturwerte auf die ruminale Mikroflora zu untersuchen und Verbunden damit, einen Ursprungsort der Mikroorganismen im Pansen zu identifizieren, wurden neben dem Pansensaft ebenfalls Pansenmatte und Pansenepithel untersucht.

Tabelle 13: Einfluss des Strukturwertes (SW) auf die ruminale Mikroflora des Pansensaftes ( $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ )

	Strukturversorgung			SEM	p-Wert
	Kontrolle (SW1,2)	SW 1,1	SW 0,6		
Gesamtheit Bakterien [ $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ]	8,68	8,79	8,81	0,04	0,393
<i>Fibrobacter succinogenes</i> [ $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ]	9,21	9,40	9,24	0,05	0,332
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> [ $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ]	7,87 <sup>b</sup>	8,03 <sup>a</sup>	8,86 <sup>a</sup>	0,03	0,026
Anaerobe Pilze [ $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ]	8,67	8,82	8,60	0,04	0,174
$\alpha$ -Proteobakterien [ $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ]	9,39	9,43	9,59	0,05	0,222
<i>Archaea</i> [ $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ]	8,83	8,92	8,82	0,06	0,776
Protozoen [ $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ]	8,79	9,04	8,85	0,05	0,161
Gesamtheit Bakterien [%]	100,00	112,35	129,84	8,74	0,374
<i>Fibrobacter succinogenes</i> [%]	100,00	161,03	115,20	8,07	0,058
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> [%]	100,00 <sup>b</sup>	151,12 <sup>a</sup>	166,56 <sup>a</sup>	12,11	0,024
Anaerobe Pilze [%]	100,00	122,91	87,94	10,38	0,235
$\alpha$ -Proteobakterien [%]	100,00	106,40	131,03	11,20	0,428
<i>Archaea</i> [%]	100,00	129,18	103,65	10,10	0,573
Protozoen [%]	100,00	132,70	88,28	10,23	0,264

Anmerkung: SEM = standard error of means; Kopienzahl pro g Pansensaft; Relationen auf die Kontrollgruppe in Prozent  
<sup>a, b, ...</sup> Mittelwerte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben sind signifikant unterschiedlich  $p < 0,05$

Bei der Untersuchung des Pansensaftes ergab sich für *Ruminococcus flavefaciens* ein signifikanter Behandlungseffekt ( $p=0,026$ ; SEM= 0,03; Tab. 13). Mit geringerem Strukturwert nahm die Gesamtheit der Bakterien im Pansen von 8,68 über 8,79 auf 8,81 log<sub>10</sub> Kopien/g TM Pansensaft zu, dieser Effekt war jedoch statistisch nicht signifikant ( $p=0,393$ ). Bei der Untersuchung von Protozoen, anaeroben Pilzen, *Fibrobacter succinogenes* sowie *Archaea* wies die Gruppe mit einem SW von 1,1 die größte Dichte an diesen Mikroorganismen auf (Tab. 13). Bei der Quantifizierung der  $\alpha$ -Proteobakterien wies die Behandlung mit einem SW von 0,6 die meiste log<sub>10</sub> Kopienzahl/ g TM Pansensaft auf (Tab. 13).

Zum weiteren Verständnis der Mikroorganismen im Pansensaft wurden neben den quantifizierten Vertretern Ratios in Bezug auf die Gesamtheit aller Bakterien (16S RNA) berechnet. Wie in Tabelle 14 zu sehen, ergaben sich hierbei signifikanten Unterschiede zwischen für Protozoen und Anaerobe Pilze (Protozoen:  $p=0,023$ ; SEM= 12,81; Pilze:  $p= 0,008$ ; SEM= 6,44; Tab. 14). Bei den anderen Bakteriengruppen konnte kein signifikanter Einfluss des Strukturwertes auf die Verhältnisse der Mikroorganismen in Bezug auf die Summe aller Bakterien im Pansensaft aufgezeigt werden.

Die Betrachtung der Ratios in Bezug auf die Gesamtheit der Bakterien zeigten häufig Werte über 100%. Da dies auf eine Unterschätzung bzw. Überschätzung mancher funktioneller Hauptgruppen hindeutet, wurden Relationen der Behandlungsgruppen (SW 1,1 und SW 0,6) auf die Kontrollgruppe mit einem SW von 1,2 errechnet (Tab. 13). Hierbei zeigte sich bei der Betrachtung aller funktionellen Hauptgruppen eine numerisch erhöhte Anzahl an Kopienzahl pro Gramm Pansensaft bei der Versuchsgruppe mit einem SW von 1,1 in Relation auf die Kontrollgruppe (SW 1,2). Bei der Relation der Gruppe mit einem SW von 0,6 auf die Kontrollgruppe zeigte sich diese numerische Erhöhung für alle funktionellen Hauptgruppen bis auf die anaeroben Pilze und die Hauptgruppe der Protozoen. Bei diesen beiden Hauptgruppen lagen die Tiere aus der Gruppe mit dem niedrigsten Strukturanteil unter der Kontrollgruppe. Signifikante Unterschiede zwischen Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe konnten bei der Untersuchung des Pansensaftes *Ruminococcus*

*flavefaciens* gezeigt werden (SW 1,1: 151,12%, SW 0,6: 166,56%;  $p=0,024$ ; Tab. 13). Für *Fibrobacter succinogenes* zeigte sich ein Trend (SW 1,1: 161,03%, SW 0,6: 115,12%;  $p=0,058$ ; Tab. 13).

Bei der Betrachtung der Relationen der Ratios auf die Kontrollgruppe zeigten sich im Pansensaft für die Ratios der anaeroben Pilze sowie die Ratios der Protozoen signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Tab. 14). Bei den anaeroben Pilzen zeigte sich eine Erhöhung der Pilze in der Gruppe mit einem Strukturwert von 1,1 in Bezug auf die Kontrollgruppe und bei der Gruppe mit dem niedrigsten Strukturwert ein Abfall der Kopienzahl in Bezug auf die Kontrollgruppe (SW 1,1: 115,20%, SW 0,6: 63,52%;  $p=0,008$ ; Tab. 14). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den Ratios der Protozoen, allerdings lag hier die Gruppe mit dem niedrigsten Strukturwert ebenfalls über der Kontrollgruppe (SW 1,1: 180,36%, SW 0,6: 116,83%;  $p=0,023$ ; Tab. 14).

Tabelle 14: Einfluss des Strukturwertes (SW) auf die Verhältnisse der funktionellen Hauptgruppen in Bezug auf die Gesamtheit der Bakterien (%) im Pansensaft

	Strukturversorgung			SEM	p-Wert
	SW 1,2	SW 1,1	SW 0,6		
Verhältnis <i>Fibrobacter succinogenes</i> [%]	304,64	487,72	373,84	30,57	0,085
Verhältnis <i>Ruminococcus flavefaciens</i> [%]	18,80	21,28	19,04	1,14	0,836
Verhältnis anaerobe Pilze [%]	103,42 <sup>a</sup>	119,14 <sup>a</sup>	65,70 <sup>b</sup>	6,44	0,008
Verhältnis $\alpha$ -Proteobakterien [%]	472,82	486,88	570,19	24,94	0,291
Verhältnis <i>Archaea</i> [%]	145,50	165,38	106,01	11,97	0,162
Verhältnis Protozoen [%]	113,75 <sup>b</sup>	205,16 <sup>a</sup>	132,90 <sup>b</sup>	12,81	0,023
Ratio <i>Fibrobacter succinogenes</i> [%]	100,00	160,10	122,72	6,28	0,085
Ratio <i>Ruminococcus flavefaciens</i> [%]	100,00	113,17	101,27	8,29	0,836
Ratio anaerobe Pilze [%]	100,00 <sup>a</sup>	115,20 <sup>a</sup>	63,52 <sup>b</sup>	10,11	0,008
Ratio $\alpha$ -Proteobakterien [%]	100,00	102,97	120,58	11,35	0,291
Ratio <i>Archaea</i> [%]	100,00	113,67	72,86	9,33	0,162
Ratio Protozoen [%]	100,00 <sup>b</sup>	180,36 <sup>a</sup>	116,83 <sup>b</sup>	5,32	0,023

Anmerkung: SEM = standard error of means;

Verhältnis (%) = funktionelle Hauptgruppe in Bezug auf Gesamtheit der Bakterien

Ratio (%) = Relation Behandlung auf die Kontrollgruppe

<sup>a, b, ...</sup> Mittelwerte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben sind signifikant

unterschiedlich  $p < 0,05$

Bei der Untersuchung der Mikroflora in der Pansenmatte zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Alle drei Versuchsgruppen lagen bei allen Messparametern auf einem ähnlichen Niveau (Tab. 15). Nur für *Ruminococcus flavefaciens* konnte ein leichter Trend ( $p = 0,095$ ) aufgezeigt werden. Die Behandlungsgruppe mit einem SW von 0,6 wies hierbei die höchste Konzentration mit 8,27 log<sub>10</sub> Kopienzahl/ g Pansenmatte auf.

Auch für die Pansenmatte wurden zum weiteren Verständnis Ratios der quantifizierten Mikroorganismen in Bezug auf die Summe aller Bakterien (16S rRNA) errechnet. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gehalten an strukturwirksamer Rohfaser zeigte sich für die Ratio von *Ruminococcus flavefaciens* in Bezug auf die Summe aller Bakterien (16S rRNA). Die Ratio der Gruppe mit der niedrigsten Strukturzulage zeigte die höchste Signifikanz (3,00%,  $p < 0,001$ ; Tab. 16). Die Gruppe mit einem Strukturwert von 1,1 wies einen Gehalt von 2,09%, die Tiere mit dem höchsten SW den niedrigsten Gehalt (1,08%) an *Rumiococcus flavefaciens* auf.

Da sich ebenfalls bei der Berechnung der Ratios der funktionellen Hauptgruppen in Bezug auf die Gesamtheit der Bakterien in der Pansenmatte Werte über 100% ergaben, wurden zusätzlich Relationen der Behandlungsgruppen zur Kontrollgruppe berechnet. Hierbei zeigte sich für die funktionelle Hauptgruppe der  $\alpha$ -*Proteobacteria* ein signifikanter Unterschied zwischen den Strukturwerten. Beide Behandlungsgruppen lagen hierbei signifikant über den Gehalten der Kontrollgruppe (SW 1,1: 141,80%, SW 0,6: 148,96;  $p = 0,019$ ; Tab.15). Bei der Betrachtung der *Archaea* zeigte sich ein Trend zwischen den Behandlungsgruppen. Die Gruppe mit einem SW von 1,1 lag dabei auf dem Niveau der Kontrollgruppe, die Gruppe mit dem niedrigsten SW lag signifikant über der Kontrollgruppe (SW 1,1: 108,32%, SW 0,6: 144,95%;  $p = 0,079$ ; Tab. 15). Die Relationen der Ratios zur Kontrollgruppe zeigten hingegen keine signifikanten Unterschiede. Ein numerischer Trend zeigte sich lediglich bei den Ratios der *Archaea*. Hierbei lag die Ratio der Tiere mit einem SW von 1,1 auf dem niedrigsten Niveau, die Tiere mit dem niedrigsten Strukturwert wiesen hingegen den höchsten Gehalt an *Archaea* zur Kontrollgruppe auf (SW 1,1: 78,74%; SW 0,6: 113,82%;  $p = 0,084$ ; Tab. 16).

Tabelle 15: Einfluss des Strukturwertes (SW) auf die ruminale Mikroflora der Pansenmatte (log<sub>10</sub>(Kopienzahl)/g TM)

	Strukturversorgung			SEM	p-Wert
	Kontrolle (SW 1,2)	SW 1,1	SW 0,6		
Gesamtheit Bakterien [log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g Pansenmatte]	10,33	10,35	10,37	0,03	0,904
<i>Fibrobacter succinogenes</i> [log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g Pansenmatte]	10,83	10,77	10,80	0,03	0,878
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> [log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g Pansenmatte]	8,13	8,08	8,27	0,02	0,095
Anaerobe Pilze [log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g Pansenmatte]	9,10	9,20	9,21	0,04	0,645
α-Proteobakterien [log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g Pansenmatte]	10,17	10,28	10,32	0,02	0,206
<i>Archaea</i> [log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g Pansenmatte]	8,62	8,63	8,81	0,03	0,170
Protozoen [log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g Pansenmatte]	9,00	8,92	8,75	0,05	0,406
Gesamtheit Bakterien [%]	100,00	114,28	109,15	6,60	0,694
<i>Fibrobacter succinogenes</i> [%]	100,00	88,76	81,46	8,36	0,469
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> [%]	100,00	111,69	118,00	8,29	0,539
Anaerobe Pilze [%]	100,00	138,16	122,78	5,85	0,217
α-Proteobakterien [%]	100,00 <sup>b</sup>	141,80 <sup>a</sup>	148,96 <sup>a</sup>	8,83	0,019
<i>Archaea</i> [%]	100,00	108,32	144,95	6,38	0,079
Protozoen [%]	100,00	105,44	80,53	6,97	0,504

Anmerkung: SEM = standard error of means; Kopienzahl pro g Pansenmatte; Relationen auf die Kontrollgruppe in Prozent

<sup>a, b, ...</sup> Mittelwerte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben sind signifikant unterschiedlich p<0,05

Tabelle 16: Einfluss des Strukturwertes (SW) auf die Verhältnisse der funktionellen Hauptgruppen in Bezug auf die Gesamtheit der Bakterien (%) in der Pansenmatte

	Strukturversorgung			SEM	p-Wert
	Kontrolle (SW 1,2)	SW 1,1	SW 0,6		
Verhältnis <i>Fibrobacter succinogenes</i> [%]	5,27	4,24	3,68	0,33	0,432
Verhältnis <i>Ruminococcus flavefaciens</i> [%]	1,08	2,09	3,00	0,03	<0,001
Verhältnis anaerobe Pilze [%]	2,41	1,94	3,07	0,19	0,270
Verhältnis $\alpha$ -Proteobakterien [%]	84,67	101,37	98,89	7,34	0,648
Verhältnis <i>Archaea</i> [%]	340,71	325,05	343,05	23,86	0,973
Verhältnis Protozoen [%]	0,74	0,72	0,86	0,06	0,785
Ratio <i>Fibrobacter succinogenes</i> [%]	100,00	76,62	75,82	7,51	0,168
Ratio <i>Ruminococcus flavefaciens</i> [%]	100,00	84,04	99,45	6,26	0,560
Ratio anaerobe Pilze [%]	100,00	107,17	108,34	5,52	0,901
Ratio $\alpha$ -Proteobakterien [%]	100,00	119,71	116,80	7,28	0,6479
Ratio <i>Archaea</i> [%]	100,00	78,74	113,82	6,64	0,084
Ratio Protozoen [%]	100,00	72,44	73,33	9,47	0,274

Anmerkung: SEM = standard error of means;

Verhältnis (%) = funktionelle Hauptgruppe in Bezug auf Gesamtheit der Bakterien

Ratio (%) = Relation Behandlung auf die Kontrollgruppe

<sup>a, b, ...</sup> Mittelwerte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben sind signifikant unterschiedlich  $p < 0,05$

Weiterhin sollte in dieser Studie der Effekt unterschiedlicher Strukturwerte auf die Mikroflora am Pansenepithel untersucht werden. Hierzu wurden Proben des dorsalen Pansens untersucht (siehe Abbildung 1), welcher die strukturell längsten Zotten enthält. Die Analyse des Pansenepithels ergab jedoch keinen signifikanten Einfluss des SWs auf die mikrobielle DNA sowie die errechneten Ratios der Mikroorganismen. Bei allen untersuchten Messparametern zeigten

die drei Behandlungsgruppen ein konstantes Niveau (Tab. 17, Tab. 18). Auch die Betrachtung der Relationen zur Kontrollgruppe zeigte bei den funktionellen Hauptgruppen sowie der Ratios keinen signifikanten Unterschied zwischen den Strukturwerten. Die Gehalte der beiden Behandlungsgruppen lagen entweder auf dem Niveau der Kontrollgruppe oder unter der Kontrollgruppe (Tab. 17, Tab. 18).

Tabelle 17: Einfluss des Strukturwertes (SW) auf die ruminale Mikroflora des Pansenepithels (log<sub>10</sub>(Kopienzahl)/g TM)

	Strukturversorgung			SEM	p-Wert
	Kontrolle (SW 1,2)	SW 1,1	SW 0,6		
Gesamtheit Bakterien [log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g Pansenepithel]	8,74	8,65	8,57	0,04	0,170
Anaerobe Pilze [log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g Pansenepithel]	7,96	7,91	7,85	0,03	0,542
α-Proteobakterien [log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g Pansenepithel]	8,99	9,00	8,95	0,01	0,242
Archaea [log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g Pansenepithel]	7,26	7,25	7,18	0,04	0,704
Protozoen [log <sub>10</sub> (Kopienzahl)/g Pansenepithel]	6,70	6,65	6,70	0,02	0,657
Gesamtheit Bakterien [%]	100,00	80,52	71,63	6,27	0,180
Anaerobe Pilze [%]	100,00	98,41	80,30	6,80	0,423
α-Proteobakterien [%]	100,00	102,93	92,47	9,61	0,370
<i>Archaea</i> [%]	100,00	97,93	111,34	5,00	0,831
Protozoen [%]	100,00	91,02	97,96	3,05	0,748

Anmerkung: SEM = standard error of means; alle Kopien pro g Pansenepithel; Relationen auf die Kontrollgruppe in Prozent  
<sup>a, b, ...</sup> Mittelwerte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben sind signifikant unterschiedlich p<0,05

Tabelle 18: Einfluss des Strukturwertes (SW) auf die Verhältnisse der funktionellen Hauptgruppen in Bezug auf die Gesamtheit der Bakterien (%) am Pansenepithel

	Strukturversorgung			SEM	p-Wert
	Kontrolle (SW 1,2)	SW 1,1	SW 0,6		
Verhältnis anaerobe Pilze [%]	19,53	21,94	17,84	1,62	0,624
Verhältnis $\alpha$ -Proteobakterien [%]	204,12	251,27	243,09	15,02	0,402
Verhältnis <i>Archaea</i> [%]	4,10	4,69	4,95	0,32	0,566
Verhältnis Protozoen [%]	1,12	1,17	1,42	0,09	0,403
Ratio anaerobe Pilze [%]	100,00	112,32	91,34	8,34	0,624
Ratio $\alpha$ -Proteobakterien [%]	100,00	123,10	119,09	7,89	0,402
Ratio <i>Archaea</i> [%]	100,00	114,44	120,58	8,16	0,565
Ratio Protozoen [%]	100,00	104,07	126,68	7,42	0,403

Anmerkung: SEM = standard error of means; Ratios in Prozent (%)  
 Verhältnis (%) = funktionelle Hauptgruppe in Bezug auf Gesamtheit der Bakterien  
 Ratio (%) = Relation Behandlung auf die Kontrollgruppe  
<sup>a, b, ...</sup> Mittelwerte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben sind signifikant unterschiedlich  $p < 0,05$

Ein weiterer Teilaspekt der Studie war, ob es einen Ursprungsort der Mikroflora im Pansen gibt und ob dieser unabhängig von der Ration konstant bleibt und somit ein "Kern-Mikrobiom" darstellen kann. Zur Klärung dieser Frage wurde im vorliegenden Versuch verglichen, ob sich die Kopienzahl des Pansensaftes, der Pansenmatte und des Pansenepithels unterscheidet (Tab. 19). Damit konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an Kopien (log<sub>10</sub> Kopien je Gramm Pansenmatte) signifikant bei allen untersuchten funktionellen Hauptgruppen bis auf *Archaea* am höchsten war. Die geringste Kopienzahl konnten am Epithel detektiert werden. Darüber hinaus konnten am Epithel keine faserabbauenden Mikroorganismen quantifiziert werden.

Tabelle 19: Unterschiede zwischen Pansensaft, Pansenmatte und Pansenepithel in der ruminalen Mikroflora ( $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ )

	Pansengewebe			SEM	p-Wert
	PS	PM	Epithel		
Gesamtheit Bakterien [ $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ]	8,76 <sup>b</sup>	10,36 <sup>a</sup>	8,64 <sup>c</sup>	0,02	<0,001
Anaerobe Pilze [ $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ]	8,70 <sup>b</sup>	9,18 <sup>a</sup>	7,92 <sup>c</sup>	0,02	<0,001
$\alpha$ -Proteobakterien [ $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ]	9,48 <sup>b</sup>	10,26 <sup>a</sup>	8,68 <sup>c</sup>	0,02	<0,001
<i>Archaea</i> [ $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ]	8,86 <sup>a</sup>	8,74 <sup>a</sup>	7,17 <sup>b</sup>	0,03	<0,001
Protozoen [ $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ]	8,90 <sup>a</sup>	8,94 <sup>a</sup>	6,68 <sup>b</sup>	0,02	<0,001

Anmerkung: SEM = standard error of means; Kopienzahlen pro g TM

<sup>a, b, ...</sup> Mittelwerte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben sind signifikant unterschiedlich  $p < 0,05$

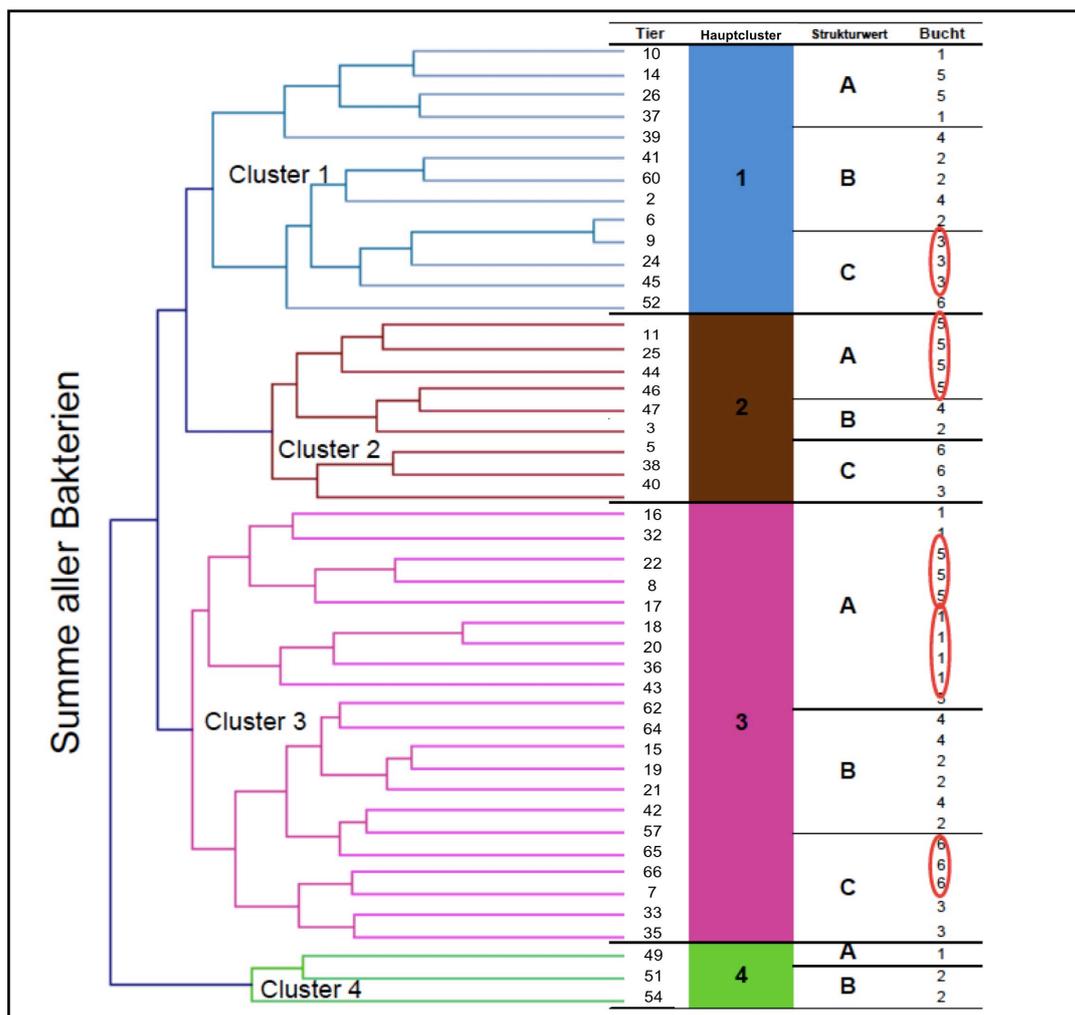
PS = Pansensaft; PM = Pansenmatte; Epithel = Pansenepithel

### *Untersuchung mittels Clusteranalyse*

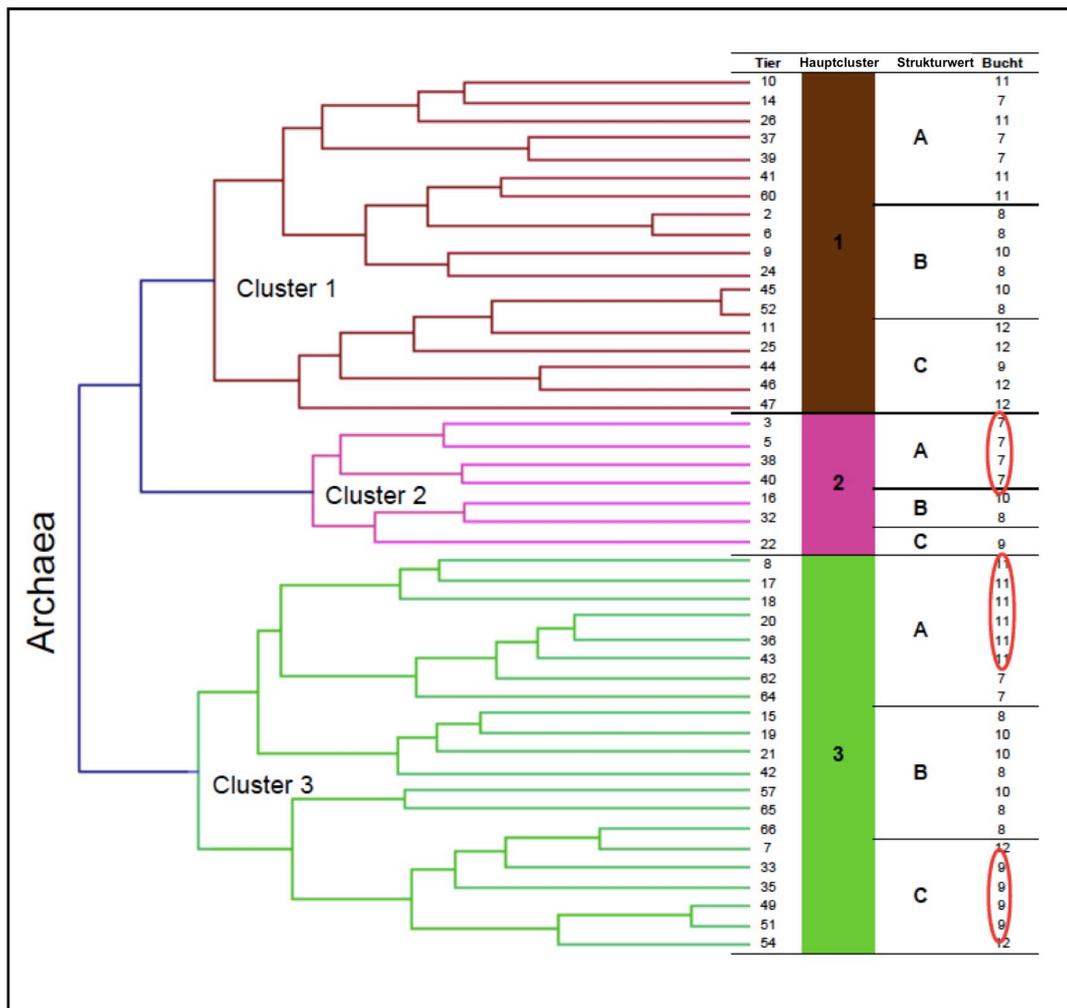
Neben der Untersuchung eines möglichen Behandlungseffekts durch Fütterung strukturwirksamer Faser mittels quantitativer PCR sollten durch eine Clusteranalyse der Daten zusätzliche Informationen gewonnen werden. Hierzu wurden alle Tiere hypothesenfrei mittels eines hierarchischen Clusters näher betrachtet, um auch auf dieser Ebene einen Effekt der strukturwirksamen Faser zu untersuchen. Es wurde für alle untersuchten Mikroorganismen (Kopienzahl pro Gramm Trockenmasse) im Panseninhalt bestehend aus Pansensaft und Pansenmatte sowie für das Pansenepithel jeweils eine getrennte Clusteranalyse durchgeführt.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass bei allen untersuchten Vertretern der Mikroflora keine komplette Auftrennung der drei Behandlungsgruppen deutlich wird. Erstaunlicherweise zeigten sich dabei jedoch Untercluster, die Tiere mit der gleichen Behandlung beinhalteten. Bei einer tieferen Analyse zeigte sich auch, dass diese Tiere mit derselben Behandlung auch in der gleichen Bucht aufgestellt waren (Abb. 12-23). Die nachfolgenden Abbildungen verdeutlichen dies mittels eines graphisch dargestellten, hierarchischen Clusters sowie einer Tabelle mit den jeweiligen Versuchstieren. Ebenso konnte gezeigt werden, dass

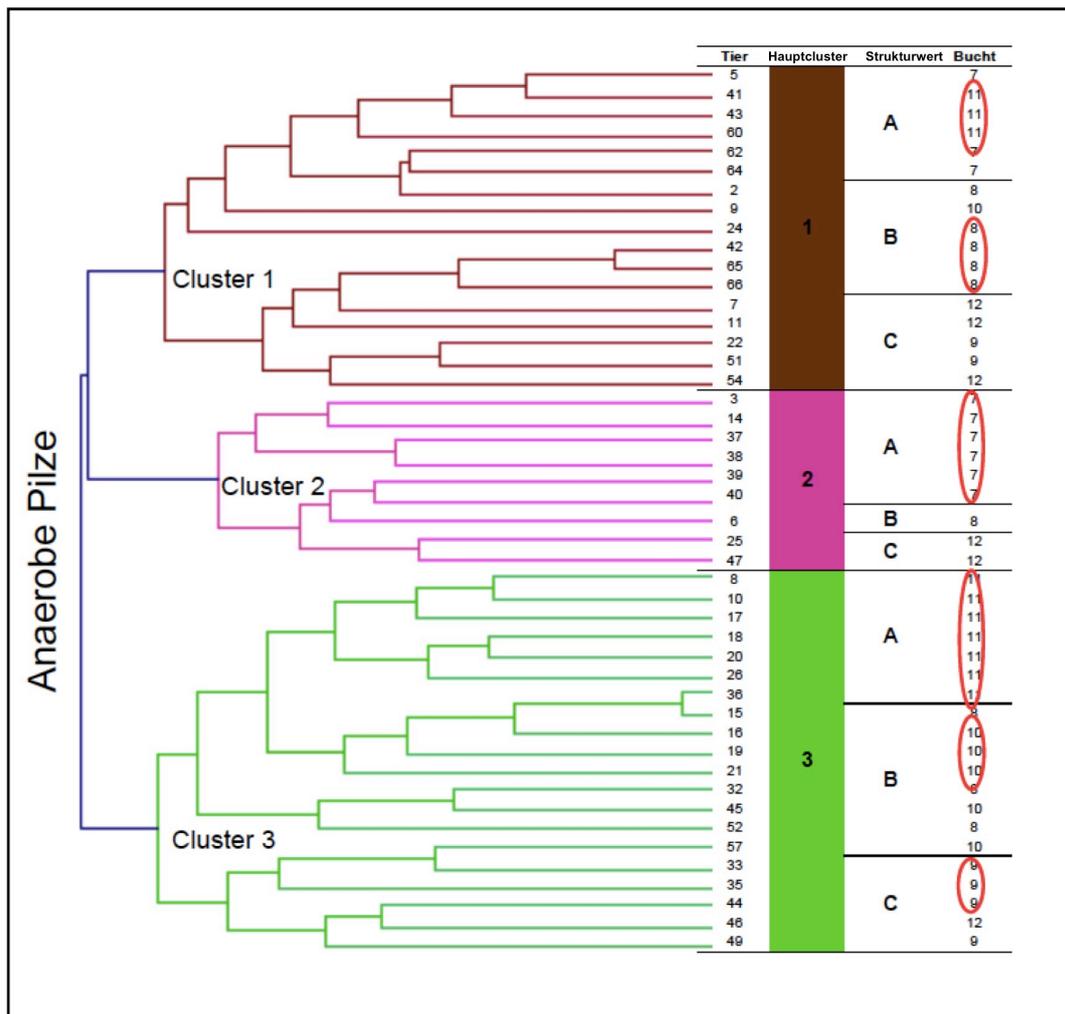
bei der Untersuchung des Panseninhaltes die Distanzen innerhalb der Cluster kleiner sind (Summe der Bakterien 18%; *Archaea* 28%; anaerobe Pilze 36%; Protozoen 39%;  $\alpha$ -*Proteobacteria* 37%), als die Distanzen zwischen den Hauptclustern (Summe der Bakterien 82%; *Archaea* 72%; anaerobe Pilze 64%; Protozoen 61%;  $\alpha$ -*Proteobacteria* 63%). Folglich lässt sich aufzeigen, dass die Homogenität innerhalb der Cluster sehr hoch ist. Bei den cellulolytischen Bakterien zeigte sich jedoch kein Unterschied bei den Inter- und Intra-Distanzen der Cluster (Inter: *Fibrobacter succinogenes* 42%; *Ruminococcus flavefaciens* 41%; Intra: *Fibrobacter succinogenes* 58%; *Ruminococcus flavefaciens* 59%). Bei der Untersuchung der Clusteranalyse des Behandlungseffektes am Pansenepithel zeigten sich deutliche Unterschiede in den Distanzen innerhalb eines Clusters (Summe der Bakterien 33%; *Archaea* 28%; anaerobe Pilze 11%; Protozoen 21%;  $\alpha$ -*Proteobacteria* 19%), und zwischen den Hauptclustern (Summe der Bakterien 67%; *Archaea* 72%; anaerobe Pilze 89%; Protozoen 79%;  $\alpha$ -*Proteobacteria* 81%). Dieser Effekt konnte über alle messbaren Gruppen am Pansenepithel gezeigt werden. Jedoch war dieser Effekt bei der Untersuchung der anaeroben Pilze und der  $\alpha$ -*Proteobacteria* besonders deutlich sichtbar. Dies lässt eine ausgeprägte Homogenität innerhalb eines Clusters vermuten.



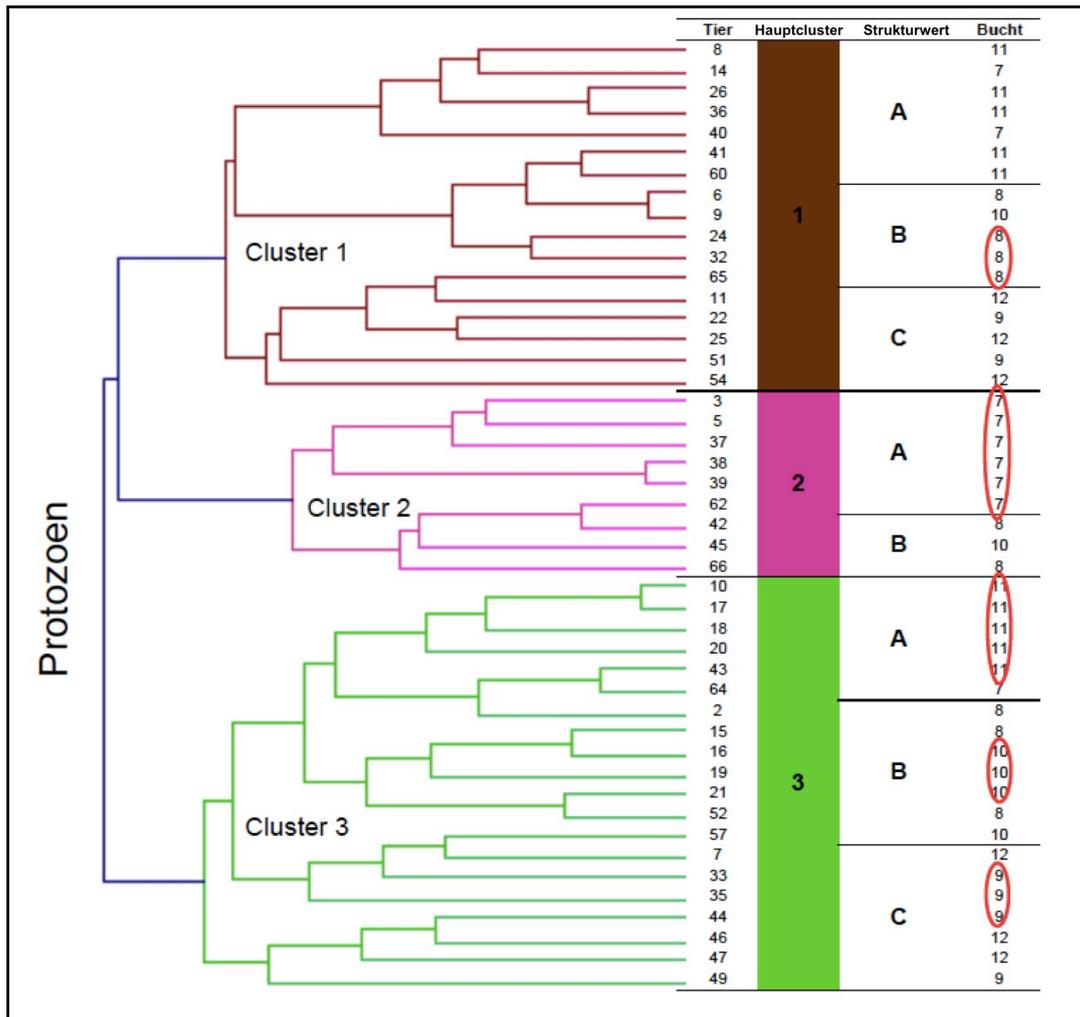
**Abb. 12: Hierarchische Clusteranalyse der Summe aller Bakterien ( $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ) im Panseninhalt (Saft und Matte) zur Untersuchung eines Fütterungseffektes.** Auf der rechten Seite der Abbildung sind die einzelnen Tiere pro Cluster aufgeführt mit dem jeweils zugehörigen Behandlung und Bucht. Tiere mit der gleichen Strukturversorgung (SW 1,2 = A, SW 1,1 = B, SW 0,6 = C) und derselben Bucht innerhalb eines Clusters wurden farblich markiert (Roter Kreis). Die hierbei bezeichnete Bucht spiegelt den abgetrennten Stallteil wider, in denen jeweils 6 Tiere während des Versuchs untergebracht waren. Auf der linken Seite der Abbildung ist ein agglomeratives, hierarchischen Cluster abgebildet. Die Distanz innerhalb des Clusters war mit 18% enger als die Distanz zwischen den Hauptclustern (82%).



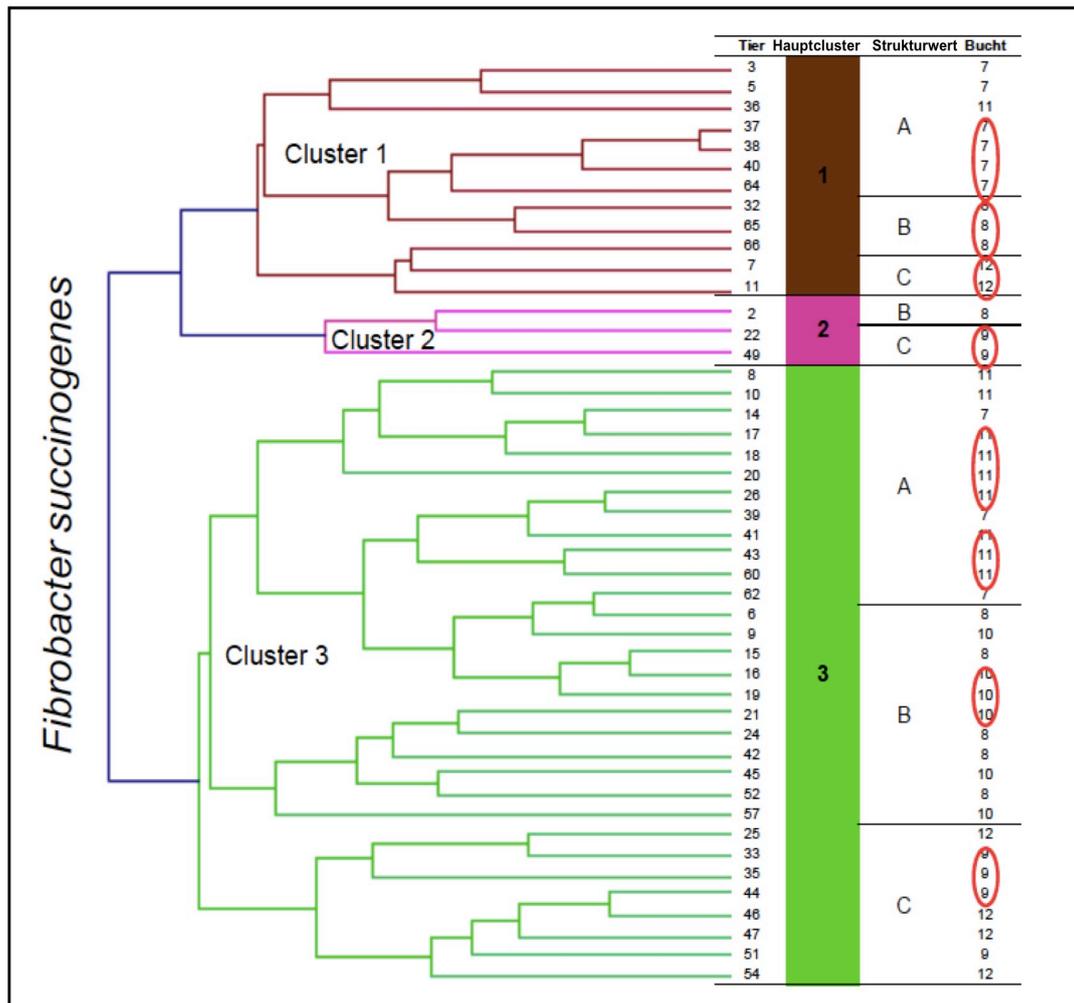
**Abb. 13: Hierarchische Clusteranalyse von Archaea (log<sub>10</sub>(Kopienzahl)/g TM) im Panseninhalt (Saft und Matte) zur Untersuchung eines Fütterungseffektes.** Auf der rechten Seite der Abbildung sind die einzelnen Tiere pro Cluster aufgeführt mit dem jeweils zugehörigen Behandlung und Bucht. Tiere mit der gleichen Strukturversorgung (SW 1,2 = A, SW 1,1 = B, SW 0,6 = C) und derselben Bucht innerhalb eines Clusters wurden farblich markiert (Roter Kreis). Die hierbei bezeichnete Bucht spiegelt den abgetrennten Stallteil wider, in denen jeweils 6 Tiere während des Versuchs untergebracht waren. Auf der linken Seite der Abbildung ist ein agglomeratives, hierarchischen Cluster abgebildet. Die Distanz innerhalb des Clusters war mit 28% enger als die Distanz zwischen den Hauptclustern (72%).



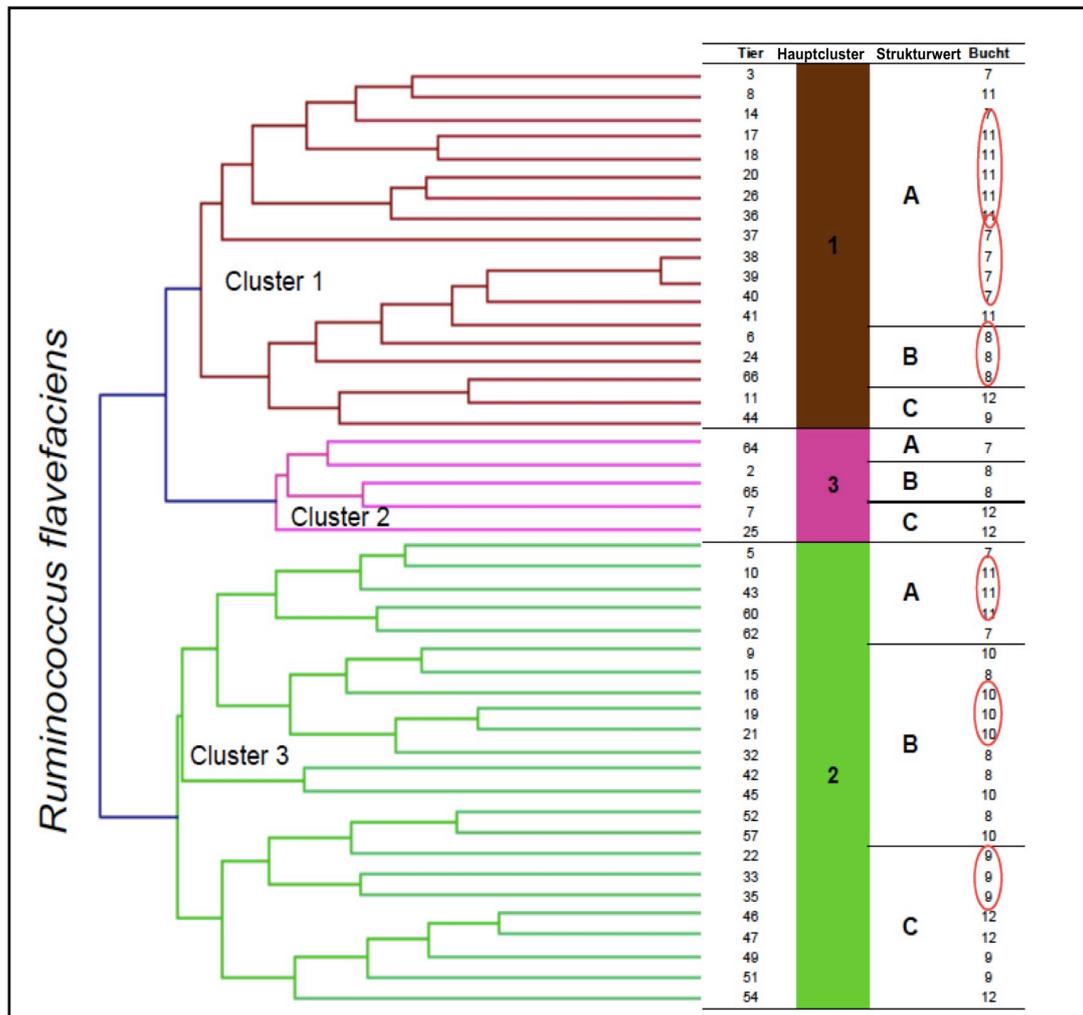
**Abb. 14: Hierarchische Clusteranalyse der Anaeroben Pilze ( $\log_{10}$ (Kopienzahl)/g TM) im Panseninhalt (Saft und Matte) zur Untersuchung eines Fütterungseffektes.** Auf der rechten Seite der Abbildung sind die einzelnen Tiere pro Cluster aufgeführt mit dem jeweils zugehörigen Behandlung und Bucht. Tiere mit der gleichen Strukturversorgung (SW 1,2 = A, SW 1,1 = B, SW 0,6 = C) und derselben Bucht innerhalb eines Clusters wurden farblich markiert (Roter Kreis). Auf der linken Seite der Abbildung ist ein agglomeratives, hierarchisches Cluster abgebildet. Die Distanz innerhalb des Clusters war mit 36% enger als die Distanz zwischen den Hauptclustern (64%).



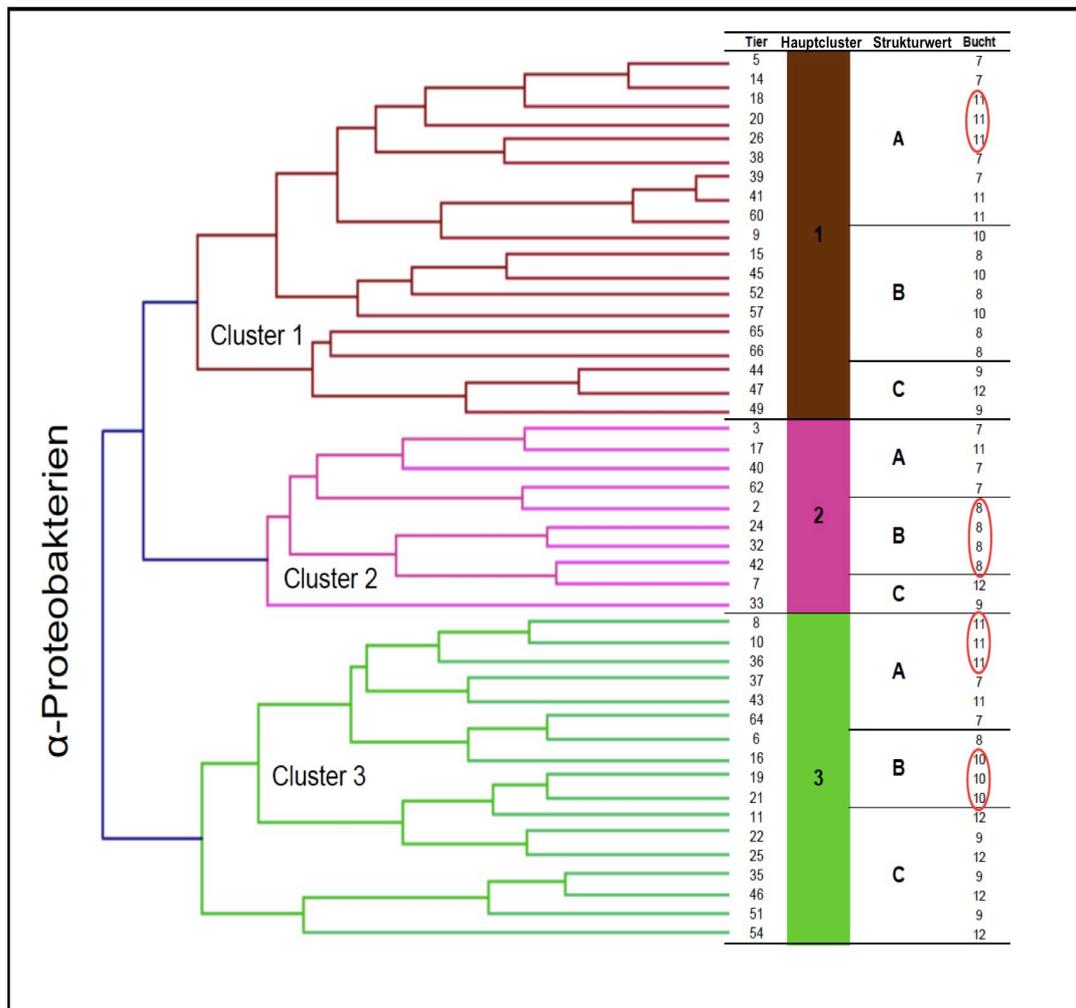
**Abb. 15: Hierarchische Clusteranalyse der Protozoen (log<sub>10</sub>(Kopienzahl)/g TM) im Panseninhalt (Saft und Matte) zur Untersuchung eines Fütterungseffektes.** Auf der rechten Seite der Abbildung sind die einzelnen Tiere pro Cluster aufgeführt mit dem jeweils zugehörigen Behandlung und Bucht. Tiere mit der gleichen Strukturversorgung (SW 1,2 = A, SW 1,1 = B, SW 0,6 = C) und derselben Bucht innerhalb eines Clusters wurden farblich markiert (Roter Kreis). Die hierbei bezeichnete Bucht spiegelt den abgetrennten Stallteil wider, in denen jeweils 6 Tiere während des Versuchs untergebracht waren. Auf der linken Seite der Abbildung ist ein agglomeratives, hierarchisches Cluster abgebildet. Die Distanz innerhalb des Clusters war mit 39% enger als die Distanz zwischen den Hauptclustern (61%).



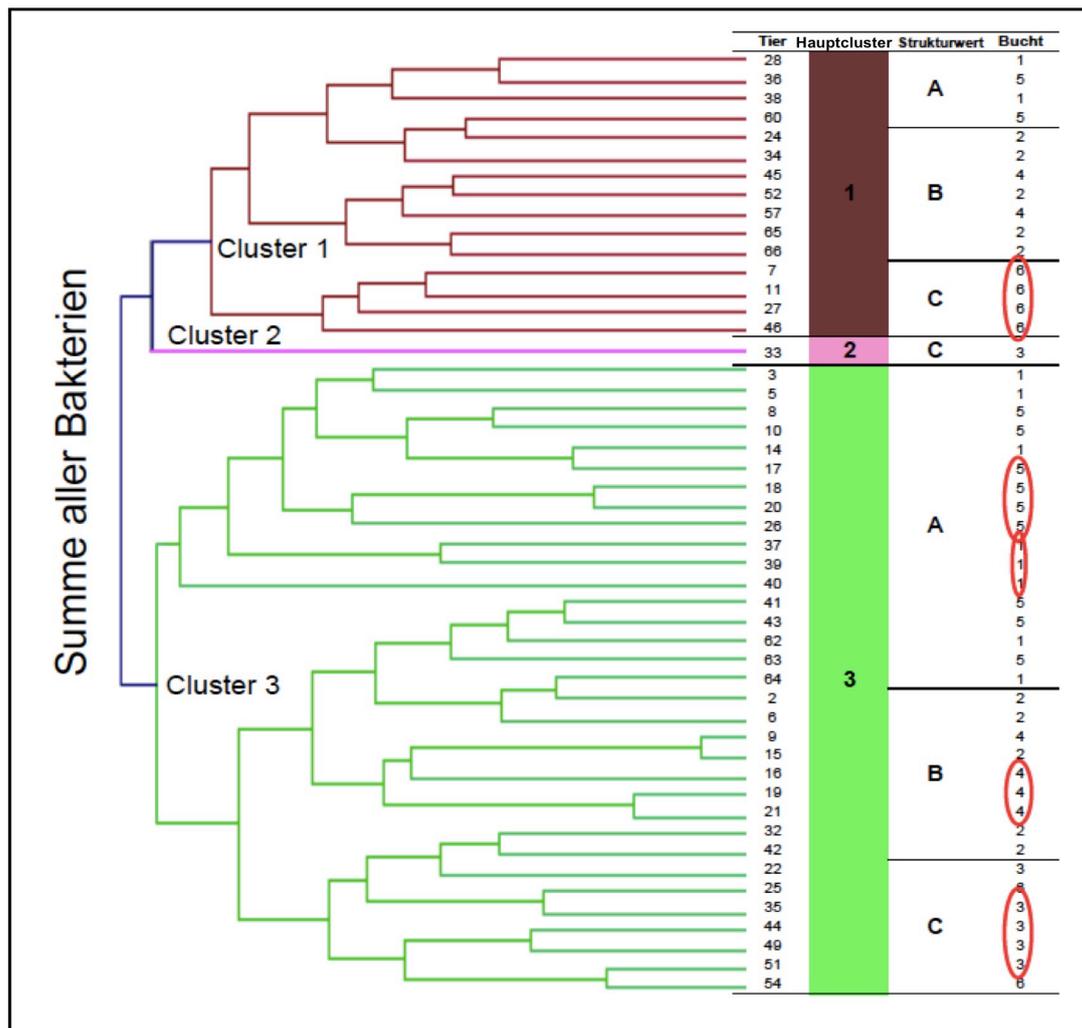
**Abb. 16: Hierarchische Clusteranalyse von *Fibrobacter succinogenes* ( $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ) im Panseninhalt (Saft und Matte) zur Untersuchung eines Fütterungseffektes.** Auf der rechten Seite der Abbildung sind die einzelnen Tiere pro Cluster aufgeführt mit dem jeweils zugehörigen Behandlung und Bucht. Tiere mit der gleichen Strukturversorgung (SW 1,2 = A, SW 1,1 = B, SW 0,6 = C) und derselben Bucht innerhalb eines Clusters wurden farblich markiert (Roter Kreis). Die hierbei bezeichnete Bucht spiegelt den abgetrennten Stallteil wider, in denen jeweils 6 Tiere während des Versuchs untergebracht waren. Auf der linken Seite der Abbildung ist ein agglomeratives, hierarchischen Cluster abgebildet. Die Distanz innerhalb des Clusters war mit 42% kaum enger als die Distanz zwischen den Hauptclustern (58%).



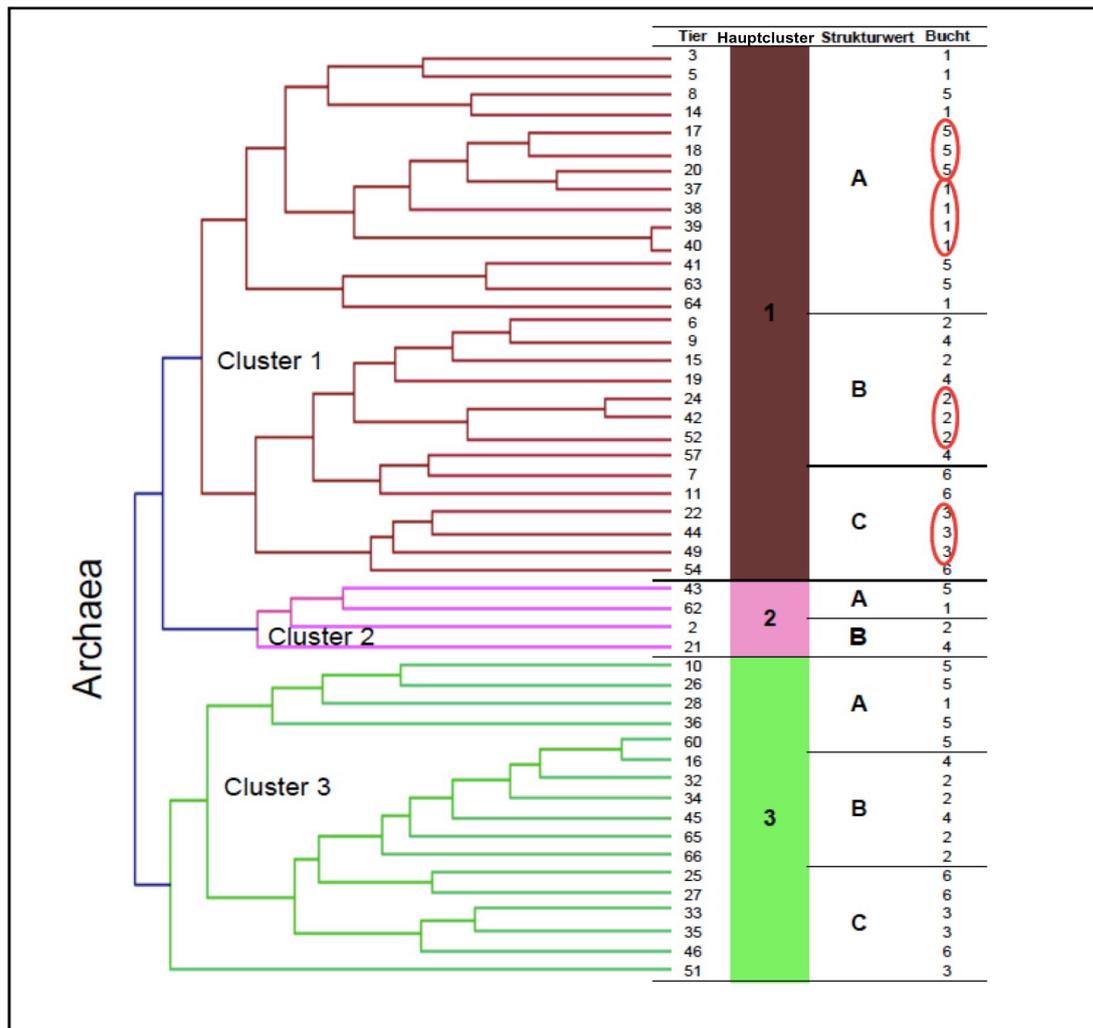
**Abb. 17: Hierarchische Clusteranalyse von *Ruminococcus flavefaciens* ( $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ) im Panseninhalt (Saft und Matte) zur Untersuchung eines Fütterungseffektes.** Auf der rechten Seite der Abbildung sind die einzelnen Tiere pro Cluster aufgeführt mit dem jeweils zugehörigen Behandlung und Bucht. Tiere mit der gleichen Strukturversorgung (SW 1,2 = A, SW 1,1 = B, SW 0,6 = C) und derselben Bucht innerhalb eines Clusters wurden farblich markiert (Roter Kreis). Die hierbei bezeichnete Bucht spiegelt den abgetrennten Stallteil wider, in denen jeweils 6 Tiere während des Versuchs untergebracht waren. Auf der linken Seite der Abbildung ist ein agglomeratives, hierarchischen Cluster abgebildet. Die Distanz innerhalb des Clusters war mit 41% kaum enger als die Distanz zwischen den Hauptclustern (59%).



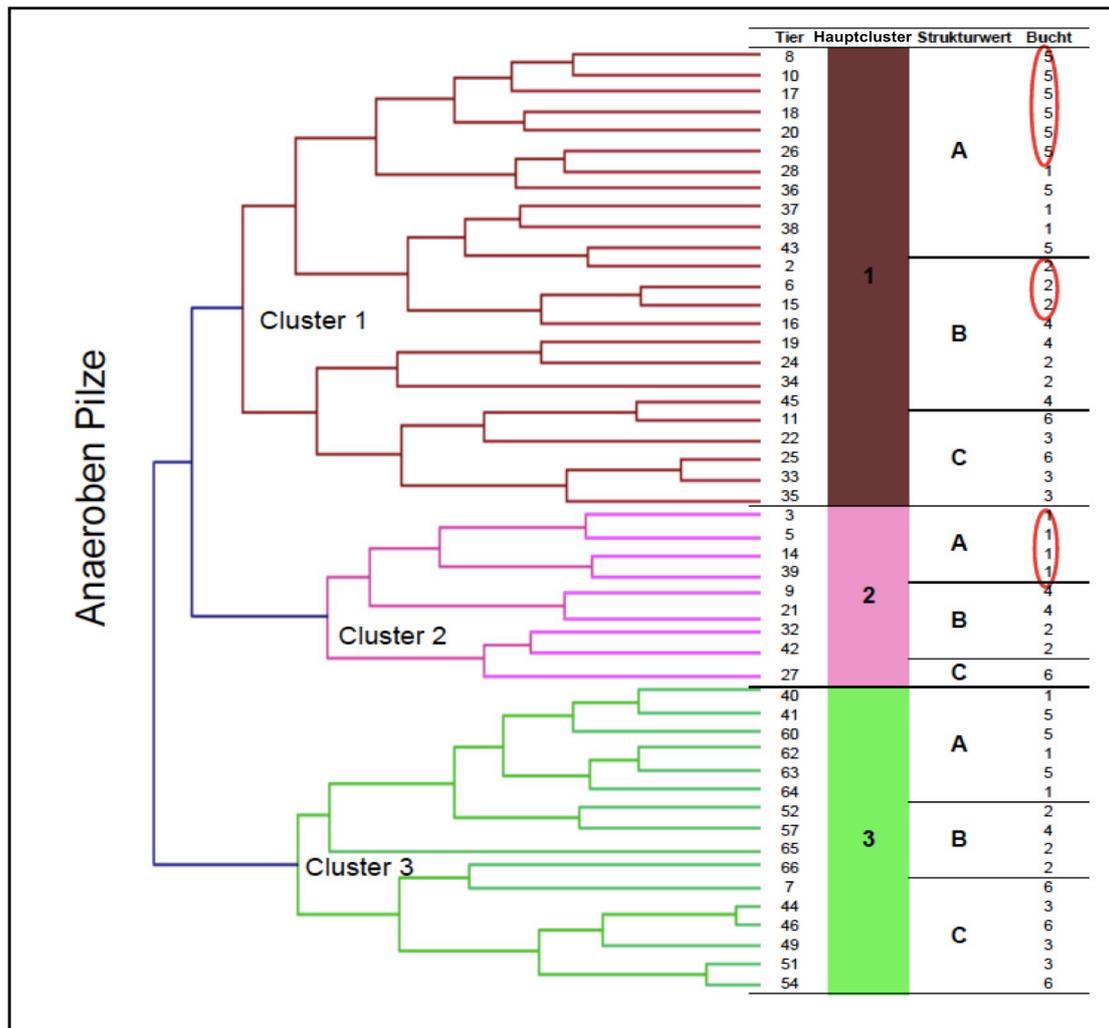
**Abb. 18: Hierarchische Clusteranalyse der  $\alpha$ -Proteobacteria ( $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ) im Panseninhalt (Saft und Matte) zur Untersuchung eines Fütterungseffektes.** Auf der rechten Seite der Abbildung sind die einzelnen Tiere pro Cluster aufgeführt mit dem jeweils zugehörigen Behandlung und Bucht. Tiere mit der gleichen Strukturversorgung (SW 1,2 = A, SW 1,1 = B, SW 0,6 = C) und derselben Bucht innerhalb eines Clusters wurden farblich markiert (Roter Kreis). Die hierbei bezeichnete Bucht spiegelt den abgetrennten Stallteil wider, in denen jeweils 6 Tiere während des Versuchs untergebracht waren. Auf der linken Seite der Abbildung ist ein agglomeratives, hierarchischen Cluster abgebildet. Die Distanz innerhalb des Clusters war mit 37% enger als die Distanz zwischen den Hauptclustern (63%).



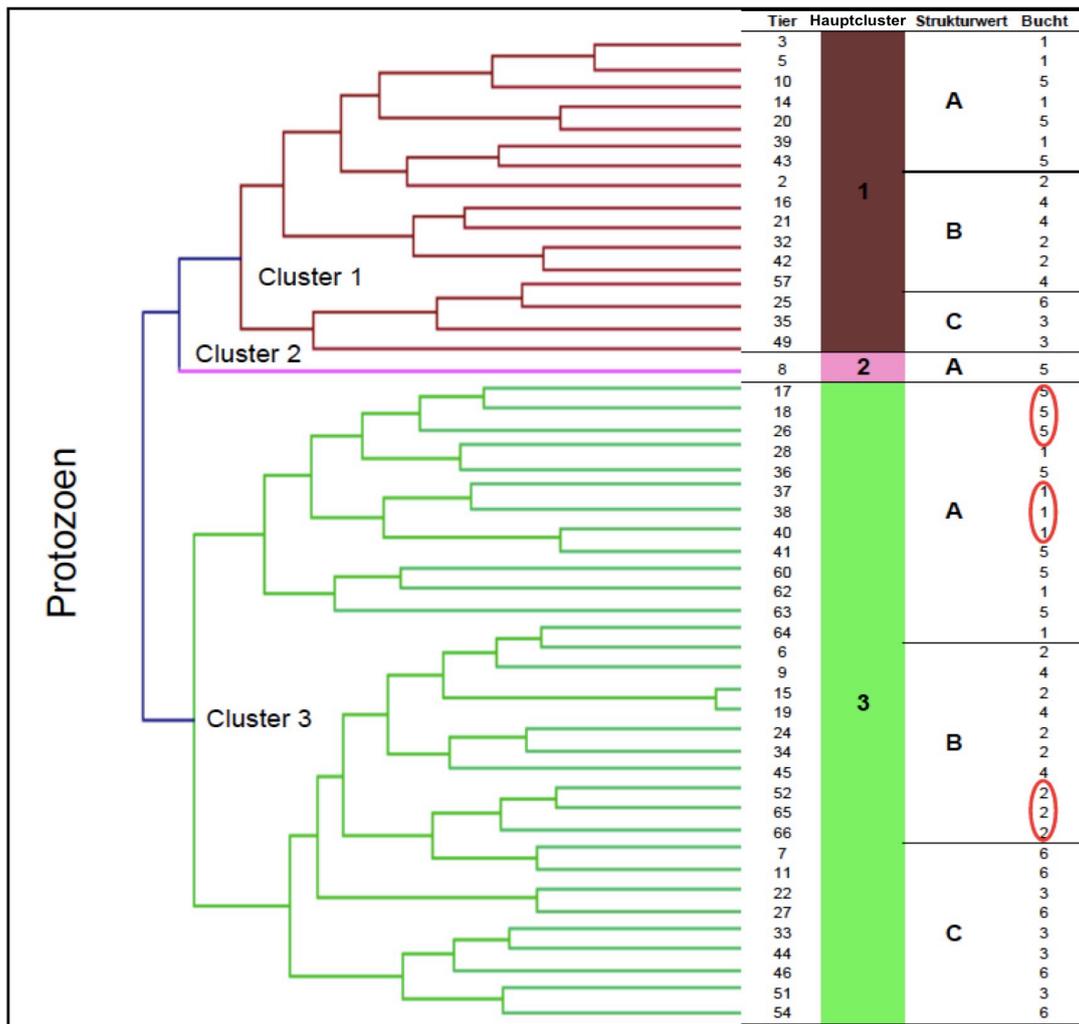
**Abb. 19: Hierarchische Clusteranalyse der Summe aller Bakterien ( $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ) am Pansenepithel zur Untersuchung eines Fütterungseffektes.** Auf der rechten Seite der Abbildung sind die einzelnen Tiere pro Cluster aufgeführt mit dem jeweils zugehörigen Behandlung und Bucht. Tiere mit der gleichen Strukturversorgung (SW 1,2 = A, SW 1,1 = B, SW 0,6 = C) und derselben Bucht innerhalb eines Clusters wurden farblich markiert (Roter Kreis). Die hierbei bezeichnete Bucht spiegelt den abgetrennten Stallteil wider, in denen jeweils 6 Tiere während des Versuchs untergebracht waren. Auf der linken Seite der Abbildung ist ein agglomeratives, hierarchischen Cluster abgebildet. Die Distanz innerhalb des Clusters war mit 33% enger als die Distanz zwischen den Hauptclustern (67%).



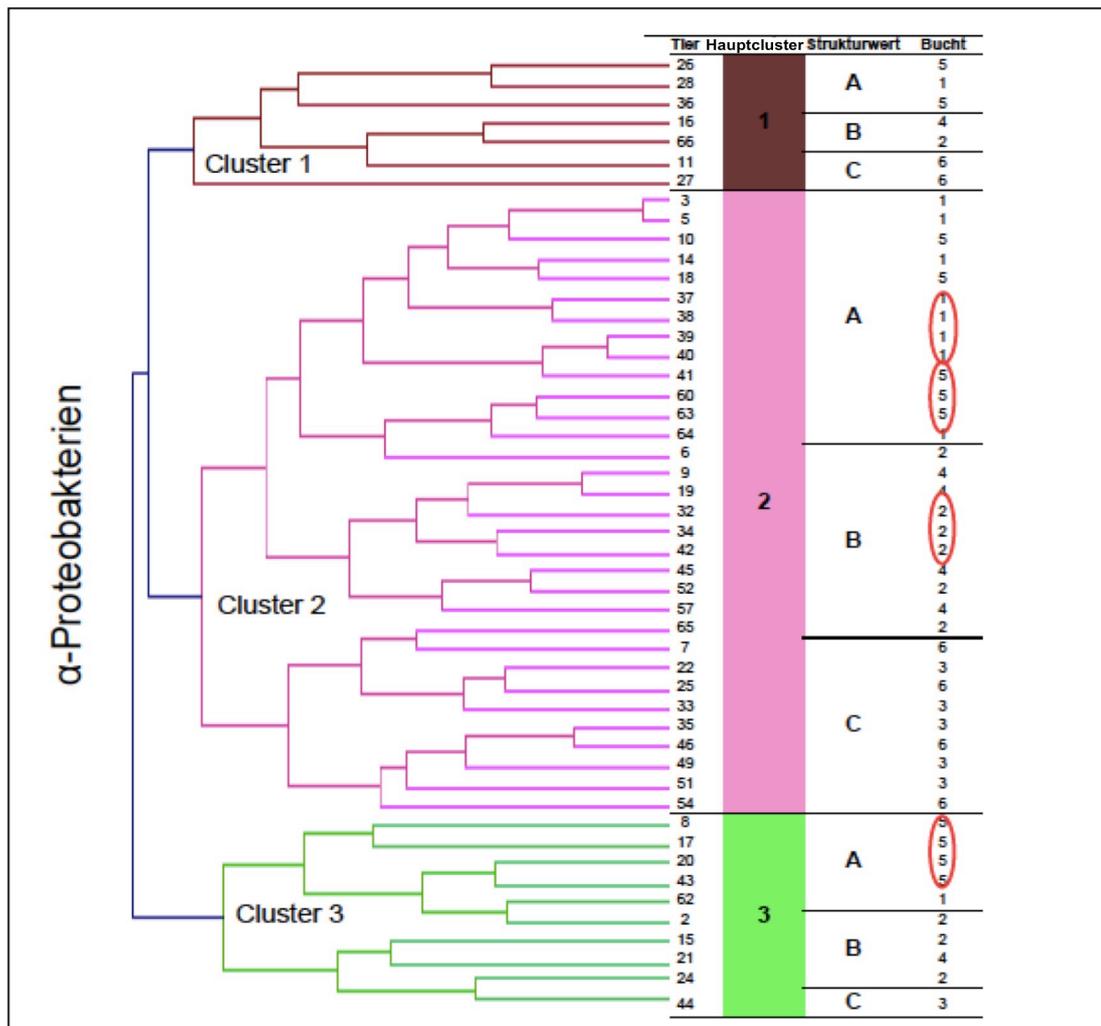
**Abb. 20: Hierarchische Clusteranalyse der Archaea (log<sub>10</sub>(Kopienzahl)/g TM) am Pansenepithel zur Untersuchung eines Fütterungseffektes.** Auf der rechten Seite der Abbildung sind die einzelnen Tiere pro Cluster aufgeführt mit dem jeweils zugehörigen Behandlung und Bucht. Tiere mit der gleichen Strukturversorgung (SW 1,2 = A, SW 1,1 = B, SW 0,6 = C) und derselben Bucht innerhalb eines Clusters wurden farblich markiert (Roter Kreis). Die hierbei bezeichnete Bucht spiegelt den abgetrennten Stallteil wider, in denen jeweils 6 Tiere während des Versuchs untergebracht waren. Auf der linken Seite der Abbildung ist ein agglomeratives, hierarchischen Cluster abgebildet. Die Distanz innerhalb des Clusters war mit 28% enger als die Distanz zwischen den Hauptclustern (72%).



**Abb. 21: Hierarchische Clusteranalyse der Anaeroben Pilze ( $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ) am Pansenepithel zur Untersuchung eines Fütterungseffektes.** Auf der rechten Seite der Abbildung sind die einzelnen Tiere pro Cluster aufgeführt mit dem jeweils zugehörigen Behandlung und Bucht. Tiere mit der gleichen Strukturversorgung (SW 1,2 = A, SW 1,1 = B, SW 0,6 = C) und derselben Bucht innerhalb eines Clusters wurden farblich markiert (Roter Kreis). Die hierbei bezeichnete Bucht spiegelt den abgetrennten Stallteil wider, in denen jeweils 6 Tiere während des Versuchs untergebracht waren. Auf der linken Seite der Abbildung ist ein agglomeratives, hierarchischen Cluster abgebildet. Die Distanz innerhalb des Clusters war mit 11% enger als die Distanz zwischen den Hauptclustern (89%).



**Abb. 22: Hierarchische Clusteranalyse der Protozoen ( $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ) am Pansenepithel zur Untersuchung eines Fütterungseffektes.** Auf der rechten Seite der Abbildung sind die einzelnen Tiere pro Cluster aufgeführt mit dem jeweils zugehörigen Behandlung und Bucht. Tiere mit der gleichen Strukturversorgung (SW 1,2 = A, SW 1,1 = B, SW 0,6 = C) und derselben Bucht innerhalb eines Clusters wurden farblich markiert (Roter Kreis). Die hierbei bezeichnete Bucht spiegelt den abgetrennten Stallteil wider, in denen jeweils 6 Tiere während des Versuchs untergebracht waren. Auf der linken Seite der Abbildung ist ein agglomeratives, hierarchischen Cluster abgebildet. Die Distanz innerhalb des Clusters war mit 21% enger als die Distanz zwischen den Hauptclustern (79%).



**Abb. 23: Hierarchische Clusteranalyse der  $\alpha$ -Proteobakterien ( $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ) am Pansenepithel zur Untersuchung eines Fütterungseffektes.** Auf der rechten Seite der Abbildung sind die einzelnen Tiere pro Cluster aufgeführt mit dem jeweils zugehörigen Behandlung und Bucht. Tiere mit der gleichen Strukturversorgung (SW 1,2 = A, SW 1,1 = B, SW 0,6 = C) und derselben Bucht innerhalb eines Clusters wurden farblich markiert (Roter Kreis). Die hierbei bezeichnete Bucht spiegelt den abgetrennten Stallteil wider, in denen jeweils 6 Tiere während des Versuchs untergebracht waren. Auf der linken Seite der Abbildung ist ein agglomeratives, hierarchischen Cluster abgebildet. Die Distanz innerhalb des Clusters war mit 19% enger als die Distanz zwischen den Hauptclustern (81%).

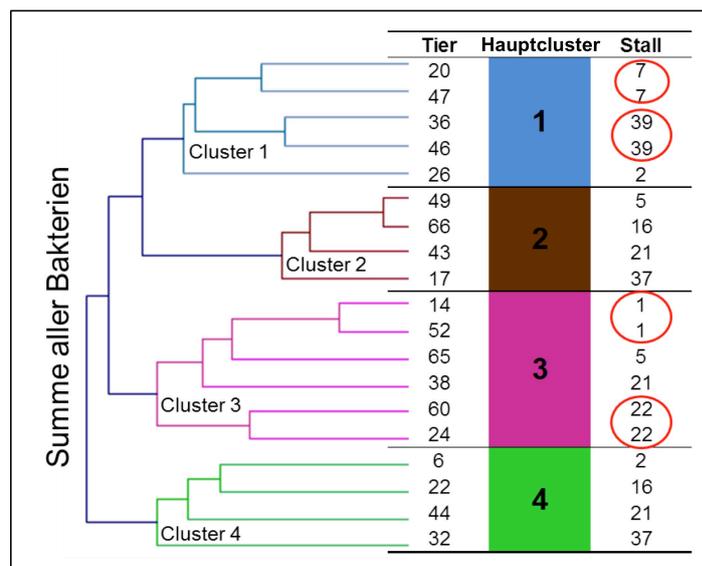
Neben der Untersuchung eines Behandlungseffekts und eines Buchteffektes sollte weiter untersucht werden, ob die Prägung der Mikroflora von historischen Gemeinsamkeiten über die Lebenszeit hinweg beeinflusst wird. Hierzu wurden 19 Tiere, die im gleichen Stall aufgewachsen sind, jedoch während des Versuches in einer randomisiert-unterschiedlichen Behandlungsgruppe sowie Bucht waren, mittels eines hierarchischen Clusters näher betrachtet. Es wurde für alle untersuchten Mikroorganismen des Panseninhaltes, bestehend aus Pansensaft und Pansenmatte, sowie für das Pansenepithel jeweils eine getrennte Clusteranalyse durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich für alle funktionellen Hauptgruppen innerhalb eines Clusters Tiere aus demselben Stall wiederfinden ließen (Abb. 24-30). Somit lässt sich neben einem Effekt von strukturwirksamer Faser auf Ebene der qPCR ein langfristiger Effekt von historischen Gemeinsamkeiten der Tiere über den Versuch hinweg aufzeigen. Die nachfolgenden Abbildungen verdeutlichen dies mittels eines graphisch dargestellten, hierarchischen Clusters sowie eine Tabelle mit den jeweiligen Versuchstieren (Abb. 24-30). Ebenso zeigte sich bei der Clusteranalyse des Panseninhaltes sowie des Pansenepithels, dass die Distanzen innerhalb der Cluster kleiner sind (Summe der Bakterien 22%; *Archaea* 26%; anaerobe Pilze 25%; Protozoen 34%; *Fibrobacter succinogenes* 29%; *Ruminococcus flavefaciens* 28%;  $\alpha$ -*Proteobakteria* 34%), als die Distanzen zwischen den Hauptclustern (Summe der Bakterien 78%; *Archaea* 74%; anaerobe Pilze 75%; Protozoen 66%; *Fibrobacter succinogenes* 71%; *Ruminococcus flavefaciens* 72%;  $\alpha$ -*Proteobakteria* 66%), sodass die Homogenität innerhalb der Cluster sehr hoch ist. Es zeigte sich jedoch, dass am Pansenepithel eine deutlich höhere Homogenität vorliegt (Inter: Summe der Bakterien 18%, *Archaea* 22%, anaerobe Pilze 10%, Protozoen 12%,  $\alpha$ -*Proteobakteria* 10%; Intra: Summe der Bakterien 82%, *Archaea* 78%, anaerobe Pilze 90%, Protozoen 88%,  $\alpha$ -*Proteobakteria* 90%), insbesondere bei der Analyse der anaeroben Pilze sowie den  $\alpha$ -*Proteobakteria*.

Ebenso wurde eine Häufigkeitsverteilung der einzelnen Ställe im Panseninhalt sowie am Pansenepithel ermittelt. Die folgende Tabelle 20 zeigt eine Häufigkeitsverteilung der Stallnummern, die innerhalb eines Clusters Auftreten.

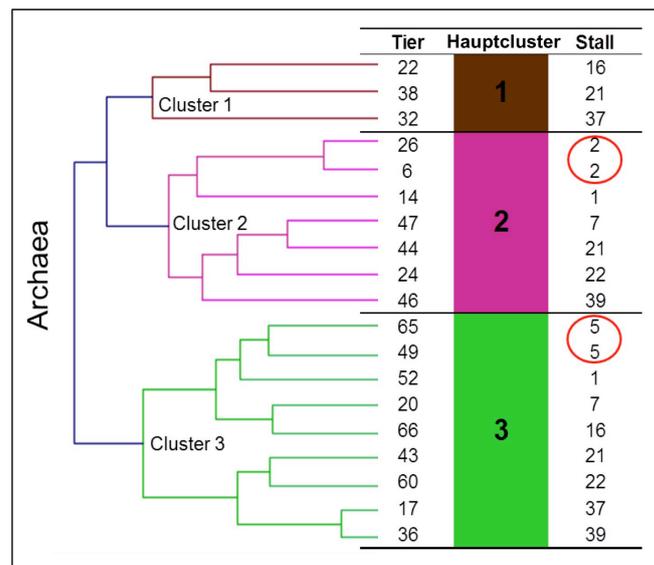
Hierbei zeigte sich für den Panseninhalt, dass die Tiere aus Stall 21 in 56% der Fälle in einem gemeinsamen Cluster zu finden waren.

Tabelle 20: Häufigkeitsverteilung der Clusterung gleicher Stallnummern im Pansen

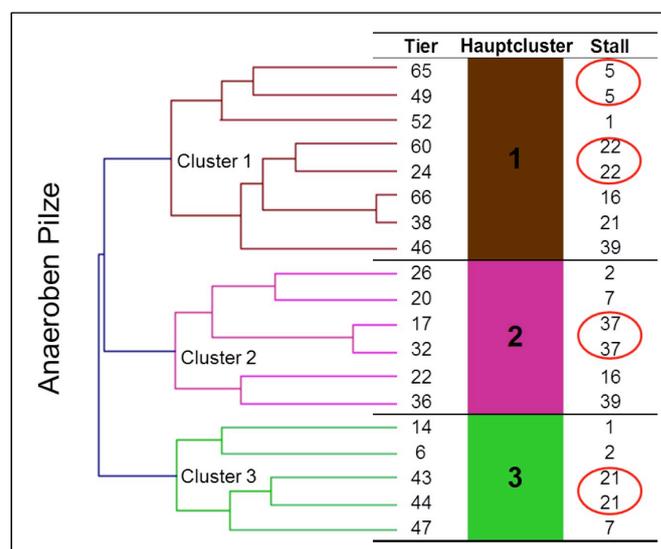
Stall	Häufigkeit Cluster	
	absolut	relativ
1	3	33%
2	3	33%
5	3	33%
7	1	11%
16	0	0%
21	5	56%
22	2	22%
37	1	11%
39	3	33%



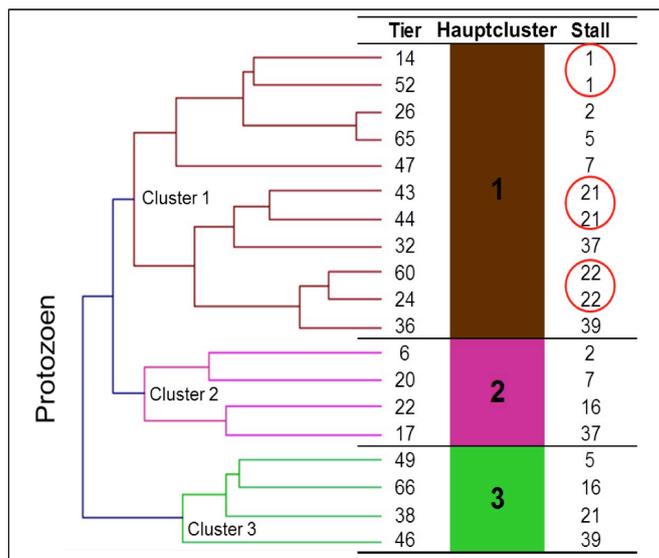
**Abb. 24: Hierarchische Clusteranalyse der Summe aller Bakterien ( $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ) im Panseninhalt (Saft und Matte) zur Untersuchung eines Stalleffektes.** Auf der rechten Seite der Abbildung sind die einzelnen Tiere innerhalb eines Clusters aufgeführt mit dem jeweils zugehörigen Stall. Die Clusterung zeigte sich nicht fütterungsbasiert, sondern aufgrund eines unbekanntes Effektes. Tiere aus dem gleichen Stall und im gleichen Cluster wurden farblich markiert (Roter Kreis). Auf der linken Seite der Abbildung ist die Unähnlichkeit des agglomeratives, hierarchischen Cluster abgebildet. Die Distanz innerhalb des Clusters war mit 22% enger als die Distanz zwischen den Hauptclustern (78%).



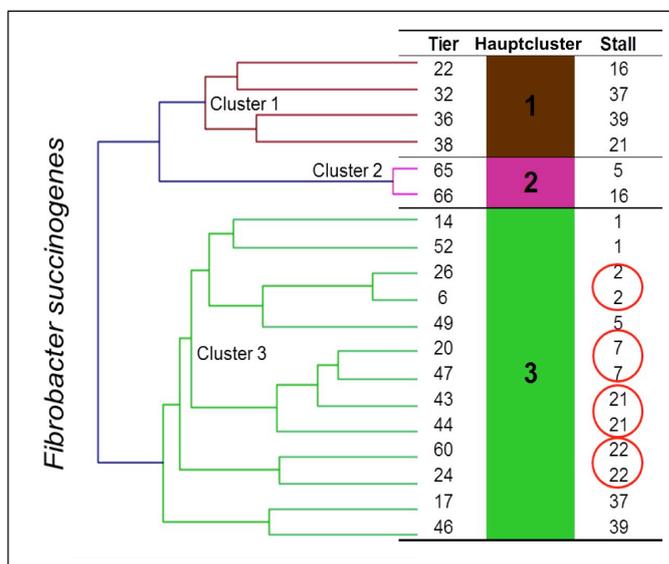
**Abb. 25: Hierarchische Clusteranalyse der Archaea ( $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ) im Panseninhalt (Saft und Matte) zur Untersuchung eines Stalleffektes.** Auf der rechten Seite der Abbildung sind die einzelnen Tiere innerhalb eines Clusters aufgeführt mit dem jeweils zugehörigen Stall. Die Clusterung zeigte sich nicht fütterungsbasiert, sondern aufgrund eines unbekanntes Effektes. Tiere aus dem gleichen Stall und im gleichen Cluster wurden farblich markiert (Roter Kreis). Auf der linken Seite der Abbildung ist die Unähnlichkeit des agglomeratives, hierarchischen Cluster abgebildet. Die Distanz innerhalb des Clusters war mit 26% enger als die Distanz zwischen den Hauptclustern (74%).



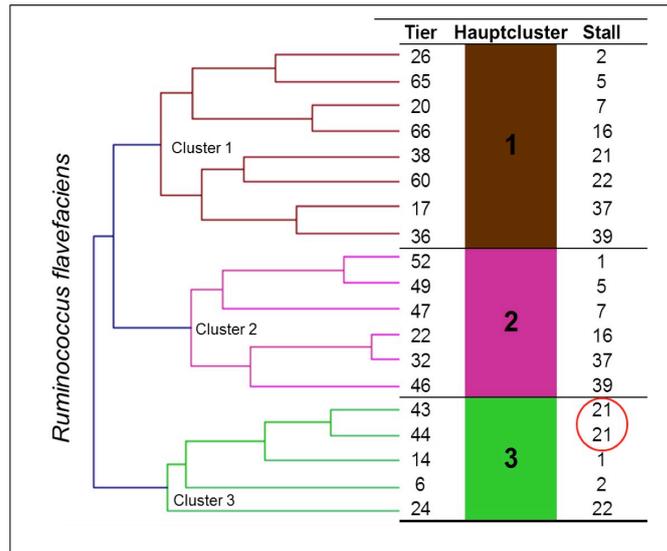
**Abb. 26: Hierarchische Clusteranalyse der Anaeroben Pilze ( $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ) im Panseninhalt (Saft und Matte) zur Untersuchung eines Stalleffektes.** Auf der rechten Seite der Abbildung sind die einzelnen Tiere innerhalb eines Clusters aufgeführt mit dem jeweils zugehörigen Stall. Die Clusterung zeigte sich nicht fütterungsbasiert, sondern aufgrund eines unbekanntes Effektes. Tiere aus dem gleichen Stall und im gleichen Cluster wurden farblich markiert (Roter Kreis). Auf der linken Seite der Abbildung ist die Unähnlichkeit des agglomeratives, hierarchischen Cluster abgebildet. Die Distanz innerhalb des Clusters war mit 25% enger als die Distanz zwischen den Hauptclustern (75%).



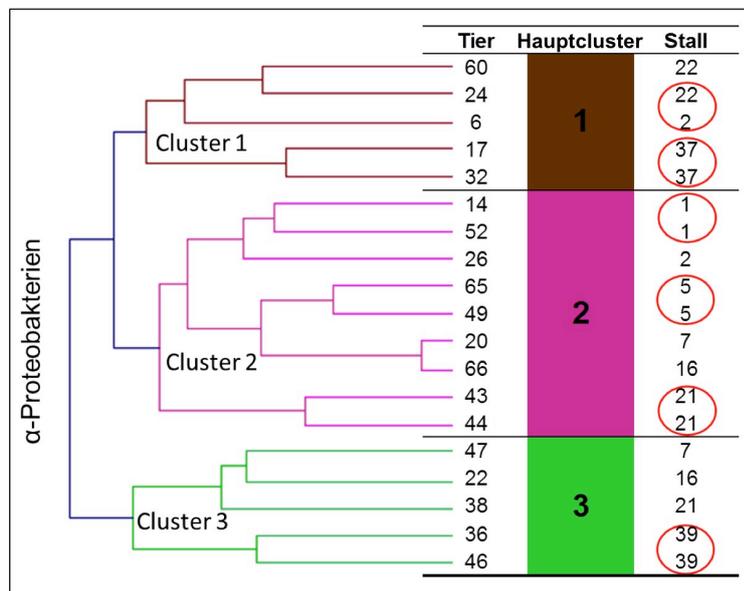
**Abb. 27: Hierarchische Clusteranalyse der Protozoen ( $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ) im Panseninhalt (Saft und Matte) zur Untersuchung eines Stalleffektes.** Auf der rechten Seite der Abbildung sind die einzelnen Tiere innerhalb eines Clusters aufgeführt mit dem jeweils zugehörigen Stall. Die Clusterung zeigte sich nicht fütterungsbasiert, sondern aufgrund eines unbekanntes Effektes. Tiere aus dem gleichen Stall und im gleichen Cluster wurden farblich markiert (Roter Kreis). Auf der linken Seite der Abbildung ist die Unähnlichkeit des agglomeratives, hierarchischen Cluster abgebildet. Die Distanz innerhalb des Clusters war mit 34% enger als die Distanz zwischen den Hauptclustern (66%).



**Abb. 28: Hierarchische Clusteranalyse *Fibrobacter succinogenes* ( $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ) im Panseninhalt (Saft und Matte) zur Untersuchung eines Stalleffektes.** Auf der rechten Seite der Abbildung sind die einzelnen Tiere innerhalb eines Clusters aufgeführt mit dem jeweils zugehörigen Stall. Die Clusterung zeigte sich nicht fütterungsbasiert, sondern aufgrund eines unbekanntes Effektes. Tiere aus dem gleichen Stall und im gleichen Cluster wurden farblich markiert (Roter Kreis). Auf der linken Seite der Abbildung ist die Unähnlichkeit des agglomeratives, hierarchischen Cluster abgebildet. Die Distanz innerhalb des Clusters war mit 29% enger als die Distanz zwischen den Hauptclustern (71%).



**Abb. 29: Hierarchische Clusteranalyse *Ruminococcus flavefaciens* ( $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ) im Panseninhalt (Saft und Matte) zur Untersuchung eines Stalleffektes.** Auf der rechten Seite der Abbildung sind die einzelnen Tiere innerhalb eines Clusters aufgeführt mit dem jeweils zugehörigen Stall. Die Clusterung zeigte sich nicht fütterungsbasiert, sondern aufgrund eines unbekanntes Effektes. Tiere aus dem gleichen Stall und im gleichen Cluster wurden farblich markiert (Roter Kreis). Auf der linken Seite der Abbildung ist die Unähnlichkeit des agglomeratives, hierarchischen Cluster abgebildet. Die Distanz innerhalb des Clusters war mit 28% enger als die Distanz zwischen den Hauptclustern (72%).

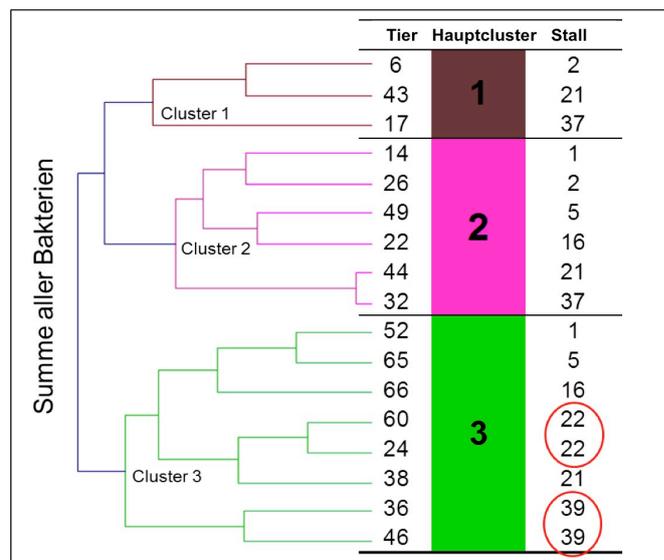


**Abb. 30: Hierarchische Clusteranalyse  $\alpha$ -Proteobakterien ( $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ) im Panseninhalt (Saft und Matte) zur Untersuchung eines Stalleffektes.** Auf der rechten Seite der Abbildung sind die einzelnen Tiere innerhalb eines Clusters aufgeführt mit dem jeweils zugehörigen Stall. Die Clusterung zeigte sich nicht fütterungsbasiert, sondern aufgrund eines unbekanntes Effektes. Tiere aus dem gleichen Stall und im gleichen Cluster wurden farblich markiert (Roter Kreis). Auf der linken Seite der Abbildung ist die Unähnlichkeit des agglomeratives, hierarchischen Cluster abgebildet. Die Distanz innerhalb des Clusters war mit 34% enger als die Distanz zwischen den Hauptclustern (66%).

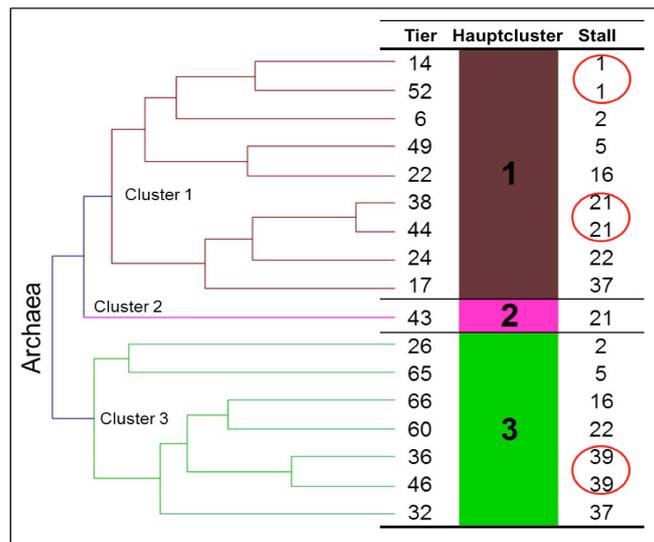
Für das Pansenepithel wurde ebenfalls die Häufigkeitsverteilung derselben Stallnummer innerhalb eines Clusters untersucht (Tab. 21). Hierbei zeigte sich, dass die Tiere aus Stall 21 in 44% der Fälle in einem gemeinsamen Cluster zu finden waren.

Tabelle 21 Häufigkeitsverteilung der Clusterung gleicher Stallnummern am Pansenepithel

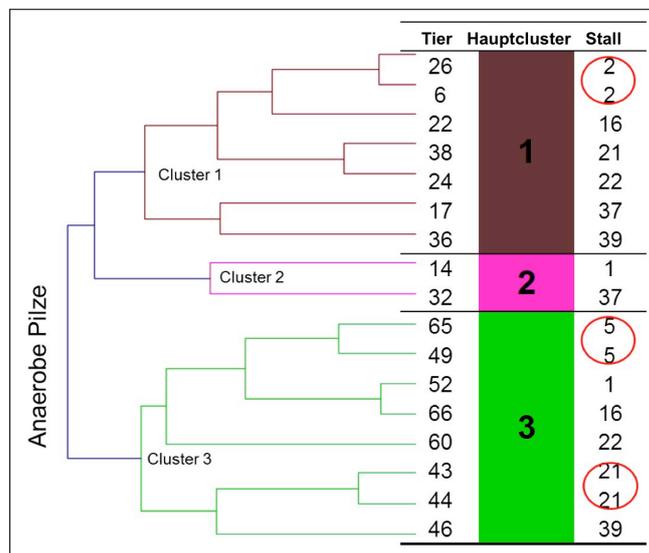
Stall	Häufigkeit Cluster	
	absolut	relativ
1	2	22%
2	1	11%
5	2	22%
7	0	0%
16	1	11%
21	4	44%
22	2	22%
37	0	0%
39	2	22%



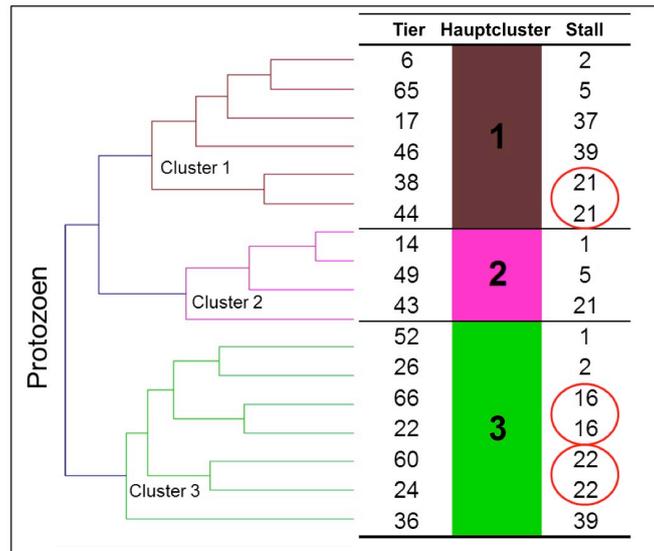
**Abb. 31: Hierarchische Clusteranalyse der Summe aller Bakterien ( $\log_{10}(\text{Kopienzahl})/\text{g TM}$ ) am Pansenepithel zur Untersuchung eines Stalleffektes.** Auf der rechten Seite der Abbildung sind die einzelnen Tiere innerhalb eines Clusters aufgeführt mit dem jeweils zugehörigen Stall. Die Clusterung zeigte sich nicht fütterungsbasiert, sondern aufgrund eines unbekanntes Effektes. Tiere aus dem gleichen Stall und im gleichen Cluster wurden farblich markiert (Roter Kreis). Auf der linken Seite der Abbildung ist die Unähnlichkeit des agglomeratives, hierarchischen Cluster abgebildet. Die Distanz innerhalb des Clusters war mit 18% enger als die Distanz zwischen den Hauptclustern (82%).



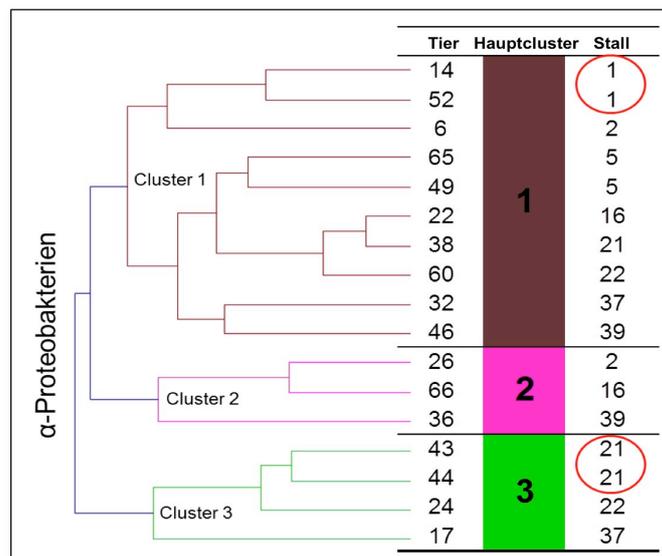
**Abb. 32: Hierarchische Clusteranalyse der Archaea (log<sub>10</sub>(Kopienzahl)/g TM) am Pansenepithel zur Untersuchung eines Stalleffektes.** Auf der rechten Seite der Abbildung sind die einzelnen Tiere innerhalb eines Clusters aufgeführt mit dem jeweils zugehörigen Stall. Die Clusterung zeigte sich nicht fütterungsbasiert, sondern aufgrund eines unbekanntes Effektes. Tiere aus dem gleichen Stall und im gleichen Cluster wurden farblich markiert (Roter Kreis). Auf der linken Seite der Abbildung ist die Unähnlichkeit des agglomeratives, hierarchischen Cluster abgebildet. Die Distanz innerhalb des Clusters war mit 22% enger als die Distanz zwischen den Hauptclustern (78%).



**Abb. 33: Hierarchische Clusteranalyse der Anaeroben Pilze (log<sub>10</sub>(Kopienzahl)/g TM) am Pansenepithel zur Untersuchung eines Stalleffektes.** Auf der rechten Seite der Abbildung sind die einzelnen Tiere innerhalb eines Clusters aufgeführt mit dem jeweils zugehörigen Stall. Die Clusterung zeigte sich nicht fütterungsbasiert, sondern aufgrund eines unbekanntes Effektes. Tiere aus dem gleichen Stall und im gleichen Cluster wurden farblich markiert (Roter Kreis). Auf der linken Seite der Abbildung ist die Unähnlichkeit des agglomeratives, hierarchischen Cluster abgebildet. Die Distanz innerhalb des Clusters war mit 10% enger als die Distanz zwischen den Hauptclustern (90%).



**Abb. 34: Hierarchische Clusteranalyse der Protozoen (log<sub>10</sub>(Kopienzahl)/g TM) am Pansenepithel zur Untersuchung eines Stalleffektes.** Auf der rechten Seite der Abbildung sind die einzelnen Tiere innerhalb eines Clusters aufgeführt mit dem jeweils zugehörigen Stall. Die Clusterung zeigte sich nicht fütterungsbasiert, sondern aufgrund eines unbekanntes Effektes. Tiere aus dem gleichen Stall und im gleichen Cluster wurden farblich markiert (Roter Kreis). Auf der linken Seite der Abbildung ist die Unähnlichkeit des agglomeratives, hierarchischen Cluster abgebildet. Die Distanz innerhalb des Clusters war mit 12% enger als die Distanz zwischen den Hauptclustern (88%).



**Abb. 35: Hierarchische Clusteranalyse der α-Proteobakterien (log<sub>10</sub>(Kopienzahl)/g TM) am Pansenepithel zur Untersuchung eines Stalleffektes.** Auf der rechten Seite der Abbildung sind die einzelnen Tiere innerhalb eines Clusters aufgeführt mit dem jeweils zugehörigen Stall. Die Clusterung zeigte sich nicht fütterungsbasiert, sondern aufgrund eines unbekanntes Effektes. Tiere aus dem gleichen Stall und im gleichen Cluster wurden farblich markiert (Roter Kreis). Auf der linken Seite der Abbildung ist die Unähnlichkeit des agglomeratives, hierarchischen Cluster abgebildet. Die Distanz innerhalb des Clusters war mit 10% enger als die Distanz zwischen den Hauptclustern (90%).

## 5.4 Diskussion

Bei der Untersuchung von unterschiedlichen Strukturgehalten in der Ration von Mastbullen sollte neben der Mastleistung auch der Einfluss auf die biochemischen Endprodukte sowie auf die ruminale Mikroflora untersucht werden. Hierbei zeigte sich ein Einfluss unterschiedlicher Strukturgehalte auf die Gehalte der flüchtigen Fettsäuren sowie der Anzahl an ruminale Mikroorganismen. Ebenso konnte ein Effekt von historischen Gemeinsamkeiten wie Herkunft, Behandlungen und Aufstallung auf die ruminale Mikroflora verdeutlicht werden.

### *Einfluss der strukturwirksamen Faser und einer damit verbundenen subakuten Pansenazidose auf die biochemischen Endpunkte der ruminale Fermentation*

Für eine normale Pansenfunktion beim Wiederkäuer ist eine adäquate Versorgung mit strukturwirksamer Faser wie einer Strohzulage von enormer Bedeutung. Sie bedingt eine optimale Schichtung des Panseninhaltes sowie eine Stabilisierung des pH-Wertes im Pansen. Beides trägt im Wesentlichen zur Vermeidung einer Pansenazidose und somit zum Erhalt der Gesundheit und des Wohlbefindens von Wiederkäuern bei (Danscher 2015). Die Strukturwirksamkeit und ihre Bewertung für Mischrationen ist eine hochaktuelle Fragestellung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE 2014). Jedoch steht bei diesen Betrachtungen mehr die Milchviehwirtschaft als die Mastbullenhaltung im Vordergrund. Es liegen zwar aktuell nur sehr wenige Arbeiten zur Strukturwirksamkeit bei Mastbullen vor, jedoch konnte bereits gezeigt werden, dass deutlich andere Werte für Mastbullen angesetzt werden müssen als bei der Milchkuhfütterung (De Campeneere 2002). Ein häufiges Problem stellt dabei die Übersäuerung des Pansen und eine damit verbundene geringere Milch- und Fleischleistung der Tiere aufgrund von Entzündungsprozessen im Pansen dar (Kleen 2003). Denn durch das längere Auftreten eines niedrigen pH-Wertes im Zusammenhang mit einer subakuten Pansenazidose kann die Mikroflora sowie synthetische Prozesse im Pansen in ein Ungleichgewicht kommen (Tajima 2000, Fernando 2010).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der pH-Wert der beiden höchst-versorgten Gruppen (SW 1,2; SW 1,1) auf einem vergleichbaren Niveau

lag. Demgegenüber war der pH-Wert der am niedrigsten mit Struktur versorgten Gruppe (SW 0,6) signifikant höher im Vergleich zur höchst-versorgten Gruppe. Jedoch wäre hier ein entgegengesetztes Bild zu erwarten gewesen, da ein geringerer Anteil an strukturwirksamer Faser in der Ration einen niedrigeren pH-Wert im Pansen bedingt (Li 2009). Allerdings ist hierbei zu beachten, dass die Tiere vor der Schlachtung 24h lang nüchtern waren. Dies ist wiederum ein Hinweis auf eine Anpassung des Organismus an den niedrigen Strukturwert. Möglicherweise hatten die Tiere dieser Futtergruppe einen stärker puffernden Speichel und/oder insgesamt größere Speichelmengen produziert. Eine effizientere Absorption von flüchtigen Fettsäuren aus dem Pansen infolge eines verstärkten Einbaus von Transportproteinen in die Pansenschleimhaut könnte ebenfalls zum einem höheren pH-Wert beigetragen haben (Dengler 2013).

Auch bei der Untersuchung der flüchtigen Fettsäuren ergab sich ein überraschendes Bild. Ein Angleichen der flüchtigen Fettsäuren zwischen den unterschiedlichen Fütterungen wäre auf Grund der Nüchternung vor der Probennahme zu erwarten gewesen. Allerdings zeigten bisherige Untersuchungen, dass bei SARA der Stoffwechsel sowie die Absorption der flüchtigen Fettsäuren an der Mucosa vermindert sind (Penner 2009b, Aschenbach 2011). Tatsächlich sanken jedoch die Konzentrationen der flüchtigen Fettsäuren mit sinkendem Strukturwert der Ration. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich die Tiere mit einem SW von 0,6 während der Fütterungsphase auf eine höhere Anflutung von flüchtigen Fettsäuren angepasst haben, indem sie beispielsweise in der Pansenschleimhaut vermehrt Transportproteine zur Absorption der Fettsäuren exprimierten (Dengler 2013).

Untersuchungen am Lehrstuhl im Zusammenhang mit dem hier beschriebenen Strukturversuch zeigten, dass die Gruppe mit dem niedrigsten Strukturwert, eine höhere Genexpression der Fettsäuretransporter auswies (Brugger 2016). Diese Gruppe zeigte eine höhere Effizienz die anfallenden Fermentationsprodukte schneller aus dem Pansenlumen zu transportieren, um den pH-Wert in einem physiologischen Bereich zu halten und einer SARA entgegenzuwirken. Somit ließ sich zeigen, dass ein sinkender Strukturwert eine Heraufregulation der Fettsäuretransporter zur Folge hat (Brugger 2016).

All diese Erkenntnisse zeigen, dass bei der Gruppe mit dem niedrigsten Strukturwert eine subakute Pansenazidose induziert wurde und die Tiere durch eine gesteigerte Genexpression und veränderte Fermentationsweisen dem entgegen wirken. Bisherige Definitionen einer SARA, die allein über den pH-Wert erfolgten, scheinen nach diesen Untersuchungen nicht aussagekräftig genug. Andere Faktoren wie Fettsäuregehalte, bzw. Genexpression spielen hierbei auch eine entscheidende Rolle.

#### *Einfluss der strukturwirksamen Faser und einer damit verbundenen subakuten Pansenazidose auf die ruminale Mikroflora*

Bisherige Studien konnten zeigen, dass durch eine subakute Pansenazidose neben den leistungstechnischen Parameter auch das Mikrobiom nachhaltig gestört wurde. Mao et al. haben bereits mittels Pyrosequencing bei Milchkühen gezeigt, dass eine SARA die Vielfalt der Mikroorganismen im Pansen stark hemmt und die ebenfalls anhand von 16S rRNA quantifizierte Gesamtheit der Bakterien deutlich reduziert wird (Mao 2013). So wurde eine Reduktion der *Proteobacteria* und *Bacteroidetes* unter Einfluss einer SARA-induzierenden Fütterung beschrieben. Daneben wurde ein Anstieg der *Firmicutes* und *Ruminococcus* beobachtet (Mao 2013).

In der vorliegenden Arbeit konnten für Mastbullen mittels qPCR ebenfalls für diese funktionellen Hauptgruppen im Pansen ein Effekt der Fütterung mit strukturwirksamer Faser gezeigt werden. So zeigte sich bei der Untersuchung des Pansensaftes für *Ruminococcus flavefaciens* ein signifikanter Behandlungseffekt mit einem Anstieg der Kopienanzahl unter einer strukturarmen Fütterung mit einem SW von 0,6. Diese Ergebnisse von Mao et al. und der hier vorliegenden Arbeit zeigen ein gegensätzliches Bild zu früheren Erkenntnissen einer SARA-induzierten Fütterung. Denn Shi und Weimer beschrieben, dass ein dauerhaft niedriger pH-Wert neben einem Einfluss auf die Futteraufnahme und Leistung der Tiere auch einen erheblichen Einfluss auf die Mikroflora, vor allem jedoch auf die cellulolytischen Bakterien im Pansen hat. Faserabbauende Bakterien können über längere Zeit einen Abfall des pH-Wertes unter 6,0 nicht tolerieren (Shi und Weimer 2002), wodurch die Anzahl

an cellulolytischen Bakterien sowie der damit verbundenen Faserverdauung im Pansen stark reduziert wird (Shi und Weimer 2002). Dieses gegensätzliche Bild kann mit der 24-stündigen Nüchterung der in dieser Arbeit untersuchten Tiere vor der Probennahme erklärt werden. Eine Anpassung der Mastbullen durch 24-stündige Nüchterung an den niedrigen Strukturwert kann dabei von großer Bedeutung sein. Weiterhin müssen in diesem Zusammenhang der tierindividuelle Einfluss in Betracht gezogen werden, was vermuten lässt, dass die individuelle Anpassung jedes Tieres an die Nüchterung und den unterschiedlichen Gehalt an strukturwirksamer Faser einen dramatischen Einfluss auf *Ruminococcus flavefaciens* hat.

Daneben zeigte ein Strukturwert von 0,6 bei der Gesamtheit Bakterien im Pansensaft eine erhöhte Kopienanzahl, welche in direkter Abhängigkeit zu der Energiedichte der Ration steht. So zeigt sich an der Gesamtheit der Bakterien im Pansen die unmittelbare Wirkung der Zusammensetzung des Futters auf die ruminale Mikroflora, während bei den biochemischen Endpunkten eher die Anpassungsreaktionen des Wirtstieres zu Tage treten. Dies zeigt deutlich, dass sich durch die 24-stündige Nüchterung der Tiere vor der Schlachtung die Mikroflora stabilisiert und eine Interaktion zwischen dem Mikrobiom und dem Wirtstier auftreten kann. Allerdings konnten bisher nur wenige Ergebnisse zu den Mikroben-Mikroben-Interaktionen innerhalb der Pansen-Mikroflora aufgezeigt werden (Kittelman 2013, Belanche 2014). Dabei konnte gezeigt werden, dass zwischen den Hauptvertretern der Pansenmikroflora Interaktionen und Assoziationen vorhanden sind. Eine Analyse der Mikroorganismen aller drei Domänen der phylogenetischen Einteilung (*Bacteria*, *Archaea* und *Eukaryota*) zeigt eine starke Inter- und Intra-Korrelation durch gegenseitige Hemmung oder Förderung der einzelnen funktionellen Hauptgruppen im Pansen (Kittelman 2013). Somit ist die Analyse der Co-Existenz phylogenetischer Domänen im Pansen eine weitere Möglichkeit, um Verschiebungen innerhalb des Mikrobioms aufzeigen zu können, selbst wenn sich auf der Ebene der einzelnen funktionellen Hauptgruppen kein Effekt zeigt.

Zudem sollte neben der Mikroflora im Lumen des Pansens auch die Zusammensetzung der Mikroflora am Pansenepithel untersucht werden.

---

Hierbei konnten am Pansenepithel neben *Ruminococcus flavefaciens* keine Kopienzahlen von *Fibrobacter succinogenes* quantifiziert werden, was klar aufzeigt, dass die cellulolytischen Bakterien am Pansenepithel den niedrigen pH-Wert nicht tolerieren. Weiter zeigt die Abwesenheit von *Fibrobacter succinogenes* und *Ruminococcus flavefaciens*, dass cellulolytische Bakterien somit überwiegend im Pansenlumen vorhanden sind. Daneben konnte eine Schädigung des Pansenepithels durch einen dauerhaft niedrigen pH-Wert, wie bereits von mehreren Forschungsgruppen beschrieben, bestätigt werden (Nocek 1997, Kleen 2003, Stone 2004, Alzahal 2007). Diese Schädigung des Pansenepithels durch eine SARA besitzt ebenfalls einen negativen Effekt auf die Mikroflora am Pansenepithel und dessen Zusammensetzung, die dadurch nachhaltig beeinflusst werden.

Trotz geringerer Konzentrationen der Mikroflora am Pansenepithel zeigte sich eine höhere Stabilität aller funktionellen Hauptgruppen gegenüber äußeren Einflüssen wie Fütterung und Stallklima. Bisherige Studien bei Schafen und Lämmern konnten ebenfalls zeigen, dass die mikrobielle Gemeinschaft am Pansenepithel kaum durch die Fütterung beeinflusst wird im Gegensatz zur Mikrobiota im Pansenlumen (Kocherginskaya 2001). Dies liegt hauptsächlich an einer unterschiedlichen metabolischen Aktivität der verschiedenen Mikroorganismen, da am Epithel anhaftenden Bakterien durch die Schichtung des Pansen weniger Substrat zur Verfügung steht als primär und sekundär fermentierenden Bakterien im Pansenlumen (Wallace 1979, Cheng 1997). Bisherige Untersuchungen konnten vereinzelt fütterungsbedingte Unterschiede der Bakterien am Pansenepithel zeigen, jedoch scheint die qPCR für diese feinen Veränderungen nicht sensitiv genug zu sein und sollte durch NGS oder Pyrosequencing ersetzt werden (Sadet-Bourgeteau 2010).

---

*Einfluss von historischen Gemeinsamkeiten auf die Entwicklung der Mikroflora unter unterschiedlicher Strukturversorgung*

Neben einem Einfluss der Fütterung oder Nüchterung der Tiere auf das Mikrobiom konnte, wie bereits beschrieben, in diesem Versuch gezeigt werden, dass auch ein tierindividueller Einfluss des Wirts auf die mikrobielle Gemeinschaft eine große Rolle spielt (Weimer 2010). Durch die 24-stündige Nüchterung der Tiere traten große Streuungen auf, weshalb neben dem Einfluss der unterschiedlichen Fütterung auch noch frühere Einflussfaktoren wie Gemeinsamkeiten aus dem Leben der Tiere auf die Mikroflora untersucht werden sollten. Bei der Clusteranalyse zeigte sich, dass das Schlachtdatum sowie die Analysetage keinen Einfluss besaßen. Daraus ließ sich schließen, dass die genetische Komponente die Kernrolle bei der Zusammensetzung der Mikroflora spielt. Überraschenderweise spielte die Aufstallung und somit die Einteilung der Versuchstiere auf unterschiedliche Buchten eine zusätzliche Rolle, währenddessen die Behandlung der Tiere nur einen geringfügigen Einfluss auf die Mikroflora besaß. Dies lässt vermuten, dass durch Abschlecken, Fressen aus demselben Trog und weiteren Körperkontakten die Tiere sich an eine eigene Mikroflora innerhalb ihrer Bucht angepasst haben. Weiter lässt sich vermuten, dass dadurch eine mikrobielle Drift in die gleiche Richtung stattfindet und sich die Mikroflora der Tiere innerhalb einer Bucht aneinander anpassen.

Neben diesem Einfluss zeigte auch die gemeinsame Herkunft einen Effekt auf die Mikroflora im Pansen der Tiere. In der Clusteranalyse der 19 Stallpaare konnte gezeigt werden, dass Tiere aus demselben Stall sich in ihrer Mikroflora sehr ähnlich sind. Bereits kurz nach der Geburt findet demnach eine Prägung durch Einflüsse der Fütterung und äußere Einflüsse wie Stallklima statt. Somit haben historische Gemeinsamkeiten der Tiere ebenfalls einen starken Einfluss, trotzdem die spätere Fütterung der Tiere ihrerseits zu Veränderungen in der Mikroflora führt (Koike 2001). Auch die Herkunft und Genetik spielen eine entscheidende Rolle in der Zusammensetzung der Mikroflora. Hierzu liegen bisher nur sehr wenige Studien vor, allerdings konnten Kelly et al. zeigen, dass lediglich in einem kurzen Zeitfenster von wenigen Wochen nach der Geburt die Möglichkeit besteht, signifikante Veränderungen im Kernmikrobiom eines Tieres

---

zu erreichen (Kelly 2007). Außerhalb dieses Entwicklungsfensters besteht die Möglichkeit, das ruminale Mikrobiom kurzfristig zu beeinflussen, jedoch bleibt das Kernmikrobiom eines Tieres in der Zusammensetzung immer konstant (Weimer 2010). Bei den hier gezeigten Untersuchungen des Pansenepithels wurde deutlich, dass die Homogenität der Mikroflora am Pansenepithel deutlich stärker ausgeprägt ist als im Panseninhalt, welcher aus Pansensaft und Pansenmatte besteht. Dies lässt die Vermutung zu, dass am Pansenepithel ein stabiles und nur gering beeinflussbares Kernmikrobiom vorliegt, jedoch historische Lebensabschnitte bei der Prägung dieses Kernmikrobioms von entscheidender Bedeutung sind.

## **5.5 Schlussfolgerungen**

Ein Einfluss von strukturwirksamer Rohfaser auf die ruminale Mikroflora sowie den biochemischen Endpunkten der Fermentation bei Mastbullen konnte in dieser Arbeit aufgezeigt werden. Zu kurzfristigen Änderungen der Fermentationsparameter sowie der Mikroflora konnte in dem vorliegenden Versuch auch gezeigt werden, dass neben kurzfristigen Fütterungseinflüssen auch langfristige, historische Gemeinsamkeiten der Tiere die ruminale Mikroflora der Mastbullen nachhaltig beeinflussen können. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Mikroflora des Pansenepithels sehr stabil gegenüber fütterungsbedingten Einflüssen ist und somit als Kernmikrobiom bezeichnet werden kann.

## 6 Generaldiskussion

Bereits seit längerem ist bekannt, dass eine unterschiedliche Rationsgestaltung sowie Änderungen in der Futterzusammensetzung einen Einfluss auf die Diversität und die Komposition der Mikroorganismengemeinschaft im Pansen besitzen (Hungate 1966). Durch die Entwicklung neuartiger molekularbiologischer Methoden ist es nun möglich, Veränderungen des ruminalen Mikrobioms in Echtzeit zu verfolgen. Einige Studien konnten in der Vergangenheit Veränderungen in der Mikroflora des Pansen mittels qPCR zeigen (Tajima 2000, Kocherginskaya 2001).

In dieser vorliegenden Arbeit lagen die Kopienzahlen der mittels qPCR bestimmten Gesamtheit der Bakterien im Bereich von  $10^{8-10}$  pro Gramm getrocknetem Pansensaft, bzw. pro Gramm Pansenmatte. Dies entspricht der Größenordnung bisheriger Angaben aus der Literatur (Jeroch 1999, Martens 2000). Die Kopienzahl an cellulolytischen Bakterien lag im Bereich von  $10^7 - 10^8$  Kopien je Gramm getrocknetem Pansensaft, bzw. pro Gramm Pansenmatte. Diese Ergebnisse liegen wiederum im Bereich von bisherigen Ergebnissen von Ölschläger (Ölschläger 2007). Leichte Abweichungen zu bisherigen Studien, welche die Bestimmung der Bakterienzahlen mittels Mikroskopie durchführten, hängen mit der Messmethode zusammen. Bei einer Messung der ruminalen Mikroflora auf Ebene der DNA mittels qPCR lässt eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen nicht zu. Somit ist mit dieser Methode eine leichte Überschätzung oder Unterschätzung möglich. Koike et al. zeigten mittels einer Messung der 16S rRNA, dass die Kopienzahl der cellulolytischen Bakterien in einem Bereich von  $10^4-10^6$  Kopien lag und zudem *Fibrobacter succinogenes* das meistauftretende faserabbauende Bakterium im Pansen ist (Koike 2001, Koike 2003).

Neben den wichtigsten funktionellen Hauptgruppen der ruminalen Mikroflora wurden ebenfalls die Ratios der funktionellen Hauptgruppen in Bezug auf die Gesamtheit der Bakterien (16S RNA) untersucht. Hierbei fiel jedoch auf, dass einige Relationen im Bezug auf die Gesamtheit der Bakterien (16S RNA) über 100% lagen, was physiologisch nicht möglich sein kann. Daraufhin erfolgte

Untersuchungen für den hier verwendeten Primer der 16S RNA von Bach et al. 2002 zeigten, dass dieser Primer in bisherigen Forschungsarbeiten für Analysen des Mikrobioms im Boden verwendet wurden. Bei Analysen des Primers für die ruminale Mikroflora ist eine Unterschätzung der Kopienzahl somit nicht auszuschließen. Bei einer absoluten Messung der mikrobiellen DNA mittels qPCR ist eine Aussage über die Gesamtheit der Bakterien mittels 16S rRNA Sequenzen durch die Vielzahl der vorhandenen Bakterien unspezifisch. Zudem zeigten Vetrovsky und Baldrian, dass die Kopienzahl der 16S rRNA Gene im bakteriellen Genom stark variieren (Větrovský T. 2013). Dies erklärt, die über 100% liegenden Ratios im Bezug auf die Gesamtheit der Bakterien. Ein Einsatz noch spezifischerer Primer kann dieses Problem für nachfolgende Untersuchungen minimieren. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Dissertation ein zweiter Primer für die Gesamtheit der Bakterien von Lettat et al. (2012) verwendet (Lettat 2012). Hierbei ließen sich etwa 20% mehr an Gesamtheit der Bakterien im Pansen detektieren

Ebenso zeigten sich deutliche Unterschiede in der Kopienanzahl zwischen Pansensaft und Pansenmatte. Ein Grund dafür sind die bereits beschriebenen partikelassoziierten Mikroorganismen, die vermehrt in der festen Phase des Pansens vorkommen (Merry 1983, Michalet-Doreau 2002). Unabhängig von der Rationsgestaltung konnten Ranilla und Carro einen Anteil an partikelassoziierten Mikroorganismen von über 50% beschreiben (Ranilla 2003). Ein weiterer Grund für die höhere Kopienzahl in der Pansenmatte ist eine Wanderung der Mikroorganismen von der flüssigen Phase hin zur festen Phase im Zeitverlauf nach der Fütterung (Briesacher 1992). Briesacher et al. konnte aufzeigen, dass vor einer Fütterung der Anteil an mikrobieller DNA im Pansensaft höher ist als der Anteil an Mikroorganismen in der Pansenmatte. Ein gegensätzliches Bild zeigte sich drei Stunden nach der Fütterung mit einem gleichmäßig über die unterschiedlichen Schichten des Pansens verteilten Gehalt an mikrobieller DNA. Dies erklärt die in der hier vorliegenden Arbeit signifikant höheren Gehalten an Mikroorganismen pro Gramm Pansenmatte.

Zusätzlich zur Untersuchung der ruminale Mikroflora mittels qPCR wurde auch eine Analyse mittels Next-Generation-Sequencing durchgeführt. Dieser Hochdurchsatz mittels NGS ermöglicht es die ruminale Mikroflora in extrem

hoher und feiner Auflösung zu bestimmen (McCann 2014). Die Betrachtung der ruminalen Mikroflora mittels qPCR ermöglicht zwar einen fokussierten Einblick in die Abbauprozesse sowie mikrobiellen Vorgänge im Pansen, jedoch besteht hierbei auch die Problematik des großen Materialverbrauchs. Bei einer Analyse mittels qPCR ist der Verbrauch an mikrobieller DNA sehr hoch, wodurch Einschränkungen in der Anzahl und dem Ausmaß der Messungen entstehen. Bei einer Untersuchung mittels NGS reicht hingegen sehr wenig Material, um eine komplette genomische Abbildung der ruminalen Mikroflora zu bekommen. Zudem ermöglicht eine Charakterisierung durch NGS eine sensitive Subtypisierung der Mikroflora im Pansen in nur einem Messvorgang. Dies hat den enormen Vorteil, dass aus wenig Material möglichst viel Information gewonnen werden kann.

## 7 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit gelang eine Charakterisierung der wichtigsten funktionellen Hauptgruppen der ruminalen Mikroflora mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR) sowie hochauflösendem Next-Generation-Sequencing (NGS). Ein Nachteil der qPCR war, dass für einige funktionelle Hauptgruppen keine gruppenspezifischen Primer entwickelt werden konnten, sondern lediglich einzelne spezifische Vertreter dieser funktionellen Hauptgruppen betrachtet wurden. In nachfolgenden Untersuchungen muss dieses Primer-Spektrum unter Heranziehung neuer bioinformatischer Systeme so weiterentwickelt werden, dass in der Zukunft ein Gesamtüberblick für alle funktionellen Hauptgruppen des Mikrobioms im Pansen ermöglicht wird. Analysen der vorliegenden Arbeit zeigten zudem auch, dass bei einzelnen funktionellen Hauptgruppen ein konstantes Niveau vorlag, vor allem auch in Abhängigkeit von unterschiedlichen Rationen. Aus diesem Grund wäre es sinnvoll, neben einer breiten Charakterisierung der ruminalen Mikroflora auch eine Subcharakterisierung und -typisierung einzelner Bakterienfamilien vorzunehmen. Ein konstantes Niveau einer funktionellen Hauptgruppe in Analysen ruminaler Proben kann Verschiebungen innerhalb einzelner Unterfamilien und somit Änderungen im Muster innerhalb einer funktionellen Hauptgruppe überlagern. Durch die Kombination dieser breiten Charakterisierung mit der Betrachtung einzelner Bakterienfamilien wäre eine noch genauere Aussage über die physiologischen Prozesse im Pansen und Interaktionen mit dem Pansenepithel möglich. Als erster Schritt einer Charakterisierung der ruminalen Mikroflora sollte in der vorliegenden Arbeit die DNA-Ebene betrachtet werden. Dies ermöglicht jedoch keine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Mikroorganismen im Pansen. Infolgedessen sollten zukünftige Charakterisierungen des ruminalen Mikrobioms auf die mikrobielle Aktivität, d.h. auf die RNA-Ebene erweitern werden. Dadurch ist es zukünftig möglich Genexpressionsmuster der Mikroorganismen darzustellen. Weiter können durch eine Betrachtung auf Proteinebene spezifische Analysen der Interaktionen zwischen den Mikroorganismen sowie der Wirt-Mikrobiom-Interaktion ermöglicht werden. Auch ein Cross-Talk zwischen dem Pansenepithel und den ruminalen Mikroorganismen wäre auf diese Weise abbildbar. Weiter verfeinert werden

---

könnte die Charakterisierung des Pansenmilieus neben einer Array-basierten Expressionsanalyse auf RNA- und Proteinebene mittels einer durchflusszytometrischen Analyse der einzelnen ruminalen Mikroorganismen, wie sie zur Zeit für das humane gastrointestinale Mikrobiom Anwendung findet.

---

## 8 Literaturverzeichnis

Alzahal, O., Rustomo, B., Odongo, N.E., Duffield, T.D., McBride, B.W. (2007). "Technical note: a system for continuous recording of ruminal pH in cattle." *Journal of Animal Science* 85: 213-217.

Aschenbach, J. R., Penner, G.B., Stumpff, F., Gäbel, G. (2011). "Ruminant nutrition symposium: role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH." *Journal of Animal Science* 89: 1092-1107.

Beauchemin, K. A., Yang, W.Z., Rode, L.M., (2003). "Effects of particle size of alfalfa based dairy cow diets on chewing activity, ruminal fermentation, and milk production." *Journal of Dairy Science* 86: 630-643.

Belanche, A., DeLaFuente, G., Newbold, C.J. (2014). "Study of methanogen communities associated with different rumen protozoal populations. ." *FEMS Microbiol. Ecol.* 90: 663-677.

Bevans, D.W., Beauchemin, K.A., Schwartzkopf-Genswein, K.S., Mc-Kinnon, J. J., McAllister, T. A. (2005). "Effect of rapid or gradual grain adaptation on subacute acidosis and feed intake by feedlot cattle." *Journal of Animal Science* 83: 1116-1132.

Briesacher, S.L., May, T., Grigsby, K.N., Kerley, M.S., Anthony, R.V., Paterson, J.A. (1992). "Use of DNA probes to monitor nutritional effects on ruminal prokaryotes and *Fibrobacter succinogenes* S85." *Journal of Animal Science* 70(1): 289-295.

Brugger D., Etle., T., Feser, S., Windisch, W.M., Bolduan, C. (2016). "Post mortem endpoints of ruminal fermentation and anion/proton transporter gene expression as affected by variations in the amounts of physically effective neutral detergent fibre in the diets of growig German Fleckvieh bulls." *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology* 25: 17.

Brulc, J.M., Antonopoulos, D.A., Miller, M.E., Wilson, M.K., Yannarell, A.C., Dinsdale, E.A., Edwards, R.E., Frank, E.D., Emerson, J.B., Wacklin, P., Coutinho, P.M., Henrissat, B., Nelson, K.E., White, B.A. (2009). "Genecentric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 1948-1953.

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M. (2009). "The MIQE guidelines: minimum information for publication of uquantitative real-time PCR experiments." *Clin. Chem.* 55(4): 611-622.

Cantalapiedra-Hijar, G., Yáñez-Ruiz, D. R., Martín-García, A. I., Molina-Alcaide, E. (2009). "Effects of forage: concentrate ratio and forage type on apparent digestibility, ruminal fermentation, and microbial growth in goats. ." *Journal of Animal Science* 87(2): 662-631.

Cardozo, P.W., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C. (2005). "creening for the effects of natural plant extracts at different pH on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. ." *Journal of Animal Science* 83: 2572-2579.

Cheng, K.J., McAllister, T.A. (1997). "The rumen microbial ecosystem." In: Hobson PN, Stewart, C.S., editors 2 ed. London: Blackie Academic & Professional.: 492-522.

Chou, K.C., Walker, D.M. (1964). "The effect on the rumen composition of feeding sheep diets supplying different starches. II The partition of nitrogen, pH, volatile fatty acids, protozoa numbers, enzymic activity and certain other chemical constituents." *J. Agric. Sci.* 62: 15-25.

Church, D.C. (1988). "Salivary function and production." Church, D.C. (Ed.), *The Ruminant Animal, Digestive Physiology and Nutrition* Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ(117-124).

Costello, E.K., Lauber, C.L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J.I. (2009). "Bacterial community variation in human body habitats across space and time." *Science* 326: 1694-1697.

Counotte, G.H.M., Prins, R.A., Janssen, R.H.A.M., deBie, M.J.A. (1981). "Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL-[2-<sup>13</sup>C]lactate in the rumen of dairy cattle." *Appl. Environ. Microbiol.* 42(4): 649-655.

Creevey, C.J., Kelly, W.J., Henderson, G. and Leahy, S.C. (2014). "Determining the culturability of the rumen bacterial microbiome. " *Microbial.Biotechnol* 7(467-479).

Dansch A.M., Li, S., Andersen, P.H., Khafipour, E., Kristensen, N.B., Plaizier, J.C. (2015). "Indicators of induced subacute ruminal acidosis (SARA) in Danish Holstein cows." *Acta Vet Scand* 17(57): 39.

De Brabander, D.L. De Boever, J.L.; De Smet, A.M.; Vanacker, J.M.; Boucque, C.V.; Bottermann, S.M., (1999). "Evaluation of physical structure in dairy cattle nutrition." In *Recent Advances in Animal Nutrition*: 111-145 P.C. Garnsworthy and J. Wiseman (Eds); Nottingham University Press.

De Campeneere, S., Fiems, L.O., de Bosschere, H., de Boever, J.L., Ducatelle, R. (2002). "The effect of physical structure in maize silage-based diets for beef bulls." *J. Anim. Phys. Anim. Nutr.* 86: 174-184.

Dehority, B.A. (1984). "Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa." *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 182-185.

Dehority, B.A., Orpin, C.G., (1997). "Development of, and natural fluctuations in, rumen microbial populations. ." 196 -245.

Dehority, B.A. und Tirabasso, P.A. (2000). "Antibiosis between ruminal bacteria and ruminal fungi." *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2921-2927.

Dengler, F., Rackwitz, R., Benesch, F., Pfannkuche, H., Gäbel, G. (2013). "Bicarbonate-dependent transport of acetate and butyrate across the basolateral membrane of sheep rumen epithelium." *Acad Physiol.* 210: 403-414.

Erickson, G.E., Milton, C.T., Fanning, K.C., Cooper, R.J.; Swingle J.C., Parrott, J.C., Vogel, G. und Klopstein, T.J. (2003). "Interaction between bunk management and monensin concentration on finishing performance, feeding behavior, and ruminal metabolism during an acidosis challenge with feedlot cattle." *Journal of Animal Science* 81: 2869-2879.

Ettle, T., Obermaier, A., Edelmann, P.; (2014). " Untersuchungen zur „Strukturversorgung“ beim Mastbulle. ." Tagungsband Forum angewandte Forschung in der Rinder- und Schweinefütterung: 23-26.

Fairfield, A.M., Plaizier, J.C., Duffield, T.F., Lindinger, M.I., Bagg, R. Dick, P., McBride, B.W. (2007). "Effects of a prepartum administration of a monensin controlled release capsule on rumen pH, feed intake, and milk production of transition dairy cows." *Journal of Dairy Science* 90: 937-945.

Fernando, S.C., Purvis, H.T., Najar, F.Z., Sukharnikov, L.O., Krehbiel, C.R., Nagaraja, T.G., Roe, B.A., Desilva, U. (2010). "Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet." *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 7482-7490.

Forsberg, C.W., Cheng, K.J., White, B.A. (1997). "Polysaccharide degradation in the rumen and large intestine." *Gastrointestinal Microbiology* 8 Mackie, R.I. und White, B.A., Eds.): 319-379 Chapman and Hall, New York.

Freemann, W.M., Walker, S.J., Vrana, K.E. (1999). "Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential." *Biotechniques* 26: 112-125.

Gesellschaft für Ernährungsphysiologie, GfE, (2001). "Empfehlungen zur Energie und Nährstoffversorgung der Milchkühe und Aufzuchtrinder." DLG Verlag.

Goad, D.W., Goad, C.L., Nagaraja, T.G. (1998). "Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers." *Journal of Animal Science* 76(234-241).

Godfray H.C., Beddington, J. R., Crute I.R., Haddad L., Lawrence D., Muir, J.F., Pretty J., Robinson S.M., Thomas S.M. und Toulmin C. (2010). "Food security: The Challenge of feeding 9 billion people." *Science* 327: 812-818.

Golder, H.M., Denman, S.E., McSweeney, C., Celi, P., Lean, I.J., (2014). "Ruminal bacterial community shifts in grain-, sugar-, and histidine-challenged dairy heifers. ." J. Dairy Sci., 97: 5131–5150.

Gozho, G.N., Krause, D.O., Plaizier, J.C. (2007). "Ruminal lipopolysaccharide concentration and inflammatory response during grain induced subacute ruminal acidosis in dairy cows." Journal of Dairy Science 90: 856-866.

Gschwendtner, S., Leberecht, M., Engel, M., Kublik, S., Dannenmann, M., Polle, A., Schloter, M. (2015). "Effects of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> on microbial community structure at the plant-soil interface of young beech trees (*Fagus sylvatica* L.) grown at two sites with contrasting climatic conditions." Microbial. Ecology. 2015(69): 867-878.

Guan, L.L., Nkrumah, J.D., Basarab, J.A. & Moore S.S., (2008). "Linkage of microbial ecology to phenotype: correlation of rumen microbial ecology to cattle's feed efficiency. ." FEMS Microbiol. Ecol. 288: 85-91.

Gürtler, H., Ketz H.-A., Kolb, E., Schröder, L. und Seidel, H. (1989). "Lehrbuch der Physiologie der Haustiere." Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag.

Hobson, P.N. und Stewart, C.S. (1997). "The rumen Microbial Ecosystem " Springer Science & Business Media: 719.

Huang, L., Forsberg, C.W., Thomas, D.Y. (1988). "Purification and characterization of a chlorid-stimulated cellobiosidase from *Bacteroides succinogenes* S85." J. Bacteriol. 170: 2923-2932.

Hungate, R. E. (1966). "Rumen and its Microbes." New York: Academic Press.

Hungate, R. E., Dougherty, R.W., Bryant, M.P., Cello, R.M. (1952). "Microbiological and physiological changes associated with acute indigestion in sheep." The Cornell veterinarian 42: 423-449.

Hungate, R.E. (1985). "Anaerobic biotransformations of organic matter." LEadbetter, E.R. and Poindexter, J.J. (Eds.) Bacteria in Nature 1: 39-95 New York: Plenum.

Ivan, M., Neill, L., Forster, R., Alimon, R., Rode, L.M., Entz, T. (2000). "Effects of *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium*, and total faune in ruminal fermentation and duodenal flow in wethers fed different diets." Journal of Dairy Science 83: 776-787.

Jami, E., Mizrahi, I. (2012). "Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals." PLoS One 7: e33306.

Jeroch, H., Drochner, W., Simon, O. (1999). "Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere." Eugen Ulmer Verlag Stuttgart 2. Auflage: 126; 119.

---

Joblin, K.N., Matsui, H., Naylor, G.E., Ushida, K. (2002). "Degradation of fresh ryegrass by methanogenic co-cultures of ruminal fungi grown in the presence or absence of *Fibrobacter succinogenes*." *Curr. Microbiol.* 45: 46-53.

Johnson, K.A., Johnson, D.E. (1995). "Methane Emissions from Cattle." *Journal of Animal Science* 73: 2483-2492.

Jouany, J.P., Ushida, K. (1999). "The role of Protozoa in Feed Degestion - Review- " *AJAS* 12(1): 113-128.

Kang, S.H., Evans, P., Morrison, M., McSweeney, C. (2013). "Identification of metabolically active proteobacterial and archaeal communities in the rumen by DNA- and RNA-derived 16S rRNA gene." *St. Lucia/Australia.*

Kelly, D., King, T., Aminov, R. (2007). "Importance of microbial colonozation of the gut in early life to the development of immunity." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 622: 58-69.

Kim, M., Morrison, M., Yu, Z., (2011b). " Phylogenetic diversity of bacterial communities in bovine rumen as affected by diets and microenvironments. ." *Folia Microbiol.* 56: 453-458.

Kim, M., und Yu, Z. (2012). "Quantitative comparisons of select cultured abd uncultured microbial populations in the rumen of cattle fed different diets." *Journal of Animal Science Biotechnol.* 3(1): 28.

Kirchgessner, M. (2011). "Tierernährung." Frankfurt am Main: DLG-Verlag GmbH.

Kittelman, S., Seedorf, H., Walters, W.A., Clemente, J.C., Knight, R., Gordon, J.I. (2013). "Simultaneous amplicon sequencing to explore co-occurrence patterns of bacterial, archaeal and eukaryotic microorganisms in rumen microbial communities." *PLoS ONE* 8: e47879.

Kleen, J.L., Hooijer, G.A., Rehage, J., Noordhuizen, J.P. (2003). "Subacute ruminal acidosis (SARA): a review." *Journal of Veterinary Medicine A. Physiology Pathology and Clinical Medicine* 50: 406-414.

Kleen, J.L., Hooijer, G.A., Rehage, J., Noordhuizen, J.P.T.M . (2004). "Rumenocentesis (rumen puncture): a viable instrument in herd health diagnosis." *Dtsch. Tierartzl. Wochenschr.* 111: 458-462.

Klieve, A.V., Hennessy, D., Ouwkerk, D., Forster, R.J., Mackie, R.I. und Attwood, G.T. (2003). "Establishing populations of *Megasphaera elsdenii* YE 34 and *Butyrivibrio fibrosolvens* YE 44 in the rumen of cattle fed high grain diets." *J. Appl Microbiol* 95: 621-630.

Knnonoff, P. J., Heinrichs, A.J., Lehman, H.A. (2003). "The effect of corn silage particle size on eating behavior, chewing activities, and rumen fermentation in lactating dairy cows." *Journal of Dairy Science* 86: 3343-3353.

Kocherginskaya, S. A., Aminov, R.I., White, B.A. (2001). "Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches." *Anaerobe* 7(3): 119-134.

Koike, S., Pan, J., Kobayashi, Y. und Tanaka, K. (2003). "Kinetics of in sacco fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR." *Journal of Dairy Science* 86(4): 1429-1435.

Koike, S. und Kobayashi, Y. (2001). "Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*." *FEMS Microbiol. Ecol.* 204(2): 361-366.

Krause, D.O., Denman, S.E., Mackie, R.I., Morrison, M., Rae, A.L., Attwood, G.T., McSweeney, C.S. (2003). "Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology and genomics." *FEMS Microbiology Reviews*(27): 663-693.

Krause, D.O., Nagaraja, T.G., Wright, A.D.G., Callaway, T.R. (2013). "Board-invited review: rumen microbiology: leading the way in microbial ecology." *Journal of Animal Science* 91(1): 331-341.

Krause, O.D. und Russel, J.B. (1996). "An rRNA approach of assessing the role of obligate amino acid-fermenting bacteria in ruminal amino acid deamination." *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 815-821.

Larue, R., Yu, Z., Parisi, V.A., Egan, A.R., Morrison, M. (2005). "Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and *rrs* gene sequencing." *Environ. Microbiol.* 7: 530-543.

Latham, M.J., Brooker, B.E., Pettipher, G.L., Harris, P.J. (1978). "Adhesion of *Bacteroides succinogenes* in pure culture and in the presence of *Ruminococcus flavefaciens* to cell walls in leaves of perennial ryegrass (*Lolium perenne*)." *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 156-165.

Leedle, J.A.Z., Bryant, M.P., Hespell, R.B. (1982). "Diurnal variations in bacterial numbers and fluid parameters in ruminal contents of animals fed low- or high-forage diets." *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 402-412.

Lengowski, M., Witzig, M., Möhring, J., Seyfang, G., Rodehutschord, M. (2015). "Effect of silage type in ruminant rations on the abundance of different microbial groups in the rumen of dairy cows during a day." *Berichte der Gesellschaft für Ernährungsohysiologie* Band 24, 2015: 58.

Lettat A., Nozière, P., Silberberg, M., Morgavi, D.P., Berger, C., Martin, C., (2012). "Rumen microbial and fermentation characteristics are affected differently by bacterial probiotic supplementation during induced lactic and subacute acidosis in sheep." *BMC Microbiology* 12(142).

Li, M., Penner, G.B., Hernandez-Sanabria, E., Oba, M., Guan, L.L. (2009). "Effects of sampling location and time, and host animal on assessment of bacterial diversity and fermentation parameters in the bovine rumen." *J. Appl Microbiol* 107: 1924-1934.

Lin, C., Raskin, L., Stahl, D. A. (1997). "Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: comparative analyses using rRNA-targeted oligonucleotide probes." *FEMS Microbiol. Ecol.* 22: 281-294.

Little, R., Martinez-Argudo, I., Shearer, N., Johnson, P., Dixon, R., (2009). "Effects of sampling location and time, and host animal on assessment of bacterial diversity and fermentation parameters in the bovine rumen." *J. Appl Microbiol* 107: 1924-1934.

Lowe, S. E., Theodorou, M.K., Trinci, A.P. (1987). "Cellulases and xylanase of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose and xylan." *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1216-1223.

Maekawa, M., Beauchemin, K.A., Christensen, D.A. (2002). "Effect of concentrate level and feeding management on chewing activities, saliva production, and ruminal pH of lactating dairy cows." *Journal of Dairy Science* 85: 1165-1175.

Mao, S.Y., Zhang, R.Y., Wang, D.S., Zhu W.Y. (2013). "Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation on rumen microbiota in dairy cattle using pyrosequencing." *Molecular biology, genetics and biotechnology.*

Martens, H., Breves, G., Leonhard-Marek, S. (2000). "Funktion der Vormägen." In: Engelhardt, von W. und Breves, G. (Hrsg.): *Physiologie der Haustiere*. Enke Verlag. Stuttgart: 344-363.

McAllan, A.B., Sutton, J.D., Beever, J.D., Beever, D.E., Napper, D.J. (1994). "Rumen fermentation characteristics and duodenal nutrient flow in lactating cows receiving two types of grass silage with two levels of concentrates. ." *Anim Feed Sci Technol* 46 (277-291).

McCann, J.C., Wiley, L.M., Forbes, T.D., Rouquette, F.M. Jr., Tedeschi, L.O. (2014). "Relationship between the rumen microbiome and residual feed intake-efficiency of Brahman bulls stocked on bermudagrass pastures." *PLoS One* 9(3): e91864.

---

McGavin, M. und Forsberg, C.W. (1996). "Catalytic and substrate-binding domains of endoglucanase 2 from *Bacteroides succinogenes*." *J. Bacteriol.* 171: 3310-3315.

McSweeney, C.S., Denman, S.E., Wright, A.-D.G., Yu, Z., (2006). " Application of recent DNA/RNA-based techniques in rumen ecology. ." AAAP Conference, Korea. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 20: 283-294.

McSweeney, C. und Mackie, R.I. (2012). "Microorganisms and ruminant digestion: State of knowledge, trends and future prospects." Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture.

Merry, R.J. und McAllen, A.B. (1983). "A comparison of the chemical composition of mixed bacteria harvested from the liquid and solid fractions of rumen digesta." *Br. J. Nutr.* 50(3): 701-709.

Mertens, D. R. (1997). "Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows." *Journal of Dairy Science* 80: 1463-1481.

Michalet-Doreau, B., Fernandez, I., Fonty, G. (2002). "A compared ison of enzymatic and molecular approaches to characterize the cellulolytic microbial ecosystem of the rumen and the cecum." *Journal of Animal Science* 80(3): 790-796.

Miron, J., Duncan, S.H., Stewart, C.S. (1994). "Interactions between rumen bacterial strains during the degradation and utilization of the monosaccharides of barley straw cell-walls." *J. Appl. Bacteriol.* 76: 282-287.

Miron, J., Yokoyama, M.T., Lamed, R. (1989). "Bacterial cell surface structures involved in lucerne cell wall degradation by pure cultures of cellulolytic rumen bacteria." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 218-222.

Miron, J. und Ben-Ghedalia, D. (1993). "Digestion of cell-wall monosaccharides of ryegrass and alfalfa hays by the ruminal bacteria *Fibrobacter succinogenes* and *Butyrivibrio fibrosolvens*." *Can. J. Microbiol.* 39: 780-786.

Mironov, A. S. und Skuhodolets, V.V. (1979). "Promoter-like mutants with increased expression of the *Escherichia coli* uridine phosphorylase structural gene." *J. Bacteriol.* 137: 802-810.

Moir, R. J., Somer, M. (1957). "Ruminal flora studies. VIII The Influence of rate and method of feeding a ration upon its digestibility, upon ruminal function, and upon the ruminal population." *Aust. J. Agric. Res.* 8: 253-265.

Monteils, V., Rey, M., Silberberg, M., Cauquil, L., Combes, S. (2012). "Modification of activities of the ruminal ecosystem and its bacterial and protozoan composition during repeated dietary changes in cows." *Journal of Animal Science* 90: 4431-4440.

---

Moss, A.R., Jouany, J.-P., Newbold, J. (2000). "Methane production by ruminants: its contribution to global warming." *Ann. Zootech.* 49: 231-253.

Nagaraja, T.G., Bartley, E.E., Fina, L.R., Anthony, H.D. (1978). "Relationship of rumen gram-negative bacteria and free endotoxin to lactic acidosis in cattle." *Journal of Animal Science* 47: 1329-1336.

Nocek, J.E. (1997). "Bovine acidosis: implications on laminitis." *Journal of Dairy Science* 80: 1005-1028.

Nozière P, Steinberg, W., Silberberg, M., Morgavi, D.P. (2014). "Amylase addition increases starch ruminal digestion in first-lactation cows fed high and low starch diets." *Journal of Dairy Science* 97(4): 2319-2328.

Ölschläger, V. (2007). "Molekularbiologische und enzymatische Untersuchungen zum Einfluss von Partikellänge und Konzentratanteil auf Parameter der fibrolytischen Pansenverdauung." Dissertation, Göttingen.

Orpin, C.G. (1975). "Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*." *J. Gen. Ecosystem* 91: 249-262.

Orpin, C.G. und Joblin, K.N. (1997). "The rumen anaerobic fungi." *The Rumen Microbial Ecosystem* (Hobson P.N. & Stewart, C.S., eds.): 140-195; Elsevier, London.

Ouwerkerk, D., Klieve, A.V. und Forster, R.J. (2002). "Enumeration of *Megasphaera elsdenii* in rumen contents by real-time Taq nuclease assay." *J. Appl Microbiol* 92: 753-758.

Ozutsumi, Y., Tajima K., Takenaka, A., Itabashi, H. (2005). "The Effect of Protozoa on the Composition of Rumen Bacteria in Cattle Using 16s rRNA Gene Clone Libraries." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 69(3): 499-506.

Ozutsumi Y., Tajima K., Takenaka A., Itabashi H. (2006). "Real time PCR detection of the effect of protozoa on rumen bacteria in cattle." *Curr. Microbiol.* 52(158-162).

Penner, G.B., Aschenbach, J.R., Gäbel, G., Rackwitz, R., Oba, M. (2009b). "Epithelial capacity for apical uptake of short chain fatty acids is a key determinant for intraruminal pH and the susceptibility to subacute ruminal acidosis in sheep." *The Journal of Nutrition*: doi:10.3945.

Phillipson, M.A. (2008). "Digestion in the ruminant" DOI: 10.1111/j.1469-185X.1944.tb00301.

Pitta, D. W., William Pinchak, E., Dowd, S.E., Osterstock, J., Gontcharova, V., Youn, E., Dorton, K., Yoon, I., Min, B.R., Fulford, J.D., Wickersham, T.A., Malinowski, D.P. (2010). "Rumen Bacterial Dynamics Associated with Changing From Bermudagrass Hay to Grazed Winter Wheat Diets." *Microbial. Ecology.* 59: 511-522.

Plazier, J. C., Krause, D.O., Gozho, G.N., McBride, B.W. (2008). "Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences." *Vet. J.* 176: 21-31.

Prins, R. A., vanRheenen, D.L., van Klooster, A.T. (1983). "Characterization of microbial proteolytic enzymes in the rumen." *J. Microbiol. Serol.* 49(585-595).

Ranilla, M. J. und Carro., M.D. (2003). "Diet and procedures used to detach particle-associated microbes from ruminal digesta influence chemical composition of microbes and estimation of microbial growth in rusitec fermenters." *Journal of Animal Science* 81: 537-544.

Russel, J. B. (2002). "Rumen Microbiology and its Role in Ruminant Nutrition." Ithaca, NY: James B. Russell.

Russell, J.B., Hino, T. (1985). "Regulation of lactate production in *Streptococcus bovis*: a spiraling effect that contributes to rumen acidosis." *Journal of Dairy Science* 68(7): 1712-1721.

Rustomo, B., Alzahal, O., Odongo, N.E., Duffield, T.F., McBride, B.W. (2006). "Effects of rumen acid load from fed and forage particle size on ruminal pH and dry matter intake in the lactating dairy cow." *Journal of Dairy Science* 89: 4758-4768.

Sadet-Bourgeteau, S., Martin, C., Morgavi, D.P. (2010). "Bacterial diversity dynamics in rumen epithelium of wethers fed forage and mixed concentrate forage diets." *Veterinary Microbiology* 146: 98-104.

Scheidemann, C. (2001). "Vergleichende Untersuchungen zur Fütterung von Totalen Mischrationen (TMR) bei Milchkühen." Dissertation, Geldern/Niederrhein.

Sharp, R., Ziemer, C.J., Stern, M.D., Stahl, D. A. (1998). "Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a model rumen system." *FEMS Microbiol. Ecol.* 26: 71-78.

Shi, Y., Weimer, P.J. (2002). "Response surface analysis of the effects of pH and dilution rate on *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 in cellulose-fed continuous culture." *Applied Environmental Microbiology* 58: 2538-2591.

Singh, K. M., Pandya, P.R., Tripathi, A.K., Patel, G.R., Parnerkar, S., Kothari, R.K., Joshi, C.G. (2014). "Study of rumen metagenome community using qPCR under different diets." *Meta Gene* 2: 191-199.

Skillman, L.C., Toovey, A.F., Williams, A.J., Wright, A.-D.G. (2006). "Development and validation of a real-time PCR method to quantify rumen protozoa and examination of variability between protozoal populations in sheep fed a hay based diet." *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 200-206.

Smith P., Gregory, P.J., van Vuuren D., Obersteiner M., Havlik P., Rounsevell M., Woodes J., Stehfest E., Bellarby J. (2010). *Compet. land. Phil. Trans. R. Sco.* 365: 2941-2957.

Spann, B. (1993). "Fütterungsberater Rind." Verlagsunion Agrar.

Stone, W.C. (2004). "Nutritional approaches to minimize subacute ruminal acidosis and laminitis in dairy cattle." *Journal of Dairy Science* 87: E13-E26.

Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M. und Benno, Y. (2001). "Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR." *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2766-2774.

Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Ogata, K., Nakamura, M., Matsui, H., Benno, Y. (1999). "Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries." *FEMS Microbiol. Ecol.* 29: 159-169.

Tajima, K., Arai, S., Ogata, K., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., Aminov, R., Benno, Y. (2000). "Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet." *Anaerobe* 6: 273-284.

UNPD , (2012). "Annual Report 2012 " New York.

Van Soest, P.J. (1994). "Nutritional Ecology of the Ruminant." second ed. Cornell University Press, Ithaca, NY.

Větrovský T., Baldrian, P. (2013). "The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses." *PLoS One* 8(2).

Wallace, R.J., Cheng, K.J., Dinsdale, D., Orskov, E.R. (1979). "An independent microbial flora of the epithelium and its role in the ecomicrobiology of the rumen." *Nature* 279: 424-426.

Weimer, P.J., Stevenson, D.M., Mantovani, H.C., Man, S.L.C. (2010). "Host specificity of the ruminal bacterial community in the dairy cow following near-total exchange of ruminal contents." *Journal of Dairy Science* 93: 5902-5912.

---

Welkie, D.G., Stevenson, D.M. and Weimer, P.J. (2010). "ARISA analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle." *Anaerobe* 16: 94-100.

Whitford, M.F., Teather, R.M., Forster, R.J. (2001). "Phylogenetic Analysis of Methanogens from the Bovine Rumen." *BMC BioMed Central Microbiology* 1: 5.

Wichern, A. (2011). "Untersuchungen zum Einfluss von Grassilagen mit auffällig niedrigen Reineiweißanteilen auf bislang nicht identifizierte Substanzen im Pansensaft (in vitro)." Dissertation. Hannover.

Yang, W. Z., Beauchemin, K.A. (2006). "Effects of physically effective fiber on chewing activity and ruminal pH of dairy cows fed diets based on barley silage." *Journal of Dairy Science* 89: 217-228.

Yang, W.Z., Beauchemin, K.A., Rode, L.M. (2001). "Effects of grain processing, forage to concentrate ratio, and forage particle size in rumen pH and digestion by dairy cows." *Journal of Dairy Science* 84: 2203-2216.

Yu, Z., Yu, M., Morrison, M. (2006). "Improved serial analysis of V1 ribosomal sequence tags (SARST-V1) provides a rapid, comprehensive, sequence-based characterization of bacterial diversity and community composition." *Environ. Microbiol.* 8: 603-611.

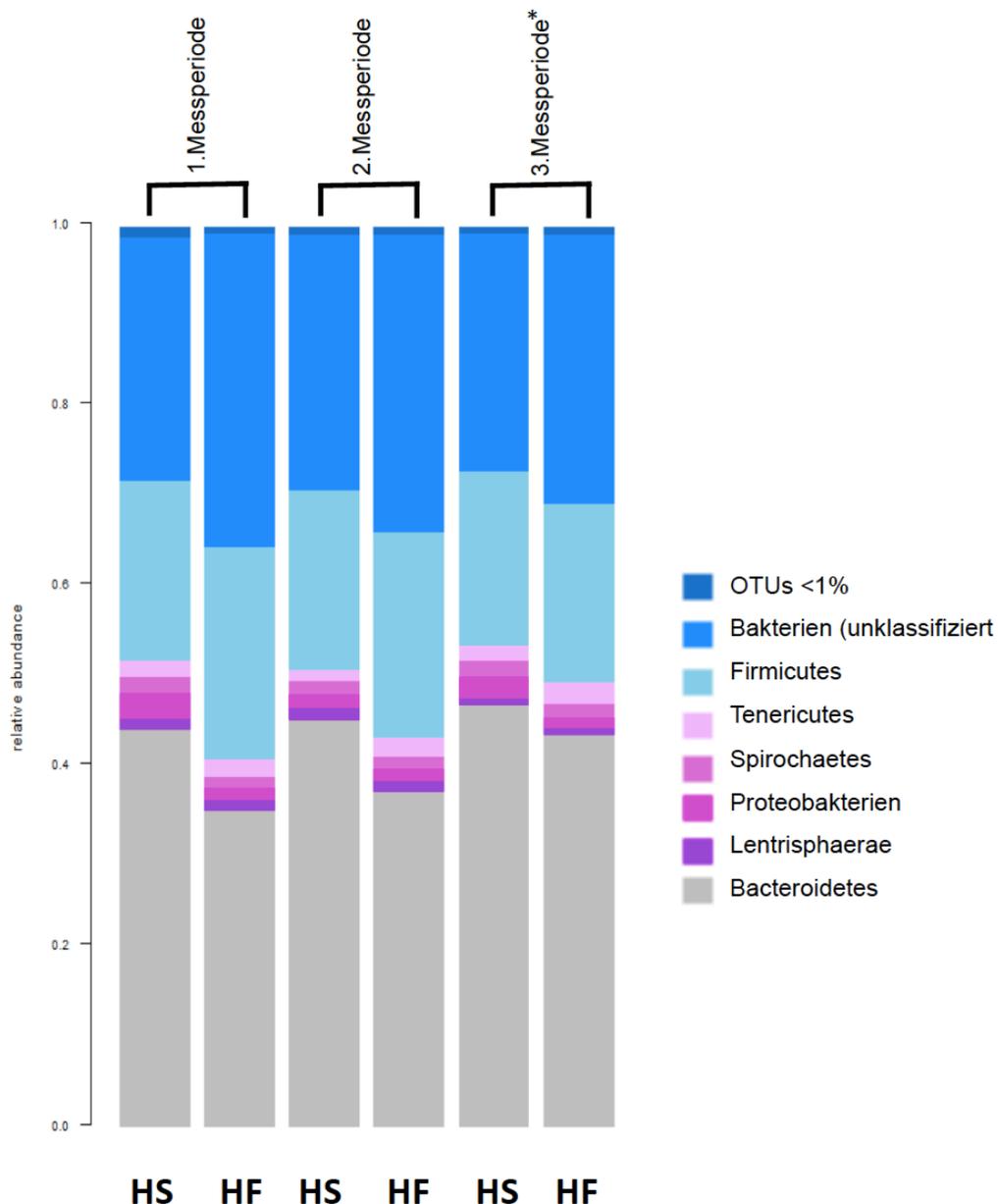
Zebeli, Q., Tafaj, M., Junck, B., Mansmann, D., Steingass, H., Drochner, W. (2008). "Evaluation of the effects of dietary particle fractions on fermentation profile and concentration of microbiota in the rumen of dairy cows fed grass silage-based diets." *Archives of Animal Nutrition* 62(3): 230-240.

Zhi, Z., Shengyong, M., Weiyun, Z. (2012). "Effects of ruminal infusion of garlic oil on fermentation dynamics, fatty acid profile and abundance of bacteria involved in biohydrogenation in rumen of goats." *Asian-Australas J Anim Sci* 25(7): 962-970.

Ziemer, C. J., Sharp, R., Stern, M. D., Cotta, M. A., Whitehead, T. R., Stahl, D. A. (2000). "Comparison of microbial populations in model and natural rumens using 16S rRNA-targeted probes." *Environ. Microbiol.* 2: 632-643.

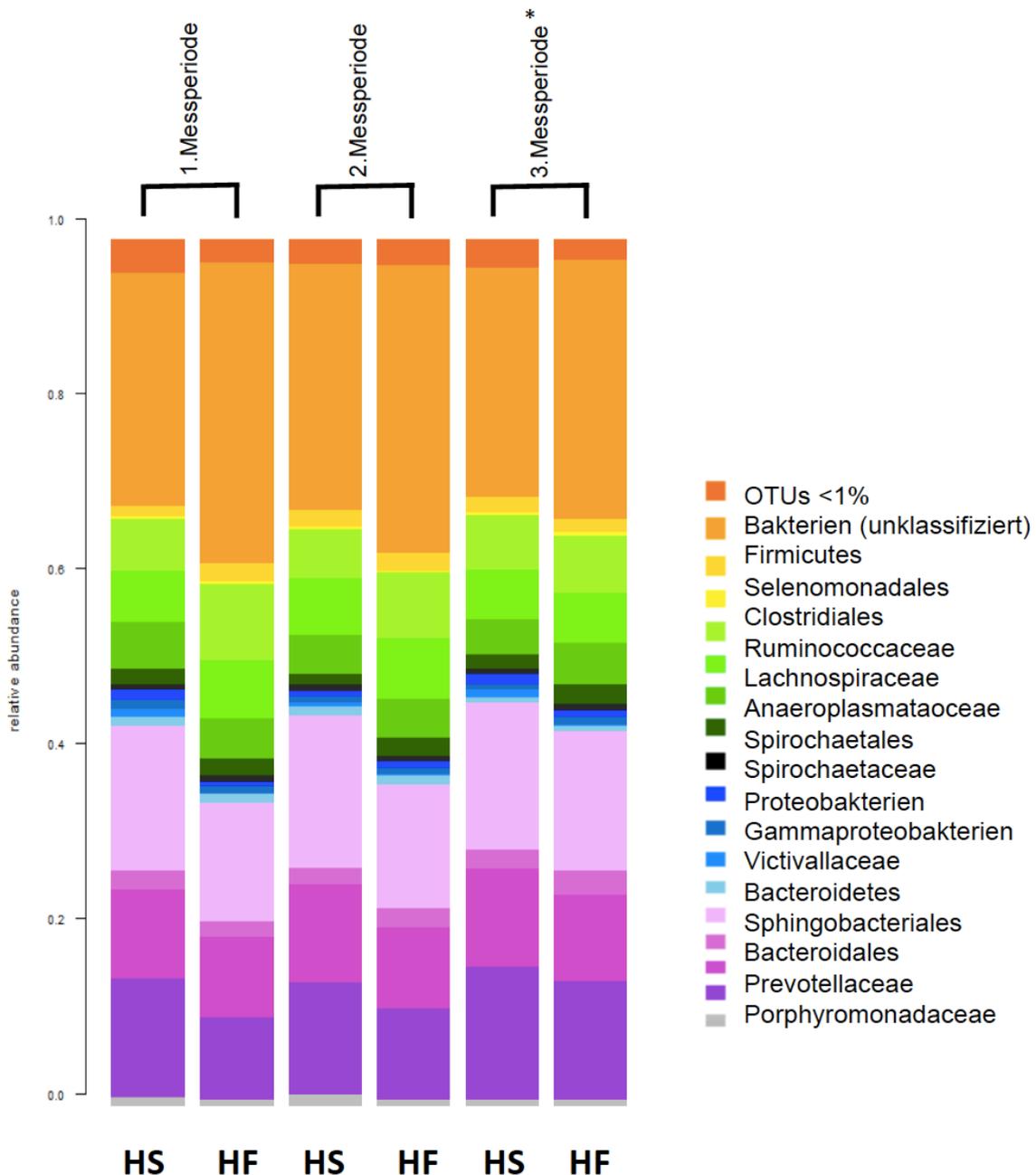
Zipper, H. (2004). "Entwicklung analytisch-molekularbiologischer Verfahren zur Konstruktion einer Plasmid-Genbank aus Boden-DNA in *Escherichia coli* und deren Durchmusterung nach neuen Enzymen für die technische Anwendung." Dissertation. Stuttgart.

## Anhang



**Abb. 36: Hauptgruppenmuster des Mikrobioms mittels Next-Generation-Sequencing bei stärkereicher (HS) und faserreicher (HF) Ration.** Das Muster der Hauptgruppen und die Veränderungen dieser nach einem Wechsel der Rationen (Messperiode 1-3) sind hier dargestellt. Die Abbildung wurde von der AG Schloter (HMGU) erstellt und für die vorliegende Arbeit modifiziert. Die Farbskala auf der rechten Seite zeigt die identifizierten Mikroorganismengruppen sowie den geringen Anteil an unbekanntem Reads. Die drei Balken innerhalb einer Gruppe spiegeln jeweils die unterschiedlichen Rationen innerhalb eines Fütterungsregimes wider. Die Versuchstiere mit der HS Ration bekamen in der zweiten Periode die gegensätzliche HF Ration und umgekehrt. \* Zusätzlich zu Untersuchung mittels qPCR wurde ein weiterer Wechsel auf die Ausgangsration in Messperiode 3 angeschlossen

## Anhang



**Abb. 37: Nähere Betrachtung des Musters der Mikrobiota mittels Next-Generation-Sequencing bei stärkereicher (HS) und faserreicher (HF) Ration.** Das nun weiter aufgeschlüsselte Muster und die Veränderungen dabei nach einem Wechsel der Rationen (Messperiode 1-3) sind hier dargestellt. Die Abbildung wurde von der AG Schloter (HMGU) erstellt und für die vorliegende Arbeit modifiziert. Die Farbskala auf der rechten Seite zeigt die identifizierten Mikroorganismengruppen sowie den nun geringen Anteil an unbekanntem Reads. Die drei Balken innerhalb einer Gruppe spiegeln jeweils die unterschiedlichen Rationen innerhalb eines Fütterungsregimes wider. Die Versuchstiere mit der HS Ration bekamen in der zweiten Periode die gegensätzliche HF Ration und umgekehrt. \* Zusätzlich zu Untersuchung mittels qPCR wurde ein weiterer Wechsel auf die Ausgangsration in Messperiode 3 angeschlossen

## Anhang

Tabelle 22 Kongressbeiträge

Autoren	Titel	Kongress/Jahr
Ziβler E, Windisch W, Ettle T, Bolduan C	Cluster analysis of abundance of total bacteria in the rumen of bulls after fattening with varying structural value of diets.	Proc. Soc. Nutr. Physiol. (25), Hannover, 08.-10.03.2016. Ed.: Gesellschaft für Ernährungsphysiologie. Frankfurt: DLG-Verlags-GmbH, p. 98. ISBN: 978-3-7690-4109-5.
Ziβler E, Ettle T, Windisch W, Fahn C	Einfluss einer unterschiedlichen Strukturversorgung von Mastbullen auf die Endpunkte der ruminalen Fermentation und das ruminale Mikrobiom nach 24-stündiger Nüchterung.	Fahn C, Windisch W (2014): 52. Jahrestagung der Bayerischen Arbeitsgemeinschaft Tierernährung e.V. - "Tierernährung und Umwelt", Eigenverlag, BAT e.V., Freising. pp. 77-81; ISBN; 978-3-9816116-1-8
Fahn C, Ziβler E, Windisch W	Anpassungsfähigkeit von Pansenmikroorganismen bei Wechsel von energie- zu rohfaserreicher Fütterung.	Zentralinstitut Hans Eisenmann Zentrum für Agrarwissenschaften der TU München: Tagungsband, 5. Agrarwissenschaftliches Symposium: Agrarische Stoffkreisläufe, Nährstoffmanagement - Umweltschutz - Ressourceneffizienz. Eigendruck Hans Eisenmann Zentrum, 25.09.2014, Freising. p.54

Fahn C, Prücklmaier J, <u>Zißler E</u> , Windisch W	Erfassung unterschiedlicher Populationen von Pansenmikroorganismen mittels qPCR bei Wechsel von energie- und rohfaserreicher Fütterung.	Arbeitsgemeinschaft für Lebensmittel-, Veterinär- und Agrarwesen - „Angewandte Forschung – gibt es neue Wege?“; ALVA-Jahrestagung 2014, Wieselburg-Land, 19.-20. Mai 2014; p 328-330. ISSN: 1606-612X
<u>Zißler E</u> , Fahn C, Windisch W, Fischer C, Aichner V, Ettle T	Proteinbewertung von Sojaprodukten aus bayerischem Anbau und heimischer Verarbeitung.	Arbeitsgemeinschaft für Lebensmittel-, Veterinär- und Agrarwesen - „Angewandte Forschung – gibt es neue Wege?“; ALVA-Jahrestagung 2014, Wieselburg-Land, 19.-20. Mai 2014; p 328-330. ISSN: 1606-612X
Fahn C, Windisch W, <u>Zißler E</u>	Characterization of the rumen microbiome with DNA-classification by qPCR including (bio)chemical parameters of rumen fermentation.	Proc. Soc. Nutr. Physiol. (23), Göttingen, 18.-20.03.2014. Ed.: Gesellschaft für Ernährungsphysiologie. Frankfurt: DLG-Verlags-GmbH, p. 60. ISBN: 978-3-7690-4107-1
<u>Lederer E</u> , Windisch W, Fahn C	Charakterisierung des ruminalen Mikrobioms durch DNAklassifizierung mittels qPCR.	Mair C, Kraft M, Wetscherek W, Schedle K, 12. BOKU Symposium Tierernährung - Auf der Suche nach neuartigen Futtermitteln und Technologien in der Tierernährung. 12, Eigenverlag, Institut für Tierernährung, Tierische Lebensmittel und Ernährungsphysiologie, Wien; p 317 – 322. ISBN: 978-3-900932-13-8

## Anhang

### Protokoll DNA Extraktion Pansensaft manuell:

#### Herstellung CTAB Lysis buffer:

2% w/v CTAB

100mM Tris-HCl

20 mM EDTA

1,4 M NaCl

#### Ablauf:

Proben wurden bei  $-40^{\circ}\text{C}$  für 48 Stunden **gefriergetrocknet**

##### 1. Zelllyse:

- 0,2 g der Probe in ein 2 ml Röhrchen und 900  $\mu\text{l}$  Lysis Puffer dazu mit 0,2 g der MaximGreen  
Lysis buffer: CTAB Lysis Puffer  
Homogenisieren für 20 sec auf dem Mini-Beadbeater
- Inkubation bei  $65^{\circ}\text{C}$  für 60 min
- Zentrifugieren bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 5 min mit 16 000 g; Überstand in ein neues 2 ml Eppendorf tube
- Zu Überstand 500  $\mu\text{l}$  Qiazol Lysis Reagenz
- Proben mixen und inkubieren für 10 min bei RT
- 500  $\mu\text{l}$  Chloroform dazu und zentrifugieren bei  $4^{\circ}\text{C}$  12 000g für 10 min zur Phasentrennung

##### 2. Ausfällung der Nukleinsäuren:

- Mittlere Phase mit 500  $\mu\text{l}$  Isopropanol und 50  $\mu\text{l}$  10 M Ammonium Acetat  
DNA ausfällen
- Über Nacht inkubieren bei  $-20^{\circ}\text{C}$
- Am nächsten Tag: Zentrifugieren bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 15 min bei 7500 g, Überstand mit einer Pipette werfen, Waschen des Pellets (2X) mit 70% Ethanol und das Pellet Lufttrocknen für 3 min
- Lösen des Pellets in 200  $\mu\text{l}$  Wasser und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  lagern

## Protokoll MP Fast DNA Spit Kit for feces

**FastDNA® SPIN Kit for Feces**

9. Transfer supernatant to the **Binding Matrix Solution** in the 15 mL conical. Shake gently by hand to mix, then place on a shaker/cocker for 3-5 minutes.

10. Centrifuge samples at 14,000 x g for 2 minutes. Decant the supernatant.

11. Wash the binding mixture pellet by gently resuspending with 1 mL **Wash Buffer #1**.

12. The following step will require two spins. First, transfer approximately 600 µL of the binding mixture to a SPIN Filter tube and centrifuge at 14,000 x g for 1 minute. Empty the catch tube. Add the remaining binding mixture to the SPIN Filter tube and centrifuge as before. Empty the catch tube again.

13. Add 500 µL of prepared **Wash Buffer #2** to the SPIN Filter tube and gently resuspend using the force of the liquid from the pipette tip to resuspend the pellet. **Do not vortex!**

**NOTE: Ensure that ethanol has been added to the Wash Buffer #2. See section 3.1.**

14. Centrifuge samples at 14,000 x g for 2 minutes. Discard the flow-through.

15. Centrifuge the sample again for 2 minutes to extract residual ethanol from the binding matrix and dry the sample.

16. Transfer the SPIN Filter bucket to a clean 1.9 mL **Catch Tube**. Add 60-100 µL **TES**. Flick the tube or stir the matrix with a pipette tip to resuspend the pellet. Do not vortex!

17. Centrifuge samples at 14,000 x g for 2 minutes to elute purified DNA into the clean catch tube. Discard the SPIN filter. DNA is now ready for PCR and other downstream applications. Store at -20°C for extended periods or 4°C until use.

**6. Troubleshooting****6.1 Humic Acid Contamination**

Some stool samples contain very high levels of humic acids which may co-purify with the genomic DNA. PCR applications are hindered by the presence of humic acid. If the final eluted DNA returns a negative PCR result, then humic acid contamination might be the reason. The FastDNA® SPIN Kit for Feces is designed to eliminate humic acid contamination in feces. If humic acid contamination is suspected, repeat the protocol from the beginning with a fresh stool sample and repeat steps #1, #10 & #11 once within each step is reached. (2 times total)

mg of dry stool and add an equivalent volume of buffer (~500 µL). Vortex the sample at a low speed to create a homogeneous solubilized stool sample. Transfer 500 mg of the solubilized sample to the Lysing Matrix E tube and process as normal

**4. Safety Precautions**

PLS Solution, Binding Matrix and Wash Solution #2 contain components that, when in contact with human tissue, may cause irritation. Wear personal protective equipment to prevent contact with the skin or mucus membranes (gloves, lab coat, and eye protection). Consult the Material Safety Data Sheet at [www.mpbio.com](http://www.mpbio.com) for additional details.

**5. Protocol**

**NOTE: See section 3.3 for other important guidelines.**

1. In a 2 mL **Lysing Matrix E** tube, add 500 mg feces sample, 825 µL **Sodium Phosphate Buffer**, and 275 µL of PLS solution. Shake to mix. Vortex 10-15 seconds

2. Centrifuge samples at 14,000 x g for 5 minutes and decant supernatant.

3. Add 978 µL **Sodium Phosphate Buffer** and 122 µL **MT Buffer**. Shake vigorously or vortex briefly to mix

4. Homogenize samples in the FastPrep® 24 instrument at setting 6.0m/s for 40 seconds.

5. Centrifuge samples at 14,000 x g for 5 minutes.

**NOTE: Extending centrifugation to 15 minutes can enhance elimination of excessive debris from large samples, or from cells with complex walls.**

6. Transfer the supernatant to a clean 2.0 mL centrifuge tube.

7. Add 250 µL of PPS solution, shake vigorously to mix, and incubate at 4°C for 10 minutes. **Do not vortex!** Centrifuge samples at 14,000 x g for 2 minutes.

8. While samples are centrifuging, add 1 mL of **Binding Matrix Solution** to a clean 15 mL conical tube (not supplied).



6



5

## Protokoll Analytic Jena innuPREP Gel Extraction Kit

Standard protocol: DNA extraction from agarose gel slices (TAE or TBE agarose gels)

### 10 Standard protocol: DNA extraction from agarose gel slices (TAE or TBE agarose gels)



**Note**  
The standard protocol allows the elution of the bound DNA fragment with standard volumes of Elution Buffer (30 – 50 µl).

**Important Note!**

Optionally, heat the needed amount of Elution Buffer to 50°C. The final elution step with heated Elution Buffer will increase the DNA yield!

1. Excise the DNA fragment from the agarose gel with a sharp scalpel.

**Note:** Minimize the agarose gel slice. Check the weight. Do not use more than 300 mg gel slice for one Spin Filter!

2. Transfer the gel slice into a 1.5 ml or 2.0 ml reaction tube and add the 650 µl Gel Solubilizer.

3. Incubate for 10 min at 50 °C until the agarose gel slice is completely dissolved.

**Note:** We recommend to use a shaking platform (thermal mixer, water bath or another rocking platform) for a continuous shaking of the sample. Alternatively, vortex the sample 3–4 times during incubation.

4. Add 50 µl Binding Optimizer and mix the suspension by vortexing or pipetting some times up and down.

5. Apply the sample onto the Spin Filter (green) located in a 2.0 ml Receiver Tube. Close the cap and centrifuge at 10,000 x g (~12,000 rpm) for 1 min.

**Note:** If the solution has not completely passed through the Spin Filter, centrifuge again at higher speed or prolong the centrifugation time.

Discard the filtrate and re-use the Receiver Tube. Place the Spin Filter back into the 2.0 ml Receiver Tube.

6. Open the Spin Filter and add 700 µl Washing Solution LS, close the cap and centrifuge at 10,000 x g (~12,000 rpm) for 1 min. Discard the filtrate and re-use the Receiver Tube. Place the Spin Filter back into the 2.0 ml Receiver Tube.

7. Repeat point 6 completely.

8. Centrifuge at max. speed for 2 min to remove all traces of ethanol. Discard the 2.0 ml Receiver Tube.

Standard protocol: DNA extraction from agarose gel slices (TAE or TBE agarose gels)

9. Place the Spin Filter into a 1.5 ml Elution Tube. Carefully open the cap of the Spin Filter and add 30 – 50 µl Elution Buffer (optionally pre-warmed to 50 °C). Incubate at room temperature for 1 min. Centrifuge at 6,000 x g (~8,000 rpm) for 1 minute. A second elution step will increase the yield of extracted DNA.



**Note**  
The DNA can be eluted with a lower or a higher volume of Elution Buffer (depends on the expected yield of DNA). Elution with lower volumes of Elution Buffer increases the final concentration of DNA. Store the extracted DNA at +4 °C. For long time storage placing at –20 °C is recommended.

## Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 23: Laborgeräte

<b>Laborgerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>DNA-Messung</b>	Nano Drop™	PeqLab Laboratories, Deutschland
<b>PCR-Cycler</b>	Eppendorf Mastercycler® Gradient S	Eppendorf, Deutschland
	ThermoCycler T100	Biorad, Deutschland
<b>Zentrifugen</b>	Centrifuge 5424	Eppendorf, Deutschland
	Universal 320R	Hettich, Deutschland
	Hermle Z 323	Hermle Labortechnik, Deutschland
<b>Spektrophotometer</b>	UV MC <sup>2</sup>	SAFS Monaco, Monaco
<b>Gaschromatograph</b>	Clarus 580	Perkin Elmer, United States
<b>pH-Meter</b>	Schott GC 842	Schott AG, Deutschland
<b>Vortexer</b>	Infrared Vortex Mixer Wizard	Velp scientifica, Italien
<b>Thermomixer</b>	Heiz Thermomixer MHR 13	Ditabis, Deutschland
<b>Pipetten</b>	1000 µL ErgoOne	StarLab, Deutschland
	200 µL ErgoOne	StarLab, Deutschland
	100 µL ErgoOne	StarLab, Deutschland
	0,5-2,5 µL ErgoOne	StarLab, Deutschland
	8 Kanal ErgoOne	StarLab, Deutschland
	Multipette Stream	Eppendorf, Deutschland
<b>Gelkammer</b>	Horizital Midi-Gel Kit	C.B.S. Scientific, United States
<b>Stromquelle</b> <b>Gelkammer</b>	peqPOWER 250V	PeqLab, Deutschland

Tabelle 24: Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Reaktionsgefäß</b>	Eppendorf 1,5 mL Tubes	Eppendorf, Deutschland
	2mL Tubes	MP Biomedicals, United States
	Eppendorf 5 mL Tubes	Eppendorf, Deutschland
<b>Spitzen für qPCR</b>	TipOne® Pipettenspitzen, 1000 µL	StarLab, Deutschland
	TipOne® Pipettenspitzen, 200 µL	StarLab, Deutschland
	TipOne® Pipettenspitzen, 10 µL	StarLab, Deutschland
	Spitzen Multipipette	Eppendorf, Deutschland
<b>qPCR</b>	FrameStar® 96 Skirted	4titude, United Kingdom
	Klebefolien	StarLab, Deutschland
	HeadSealing Folien	4titude, United Kingdom
<b>Falcon-Röhrchen</b>	50 mL	Greiner bio-one, Deutschland
	25 mL	Greiner bio-one, Deutschland
<b>Parafilm</b>		Fisher Scientific GmbH, Deutschland
<b>Spritzenvorsatzfilter</b>	0,2 µm PTFE Membran	VWR international, United States
<b>Spritzen</b>	2 mL BD Discardit™ ii	BD, United States
<b>Vials</b>	100 Vials N9, flach, SF, 1,5mL mit Deckel	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Deutschland
<b>Küvetten</b>	UV-Küvetten	Roth, Deutschland

## Verwendete Reagenzien

Tabelle 25: Chemikalien und Biochemikalien

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Agarose</b>	PeqLab, Deutschland
<b>Ethanol absolut</b>	J.T. Baker, United States
<b>Ethylendiamintraacetat (EDTA)</b>	Roth, Deutschland
<b>Ammonium Acetat</b>	J.T. Baker, United States
<b>Chloroform</b>	J.T. Baker, United States
<b>Natriumchlorid (NaCl)</b>	Roth, Deutschland
<b>Tris-Chlorwasserstoff (Tris-HCl)</b>	Roth, Deutschland
<b>Ameisensäure</b>	Merck, Deutschland
<b>Meta-Phosphorsäure (25%)</b>	Merck, Deutschland
<b>Gel Red</b>	Invitrogen, Deutschland
<b>Qiazol Lysis Reagenz</b>	Qiagen, Deutschland
<b>Matrix Green Keramik Beads</b>	MP Biomedicals, United States
<b>MP FastDNA Spin Kit for Feces</b>	MP Biomedicals, United States
<b>MiniElute PCR Purification Kit</b>	Qiagen, Deutschland
<b>innuPREP Gel Extraction Kit</b>	Analytik Jena, Deutschland

---

## Verwendete Puffer und Lösungen

### CTAB-Puffer für 1L

- 20,0 g Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)
  - 15,601 g Tris-HCl
  - 58,45 g EDTA
  - 81,816 g NaCl
  - mit Aqua bidest. auf 1000 mL aufgefüllt
- pH-Wert auf 5 eingestellt

### Ammonium Acetat 10 M Lösung (100mL)

- 77,08g Ammonium Acetat
- mit Aqua bidest. auf 100 mL aufgefüllt

### 70% Ethanol (50 mL)

- 35 mL reines Ethanol
- mit aqua bidest. auf 50 mL aufgefüllt

### TAE-Puffer (50x) für 1L

- 242 g Tris base
- 57,1 mL Eisessig
- 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
- mit aqua bidest. auf 1000 mL aufgefüllt

---

## Verwendete Programme und Datenbanken

Tabelle 26: Verwendete Softwareprogramme und Datenbanken

<b>Programm</b>	<b>Version</b>	<b>Hersteller</b>
<b>SAS</b>	SAS 9.3	Cary, United States
<b>Realplex s datatool</b>	2.2	Eppendorf, Deutschland
<b>Berechnung Kopienzahl</b>		<a href="http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html">http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html</a>

---

## Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Wilhelm Windisch danke ich für die Möglichkeit, unter seiner Anleitung meine Dissertation schreiben zu dürfen und mich mit diesem sehr interessanten Thema auseinandersetzen zu dürfen.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Michael Schloter für die Prüfung der Arbeit als Zweitgutachter bedanken. Ebenso danke ich ihm und seiner Arbeitsgruppe für die Sequenzierung der Proben und Überlassung der Daten für meine Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt auch für die herzliche und engagierte Betreuung meiner Arbeit durch Frau Dr. Carmen Bolduan. Ihre Anregungen, Erläuterungen und die Diskussionen mit ihr trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes, die mich so geduldig bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Ein Dank geht an die Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) sowie Herrn Thomas Ettle für die Überlassung der Proben und die gute Zusammenarbeit.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei der Hanns-Seidel-Stiftung bedanken für die finanzielle Förderung meiner Arbeit mit einem Promotionsstipendium.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Mann Ulrich, die mir während dieser Zeit immer eine unglaubliche Hilfe waren und stets ein offenes Ohr für meine Probleme hatten. Meinem Mann danke ich für seinen endlosen Beistand und die unermüdliche Unterstützung während allen Phasen meiner Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an alle die mich auf Ihre Art und Weise während meiner Doktorarbeit unterstützt haben und durch kleine Gesten eine große Hilfe waren.

## Lebenslauf



### PERSÖNLICHE ANGABEN

---

Geburtsdatum: 16.Dezember 1988  
Geburtsort: Stuttgart  
Familienstand: verheiratet  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### PROMOTION

---

01/2014 – 12/2015 Promotion im Bereich Agrarwissenschaften

Technische Universität München, Weihenstephan

**Promotion:** „Charakterisierung des ruminalen Mikrobioms durch DNA-Klassifizierung mittels qPCR und Next Generation Sequencing“ am Lehrstuhl für Tierernährung (Prof. Dr. W. Windisch)

Die Promotionsarbeit wird durch ein Promotionsstipendium der Hanns-Seidel-Stiftung gefördert.

### STUDIUM

---

10/2011 – 05/2013 Studium der Agrarwissenschaften (Master)  
Technische Universität München, Weihenstephan

**Masterarbeit:** „Erfassung unterschiedlicher Populationen von Pansenmikroorganismen mittels qPCR“ am Lehrstuhl für Tierernährung (Prof. Dr. W. Windisch)

---

10/2008 – 07/2011                      Studium der Agrarbiologie (Bachelor)

Universität Hohenheim

**Bachelorarbeit:**                      „Wirkung von Tanninextrakten auf die Methanabgabe von Schafen“ am Institut für Tierernährung (Prof. Dr. M. Rodehutschord)

## **WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEITEN**

---

04/2010 - 08/2011                      Studieninformationszentrum Universität Hohenheim

03/2012                                      Forschungsprojekt am Lehrstuhl für Tierernährung,  
Weihenstephan

Thema: „Messung flüchtiger Fettsäuren aus Pansensaft mittels Gaschromatographie“

08-09/2012                                Forschungsprojekt am Lehrstuhl Biotechnologie der Nutztiere, Weihenstephan

Thema: „ Untersuchung einer Mutation des polypyrimidine rich tract-binding Proteins bei Hasen mittels Polymerase-Ketten-Reaktion“

## **PUBLIKATIONEN**

---

**Ziβler E**, Windisch W, Ettle T, Bolduan C (2016): Cluster analysis of abundance of total bacteria in the rumen of bulls after fattening with varying structural value of diets. - In: Proc. Soc. Nutr. Physiol. (25), Hannover, 08.-10.03.2016. Ed.: Gesellschaft für Ernährungsphysiologie. Frankfurt: DLG-Verlags-GmbH, p. 98. ISBN: 978-3-7690-4109-5.

**Ziβler E**, Ettle T, Windisch W, Fahn C (2014): Einfluss einer unterschiedlichen Strukturversorgung von Mastbullen auf die Endpunkte der ruminalen Fermentation und das ruminale Mikrobiom nach 24-stündiger Nüchternung. - In: Fahn C, Windisch W (2014): 52. Jahrestagung der Bayerischen Arbeitsgemeinschaft Tierernährung e.V. - "Tierernährung und Umwelt", Eigenverlag, BAT e.V., Freising. pp. 77-81; ISBN; 978-3-9816116-1-8

Fahn C, **Ziβler E**, Windisch W (2014): Anpassungsfähigkeit von Pansenmikroorganismen bei Wechsel von energie- zu rohfaserreicher Fütterung. In: Zentralinstitut Hans Eisenmann Zentrum für Agrarwissenschaften der TU München: Tagungsband, 5. Agrarwissenschaftliches Symposium: Agrarische Stoffkreisläufe, Nährstoffmanagement - Umweltschutz - Ressourceneffizienz. Eigendruck Hans Eisenmann Zentrum, 25.09.2014, Freising. p.54

---

Fahn C, Prücklmaier J, **Ziβler E**, Windisch W (2014): Erfassung unterschiedlicher Populationen von Pansenmikroorganismen mittels qPCR bei Wechsel von energie- und rohfaserreicher Fütterung. - In: Arbeitsgemeinschaft für Lebensmittel-, Veterinär- und Agrarwesen - „Angewandte Forschung – gibt es neue Wege?“; ALVA-Jahrestagung 2014, Wieselburg-Land, 19.-20. Mai 2014; p 325-327. ISSN: 1606-612X

**Ziβler E**, Fahn C, Windisch W, Fischer C, Aichner V, Ettle T (2014): Proteinbewertung von Sojaprodukten aus bayerischem Anbau und heimischer Verarbeitung. - In: Arbeitsgemeinschaft für Lebensmittel-, Veterinär- und Agrarwesen - „Angewandte Forschung – gibt es neue Wege?“; ALVA-Jahrestagung 2014, Wieselburg-Land, 19.-20. Mai 2014; p 328-330. ISSN: 1606-612X

Fahn C, Windisch W, **Ziβler E** (2014): Characterization of the rumen microbiome with DNA-classification by qPCR including (bio) chemical parameters of rumen fermentation. - In: Proc. Soc. Nutr. Physiol. (23), Göttingen, 18.-20.03.2014. Ed.: Gesellschaft für Ernährungsphysiologie. Frankfurt: DLG-Verlags-GmbH, p. 60. ISBN: 978-3-7690-4107-1.

**Lederer E**, Windisch W, Fahn C (2013): Charakterisierung des ruminalen Mikrobioms durch DNA-Klassifizierung mittels qPCR. - In: Mair C, Kraft M, Wetscherek W, Schedle K, 12. BOKU Symposium Tierernährung - Auf der Suche nach neuartigen Futtermitteln und Technologien in der Tierernährung. 12, Eigenverlag, Institut für Tierernährung, Tierische Lebensmittel und Ernährungsphysiologie, Wien; p 317 – 322. ISBN: 978-3-900932-13-8

## **SCHULAUSSBILDUNG**

---

09/1999 - 06/2008	Gymnasium Plochingen, Plochingen (Abitur)
09/1995 - 07/1999	Grundschule „Burgschule“, Plochingen

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die bei der promotionsführenden Einrichtung

**Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt**

der TUM zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

**Experimentelle Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Rationsgestaltungen auf die mikrobielle Fermentation und die Zusammensetzung der Mikroflora im Pansen von Rindern**

In **Wissenschaftszentrum Weihenstephan**

(Lehrstuhl für Tierernährung)

unter der Anleitung und Betreuung durch: **Prof. Dr. Wilhelm Windisch**

ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 6 und 7 Satz 2 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Die vollständige Dissertation wurde in veröffentlicht. Die promotionsführende Einrichtung hat der Vorveröffentlichung zugestimmt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Ich habe bereits am

bei der Fakultät für

der Hochschule

unter Vorlage einer Dissertation mit dem Thema

die Zulassung zur Promotion beantragt mit dem Ergebnis:

Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung der TUM ist mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von § 28 (Nichtigkeit der Promotion) und § 29 (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst.

Mit der Aufnahme meiner personenbezogenen Daten in die Alumni-Datei bei der TUM bin ich

einverstanden,  nicht einverstanden.

Truchtlaching, 11.08.2016

Ort, Datum

Unterschrift