

Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der
Veterinärmedizin

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Universitätsklinik für Wiederkäuer

(Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Thomas Wittek, Dipl. ECBHM)

**Pilotstudie zur mikrobiellen Belastung von Gülleseparat als Einstreumaterial und zu
den Auswirkungen auf die Besiedlung der Zitzenhaut mit potenziell euterpathogenen
Bakterien**

Diplomarbeit

Zur Erlangung der Würde einer
MAGISTRA MEDICINAE VETERINARIAE
der
Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Anna Katharina Schuler

Wien, im Jänner 2024

Betreuer: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Thomas Wittek, Dipl. ECBHM
Universitätsklinik für Wiederkäuer
Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der
Veterinärmedizin

Betreuende Assistentin:

Dr. med. vet. Baumgartner Martina
Universitätsklinik für Wiederkäuer
Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der
Veterinärmedizin

BegutachterIn:

Dr. med. vet. Claudia Hess, Dipl. ECPVS
Universitätsklinik für Geflügel und Fische
Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der
Veterinärmedizin

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle übernommenen Textstellen aus fremden Quellen wurden kenntlich gemacht.

Ich habe die entscheidenden Arbeiten selbst durchgeführt und alle zuarbeitend Tätigen mit ihrem Beitrag zur Arbeit angeführt.

Die vorliegende Arbeit wurde nicht an anderer Stelle eingereicht oder veröffentlicht.

Wien, den 8.01.2024

Anna Katharina Schuler

ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden die mikrobielle Belastung von Gülleseparat als Einstreumaterial und die Auswirkungen dieser Einstreu auf die Besiedelung der Zitzenhaut mit potenziell euterpathogenen Bakterien untersucht. Dazu wurden in einem oberösterreichischen Milchviehbetrieb mit 35 laktierenden Fleckviehkühen regelmäßig Viertelgemelksproben, Einstreuproben und Zitzenhauttupfer nach standardisierten Vorgaben entnommen und bakteriologisch untersucht. Anhand von Sammelproben aus je fünf Liegeboxen wurde weiters die Keimentwicklung in den Liegeboxen 24, 48 und 96 Stunden nach der Einbringung von frisch gepressten Güllefeststoffen untersucht und es wurde der Temperatur-Feuchtigkeitsindex gemessen und ausgewertet. Die Aufarbeitung und Auswertung der Proben erfolgte im Milchlabor der Universitätsklinik für Wiederkäuer an der Veterinärmedizinischen Universität. Dazu wurden alle Einstreuproben und die Zitzenhauttupfer (in viertelstarker Ringerlösung) in Verdünnungsschritten auf Selektivnährböden ausplattiert und die Gesamtkeimzahl, die Keimbelastung mit Coliformen, Staphylokokken, äskulinpositiven katalasenegativen Kokken sowie Enterokokken bestimmt. Für die weitere Spezifizierung der Bakterien wurden schließlich insgesamt 334 Isolate von verschiedenen Selektivnährböden zufällig ausgewählt und an der Klinik für Geflügel der Veterinärmedizinischen Universität Wien mittels Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-flight-Massenspektrometrie (MALDI-ToF MS) bis auf Speziesebene identifiziert. In den Einstreuproben wurden weiters der Trockensubstanzgehalt bestimmt und der pH-Wert gemessen. In frisch gepressten Güllefeststoffen betrug die Gesamtkeimzahl bei der ersten Untersuchung im April $8,84 \times 10^8$ pro Gramm Trockensubstanz (g TS) bei der zweiten Messung im Juni $6,21 \times 10^8$ pro g TS, während die Anzahl an Coliformen bei $9,64 \times 10^5$ pro g TS (April bzw. bei $6,77 \times 10^5$ pro g TS (Juni) lag. Die Keimzahlen der Enterokokken pro g TS lagen im April bei $6,43 \times 10^5$ und im Juni bei $4,51 \times 10^5$ pro g TS. Weitere Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, dass der Trockensubstanzgehalt im Vergleich zum frisch gepressten Gülleseparat nach dem Einbringen in die Liegeboxen sinkt, während der pH-Wert im Vergleich zur frisch gepressten Einstreu alkalischer wird. Die Gesamtkeimzahl der Sammelproben aus den Liegeboxen war zum Zeitpunkt der Entnahme 0 (=frisch) am niedrigsten und zeigte den höchsten Anstieg nach 24 Stunden. Bei der Untersuchung der Zitzenhauttupfer war auffällig, dass an der Zitzenpitze deutlich höhere Keimzahlen gemessen wurden als pro cm^2 Zitzenhaut. Die Spezifizierung der Bakterien mittels MALDI-ToF MS führte zum Nachweis von mastitisrelevanten Bakterien (vor

allem von *E. coli*, *Klebsiella* spp. und *Enterococcus* spp.) sowohl in der Einstreu als auch auf der Zitzenhaut.

ABSTRACT

This diploma thesis investigated the microbial load of manure solids used as bedding material and the effects of this bedding on the colonization of the teat skin with mastitis pathogens. Quarter milk samples, bedding samples and teat skin swabs were regularly collected aseptically in an Austrian dairy farm with 35 lactating cows that were housed in a free stall barn with recycled manure solids as a bedding material in the cubicles.

Pooled samples from five cubicles each were used to analyze bacterial development in the cubicles 24, 48 and 96 hours after spreading of freshly pressed manure solids. The temperature-humidity index was measured and analyzed concurrently. All samples were analyzed in the diagnostic laboratory of the University Clinic for Ruminants at the University of Veterinary Medicine. Bedding samples and teat skin swabs (in quarter-strength Ringer's solution) were plated on selective culture media in dilution steps and the total bacterial count, the bacterial load with coliforms, staphylococci, catalase-negative cocci and enterococci were determined. Subsequently, 334 isolates from various selective culture media were randomly selected for further specification on selective culture media. Species identification was achieved using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-ToF MS) at the Poultry Clinic of the University of Veterinary Medicine, Vienna. Additionally, dry matter content and pH value were determined in the bedding samples. In freshly pressed manure solids, the total bacterial count in the first test in April was 8.84×10^8 per gramm dry matter (per g DM) and 6.21×10^8 per g DM the second test in June, while the coliform count was 9.64×10^5 per g DM (April) and 6.77×10^5 per g DM (June). The bacterial load of enterococci was 6.43×10^5 in April and 4.51×10^5 per g DM in June. Further investigations revealed a decrease in dry matter content and an increase in pH value after the introduction into the cubicles compared to freshly pressed manure solids. The total bacterial count of pooled samples from the cubicles was lowest at collection time 0 (= fresh) and showed the highest increase after 24 hours. Analysis of the teat swabs indicated significantly higher bacterial counts at the teat tip than per cm^2 of teat skin. Bacterial specification using MALDI-ToF MS identified mastitis-relevant bacteria (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterococcus* spp.) both in the bedding and on the teat skin.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	3
ABSTRACT	5
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1. MASTITISRISIKO IN VERSCHIEDENEN HALTUNGSSYSTEMEN	3
2.1.1. Eutergesundheit in der Anbindehaltung	5
2.1.2. Eutergesundheit in der Laufstallhaltung	5
2.2. EINFLUSS VERSCHIEDENER EINSTREUMATERIALIEN AUF DIE EUTERGESUNDHEIT	6
2.2.1. StrohEinstreu	7
2.2.2. Sägespäne	7
2.2.3. Sand	7
2.2.4. Alternative Einstreumaterialien	8
2.2.4.1. Kompost	8
2.2.4.2. Separatormaterial	9
3. MATERIAL UND METHODE	10
3.1. UNTERSUCHUNGEN AM LANDWIRTSCHAFTLICHEN BETRIEB	10
3.1.1. Betriebserhebungen	10
3.2. PROBENENTNAHMEN	11
3.2.1. California Mastitis Test und Aseptische Milchprobenentnahme	11
3.2.2. Zitzenhauttupfer- und Tupferproben der Melkbecher	12
3.2.3. Entnahme der Einstreuproben	13
3.2.3.1. Probenentnahme von frisch hergestelltem Separatormaterial	13
3.2.3.2. Entnahme von Einstreumaterial aus den Liegeboxen	14
3.2.3.3. Entnahme der Einstreu im frischen Zustand und nach 24, 48 sowie 96 Stunden nach Einbringung in die Liegeboxen	14

3.2.4.	Untersuchungen des Stallklimas.....	14
3.3.	LABORDIAGNOSTISCHE UNTERSUCHUNGEN	15
3.3.1.	Bakteriologische Untersuchung der aseptisch genommenen Viertelgemelksproben .	15
3.3.1.1.	Untersuchung der Zellzahl	16
3.3.2.	Untersuchung der Zitzenhauttupfer- und der Einstreuproben.....	16
3.3.2.1.	Bestimmung der Trockensubstanz und des pH-Wertes in der Einstreu	18
3.3.3.	Matrix-assisted laser desorption time-of-flight-Massenspektrometrie.....	19
3.4.	STATISTIK.....	20
4.	ERGEBNISSE	21
4.1.	ALLGEMEINE BETRIEBSDATEN.....	21
4.2.	UNTERSUCHUNG DER FRISCH GEPRESSTEN GÜLLEFESTSTOFFE	23
4.3.	ENTWICKLUNG VON PH-WERT, TROCKENSUBSTANZGEHALT UND GESAMTKEIMZAHL DER EINSTREU NACH EINBRINGUNG IN DIE LIEGEBOXEN	25
4.4.	KEIMZAHLEN AN DER ZITZENHAUT UND DER ZITZENSPITZE.....	29
4.4.1.	Gesamtkeimzahl an Zitzenhaut und Zitzenspitze	29
4.5.	AUSWERTUNGEN DER PROBEN IM MALDI-ToF MS	34
4.5.1.	Bakterienspektrum der Zitzenhaut und der Zitzenspitze.....	35
4.5.2.	Bakterienspektrum der Einstreu.....	39
4.6.	STALLKLIMADATEN	44
5.	DISKUSSION.....	47
6.	FAZIT	53
7.	LITERATURVERZEICHNIS.....	54
8.	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	63
9.	ANHANG	67

Abkürzungsverzeichnis

CMT	California Mastitis Test
NAS	Non-Aureus - Staphylokokken
LKV	Landeskontrollverband
MALDI-ToF	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-flight-Massenspektrometrie
KBE	kolonienbildende-Einheit
cfu	colony forming unit
GKZ	Gesamtkeimzahl
KZ	Keimzahl
TS	Trockensubstanz
AMS	Automatisches Melksystem
RMS	recycled manure solid
THI	Temperatur-Feuchtigkeits-Index (temperature humidity index)

1. Einleitung und Fragestellung

Die Einstreu und deren Management stellt in vielen landwirtschaftlichen Betrieben einen wesentlichen Kostenfaktor dar. Vor allem Landwirte, die nicht ihr eigenes Stroh anbauen und beziehen können, suchen Alternativen, die kostengünstiger sind, aber weder den Kuhkomfort, die Eutergesundheit oder die Milchqualität gefährden. Als Einstreu kommen sowohl organische als auch anorganische Substanzen in Frage. So werden neben Sand (anorganisch) auch Kompost oder Feststoffe aus der Gülleseparation (organisch) als Alternativen zur klassische Stroh-Mist-Matratze eingesetzt.

Unter Gülleseparation versteht man eine Form der Gülleaufbereitung. Dabei wird Gülle automatisiert mit Hilfe von Pressschnecken in eine flüssige und eine feste Phase getrennt. Die Vorteile liegen auf der Hand: Die flüssige Gülle kann leichter gelagert und ausgebracht werden, die feste Phase kann wiederum als kostengünstiges Einstreumaterial verwendet werden. Allerdings ist der Einsatz von Separatormaterial als Einstreu in Liegeboxen von Milchkühen umstritten, handelt es sich dabei doch um organisches und von Natur aus keimbelastetes Material. Für die Verwendung gibt es daher einige Auflagen: So darf zum Beispiel nur Separatormaterial aus dem eigenen Betrieb verwendet werden. In Österreich gibt es bisher keine Studien zum Einsatz von Separatormaterial als Einstreu in Milchviehbetrieben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluss von Gülleseparat auf definierte Parameter der Milchhygiene und Eutergesundheit untersucht.

Die Studie wurde auf einem Milchviehbetrieb in St. Ulrich bei Steyr in Oberösterreich durchgeführt, der Mitte Dezember 2021 von einem Anbindestall mit Rohrmelkanlage in einen neu gebauten Liegeboxenlaufstall mit Stroh-Kalk-Matratze und Einstreu von Separatormaterial übersiedelte. Gleichzeitig wurde ein Automatisches Melksystem (AMS) implementiert.

Daraus ergab sich die Möglichkeit zu dokumentieren, wie sich die Einstreu von Separatormaterial in einem Melkroboterbetrieb auf die Eutergesundheit auswirkt. Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte untersucht werden, wie hoch die Belastung mit potenziell euterpathogenen Bakterien in frisch gepresstem Separatormaterial ist, und wie sich die Keimzahlen potenziell pathogener Keime in den Liegeboxen und auf der Zitzenhaut in der Folge entwickeln.

Folgende Hypothesen wurden aufgestellt und in dieser Arbeit beleuchtet:

- I. Die Einstreu von Güllefeststoffen führt zu einer Belastung der Zitzenhaut mit potenziell euterpathogenen Keimen.**
- II. Der Keimgehalt des Gülleseparatormaterials steigt nach der Einstreu in den Liegeboxen durch Einbringung von Kot und Harn an.**
- III. Neben dem Liegeboxenmanagement bedingen hohe Luftfeuchtigkeit und Lufttemperatur einen Anstieg der Keimzahlen**

Die konkreten Auswirkungen von Güllefeststoffen auf die Entwicklung der Eutergesundheit werden in einer weiteren Diplomarbeit (Diplomand Daniel Heneckl) dargestellt.

2. Literaturübersicht

2.1. Mastitisrisiko in verschiedenen Haltungssystemen

Der Internationale Milchwirtschaftsverband (International Dairy Federation, IDF) beschreibt die Mastitis des Rindes als eine entzündliche Reaktion der Milchdrüse mit infektiöser, traumatischer oder toxischer Ätiologie (Krömker 2006). Mastitiden werden hauptsächlich durch Bakterien verursacht, seltener durch Sprosspilze, Schimmelpilze oder Algen. Die Krankheitserreger überwinden zunächst die anatomisch-physikalischen Barrieren an der Zitzenspitze und dringen anschließend in das Gewebe der Milchdrüse vor und vermehren sich dort. In der Folge resultiert durch angeborene zelluläre und humorale Abwehrmechanismen eine Entzündung (Oviedo-Boyso et al. 2007).

Euterpathogene Mikroorganismen werden aufgrund ihres primären Reservoirs und Übertragungsweges in kuhassoziierte oder umweltassoziierte Erreger eingeteilt (Makovec und Ruegg 2003). In der Literatur werden Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) gelegentlich in eine eigene und dritte Gruppe der Haut-assoziierten Bakterien zusammengefasst (Winter et al. 2009). *Streptococcus* (Sc.) *agalactiae*, *Sc. canis*, *Staphylococcus* (S.) *aureus*, und diverse Mykoplasmen zählen zu den kuhassoziierten Erregern, für die das Euter das Hauptreservoir darstellt (Ruegg 2017). Der Melkvorgang ist in der Folge der Hauptübertragungsweg zwischen den einzelnen Kühen. Zu den umweltassoziierten Erregern werden Gram-negative Bakterien wie *Escherichia* (E.) *coli*, *Klebsiella* (K.) *spp.*, *Serratia spp.*, sowie die Gram-positiven und Katalase-negativen Kokken der Gattungen *Streptococcus spp.* (*Sc. uberis* und *Sc. dysgalactiae*) und *Enterococcus spp.* gezählt (Makovec und Ruegg 2003). Die genannten Infektionserreger tragen wesentlich zur Ätiologie der Mastitis des Rindes bei, jedoch spielen vielerlei zusätzliche Faktoren (wie Aufstallung, Stall- und Melkhygiene, Melktechnik oder Fütterung und Betriebsmanagement) eine Rolle bei der Krankheitsentstehung. Mastitiden werden daher auch zu den Faktorenkrankheiten gezählt (Krömker 2006). Das Zusammentreffen von exogenen und endogenen Stressoren kann bei Milchkühen eine Abwehrdepression auslösen. Diese erleichtert es den Erregern in unmittelbarer tierischer Umgebung in den Strichkanal der Zitze einzuwandern und dort eine Infektion hervorzurufen (Krömker 2006). Durch die Entwicklung guter Strategien und Prophylaxe-Maßnahmen (Zitzen- und Melkzeugzwischeninfektion, antibiotisches Trockenstellen) sowie wirksamer Behandlungskonzepte zur Therapie kuhassoziierten Mastitiden, sind in den letzten Jahren Euterentzündungen durch umweltassoziierte Erreger vermehrt in den Fokus getreten (Barth et al. 2011). Umweltbedingte Mastitiden betreffen viele Milchviehbetriebe und gelten in

modernen und gut geleiteten Betrieben als einer der Hauptfaktoren in der Entstehung klinischer Euterentzündungen (Smith und Hogan 1993).

Das Euter, und hier vor allem die Zitzen (Strichkanalmündungen) sind in den Liegeboxen unmittelbar in Kontakt mit der Einstreu. Deshalb ist die Wahl des Einstreumaterialies ein sehr wichtiger Faktor: So kann die Einstreu je nach Ausgangsmaterial ein guter Nährboden für umweltbedingte Mastitiserreger sein (Patel et al. 2019). Kühe verbringen circa zwölf bis 14 Stunden pro Tag in ihren Liegeboxen; dies macht 60 bis 80 % eines 24-Stunden-Intervalles aus (Krawczel 2009). Die nach Patel et al. (2019) modifizierte Abbildung 1 zeigt mögliche Zusammenhänge zwischen den Eigenschaften des Einstreumaterialies, dem Keimgehalt der Einstreu, der Bakterienexposition der Zitzenhaut und der Euterhygiene und der Milchqualität.

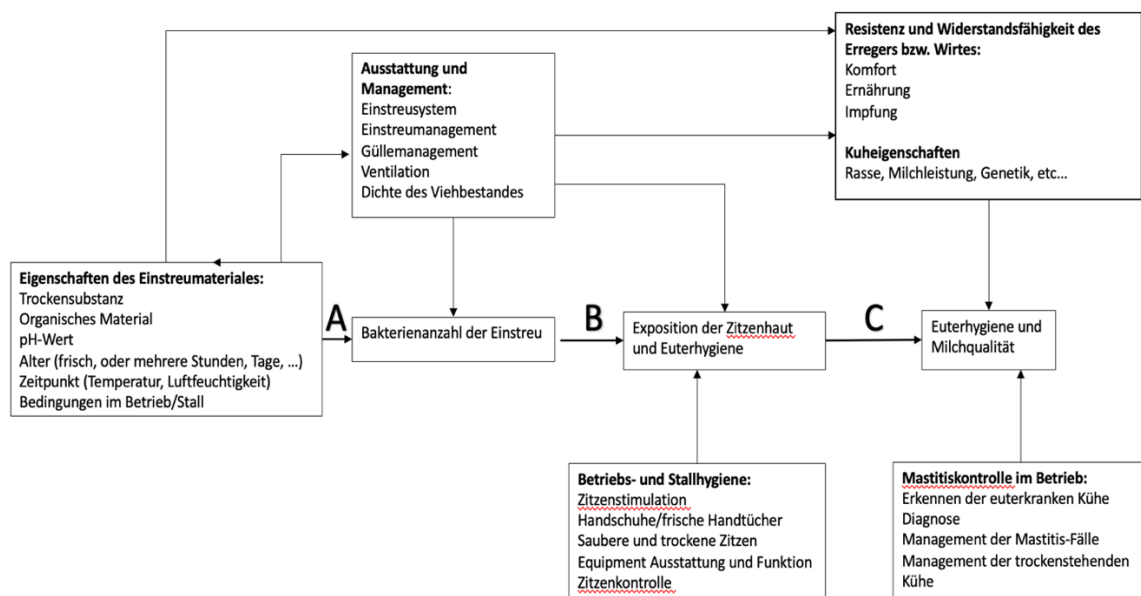


Abb. 1: mod. nach Patel et al. (2019): Darstellung eines möglichen Pfades, der die wichtigsten Risikofaktoren der umweltbedingten Mastitis beschreibt. Die dicken markierten Pfeile (A, B und C) stellen in dieser Abbildung die wichtigsten Zusammenhänge dar.

Eine Agrarstrukturhebung der Statistik Austria im Jahr 2020 ergab, dass 63 % aller Milchkühe in Österreich in Laufställen gehalten werden (12,0 % mit Festmist und Jauche, 50,9 % mit Gülle). Immerhin 35,6 % der Kühe stehen noch in Anbindehaltung (28,6 % mit Einstreu und 7,0 % mit Gülle) fielen. Auf sonstige Haltungsformen fallen 1,4 % (Statistik Austria 2022).

2.1.1. Eutergesundheit in der Anbindehaltung

Vor allem in den alpinen Regionen ist die Anbinde- und Kombinationshaltung noch weit verbreitet (Kappel 2020, ÖKL 2014). Fehlerhafte Melktechnik, unsachgemäße Melkarbeit (LFI Österreich 2017) und eine mangelhafte Hygiene am Betrieb sind Faktoren, die einen direkten Einfluss auf die Eutergesundheit sowie auf die Milchqualität haben (Schreiner und Ruegg 2003). In der Anbindehaltung führen enge Platzverhältnisse zu einem erhöhten Risiko für Zitzenverletzungen und zu erhöhtem Keimdruck im Bereich der Hinterextremitäten und der Zitzen, was weiterführend zu einer Infektion des Euters führen kann (LFI Österreich 2017). Für die Verunreinigung von Euter und Zitzen gibt es mehrere Möglichkeiten. Die direkte Verschmutzung findet statt, wenn sich die Kühe auf verschmutzten Liegeflächen hinlegen. Eine andere Möglichkeit der intramammären Infektion ergibt sich durch kotverschmutzte Klauen, die das Euter und hier besonders die Zitzen beim Liegen kontaminieren (Abe 1999, Cook 2004). Oft wird in Anbindeställen auch aus wirtschaftlichen und arbeitstechnischen Gründen auf Einstreu verzichtet (Hochboxen und Gummimatten) beziehungsweise wenig eingestreut, wodurch die Wärmedämmung gegenüber dem Untergrund niedrig ist. Dies erhöht neben dem Verletzungsrisiko durch fehlende Trennbügel, rutschige oder kurze Standflächen beziehungsweise falsche Standmaße (Euter liegen im Kot oder auf dem Gitterrost) ebenfalls das Mastitisrisiko, sodass die Anbindehaltung, und besonders die Aufstallung im Kurzstand mit den meisten Tierschutzproblemen einhergeht (Richter et al. 2006).

2.1.2. Eutergesundheit in der Laufstallhaltung

Die Haltung von Milchkühen in Laufställen ist eine Weiterentwicklung der Stallhaltung mit vielen positiven Aspekten. In den meisten Fällen geht diese Haltungsform mit einer Zunahme der Herdengröße, einer Steigerung der Milchleistung, der Tiergesundheit und des Tierkomforts einher (Waßmuth 2001). Die Vorteile betreffen eine geringere Arbeitsbelastung (Füttern, Entmisten) und ein effizienteres und schnelleres Melken, das durch eine Reihe von Automatisierungen erleichtert werden kann. Als Risikofaktoren in der Laufstallhaltung gelten erhöhtes Verletzungsrisiko durch z.B. fehlende Trennbügel oder Hochboxen, mangelhafte Ruhezeiten durch ein Verhältnis von Tierzahl/Liegebox $>1:1$, ungünstige Boxenmaße, schlechte Belüftung und mangelhafte Einstreu der Liegeflächen (Richter et al. 2006). Bezogen auf die Eutergesundheit ist das Einhalten einer Melkreihenfolge im Vergleich zur Anbindehaltung schwierig (Deutz und Obritzhauser 2003).

2.2. Einfluss verschiedener Einstreumaterialien auf die Eutergesundheit

Eine tierwohlgerechte und ordnungsgemäße Aufstallung der Milchkühe ist erforderlich, um die Leistung, die Reproduktion, die Gesundheit und vor allem das Wohlbefinden der Herde zu gewährleisten. Dabei ist eine für den Betrieb geeignete Einstreu ein unverzichtbarer Bestandteil. Diese ist unter anderem essenziell für den Komfort, sie fördert die Produktionsleistung und trägt ebenfalls dazu bei, Verletzungen und Lahmheiten der Kühe zu reduzieren beziehungsweise zu vermeiden (Singh et al. 2020). Die Art und Qualität der Einstreu hat auch erheblichen Einfluss auf die Eutergesundheit der Milchkühe (Fréchette et al. 2021). Sie ist unter anderem eine wichtige Quelle vor allem für die Exposition der Zitzenenden gegenüber umweltassoziierten Mastitisserregern. Für die Prävention, die Kontrolle und die Therapie einer umweltbedingten Mastitis ist es wichtig, ein besseres Verständnis der Zusammenhänge von Einstreuauswahl und deren Management, der Anzahl der Bakterien, sowie der Euterhygiene zu besitzen (Patel et al. 2019).

Die Einstreu wird in folgende zwei Kategorien eingeteilt: organisches Material (beispielsweise Sägemehl, Stroh, Heu, Erntereste und Güllefeststoff) und anorganisches Material wie Sand, Kalkstein und Gummimatten (Schwarz et al. 2010, Singh et al. 2020).

Organisches Einstreumaterial enthält auch im unbenützten, nicht mit Kot und Urin verschmutzten Zustand, zahlreiche Nährstoffe, die dem Wachstum von Mikroorganismen dienen (Bey et al. 2022, Harrison et al. 2008) und die im anorganischen Material fehlen (Harrison et al. 2008). Unabhängig von der Art des Einstreumaterials (organisch oder anorganisch) wird das Wachstum von pathogenen Erregern gefördert, wenn dieses mit Kot und Urin nach Ausbringung verschmutzt wird (Hogan et al. 1989, Schwarz et al. 2010). Voraussetzungen für das Wachstum von Bakterien sind Feuchtigkeit, ausreichende Temperaturen und die angemessenen Nährstoffe (Rowbotham und Ruegg 2016). Laut Hogan et al. (1989) wiesen organische Materialien in der Einstreu von laktierenden Kühen einen signifikant höheren Feuchtigkeitsgehalt und auch eine höhere Anzahl an Gram-negativen Bakterien und Streptokokken auf als in anorganische Einstreu. Godden et al. (2008) beschrieben in ihrer Arbeit, dass das Bakterienwachstum je nach Einstreutyp variiert. Verantwortlich dafür sind vor allem physikalische, biochemische oder ernährungsphysiologische Eigenschaften des Einstreumaterials.

2.2.1. Stroheinstreu

Stroh wird oft und gerne als Einstreu in Milchviehbetrieben verwendet, da es ein trockenes und für die Liegefläche ein nutzbares, weiches Naturmaterial ist (Barth et al. 2011). Norring et al. (2008) konnten feststellen, dass Stroh als Einstreumaterial im Vergleich zu Sand die Liegezeit der Kühe erhöht und die Tiere generell Stroh dem Sand vorzogen. In der Arbeit von Barth et al. (2011) konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Strohlagerung am Betrieb keine Auswirkung auf die Eutergesundheit hatte. Jedoch konnte festgestellt werden, dass Betriebe, die das Stroh im Kopfraum der Liegeflächen zwischenlagerten, eine signifikant höhere Zellzahl in den Einzelgemelksproben bei der Milchleistungsprüfung hatten als jene, die das Material gar nicht oder woanders zwischenlagerten.

2.2.2. Sägespäne

Sägespäne und Sägemehl sind Abfallprodukte der Holzverarbeitung und zählen daher zu den organischen Einstreumaterialien in der Milchviehhaltung (Kögler 2005). In der Regel werden Holzspäne oft mit Sägemehl vermischt, um die Belüftung zu verbessern, die Verdichtung zu fördern, sowie die Bodenbearbeitung zu erleichtern (K. A. Janni et al. 2007). Letzteres ist im Hinblick auf das Management der Liegeflächen wichtig, da eine tägliche Reinigung und erneutes Einstreuen zu einer Verringerung der bakteriellen Belastung führt (Smith und Hogan 1995). Vor allem der Eintrag von Feuchtigkeit kann mikrobielles Wachstum (Singh et al. 2020) und damit umweltassoziierte Mastitiden fördern (K. A. Janni et al. 2007). Untersuchungen ergaben, dass Sägespäne als Einstreumaterial akute Mastitiden durch Coliforme erleichtern (Deutz und Obritzhauser 2003).

2.2.3. Sand

Im Zuge von Untersuchungen in der Schweiz konnte man bei Verwendung von Sand in den Liegeboxen eine niedrige Kuhverschmutzung sowie eine deutlich höhere Wärmeableitung im Vergleich zur Stroh-Mist-Matratze nachweisen. Diese Wärmeableitung ist im Sommer ein Vorteil, weil die Tiere dort ihre überschüssige Wärme gut über den Sand abgeben können. Im Winter jedoch ist dies eher von Nachteil, weil die wärmedämmende Wirkung von Sand gering ist (Zähner et al. 2009). Norring et al. (2008) untersuchten die Auswirkungen und Aspekte von Stroh und Sand als Einstreumaterial und konnten im Zuge dessen feststellen, dass die Sauberkeit und Klauengesundheit der Milchkühe in Sandställen deutlich besser waren.

Patel et al. (2019) verglichen vier Einstreumaterialien in Hinblick auf das Wachstum umweltassoziiertter Mastitiserreger: Sand förderte das Wachstum von *Klebsiella pneumoniae*

am wenigsten, ebenso wurde ein geringes Wachstum von *Enterococcus faecium* im Sand nachgewiesen. Ebenso verglichen Kristula et al. (2005) „clean sand“ (CS) und „recycled sand“ (RS) hinsichtlich Bakterienpopulation und Wachstum: Beide Materialien (CS und RS) wurden als sicher für die Verwendung als Einstreu deklariert, da die Anzahl der nachgewiesenen coliformen Bakterien unter dem anerkannten Schwellenwert von 1 000 000 cfu/g lag. Laut Godden et al. (2008) fördern Sägespäne zwar ein mäßiges Wachstum von *Klebsiella pneumoniae*, führen jedoch zu einem schnellen Rückgang der Anzahl von *Enterococcus faecium*. Ebenso konnten Madke et al. (2010) feststellen, dass Euterverletzungen oder Mastitisserkrankungen am wenigsten bei Sand, gefolgt von Gummimatten und Betonbodeneinstreumaterialien gefunden worden sind. Im Hinblick auf Tiergerechtigkeit und Tierwohl ist Sand als Einstreumaterial mit einer Stroh-Mist-Matratze vergleichbar. Sand weist zwar niedrigere Arbeitszeiten für die Pflege auf, aber doch einiges an Materialkosten (Zähner et al. 2009).

2.2.4. Alternative Einstreumaterialien

Alternative Einstreuprodukte werden für Milcherzeuger beziehungsweise Landwirte immer attraktiver (Fréchette et al. 2021). Vor allem Stroh als Einstreumaterial ist in Grünlandgebieten ein wesentlicher Kostenfaktor in der Milchviehhaltung geworden. Landwirte suchen immer mehr günstigere Einstreusysteme, die aber in einwandfreien Zustand sein müssen, die Tiergesundheit nicht gefährden und die Milchqualität nicht beeinträchtigen bzw. beeinflussen dürfen (Zähner et al. 2009). Die Alternative zum Beispiel zu einer Stroh-Mist-Matratze können Sand, Feststoffe aus der Separierung der Gülle und Kompost sein. Diese Systeme sind weniger teuer in der Produktion oder im Einkauf, sehr leicht in größeren Mengen verfügbar und bei richtiger Aufbereitung und Verwendung sicher für Tier und Mensch (Fréchette et al. 2021).

2.2.4.1. Kompost

Die Komposteinstreu gilt als einer der alternativen Ansätze für die Wiederverwertung von landwirtschaftlichen Nebenprodukten. Dies hat zum einen den Vorteil, dass man die Produkte entsprechend recyceln und als Einstreumaterial verwenden kann und zum anderen, dass man durch ein betriebsangepasstes Management das Wohlergehen des Betriebes und auch der Milchkühe verbessert (Sun et al. 2020). Zähner et al. (2009) verglichen die bakteriologische Qualität der Liegeflächen und der Milch bei Einstreu von Kompost und Güllesfeststoffen mit jener der Stroh-Mist-Matratze und zeigten, dass die mit alternativem Material eingestreuten

Liegeflächen aus hygienischer Sicht nicht kritischer zu beurteilen sind. In den Untersuchungen waren die Keimgehalte insgesamt niedrig. Koagulase-positive Staphylokokken und Propionsäurebakterien konnten in den Einstreuproben nicht nachgewiesen werden. Enterokokken wurden zwar in der Einstreu identifiziert, aber in der Milch gar nicht beziehungsweise nur in geringen Mengen nachgewiesen.

2.2.4.2. Separatormaterial

Die Europäische Union (EU) schreibt für die Verwendung von recycelten Güllefeststoffen (englisch: recycled manure solids, RMS) als Einstreumaterial für Milchkühe vor, dass es „kein inakzeptables Risiko für die Gesundheit von Menschen und Tieren“ geben darf (European Commission 2009). Gülle ist ein Gemisch aus Harn und Kot, in dem häufig auch Futterreste, Wasser und andere Bestandteile enthalten sind (Gienapp und Schuhmann 1999). Davon lässt sich ableiten, dass recycelte Güllefeststoffe einen hohen Gehalt an Bakterien haben, was wiederum in zahlreichen Studien belegt ist (Fréchette et al. 2021; Godden et al. 2008; Harrison et al. 2008). Die am häufigsten identifizierten umweltassoziierten Pathogene in Zusammenhang mit klinischen Mastitiden in der Studie von Fréchette et al. (2021) waren (in absteigender Reihenfolge) *Sc. uberis*, *E. coli*, *Klebsiella (K.) pneumoniae*, *Sc. dysgalactiae* und *S. aureus*. Klinische Mastitiden mit *K. pneumoniae* traten dabei in Betrieben mit Gülleseparat als Einstreu signifikant häufiger auf und hatten einen schweren Krankheitsverlauf. Jedoch konnten Fréchette et al. (2021) auch belegen, dass die Inzidenz insgesamt aller klinischer Mastitiden in Betrieben mit Einstreu von aufbereiteter Gülle nicht höher war als in Betrieben, die Stroh als Einstreumaterial verwendeten. Ebenso gab es keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Inzidenz von Mastitiden durch *Sc. uberis*, *E. coli*, *Sc. dysgalactiae* oder *S. aureus* (Fréchette et al. 2021). Frondelius et al. (2020) beschrieben in ihrem Bericht, dass die Verwendung von RMS zu saubereren Eutern führte und die Einstreu keinen Effekt auf die Gesamtkeimzahl der untersuchten Betriebe hatte. Darüber hinaus kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass es einen Zusammenhang zwischen umweltbedingter Mastitis und der Verwendung von recyceltem Gülleseparat gibt. Kernaussage hierbei war, dass das Management der Betriebe ausschlaggebend und wichtig speziell für die Eutergesundheit ist, denn Mikroorganismen im Umfeld des Euters müssen nicht zwingend zu Eutererkrankungen führen (Frondelius et al. 2020).

3. Material und Methode

3.1. Untersuchungen am landwirtschaftlichen Betrieb

Die Studie wurde auf einem oberösterreichischen Milchviehbetrieb durchgeführt, wo im Zuge eines Stallneubaues von Anbindehaltung und Rohrmelkanlage auf Liegeboxenlaufstall und Automatisches Melksystem (AMS) umgestellt wurde. Gleichzeitig erfolgte auch der Wechsel des Einstreumaterials von Sägespänen in der Anbindehaltung auf eine Stroh-Kalkmatratze mit regelmäßiger Einstreu von Separatormaterial in den Liegeboxen.

3.1.1. Betriebserhebungen

Für die Bestandserhebungen wurden regelmäßig Betriebsbesuche durchgeführt. Vor der Umstellung wurden am 28.10.2021 und am 09.12.2021 Betriebserhebungen zur Dokumentation des Ist-Zustandes hinsichtlich Betriebsmanagement und Eutergesundheit erfasst und dokumentiert. Mitte Dezember 2021 wurden die Milchkühe in den neu gebauten Laufstall übersiedelt. In der Umstellungsphase wurde der Betrieb einmalig am 12.01.2022 für eine Bestandsuntersuchung besucht. Nach der Umstellung erfolgten zwei weitere Bestandserhebungen im April und im Juni 2022 (Status nach der Umstellung). Mittels einer Checkliste wurden Herdenstatus, Tier- und Stallhygiene, Fütterungsregime, betriebsinterne Maßnahmen zur Kontrolle der Eutergesundheit inklusive Trockenstellverfahren und Therapiemaßnahmen sowie Kennzahlen zur Bewertung des Melkmanagements im Roboter erhoben. Bei der Abendmeldung (vor der Umstellung) beziehungsweise durch Beurteilung der Melkung am Roboter wurden Melkhygiene und Melkarbeit beurteilt. Weiters wurden die Daten der Milchleistungsprüfung (im Abstand von 30 bis 40 Tagen) durch den Landeskontrollverband erhoben; sie umfassen für den Untersuchungszeitraum neben der Milchleistung auch die Einzeltierzellzahl sowie Milcheiweiß- und Milchfettgehalt, Fett-Eiweißquotient und Milchharnstoffgehalt.

Bei jedem Betriebsbesuch erfolgten eine aseptische Entnahme von Viertelgemelksproben für eine bakteriologische Untersuchung und ein Euterhygiene- und Zitzen-scoring. Nach der Umstellung wurden zusätzlich Zitzenhauttupferproben und Einstreuproben untersucht.

3.2. Probenentnahmen

3.2.1. California Mastitis Test und Aseptische Milchprobenentnahme

Der California Mastitis Test, umgangssprachlich auch Schalmtest genannt, ist ein semiquantitatives Verfahren zur Zellzahlkontrolle in Viertelgemelksproben und dient der Detektion subklinischer Mastitiden. Für die Durchführung des Schalmtests wird eine Testplatte, die aus je vier Schalen besteht, sowie eine Testflüssigkeit benötigt. Diese besteht aus Alkyl-Aryl-Sulfonat, einem anionischen Detergens und aus einem Indikator, dem Bromkresolpurpur. Aus jedem Viertel des Euters wurde händisch Milch in die einzelnen Schalen der Testplatte gemolken, sodass die Schalen möglichst voll waren. Danach wurde die Testplatte gekippt und die überschüssige Milch bis zur Strichmarkierung verworfen. Nun wurde die Testflüssigkeit im Verhältnis 1:1 hinzugegeben und durch langsam kreisende Bewegungen mit der Milch vermischt. Das Alkyl-Aryl-Sulfonat bewirkt in der Milch die Freisetzung von Desoxyribonukleinsäure aus den Zellen, die Viskositätsänderung der Milch wird sichtbar. Hierbei wird innerhalb von Sekunden an der Reaktion sichtbar, ob es zu einem schwach positiven (+), positiven (++) , stark positiven (+++) oder negativem Ergebnis kommt. Das negative Ergebnis zeigt an, dass das Gemisch von Milch und Testflüssigkeit flüssig ist und einen Zellgehalt pro Milliliter Milch von <150 000 Zellen aufweist. Positiv beurteilt wurde der California Mastitis Test, wenn sich die Reaktion zu einer Schlieren- (+) -, Gel- (++) , oder Pfropfbildung (+++) auftraten. In Tabelle 1 sind die Zusammenhänge zwischen Testbild und geschätzter Zellzahl dargestellt. Die Farbreaktion des Milch-/Testflüssigkeitsgemisches gibt Auskunft über den pH-Wert. Bei einem erhöhten pH-Wert (>7,0) färbt sich die Milch intensiv purpurfarben, dies gibt Auskunft über eine Sekretionsstörung, Kolostralmilchperiode oder über ein Altmelkstadium der Kuh. Eine deutliche Gelbfärbung ist bei einem niedrigen pH-Wert (<5,2) zu erwarten (Schusser et al. 2018).

Tab. 1: Beurteilungsschema zur Auswertung des Schalmtests modifiziert nach Schusser et al. (2018).

Beurteilung	Testbild	Zellgehalt pro ml Milch
-	flüssig	< 150 000 Zellen
(+)	ggr. Schlieren	100 000-250 000 Zellen
+	hgr. Schlieren	200 000-700 000 Zellen
++	Gelbildung	500 000- 1 500 000 Zellen
+++	Gelbildung und Pfropf	> 1 000 000 Zellen

Die aseptische Milchprobenentnahme erfolgte bei jeder Probenausfahrt von allen laktierenden Kühen des Bestandes. Sobald eine Kuh die Melkbox des Melkroboters betreten hatte, wurde ein Hygienescoreing (Schreiner und Ruegg 2022) durchgeführt. Danach wurde von dem automatisierten Melksystem zunächst vorgemolken, anschließend erfolgte eine automatische Zitzenreinigung mittels Zitzenreinigungsbecher. Nach dieser Prozedur wurde die Melkroboterautomatik ausgeschaltet, der Schalmtest durchgeführt, sowie Milchproben aseptisch nach den Vorgaben der Klinischen Propädeutik (Baumgartner et al. 2018) entnommen.

Für die Beprobung wurden die Strichkanalmündungen mit einem alkoholgetränkten Wattetupfer unter drehenden Bewegungen gereinigt und desinfiziert. Dabei wurden zuerst die Zitzenenden der gegenüberliegenden Seite, dann jene der dem Probennehmer naheliegenden Seite desinfiziert. Die Probennahme erfolgte unmittelbar danach in umgekehrter Reihenfolge, um eine Rekontamination der Strichkanalmündungen zu vermeiden. Bei der Entnahme wurde die Milch jeder Zitze in ein eigenes, steriles Probenröhrchen gemolken.

Der Melkroboter wurde wieder auf Automatik geschaltet und die Melkung wurde mit dem Ansetzen der Melkbecher fortgesetzt. Die entnommenen Milchproben wurden gekühlt und in das Milchlabor der Universitätsklinik für Wiederkäuer gebracht.

3.2.2. Zitzenhauttupfer- und Tupferproben der Melkbecher

Für die Beprobung der Zitzenhaut- und Zitzenspitzen wurde eine Nass-Trockentupfer Technik angewandt (modifiziert nach Paduch und Krömker 2011). Dafür wurden saubere Einmalhandschuhe, sterile Wattetupfer, beschriftete Proberöhrchen gefüllt mit 2 ml einer viertelstarken Ringerlösung (Oxoid, Wesel, D) und ein Lineal verwendet. Beprobt wurden immer jeweils zehn zufällig ausgewählte laktierende Milchkühe, wenn sie die Melkbox zur Melkung betraten.

Zuerst wurden die beprobten Zitzen mit einem trockenen Euterpapier grob gereinigt. Zur Erstellung einer standardisierten Versuchsreihe wurden immer die Zitzen rechts vorne (rv) und links hinten (lh) beprobt. Nach der Grobreinigung wurden die Einmalhandschuhe angezogen. Für das erste Zitzenhauttupferpaar wurde ein steriler Wattetupfer in viertelstarke Ringerlösung getaucht und an der Zitze rechts vorne über eine Länge von 5 cm horizontal liegend Richtung Zitzenspitze geführt (parallel zu einem an der Zitze angelegten Lineal zur korrekten und gleichbleibenden Abmessung der Beprobungslänge). Mit einem zweiten, jedoch trockenen Tupfer wurde dieselbe Hautregion in gleicher Weise beprobt. An der Zitze lh wurde genauso

vorgegangen. Beide Tupferpaare (Nass-Trockentupfer von rv und lh) wurden in ein Röhrchen mit 2 ml viertelstarker Ringerlösung überführt.

Ein weiteres Nass-Trockentupferpaar wurde von denselben Zitzen (rv, lh) von der Strichkanalmündung entnommen. Dazu wurden der nasse bzw. der trockene Tupfer nacheinander senkrecht auf die Strichkanalmündung mit sanftem Druck aufgesetzt und um die eigene Achse gedreht. Auch hier wurden beide Tupferpaare in 2 ml viertelstarker Ringerlösung aufgenommen. Anschließend erfolgten die Reinigung und das Ansetzen der Melkbecher durch den Roboter.

Der Melkroboter ist eine potenzielle Quelle für die Übertragung von pathogenen Keimen. Daher wurde auch die Wirksamkeit der Zitzenreinigung und -desinfektion, sowie die Keimbelastung der Melkbecher vor und nach der Zwischendesinfektion untersucht. Im Zuge der Beprobung von der Zitzenhaut melkberechtigter Kühe wurden die entsprechenden Melkbecher rechts hinten und links vorne betupfert. Dazu wurde der Roboter unmittelbar nach Abnahme der Melkbecher gestoppt und mit je einem sterilen trockenen Tupfer dreimal kreisförmig über den Zitzengummischaff gestrichen. Beide Tupfer wurden wiederum in ein mit 2 ml viertelstarker befülltes Röhrchen überführt. Nach der automatisierten Melkzeugzwischendesinfektion mit Peressigsäure wurden erneut Tupferproben in gleicher Weise entnommen und in ein neues Proberöhrchen mit viertelstarker Ringerlösung überführt.

3.2.3. Entnahme der Einstreuproben

Die Einstreuproben wurden nach einem standardisiertem Prüfprotokoll (Patel et al. 2019) entnommen und untersucht.

Für die Entnahme der Einstreu wurden Einmalhandschuhe sowie neue saubere Nylonsäcke verwendet. Aus den entnommenen Poolproben wurde anschließend die Gesamtkeimzahl, die coliformen Bakterien, Staphylokokken und Äskulin-positive Kokken bzw. Enterokokken, der pH-Wert und die Trockensubstanz in Prozent bestimmt.

Zusätzlich wurden Daten über das Stallklima, insbesondere der Temperatur und Luftfeuchtigkeit, aufgezeichnet.

3.2.3.1. Probenentnahme von frisch hergestelltem Separatormaterial

Bei jedem Betriebsbesuch wurde eine Handvoll frisch gepresstes Separatormaterial zur weiteren Untersuchung entnommen. Diese Probe wurde gemeinsam mit den Proben aus den Liegeboxen über Nacht gekühlt gelagert und am nächsten Morgen weiteruntersucht.

3.2.3.2. Entnahme von Einstreumaterial aus den Liegeboxen

Für die Untersuchung der Einstreu wurde Liegeboxenmaterial aus dem hinteren Drittel und dem Euterbereich der Liegefläche der Kuh entnommen. Pro Box wurde eine Handvoll Einstreumaterial mit Handschuhen entnommen, wobei offensichtlich kotverschmutztes Material vermieden wurde. Die gezogenen Proben von je fünf Liegeboxen wurden in einen sauberen Nylonsack gepoolt und gut geschüttelt. Auf diese Weise wurden 10 Poolproben von je fünf Liegeboxen gezogen (zehn Proben von insgesamt 50 Liegeboxen). Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C gekühlt und am nächsten Morgen im Labor weiterverarbeitet.

3.2.3.3. Entnahme der Einstreu im frischen Zustand und nach 24, 48 sowie 96 Stunden nach Einbringung in die Liegeboxen

Für die Untersuchungen zur Entwicklung der Keimzahlen in den Liegeboxen wurde frisch gepresstes Separatormaterial in die Boxen eingebracht. Anschließend wurden wiederum von je fünf Liegeboxen eine Sammelprobe (Poolprobe) entnommen. Die Entnahme erfolgte mit sauberen Einmalhandschuhen und es wurde pro Box je eine Handvoll Einstreu von den oberen 5 cm im letzten Drittel der Box gesammelt, wobei wiederum die Entnahme von Kotklumpen oder langen Strohteilen aus der Stroh-Kalk-Matratze vermieden wurde. Insgesamt wurde Einstreumaterial von 25 (5x5) Liegeboxen in sauberen Nylonsäcken gepoolt, gut vermischt und verschlossen.

Aus den entnommenen Proben wurde im Labor eine repräsentative Probe (mindestens 100 ml) für weitere Untersuchungen bei -20 °C konserviert. In gleicher Weise erfolgte eine Probenentnahme und Lagerung bei -20 °C nach 24, 48 und 96 Stunden.

3.2.4. Untersuchungen des Stallklimas

Die Erhebung ausgewählter Stallklimadaten erfolgte mit zwei Lubratec® SmartBoxen der Firma Huesker Synthetic GmbH (Dülmen, Deutschland). Die Boxen wurden an zwei verschiedenen klimarelevanten Stellen im Laufstall montiert. Folgende Messparameter wurden mittels spezieller Sonden mehrmals am Tag gemessen:

- NH₃ (Ammoniak)
- CO₂ (Kohlendioxid)
- Luftfeuchtigkeit (H₂O)
- Temperatur in °C
- Beleuchtungsstärke in Lux

Der Temperatur-Humiditäts-Index (THI) wurde ebenfalls anhand der Daten von der Temperatur und der Luftfeuchtigkeit gemessen und in °C pro % angegeben.

3.3. Labordiagnostische Untersuchungen

3.3.1. Bakteriologische Untersuchung der aseptisch genommenen Viertelgemelksproben

Die Viertelgemelksproben wurden bei 1300 x g für zehn Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden der Überstand und das Sediment jeder Probe makroskopisch beurteilt und je 5 µl des Sedimentes wurden auf Columbia Agar (Merck, Darmstadt, D) mit Zusatz von 5 % Schafblut mäanderförmig auf je ein Viertel der Agarplatte ausgestrichen, sodass für alle vier Viertelgemelksproben einer Kuh je eine Agarplatte verwendet wurde. Die so beimpften Nährböden wurden bei 37 °C inkubiert und nach 24 und 48 Stunden beurteilt. Die Befundung erfolgte auf Basis der Koloniemorphologie und des Hämolyse-Verhaltens, sowie mithilfe einfacher biochemischer Testsysteme nach den DVG-Leitlinien zur Isolierung und Identifizierung von Mastitisserregern (Fehlings et al. 2009).

Für die weitere Differenzierung der angewachsenen Kolonien wurde eine Gram-Färbung (Gram-positive Kokken) (Huber-Schlenstedt et al. 2018) durchgeführt. Ein Katalase-Test mit dreiprozentigem Wasserstoffperoxid wurde zur Abgrenzung zwischen Streptokokken (Katalase-negativ) und Staphylokokken (Katalase-positiv) durchgeführt. Alle Streptokokken wurden zur weiteren Differenzierung auf drei weitere Spezialnährböden ausgestrichen: Für die Differenzierung zwischen Äskulin-positiven (*S. uberis* und Enterokokken) und Äskulin-negativen Streptokokken (Streptokokken der Lancefieldgruppen B, C und G) wurde Äskulin-Blutagar (Merck) verwendet, wo die Fluoreszenz des Nährbodens im UV-Licht durch das Wachstum Äskulin-positiver Streptokokken aufgehoben wird (Fehlings et al. 2009).

Alle Äskulin-positiven Stämme wurden weiters auf Äskulin-Galle-Azid-Agar (BAA-Agar, Merck) und auf modifizierten Rambach-Agar (Watts et al. 1993) ausgestrichen, um *Sc. uberis* von Enterokokken zu differenzieren (Wald et al. 2017). *Sc. uberis* zeigt auf Letzerem aufgrund seiner β -Galactosidase-Aktivität Wachstum in blaufarbenen Kolonien. Enterokokken führen zur Braunfärbung des Nährbodens und braunschwarzes Kolonienwachstum auf Galle-Äskulin-Azid Agar. Zur Bestätigung aller Äskulin-negativen Streptokokken der Lancefieldgruppe B als *Sc. agalactiae* wurde der CAMP-Test (positiv) angeschlossen (Fehlings et al. 2009). Für die Differenzierung zwischen von *S. aureus* und Koagulase-negative Staphylokokken wurden der Clumping factor A Nachweis (Staphytect Plus®, Oxoid) und der Koagulase-Röhrchentest (Remel Coagulase plasma®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt (Fehlings

et al. 2009). Bei schleimig angewachsenen großen Kolonien wurden eine Gramfärbung und ein KOH-Test durchgeführt, um diese als Gram-negative zu bestätigen. Die weitere Differenzierung erfolgte durch den Ausstrich auf MacConkey® Agar (Oxoid) auf Basis des Lactoseabbaues durch *E. coli* und *Klebsiella* spp. (Fehlings et al. 2009).

Prototheken und Sporenpilze werden als Nativpräparat unter dem Mikroskop betrachtet und aufgrund der Kolonienmorphologie und des mikroskopischen Bildes auf Gattungsebene befundet. Zusätzlich wurden die Ergebnisse der Tankmilchzellzahlen und -keimzahlen, welche von der Milchleistungsprüfung der LKV Oberösterreich durchgeführt wurde, erhoben.

3.3.1.1. Untersuchung der Zellzahl

Für den Zellzahlverlauf wurden die Ergebnisse der monatlichen Milchleistungsprüfung (Zellzahl in den Einzelgemelksproben) durch den Landeskontrollverband Oberösterreich herangezogen.

3.3.2. Untersuchung der Zitzenhauttupfer- und der Einstreuproben

Die entnommenen Tupferproben der Zitzenhaut in 2 ml viertelstarker Ringerlösung wurden unmittelbar nach jeder Betriebsausfahrt im diagnostischen Labor der Klinik für Wiederkäuer aufgearbeitet. Die Untersuchung der Gesamtkeimzahl auf Columbia-Schafblutagar (Merck) und der Keimzahlen von Coliformen, Staphylokokken und Streptokokken der Zitzenhaut und der Einstreu wurden Verdünnungsreihen mit NaCl hergestellt und ein Plattenausstrichverfahren durchgeführt. Je 100 µl Keimsuspension wurde unverdünnt beziehungsweise in den Verdünnungen 10^{-1} bis 10^{-5} mittels Spateltechnik auf den jeweiligen Agarplatten aufgebracht.

Folgende Nährböden wurden hierfür verwendet:

- I. Columbia Agar mit 5 % Schafblut als Universalagar für die Gesamtkeimzahl
- II. MacConkey Agar für coliforme Bakterien
- III. Baird Parker Blutagar (BPA, Oxoid) für den selektiven Nachweis von Staphylokokken
- IV. Kanamycin-Äskulin-Acid-Agar (KAA-Agar, Merck) für den Nachweis der Katalase-negativen und Äskulin-positiven Streptokokken
- V. Galle-Äskulin-Azid Agar (BAA-Agar) für Enterokokken
- VI. Slanetz-Bartley Agar für Enterokokken (Oxoid)

Die Agarplatten wurden anschließend bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, nach 24 beziehungsweise 48 Stunden beurteilt und die koloniebildenden Einheiten (KBE) pro Platte ausgezählt. Je nachdem welche Keimsuspension beim jeweiligen Beprobungsmaterial anwuchs (Tupfer der Zitzenhaut, Einstreumaterial oder Melkzeugtupfer), wurden nur die Verdünnungsstufen mit 3 bis 300 KBE pro 100 µl Suspension ausgezählt und dokumentiert.

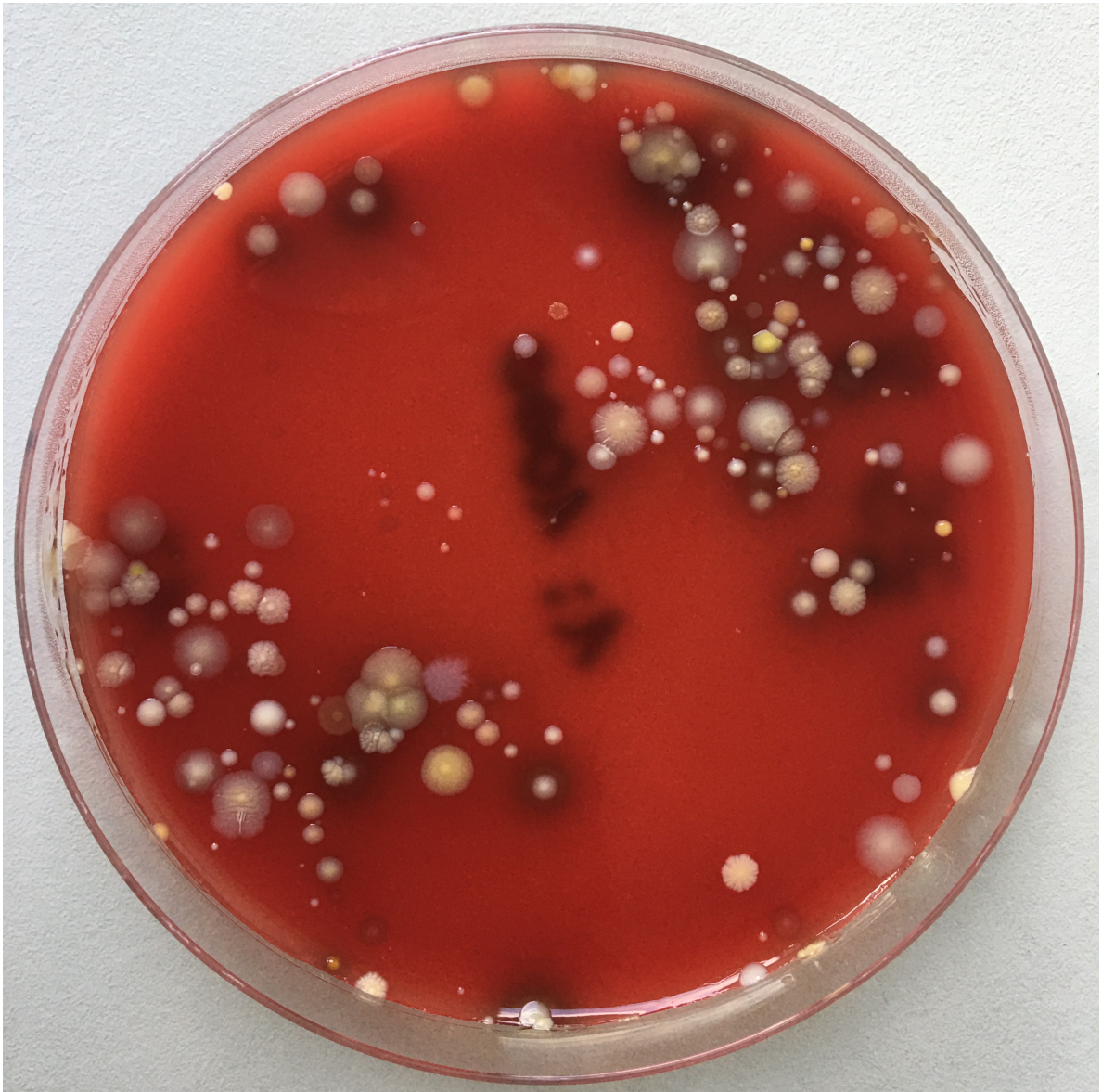


Abb. 2: Tupferprobe der Zitzenhaut in 1000-facher Verdünnung ausplattiert auf Columbia-Agar nach 48 Stunden Inkubation.

Für die bakteriologische Untersuchung der Einstreuproben wurde ein Protokoll von Rowe et al. (2019) angewendet. Ein Volumen von 50 ml Einstreu wurde in ein steriles Becherglas eingewogen und mit 250 ml Aqua dest. bei Raumtemperatur am Magnetrührer vermischt. Anschließend wurden Verdünnungsreihen hergestellt (10^{-1} bis 10^{-5}) und 100 µl auf Columbia-Schafblutagar zur Bestimmung der GKZ und auf die Selektivnährböden (siehe oben) ausplattiert.

Nach 24 und 48 Stunden Inkubation bei 37 °C wurde das Keimwachstum beurteilt und es wurden die Nährböden mit zählbarem Wachstum (zwischen 3 und 300 Kolonien) ausgezählt.

Die Berechnung erfolgte anhand folgender Formel:

Keimzahl pro Gramm Einwaage = Anzahl der gezählten Kolonien x 10 (100 µl wurden ausplattiert) x Verdünnungsfaktor x 300/Einwaage (g).

Für die qualitative Analyse des Keimspektrums der Einstreu und der Zitzenhaut wurden Einzelkolonien auf den Selektivnährböden zufällig ausgewählt, von den Spezialnährboden abgenommen und für die Untersuchung mittels MALDI-TOF MS (Microflex LT Instrument, Bruker Daltonics, Flexcontrol 3.0 Software und MALDI Biotyper 2.0 Datenbank) kryokonserviert.

Dafür wurde die ausgewählte Kolonie in Hirn-Herz-Bouillon (Brain Heart Infusion broth, BHI, Oxoid) überführt und 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Als Kryoprotektor wurden zu einem Milliliter Keimsuspension je 200 Mikroliter einer 2,5-prozentigen Dimethylsulfoxid-Lösung zugegeben. Anschließend wurden die Proben bei –80 °C gelagert.

3.3.2.1. Bestimmung der Trockensubstanz und des pH-Wertes in der Einstreu

Für die Bestimmung des Trockensubstanzgehaltes wurden 2 g des frisch gepressten Separatormaterials bzw. der Einstreuproben in ein steriles Becherglas eingewogen und das Gewicht notiert. Das Glas wurde mit einer Alufolie verschlossen und bei 100 °C für 24 Stunden im Trockenschrank mit Heißluft getrocknet. Anschließend wurde die gezogene Probe rückgewogen und der Trockensubstanzgehalt berechnet.

$TS (\%) = \text{Rückwaage} \times 100 / \text{Einwaage}$

Für die Messung des pH-Wertes wurden je 2 g der jeweiligen Einstreuprobe mit 50 ml deionisiertem Wasser vermischt und alle zehn Minuten aufgerührt. Nach 30 Minuten wurde der pH-Wert mittels pH-Meter gemessen und notiert.

3.3.3. Matrix-assisted laser desorption time-of-flight-Massenspektrometrie

Für die qualitative Analyse des Keimspektrums in der Einstreu und auf der Zitzenhaut wurden die kryokonservierten Isolate der Spezialnährböden auf Columbia Agar mit 5 % Schafblut rekultiviert. Um die für die MALDI-TOF Untersuchung benötigten Einzelkolonien zu erhalten, wurden jeweils am Folgetag der Rekultivierung Subkulturen mithilfe des Dreiösenausstriches auf Columbia Agar erstellt und 24 Stunden bei 37 °C bebrütet. Für die Identifizierung der Isolate wurde jedes Isolat im Duplikat untersucht. Als Referenzstamm wurde ein *E. coli* Referenzstamm verwendet.

Für den ersten Durchgang wurde die Basismethode gewählt, die sogenannte Direct Transfer Methode (Freiwald und Sauer 2009). Dazu wurde eine Einzelkolonie direkt mittels einer 1 µl sterilen Einwegöse von der Columbia Agarplatte abgenommen, auf die Target-Platte (microScout Target MSP 96) aufgetragen und luftgetrocknet. Anschließend wurde das getrocknete Kolonienmaterial mit je 1 µl Alpha-Cyano-4-Hydroxycinnamic-Säure (Matrixlösung) überschichtet, ein zweites Mal luftgetrocknet und analysiert.

Die ermittelten Spektren werden vom Gerät automatisiert und mit der systemintegrierten Referenzdatenbank abgeglichen. Die Validität der ausgegebenen Ergebnisse wird über einen errechneten Zahlenwert, Score, ausgegeben, der die Übereinstimmung der ermittelten Spektren mit den hinterlegten Referenzspektren wiedergibt. Ein Score Value von >2,300 gibt dabei an, dass das Isolat mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit auf Speziesebene identifiziert werden konnte, ein Score Value von 2,000-2,299 gibt an, dass es wahrscheinlich auf Speziesebene und sicher auf Genusebene zuverlässig erkannt wurde. Score Values zwischen 1,700-1,999 beschreiben Isolate, die mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Genusebene erkannt wurden. Mit einem Score Value <1,7000 werden die beprobten Isolate weder auf Spezies- noch auf Genusebene erkannt.

Bei einzelnen Isolaten konnte mit der Direct Transfer Methode kein aussagekräftiges Ergebnis auf Spezies- oder Genusebene erzielt werden. Daher wurde ein zweites Verfahren, die erweiterte Direct Transfer Methode, angewandt. Wie oben im Text beschrieben, wurden die einzelnen Kolonien auf die Targetplatte aufgetragen und in einem weiteren Zwischenschritt mit 1 µl 70 %iger Ameisensäure überschichtet und luftgetrocknet (Gosselin et al. 2018). Erst danach erfolgten die Überschichtungen mit der Matrixlösung (1 µl) und die Analyse wie bei der Direct Transfer Methode. Konnte auch diese Methode keine aussagekräftigen Ergebnisse liefern, wurde als drittes Verfahren eine Extraktionsmethode angewendet.

Diese Methode wurde wie folgt durchgeführt (Bizzini et al. 2010):

Eine Einzelkolonie wurde in einem Eppendorf Tube in 300 µl destilliertem Wasser eine Minute lang in einem Vortex-Mixer homogenisiert. Nun wurden 900 µl pures Ethanol hinzugegeben und nach erneuter Homogenisierung wurde die Probe für zwei Minuten bei 1300 ppm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und die Probe erneut bei gleicher Einstellung zentrifugiert. Das verbliebene Ethanol wurde dann mit einer Pipette abgehoben und das Pellet luftgetrocknet. Nun wurden 50 µl einer 70%igen Ameisensäure zum Pellet gegeben und mit der Pipette homogenisiert. Nach der Zugabe von 50 µl Acetonitril wurde die Suspension erneut mit der Pipette homogenisiert und es erfolgte ein weiterer zweiminütiger Zentrifugationsschritt bei 1300 ppm. Hiervon wurde je 1 µl jeder Probe auf die Targetplatte aufgetragen, luftgetrocknet und mit je 1 µl der Matrixlösung überschichtet. Danach wurde die getrocknete Targetplatte zur Identifikation in das MALDI-TOF MS-Gerät eingelegt und analysiert.

3.4. Statistik

Die statistischen Analysen dieser Arbeit wurden alle mittels der Software SPSS Statistics 23.0 (IBM, Armonk, NY, USA) und Microsoft Excel 2022 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA)) durchgeführt. Aufgrund des Aufbaues dieser Studie (Fallstudie in einem Betrieb) wurden rein deskriptive Statistiken angewandt und die Ergebnisse entsprechend dargestellt. Hierfür wurden die Daten zunächst auf Normalverteilung geprüft, es wurden Mittelwert (bzw. Median bei nicht normalverteilten Daten) und Standardabweichung bzw. Quartile berechnet. Die Zellzahlverläufe wurden grafisch mittels Boxplots bzw. Punkt-Streudiagrammen dargestellt.

4. Ergebnisse

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt auf den Untersuchungen der Güllefeststoffe und auf dem Verlauf der Keimzahlen in den Liegeboxen. Eine Kurzcharakteristik des Betriebes wird einleitend zum besseren Verständnis wiedergegeben. Anschließend werden die mikrobielle Belastung des Gülleseparates als Einstreumaterial unter der Berücksichtigung von Trockensubstanzgehalt und Temperatur-Luftfeuchtigkeitsindex und die Entwicklung der Keimzahlen in der Einstreu beschrieben. Ein weiteres Kapitel befasst sich mit der Besiedlung der Zitzenhaut mit euterpathogenen Keimen. Die Identifizierung ausgewählter Isolate der Einstreuproben, sowie der Zitzentupferproben mittels MALDI-ToF MS ermöglicht die Beurteilung der nachgewiesenen Keime hinsichtlich Mastitis-Relevanz. Die konkreten Auswirkungen auf die Eutergesundheit werden detailliert in der Diplomarbeit von Daniel Heneckl beschrieben und grafisch dargestellt.

4.1. Allgemeine Betriebsdaten

Bei dem Versuchsbetrieb handelte es sich um einen Fleckviehzuchtbetrieb in Oberösterreich. Zu Beginn des Versuches im Herbst 2021 (Zeitpunkt der Betriebsbesuche vor der Umstellung) wurden am Milchviehbetrieb 32 laktierende und 3 trockenstehende Kühe, sowie 12 Kalbinnen und Jungtiere gehalten. Die laktierenden beziehungsweise trockenstehenden Kühe wurden in Anbindehaltung (Kurzstand) und Einstreu von Sägespänen gehalten. Die Remontierung erfolgte vorwiegend aus eigener Nachzucht, lediglich eine Kuh und zwei trächtige Kalbinnen waren im Herbst/Winter 2021 zugekauft worden. Die Gesamtgröße der Herde lag 2021 bei 80 Tieren. Die Milchkühe wurden mit einer Rohrmelkanlage gemolken, die durchschnittliche Milchleistung betrug 6500 kg. Bei den beiden Betriebsbesuchen vor der Umstellung wurde die Stall- und Tierhygiene als mangelhaft bewertet. Bei über 20 % der Kühe waren die Euter stark verschmutzt (≥ 30 % der Euterhaut kotverschmutzt). Die Fütterung erfolgte über eine Grundfütterration bestehend aus Grassilage und Heu. Das Kraftfutter wurde manuell zugeteilt.

Mitte Dezember 2021 erfolgte der Umzug in den Neubau mit 32 laktierenden und einer trockengestellten Kuh sowie den Kalbinnen und den Jungtieren in den Liegeboxenlaufstall. Im neuen Stall wurden die Liegeboxen mit einer Stroh-Kalk-Matratze aufgebaut und mit Gülleseparat nachgestreut. Außerdem wurde ein Automatisches Melksystem (VMS V300, DeLaval, Tumba, Schweden) implementiert. Zum Zeitpunkt des Umzuges lag die durchschnittliche Laktationsleistung bei 6500 kg. Zur Dokumentation des Mastitiserregerspektrums wurden regelmäßig Viertelgemelksproben bakteriologisch

untersucht (Diplomarbeit Daniel Heneckl). Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse ist in Tabelle 2 wiedergegeben.

Bei den Untersuchungen vor der Umstellung waren drei (US 1) beziehungsweise fünf (US 2) Kühe mit *S. aureus* infiziert. Sie wurden noch vor der Umstellung ausgeschieden.

Tab. 2: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung von Viertelgemelksproben vor (grau schattiert), während (weiß hinterlegt) und nach der Umstellung (ockerfarben) auf Melkroboter und Einstreu von Separatormaterial.

Datum	n % von BU	negativ	<i>S. aureus</i>	KNS	<i>Sc.</i> <i>species</i>	Coliforme	Enterokokken
25.11.21	Anzahl	25	3	2	1	1	1
	% von BU	75,0	9,1	6,1	3	3	3
09.12.22	Anzahl	24	5	1	1	0	1
	% von BU	75,0	15,6	3,1	3,1	0	3,1
13.01.22	Anzahl	21	0	0	5	0	1
	% von BU	77,8	0	0	18,5	0	3,7
06.04.22	Anzahl	22	0	5	0	2	1
	% von BU	73,3	0	16,7	0	6,7	3,3
24.06.22	Anzahl	22	0	3	1	0	1
	% von BU	81,5	0	11,1	3,7	0	3,7

4.2. Untersuchung der frisch gepressten Güllefeststoffe

Das Separatormaterial wird am Hof über eine Pressschnecke hergestellt und unmittelbar als Einstreu in die Liegeboxen verwendet. Bei den beiden Betriebsbesuchen nach der Umstellung wurden neben den Einstreuproben aus den Liegeboxen auch je eine frisch gepresste Einstreuprobe entnommen und untersucht. Trockensubstanzgehalt und pH-Wert des frisch gepressten Separatormaterials sind in Tabelle 4 dargestellt. Tabelle 3 listet Gesamtkeimzahl und die Keimzahlen auf den Selektivnährböden bei der Untersuchung von Poolproben aus den Liegeboxen auf. Daraus ist ersichtlich, dass sowohl die Gesamtkeimzahl als auch die Keimzahlen der Selektivnährböden im Juni im Vergleich zur Untersuchung im April 2022 gesunken sind. Die Angaben der Keimzahlen in den Tabellen 3, 5 und 7 sind jeweils in der Exponentialschreibweise angegeben und folgendermaßen zu lesen: die Verwendung des Buchstabens E bedeutet „10 hoch“.

Tab. 3: Gesamtkeimzahl pro Gramm TS, Anzahl Coliformer Keime (MacC), sowie Keimzahlen auf Baird Parker Agar (BPA), Kanamycin-Äskulin-Azid Agar(KAA) und Galle-Äskulin-Azid Agar (BAA) pro Gramm TS in frisch gepressten Separatormaterial

Gülleseparat frisch	GKZ/g TS	MacC/g TS	BP/g TS	KAA/g TS	BAA/g TS
06. 04. 22	8,84E+08	9,64E+05	8,04E+06	2,87E+05	6,43E+05
23. 06. 22	6,21E+08	6,77E+05	1,72E+08	2,02E+05	4,51E+05

Nachdem die Umstellungsphase (Jänner bis März 2022) abgeschlossen war, wurden am 06. April und am 23. Juni 2022 Einstreuproben aus den Liegeboxen untersucht, wobei Proben aus dem Euterbereich entnommen und gepoolt wurden. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 4 bis 7 dargestellt. Es fällt auf, dass der Trockensubstanzgehalt der Einstreu aus den Liegeboxen deutlich niedriger ist, als in den frisch gepressten Einstreuproben und dass der pH-Wert im Vergleich zur frisch gepressten Einstreu alkalischer wird (Tab. 4). Die Gesamtkeimzahlen, sowie die Keimzahlen auf den Selektivnährböden werden in den Tabellen 5 (Untersuchungszeitpunkt am 06.04.23) und 7 (Untersuchungszeitpunkt am 23.06.23) dargestellt.

Tab. 4: Trockensubstanzgehalt (TS) und pH-Wert in den Einstreuproben aus den Liegeboxen und in frisch gepresstem Separatormaterial, am 06.04.2022

Poolproben Boxen	TS-Einwaage	TS Rückwaage	% TS	BU- Einwaage (50 ml)	pH
1 bis 5	5,18	2,74	52,90	12,77	9,53
6 bis 10	5,10	3,14	61,57	16,92	9,14
11 bis 15	5,09	3,45	67,78	13,46	9,53
16 bis 20	5,07	3,09	60,95	11,41	9,53
21 bis 25	5,15	2,89	56,12	11,71	9,23
Probe frisch	5,14	3,81	74,12	10,09	8,51

Tab. 5: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung der Poolproben aus den Liegeboxen am 06.04.22: Gesamtkeimzahl (GKZ) und KZ (Keimzahl) auf den Selektivnährböden GKZ/g TS: Gesamtkeimzahl pro g TS, MacC/g TS: Coliforme pro g TS, BP/g TS: Staphylokokken pro g TS, KAA/g TS: Äskulinpositive Kokken pro g TS, BAA/g TS: Enterokokken pro g TS

Poolproben Box	GKZ/g TS	MacC/gTS	BP/gTS	KAA/gTS	BAA/gTS
1 bis 5	3,09E+10	6,66E+06	7,80E+08	2,38E+06	1,78E+07
6 bis 10	2,57E+10	1,17E+07	1,54E+07	3,43E+06	4,86E+07
11 bis 15	1,52E+10	1,67E+07	1,80E+08	4,56E+06	3,61E+07
16 bis 20	1,73E+10	1,62E+07	3,19E+07	1,94E+07	1,64E+07
21 bis 25	2,37E+10	7,91E+07	6,95E+07	8,41E+07	8,41E+07
Probe frisch	8,84E+08	9,64E+05	8,04E+06	2,87E+05	6,43E+05

Tab. 6: Trockensubstanzgehalt (TS) und pH-Wert der gepoolten Einstreuproben aus den Liegeboxen am 23.06.2022

Poolproben Box	TS-Einwaage	TS-Rückwaage	% TS	BU-Einwaage	pH
1 bis 5	2,07	0,94	45,41	12,96	9,53
6 bis 10	2,16	1,15	53,24	16,96	9,14
11 bis 15	2,04	1,19	58,33	9,98	9,53
16 bis 20	2,05	0,94	45,85	13,4	9,53
21 bis 25	2,04	1,16	56,86	10,38	9,23
Probe frisch	2,00	1,54	77,00	13,81	8,54

Tab. 7: Gesamtkeimzahl (GKZ) und Keimzahlen auf den Selektivnährböden am 23.06.22 GKZ/g TS: Gesamtkeimzahl pro g TS, MacC/g TS: Coliforme pro g TS, BP/g TS: Staphylokokken pro g TS, KAA/g TS: Äskulinpositive Kokken pro g TS, BAA/g TS: Enterokokken pro g TS

Poolproben Boxen	GKZ/g TS	MacC/g TS	BP/g TS	KAA/g TS	BAA/g TS
1 bis 5	3,58E+10	5,14E+06	5,35+07	2,75E+06	2,06E+06
6 bis 10	3,00E+10	1,37E+07	1,80E+07	4,00E+06	5,67E+07
11 bis 15	2,41E+10	2,64E+07	2,85E+08	1,68E+07	5,70E+07
16 bis 20	1,95E+10	1,10E+07	3,60E+07	4,87E+06	1,85E+07
21 bis 25	1,57E+10	3,55E+07	8,96E+08	2,92E+07	2,92E+07
Probe frisch	6,21E+08	6,77E+05		2,02E+05	4,51+05

4.3. Entwicklung von pH-Wert, Trockensubstanzgehalt und Gesamtkeimzahl der Einstreu nach Einbringung in die Liegeboxen

In den Tabellen 8 und 9 werden der pH-Wert und der Trockensubstanzgehalt des Gülleseparates zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten (frische Einstreu, Einstreuproben nach 24, 48 und nach 96 Stunden) aufgelistet. Man erkennt, dass der pH-Wert von Zeitpunkt zu Zeitpunkt immer alkalischer (anstiegt) wird, während der Gehalt der Trockensubstanz in den Einstreuproben gleichzeitig sinkt.

Tab. 8: Verlauf des pH-Wertes in den jeweiligen Sammelproben in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt

Boxen	Proben pH-Wert			
	frisch (0 h)	24 h	48 h	96 h
1 bis 5	8,92	9,50	9,56	9,61
6 bis 10	8,79	9,69	9,55	9,50
11 bis 15	8,71	9,33	9,44	9,43
16 bis 20	8,79	9,12	9,38	9,52

Tab. 9: Verlauf des Trockensubstanzgehaltes in % (TS-Gehalt) in den jeweiligen Sammelproben in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt

Boxen	Proben TS-Gehalt in %			
	frisch (0 h)	24 h	48 h	96 h
1 bis 5	73,4	67,3	63,2	56,8
6 bis 10	77,7	70,5	61,7	61,8
11 bis 15	71,5	61,5	57,5	57,5
16 bis 20	69,0	62,9	61,5	65,5

In den Abbildungen 3 bis 7 ist die Entwicklung der Keimzahlen pro Gramm Trockensubstanz (TS) in den Liegeboxen unmittelbar nach der Einstreu frisch gepressten Separatormaterials, sowie nach 24, 48 und nach 96 Stunden dargestellt. Zur besseren Interpretation sind die Keimzahlen als dekadischer Logarithmus dargestellt. Es wurden wiederum Proben aus je fünf Liegeboxen gepoolt. Wie aus den Abbildungen hervorgeht, kommt es in den ersten 24 Stunden nach der Einstreu der Proben zu einem raschen Anstieg der Gesamtkeimzahl, aber auch der Keimzahlen auf den Selektivnährböden.

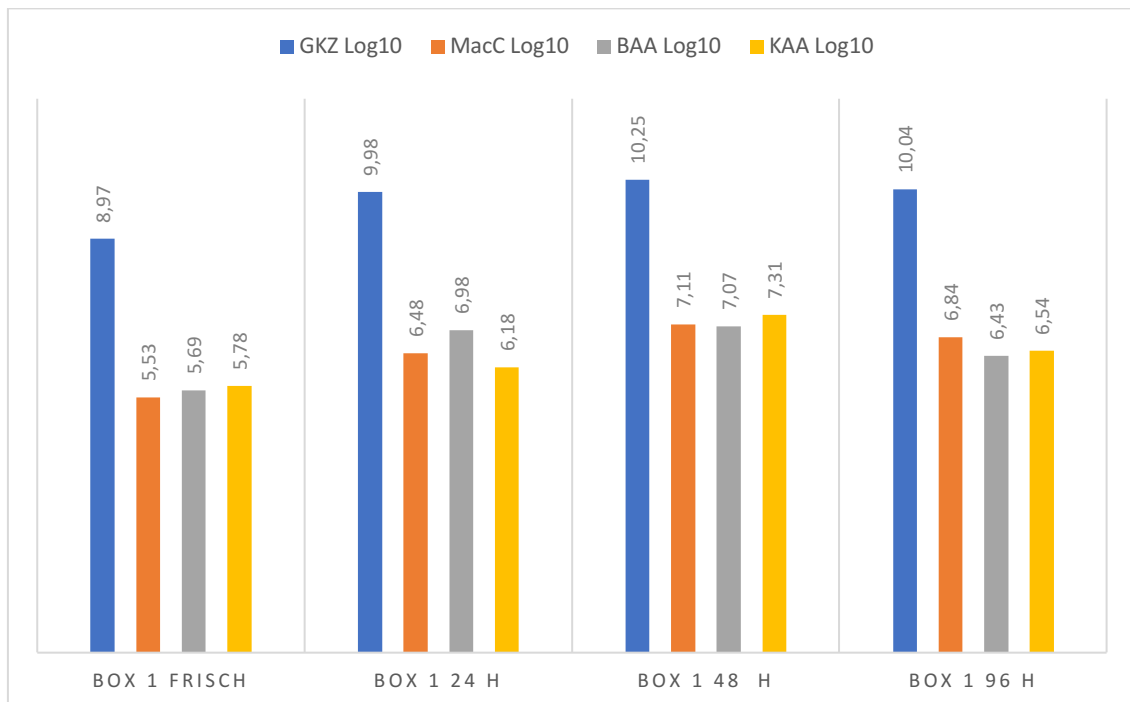


Abb. 3: Grafische Darstellung der Entwicklung der Keimzahlen in der Sammelprobe 1 nach Einbringen frischer Einstreu sowie nach 24, 48 und 96 Stunden in den Liegeboxen. Alle Keimzahlen sind logarithmiert dargestellt. Die Keimzahlen (Blau: Gesamtkeimzahl, orange Anzahl Staphylokokken/Corynebakterien, grau und gelb: Enterokokken bzw. Äskulinpositive Kokken) steigen in den ersten 24 Stunden deutlich an.

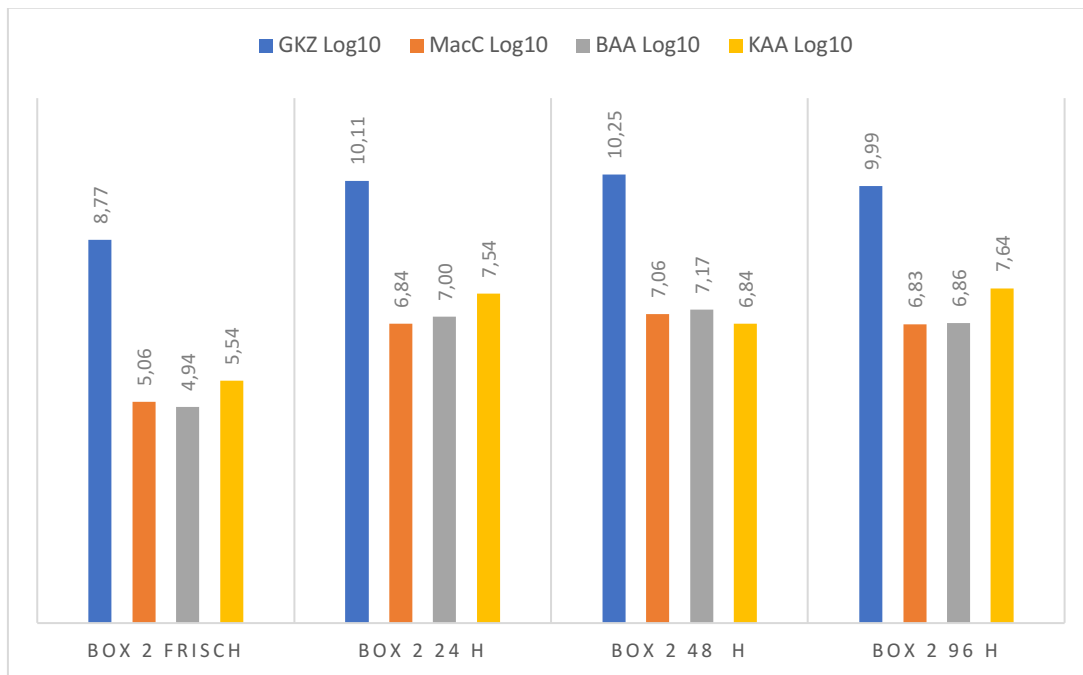


Abb. 4: Grafische Darstellung der Entwicklung der Keimzahlen (GKZ und Keimzahlen auf den Selektivnährböden) in der Sammelprobe 2

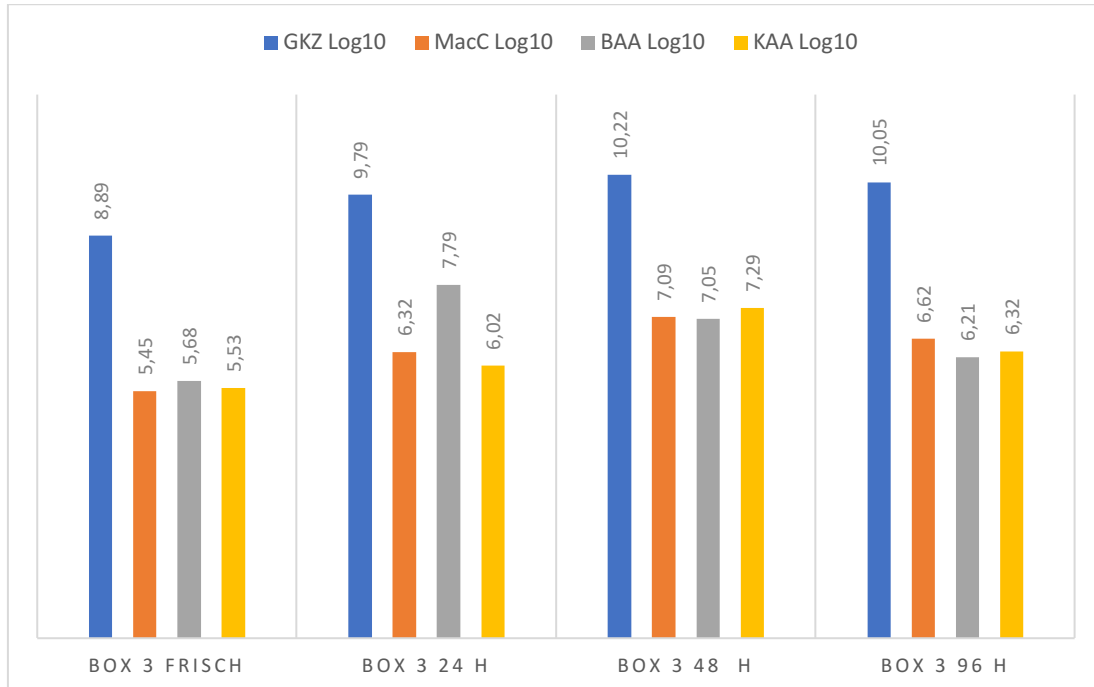


Abb. 5: Grafische Darstellung der Entwicklung der Keimzahlen (GKZ und Keimzahlen auf den Selektivnährböden) in der Sammelprobe 3

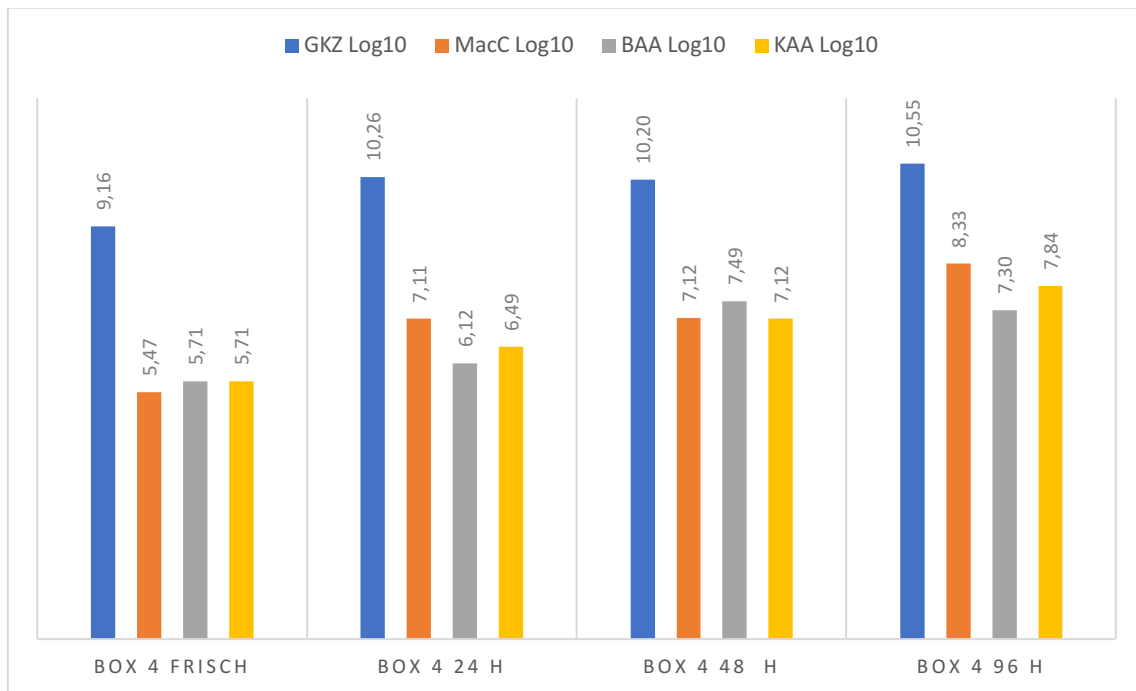


Abb. 6: Grafische Darstellung der Entwicklung der Keimzahlen (GKZ und Keimzahlen auf den Selektivnährböden) in der Sammelprobe 4

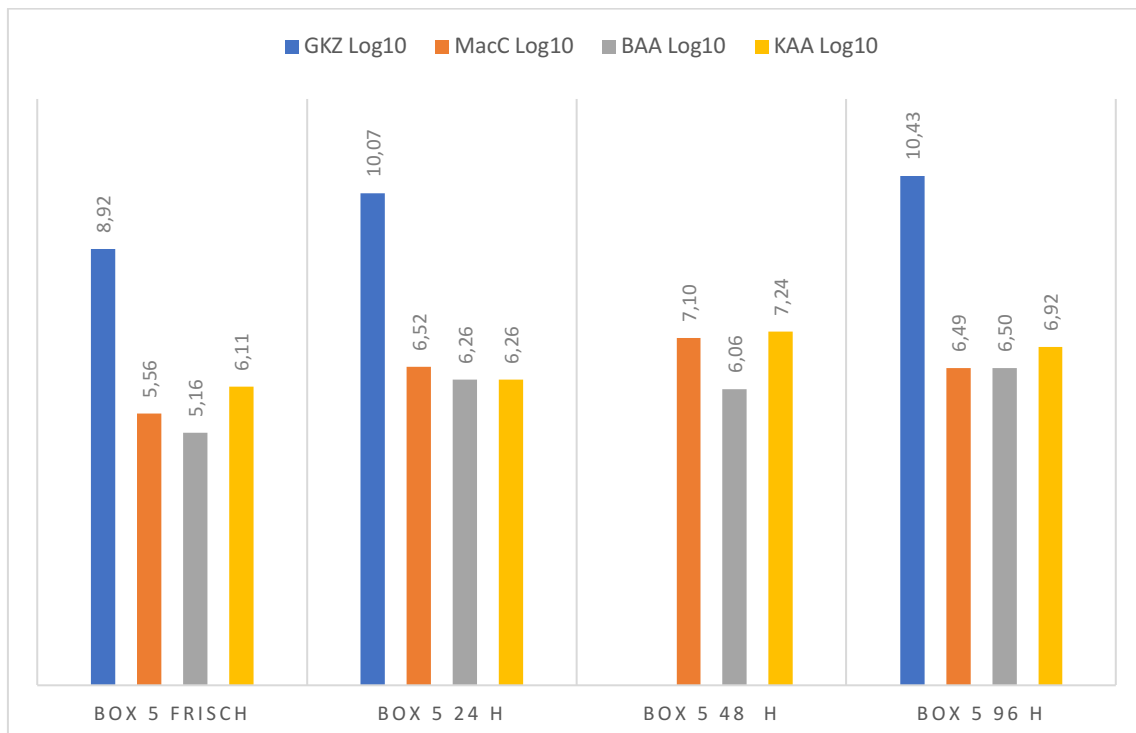


Abb. 7: Grafische Darstellung der Entwicklung der Keimzahlen (GKZ und Keimzahlen der Selektivnährböden) in der Sammelprobe 5

Die Gesamtkeimzahlen (blau) aller Sammelproben (eins bis fünf) waren unmittelbar nach dem Einstreuen (= frisch) am niedrigsten und zeigten den höchsten Anstieg nach 24 Stunden. Bei den weiteren Untersuchungszeitpunkten (48 und 96 Stunden) konnte nur mehr ein geringgradiger Anstieg der Keimzahl verzeichnet werden. Bei den Sammelproben 1 und 2 fiel die Keimzahl nach 96 Stunden wieder etwas ab. Bei der Probe 5 waren die Daten der Gesamtkeimzahl unvollständig, daher wurden diese nicht in der Bewertung der Ergebnisse herangezogen. Bei der genaueren Keimdifferenzierung konnte außerdem ein Anstieg der Staphylokokken/Corynebakterien (orange) der Enterokokken (grau), der Äskulin-positive Kokken (gelb) in den ersten 24 Stunden beobachtet werden. Bei den weiteren Untersuchungszeitpunkten blieben sie nahezu unverändert.

4.4. Keimzahlen an der Zitzenhaut und der Zitzenspitze

Die Ergebnisse der Tupfer der Zitzenhaut und der Zitzenspitzen (Strichkanalmündung) sind in den Tabellen 10 und 11 ersichtlich. Die Tupfer wurden bei den Betriebsbesuchen in der Umstellungsphase und nach der Umstellung von jeweils einem gegenständlich liegendem Zitzenpaar rechts vorne und links hinten von insgesamt 10 zufällig ausgewählten Kühen pro Betriebsbesuch entnommen.

4.4.1. Gesamtkeimzahl an Zitzenhaut und Zitzenspitze

Die Die Gesamtkeimzahl pro cm² Zitzenhaut zeigt keine eindeutige Tendenz, wie in Tabelle 10 ersichtlich ist. Nach einem Rückgang im April stieg die mittlere Gesamtkeimzahl (Median) im Juni wieder deutlich an. Auf den Selektivnährböden ist vor allem die Zunahme der Coliformen und der Enterokokken im Juni auffallend.

Tab. 10: Auflistung der Gesamtkeimzahl (GKZ), der Anzahl der Coliformen (auf MacConkey Agar), der Staphylokokken (BP) und der Enterokokken (BAA, bzw. Äskulin-positive Kokken, KAA) pro cm² Zitzenhaut

Datum			KBE/ cm ² GKZ	KBE/cm ² MacConkey	KBE/cm ² BP	KBE/cm ² KAA	KBE/cm ² BAA
12-JAN-22	N	Gültig	10	8	9	8	8
		Fehlend	0	2	1	2	2
	Mittelwert		97463	38	26320	121	286
	Median		48550	14	26000	38	280
	Minimum		520	6	3010	12	67
	Maximum		266000	182	59600	740	540
06-APR-22	N	Gültig	10	8	10	3	0
		Fehlend	0	2	0	7	10
	Mittelwert		67997	60	30930	100	
	Median		29850	27	9300	100	
	Minimum		5166	8	1400	60	
	Maximum		238000	179	178000	140	
23-JUN-22	N	Gültig	8	7	9	8	7
		Fehlend	2	3	1	2	3
	Mittelwert		78425	193	51956	1247	674
	Median		65050	180	34000	750	100
	Minimum		8400	14	1200	32	60
	Maximum		178000	420	196000	3600	3200

Abbildung 7 stellt den Verlauf der Gesamtkeimzahl (KBE pro cm² der Zitzenhaut) zum Zeitpunkt der Umstellung im Jänner, sowie nach der Umstellungsphase im April und Juni 2022 dar. Hierbei wird ersichtlich, dass die Gesamtkeimzahlen der zehn beprobten Zitzenpaare im Jänner (Umstellungsphase) weit streuen und ein hohes Maximum aufweisen.

Nach der Umstellung im April sank die Gesamtkeimzahl auf der Zitzenhaut deutlich ab, um im Juni wieder etwas anzusteigen: Im Jänner lagen 75 % der untersuchten Kühe bei einer Gesamtkeimzahl der Zitzenhaut von knapp über 200.000 Zellen pro cm². Im April sank die Zahl auf 100.000 Zellen pro cm², während sie im Juni wiederum auf knapp unter 150.000 KBE pro cm² der Zitzenhaut anstieg.

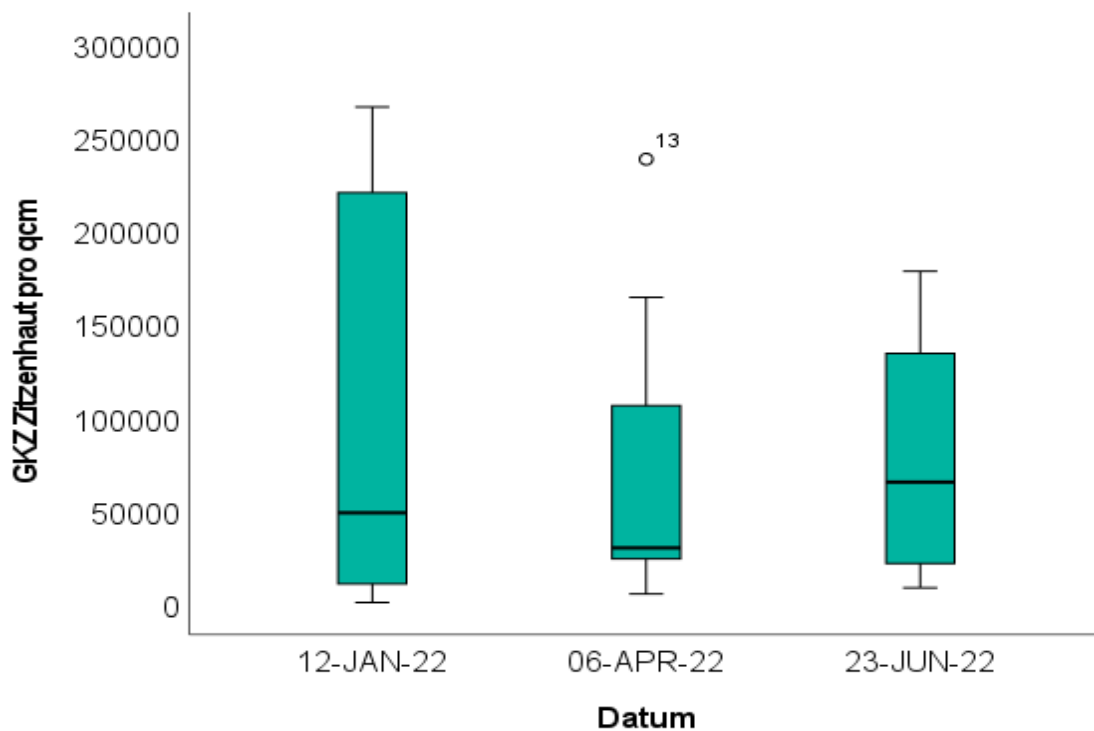


Abb. 8: Verlauf der Gesamtkeimzahl pro cm² Zitzenhaut an den drei Untersuchungszeitpunkten

Der Verlauf der Gesamtkeimzahl an der Zitzenspitze ist Tabelle 11 und Abbildung 8 wiedergegeben. Es zeigt sich eine eindeutigere Tendenz als an der Zitzenhaut und die Anzahl der KBE ist um ein Vielfaches höher als pro cm² Zitzenhaut. Aus Abbildung 8 ist deutlich ablesbar, dass die Keimbelastung zum Zeitpunkt der Umstellung von Jänner bis im Juni absinkt. Ebenso sinkt die Anzahl der Bakterien, die auf den Selektivnährböden ausgewertet wurden (coliforme Bakterien, Staphylokokken, Streptokokken und Enterokokken).

Im Jänner wiesen 75 % der Kühe eine Gesamtkeimzahl unter 2.000.000 Zellen auf (Abb. 9, 75 % - Quartil), während im Juni eine Keimbelastung von weniger als 60.000 Zellen detektiert wurde.

Tab. 11: Darstellung der Gesamtkeimzahl (GKZ), sowie der Keimzahlen auf MacConkey Agar, auf BP Agar, BAA und KAA an der Zitzenspitze.

Datum			GKZ	KBE MacConkey	KBE BP	KBE KAA	KBE BAA
12-JAN-22	N	Gültig	10	7	7	8	6
		Fehlend	0	3	3	2	4
	Mittelwert		1562000	429	239143	2184	3067
	Median		1220000	180	218000	465	3000
	Minimum		7000	120	28000	160	1200
	Maximum		4540000	900	564000	8800	4800
06-APR-22	N	Gültig	10	7	10	2	2
		Fehlend	0	3	0	8	8
	Mittelwert		860280	3265	240050	3150	2650
	Median		565000	720	66500	3150	2650
	Minimum		54800	80	21500	600	600
	Maximum		2820000	13200	1220000	5700	4700
23-JUN-22	N	Gültig	8	7	8	9	8
		Fehlend	2	3	2	1	2
	Mittelwert		179873	253	50600	438	337
	Median		96000	282	30450	320	122
	Minimum		2400	10	1200	60	12
	Maximum		508000	620	182000	1200	1800

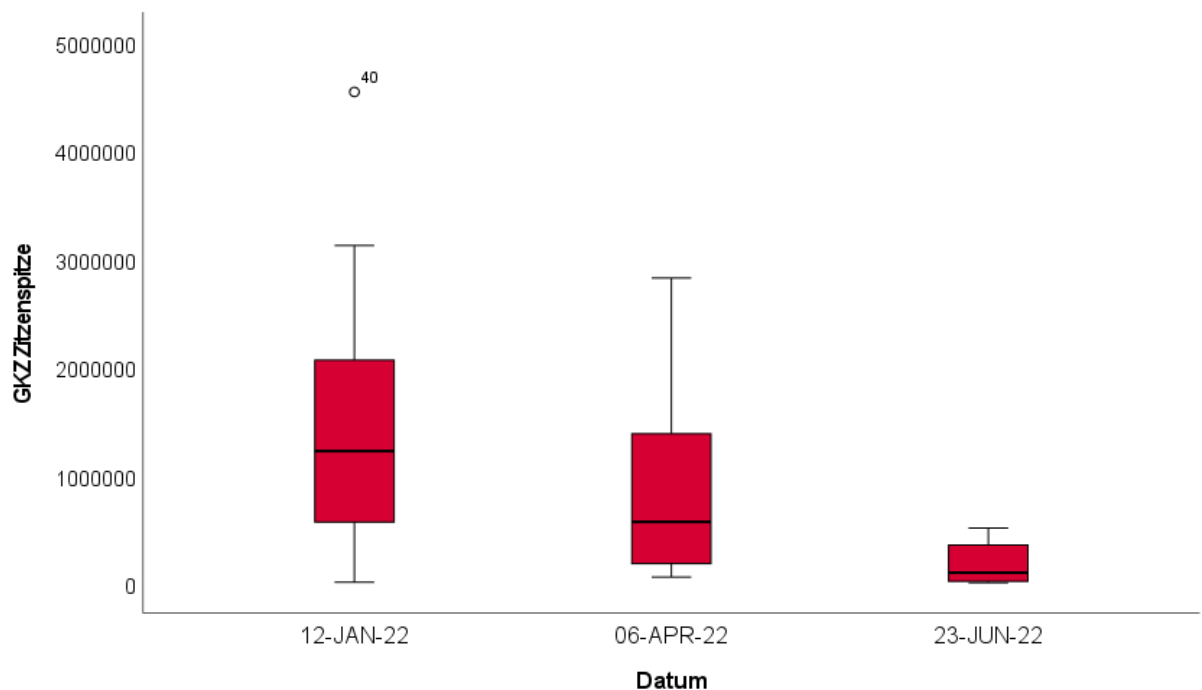


Abb. 9: Darstellung der Gesamtkeimzahl an der Zitzenspitze zum Zeitpunkt der Betriebsbesuche.

Bei der Betrachtung der Gesamtkeimzahl im methodischen Vergleich zwischen den Tupfern der Zitzenhaut und Zitzenspitze fällt auf, dass die Keimbelastung an der Zitzenspitze (Summe der KBE an der Zitzenspitze rechts vorne und links hinten) um ein Vielfaches höher ist als pro cm^2 Zitzenhaut.

4.5. Auswertungen der Proben im MALDI-ToF MS

Für die Spezifizierung wurden insgesamt 334 Isolate von den verschiedenen Nährböden abgenommen und an der Klinik für Geflügel der Veterinärmedizinischen Universität Wien mittels MALDI-ToF bis auf Speziesebene differenziert. Die Anzahl der untersuchten Isolate der jeweiligen Selektivnährböden bei der Untersuchung der **Zitzentupfer** ist unten aufgelistet.

Insgesamt sind dabei 142 Isolate gezählt worden, wobei zehn dieser Proben ein MALDI Score von <1,7000 aufwiesen. Für diese Isolate ist die Speziesdifferenzierung nicht zuverlässig, da keine Spektren in der Datenbank zum Abgleich vorliegen. Diese Isolate wurden daher weder auf Spezies- noch auf Genusebene erkannt und bei den Auswertungen nicht berücksichtigt.

- 09.12.2021: 14 Isolate von Slanetz-Bartley Agar
10 Isolate von Baird Parker Blutagar
5 Isolate von MacConkey Agar
- 12.01.2022 10 Isolate von Baird Parker Agar
10 Isolate von MacConkey Agar
10 Isolate von Galle-Äskulin-Azid Agar
10 Isolate von Kanamycin-Äskulin-Acid-agar
- 04.04.2022 10 Isolate von Baird Parker Agar
10 Isolate von MacConkey Agar
10 Isolate von Galle-Äskulin-Agar
10 Isolate von Kanamycin-Äskulin-Acid-Agar
- 23.06.2022 8 Isolate von Baird Parker Agar
8 Isolate von McConkey-Agar
8 Isolate von Galle Äskulin Agar
9 Isolate von Kanamycin-Äskulin-Acid-Agar

Die Anzahl der zufällig ausgewählten Isolate der **Einstreuproben** ist unten wiedergegeben. Von den insgesamt 192 Isolaten konnten zehn in der MALDI-ToF MS nicht eindeutig identifiziert werden (Score Value < 1,7000) und wurden daher ausgeschlossen.

- 12.01.2022 15 Proben auf Baird Parker Agar (Oxoid)
15 Proben auf MacConkey Agar (Merck)
15 Proben auf Galle Äskulin Agar (Merck)
15 Proben auf Kanamycin-Äskulin-Acid-Agar (Merck)

- 04.04.2022 18 Proben auf Baird Parker Agar (Oxoid)
 18 Proben auf MacConkey Agar (Merck)
 18 Proben auf Galle Äskulin Agar (Merck)
 18 Proben auf Kanamycin-Äskulin-Acid-Agar (Merck)

- 23.06.2022 15 Proben auf Baird Parker Agar (Oxoid)
 15 Proben auf MacConkey-Agar (Merck)
 15 Proben auf Galle Äskulin Agar (Merck)
 15 Proben auf Kanamycin-Äskulin-Acid-Agar (Merck)

Aus der Gesamtuntersuchung (Zitzenhaut- und Zitzenspitzetupfer und Einstreuproben) konnten 20 Isolate nicht identifiziert (Score Value < 1,7000) und infolgedessen in dieser Arbeit auch nicht berücksichtigt werden. Die daraus festgestellten Bakterien der Zitzenhaut und Zitzenspitze, sowie der Einstreu sind in den folgenden Kapiteln graphisch dargestellt und beschrieben.

4.5.1. Bakterienspektrum der Zitzenhaut und der Zitzenspitze

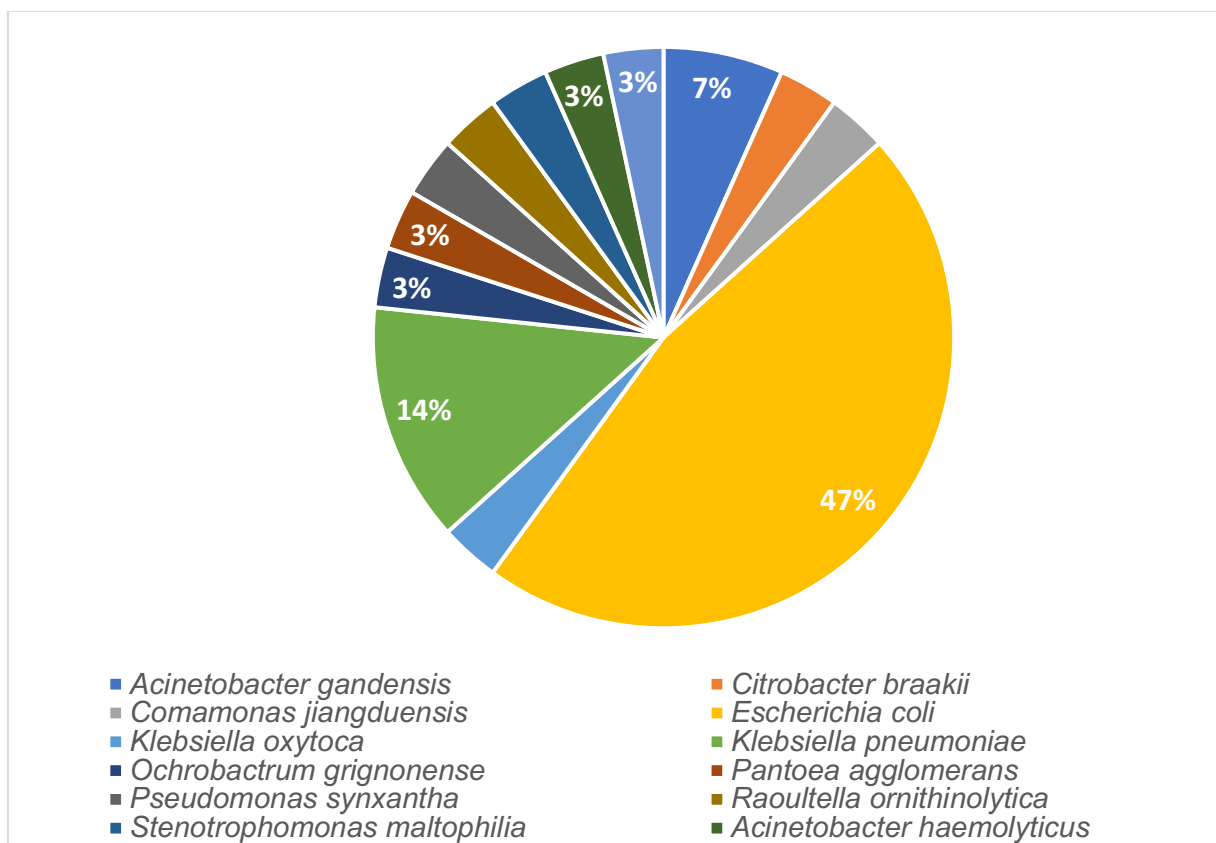


Abb. 10: Graphische Darstellung der auf MacConkey-Agar zufällig ausgewählten Kolonien im Untersuchungszeitraum von Dezember 2021 bis Juni 2022, die mittels MALDI-ToF MS spezifiziert worden sind.

Unter den auf der Zitzenhaut nachgewiesenen Coliformen finden sich neben *E. coli* einige bedeutende Mastitispathogene darunter auch *K. pneumoniae* (Tab. 12).

Tab. 12: Auflistung der Bakterien, die auf MacConkey-Agar im Untersuchungszeitraum von Dezember 2021 bis Juni 2022 angewachsen und mittels MALDI-ToF MS nachgewiesen worden sind.

Spezies	n	Mastitisrelevanz
<i>Acinetobacter gandensis</i>	2	nein
<i>Citrobacter braakii</i>	1	ja (Nonnemann et al. 2019)
<i>Comamonas jiangduensis</i>	1	nein
<i>Escherichia coli</i>	14	ja (Massè et al. 2020)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	ja (Massè et al. 2020)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	ja (Massè et al. 2020)
<i>Ochrobactrum grignonense</i>	1	nein
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	ja (Nonnemann et al. 2019)
<i>Pseudomonas synxantha</i>	1	nein
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1	ja (Massè et al. 2020)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	ja (Gelasakis et al. 2016)
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	1	ja (Nonnemann et al. 2019)
<i>Pseudomonas mendocina</i>	1	nein
Summe	30	

In Abbildung 11 ist die Differenzierung der Enterokokken bzw. der Gram-positiven und Katalase-negativen Kokken dargestellt. Tabelle 13 listet die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Spezies auf und bewertet die Mastitisrelevanz anhand von wissenschaftlichen Untersuchungen.

Innerhalb der Katalase-negativen und Äskulin-positiven Kokken hatte *A. viridans* mit 32 % den größten Anteil, gefolgt von *E. saccharolyticus* mit 18 %, *E. canintestini* mit 11 % und *E. hirae* mit 8 %. Für *E. canintestini* ergab die Literaturrecherche keine Hinweise auf eine Mastitisrelevanz.

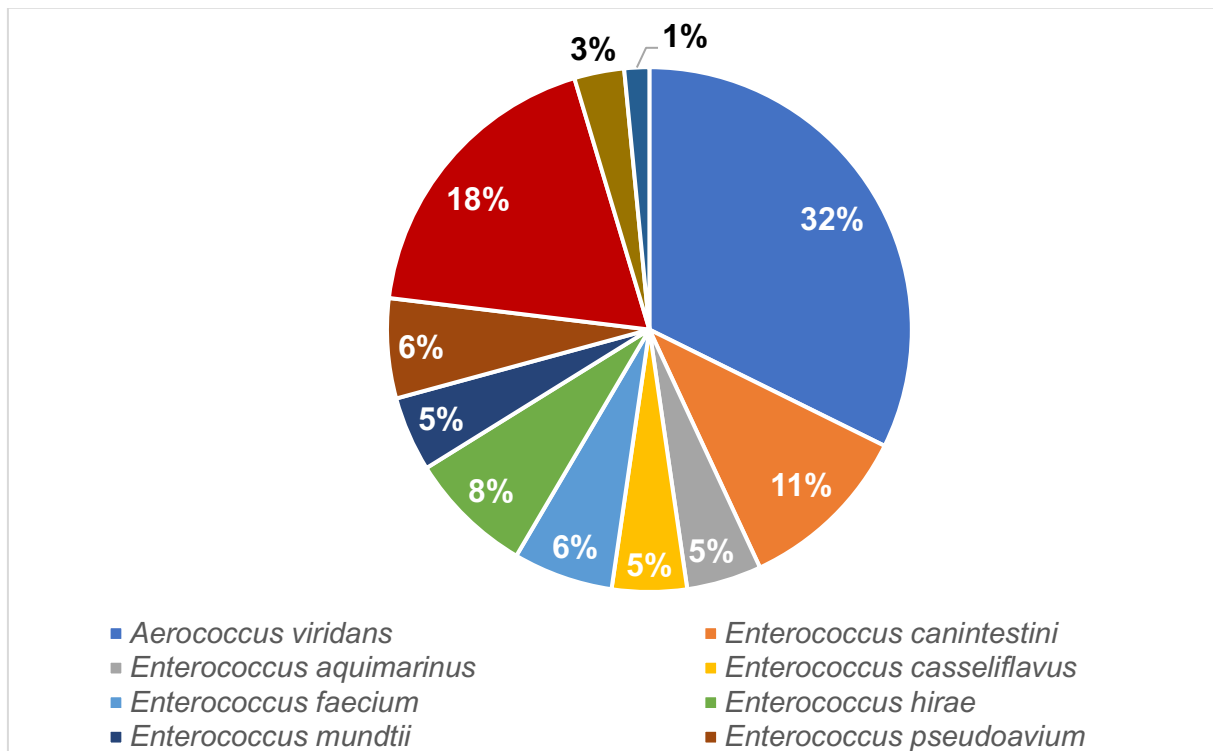


Abb. 11: Speziesverteilung der auf BAA- und KAA-Agar zufällig ausgewählten und mittels MALDI ToF MS differenzierten Spezies.

Tab. 13: Auflistung der Bakterien, die auf Galle-Äskulin-Agar im Untersuchungszeitraum von Dezember 2021 bis Juni 2022 angewachsen und mittels MALDI-ToF MS detektiert worden sind.

Spezies	n	Mastitisrelevanz
A. viridans	21	ja (Sun et al. 2017, Wyder et al. 2011)
<i>E. canintestini</i>	7	nein
<i>E. aquimarinus</i>	3	nein
E. casseliflavus	3	ja (Petersson-Wolfe et al. 2008)
E. faecium	4	ja (Nonnemann et al. 2019)
E. hirae	5	ja (Juliano et al. 2022)
<i>E. mundtii</i>	3	nein
<i>E. pseudoavium</i>	4	nein
E. saccharolyticus	12	ja (Juliano et al. 2022, Wyder et al. 2011)
<i>E. devriesei</i>	2	nein
E. durans	1	ja (Paschoalini et al. 2023)
Summe	65	

Vereinzelt wurden noch *Enterococcus (E.) mundtii*, *E. devriesei*, *E. casseliflavus*, *E. aquamarinus*, *E. durans* gefunden.

Die Differenzierung der Isolate, die vom Selektivnährboden für Staphylokokken abgenommen worden waren, zeigte sich, dass neben Staphylokokken vor allem Corynebakterien am Baird Parker Agar angewachsen waren. Die prozentuelle Verteilung ist in Abbildung 12, die genauen Zahlen und die Beurteilung der Mastitisrelevanz sind in Tabelle 14 dargestellt.

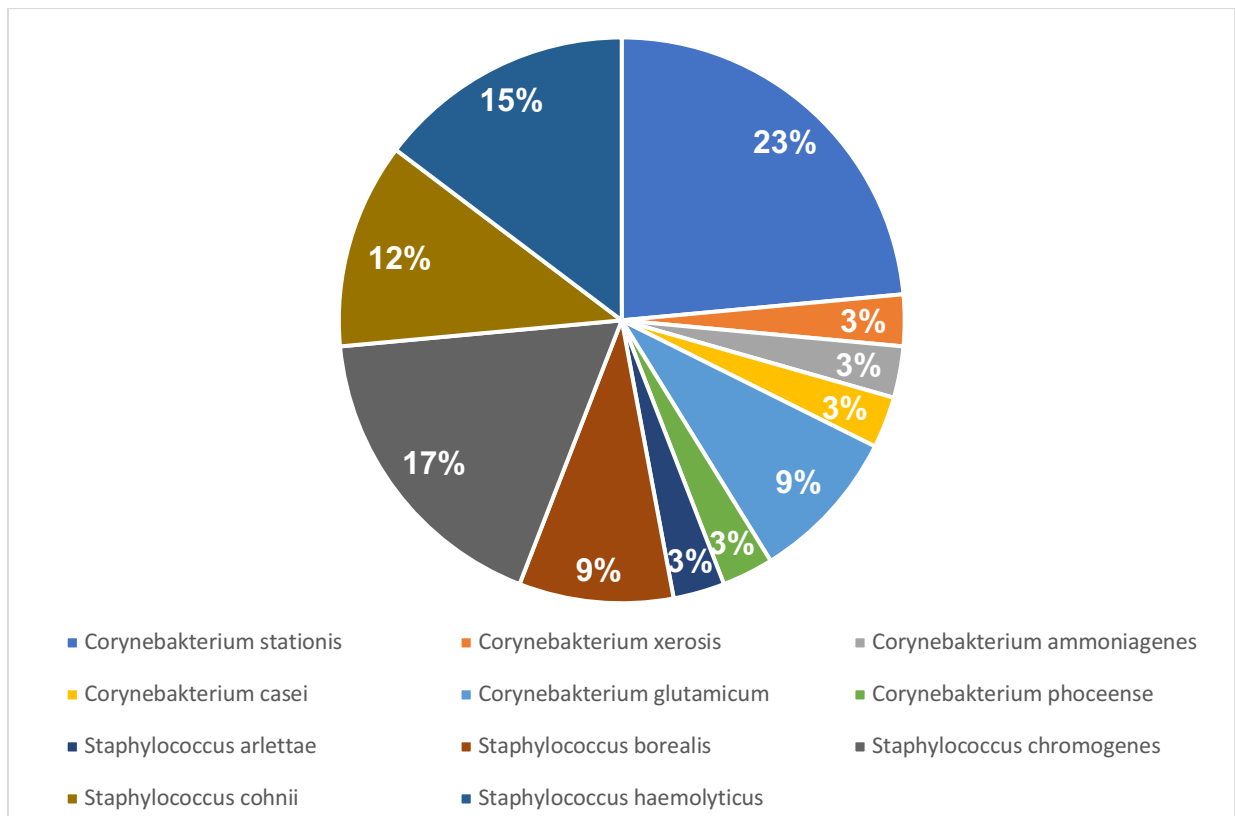


Abb. 12: Graphische Darstellung der auf Baird-Parker-Agar zufällig ausgewählten Kolonien im Untersuchungszeitraum von Dezember 2021 bis Juni 2022, die mittels MALDI-ToF MS spezifiziert worden sind.

Tab. 14: Auflistung der Bakterien, die auf Baird-Parker-Agar im Untersuchungszeitraum von Dezember 2021 bis Juni 2022 angewachsen und mittels MALDI-ToF MS detektiert worden sind.

	n	Mastitisrelevanz
<i>C. stationis</i>	8	ja (Lücken et al. 2022)
<i>C. xerosis</i>	1	ja (Lücken et al. 2022)
<i>C. ammoniagenes</i>	1	nein
<i>C. casei</i>	1	nein
<i>C. glutamicum</i>	3	nein
<i>C. phoceense</i>	1	nein
<i>S. arlettae</i>	1	nein
<i>S. borealis</i>	3	unbekannt, erst 2020 neu beschrieben
<i>S. chromogenes</i>	6	ja (Wuytack et al. 2020)
<i>S. cohnii</i>	4	ja (Wuytack et al. 2020)
<i>S. haemolyticus</i>	5	ja (Wuytack et al. 2020)
Summe	34	

4.5.2. Bakterienspektrum der Einstreu

Der erste Untersuchungszeitpunkt, in der die Einstreuproben gezogen und analysiert worden sind, war während der Umstellungsphase am 12.01.2022. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Kühe schon ein paar Wochen im neu gebauten Laufstall. In Abbildung 13 ist prozentuelle Verteilung der mittels MALDI ToF MS nachgewiesenen coliformen Spezies dargestellt. Von den als insgesamt 47 festgestellten Bakterien der Gattung Coliforme, war die Spezies *E. coli* mit 38,0 % die am häufigsten nachgewiesene, gefolgt von *K. pneumoniae* mit 13,0 %.

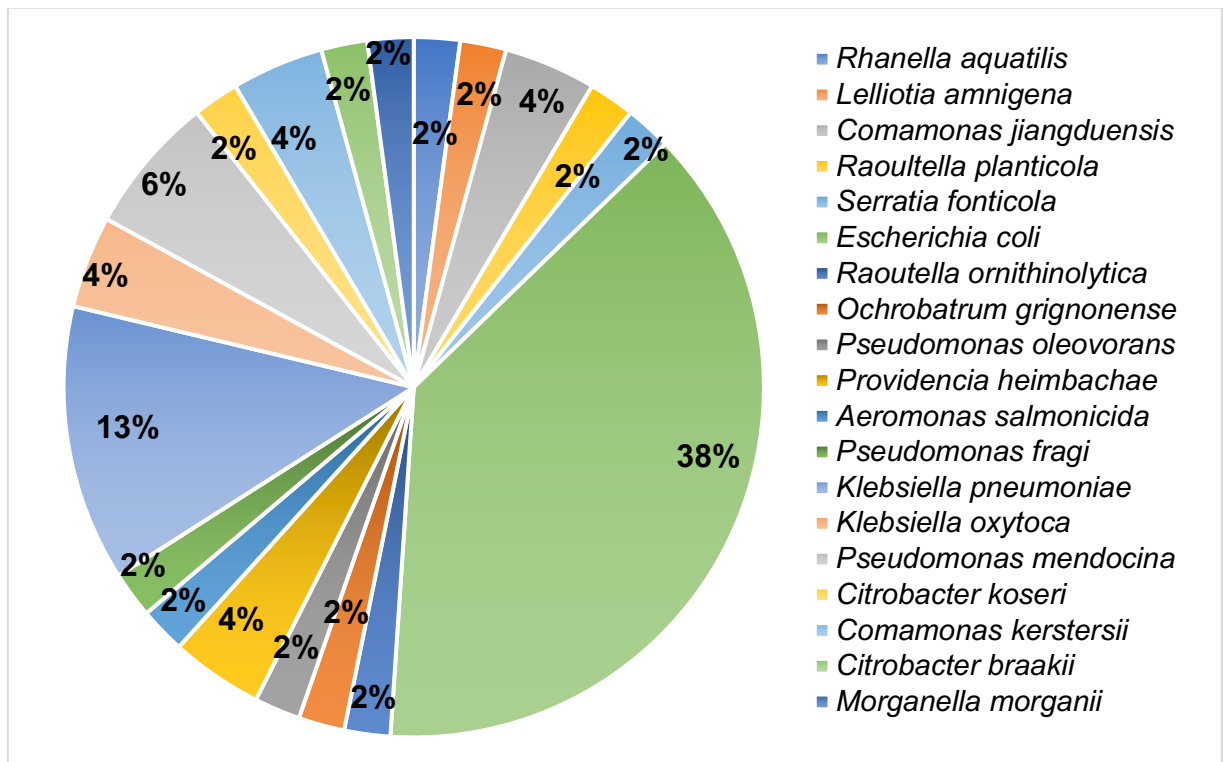


Abb. 13: Graphische Darstellung der auf MacConkey-Agar zufällig ausgewählten Kolonien im Untersuchungszeitraum von Dezember 2021 bis Juni 2022, die mittels MALDI-ToF MS spezifiziert worden sind.

Tab. 15: Auflistung der Bakterien, die auf MacConkey-Agar im Untersuchungszeitraum von Dezember 2021 bis Juni 2022 angewachsen und mittels MALDI-ToF MS detektiert worden sind.

Spezies	n	Mastitisrelevanz
<i>Rhanella aquatilis</i>	1	nein
<i>Lelliotia amnigena</i>	1	nein
<i>Comamonas jiangduensis</i>	2	nein
<i>Raoultella planticola</i>	1	ja (Massè et al. 2020)
<i>Serratia fonticola</i>	1	nein
<i>Escherichia coli</i>	18	ja
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1	ja (Massè et al. 2020)
<i>Ochrobactrum grignonense</i>	1	nein
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	1	nein
<i>Providencia heimbachae</i>	2	nein
<i>Aeromonas salmonicida</i>	1	nein
<i>Pseudomonas fragi</i>	1	nein
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	ja (Massè et al. 2020)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	ja (Massè et al. 2020)
<i>Pseudomonas mendocina</i>	3	nein
<i>Citrobacter koseri</i>	1	ja (Nonnemann et al. 2019)
<i>Comamonas kerstersii</i>	2	nein
<i>Citrobacter braakii</i>	1	ja (Nonnemann et al. 2019)
<i>Morganella morganii</i>	1	nein
Summe	47	

Von den insgesamt 92 der Gattung der Enterokokken identifizierten Isolaten war *E. saccharolyticus* mit 40,0 % die am häufigsten isolierte Spezies, gefolgt von *A. viridans* mit 23,0 %, *E. hirae* mit 9,0 %. Die Gesamtverteilung ist in Abbildung 14 wiedergegeben, In Tabelle 16 ist neben den absoluten Zahlen auch die Mastitisrelevanz angeführt. Zu den klinisch relevanten Mastitiserreger können vor allem *A. viridans* und *E. faecium* gezählt werden.

Äskulin-negative Katalase-negative Bakterien wurden während des Untersuchungszeitraums ebenfalls gefunden. Von den insgesamt fünf konservierten Stämmen wurden dreimal *Carnobacterium maltaromaticum* (Gram-positive Katalase-negative Stäbchen, die zu den Lactobacillales, den Milchsäurebakterien, gehören) sowie je einmal *Lactococcus garvieae* und *Streptococcus gallolyticus* (ebenfalls Lactobacillales, jedoch Kokken) nachgewiesen.

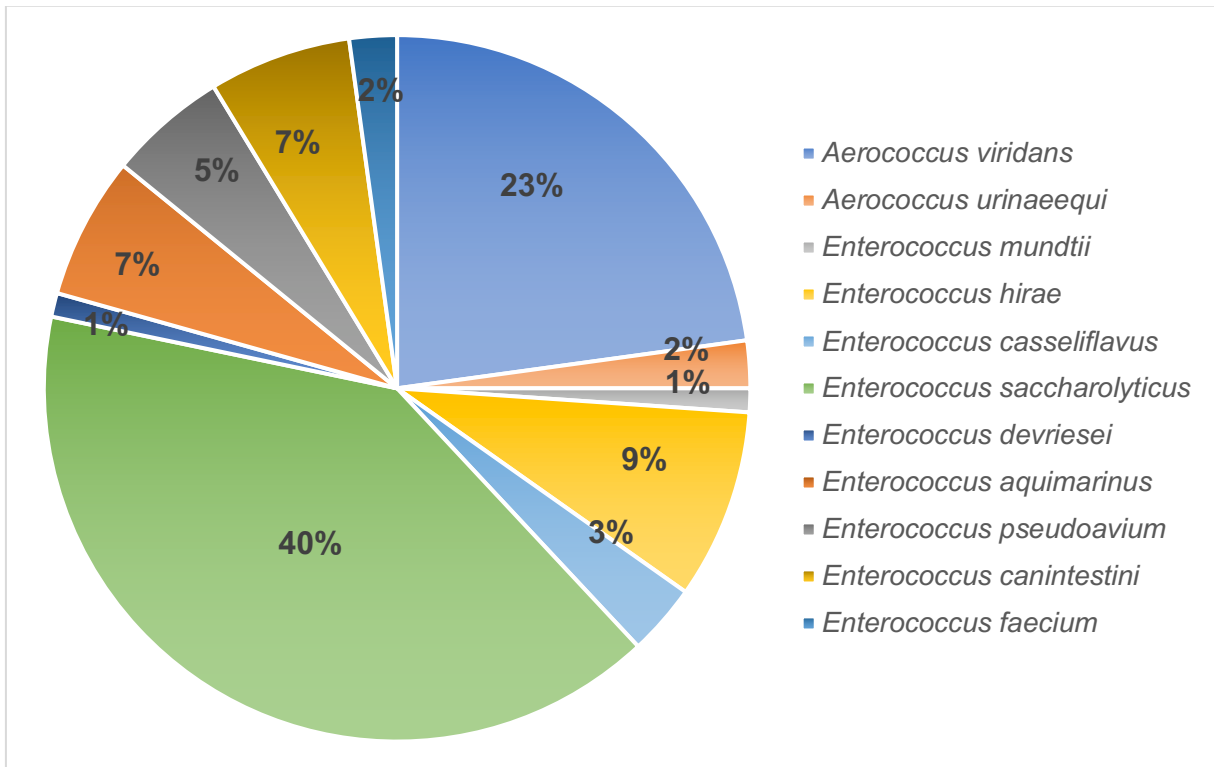


Abb. 14: Graphische Darstellung der auf Galle-Äskulin-Agar zufällig ausgewählten Kolonien im Untersuchungszeitraum von Dezember 2021 bis Juni 2022, die mittels MALDI-ToF MS spezifiziert worden sind.

Tab. 16: Auflistung der Bakterien, die auf Galle-Äskulin-Agar im Untersuchungszeitraum von Dezember 2021 bis Juni 2022 angewachsen und mittels MALDI-ToF MS detektiert worden sind.

Spezies	n	Mastitisrelevanz
A. viridans	21	ja (Sun et al. 2017, Wyder et al. 2011)
<i>A. urinaeequi</i>	2	nein
<i>E. mundtii</i>	1	Nein
E. hirae	8	ja (Juliano et al. 2022)
E. casseliflavus	3	ja (Petersson-Wolfe et al. 2008)
E. saccharolyticus	37	ja (Juliano et al. 2022, Wyder et al. 2011)
<i>E. devriesei</i>	1	nein
<i>E. aquimarinus</i>	6	nein
<i>E. pseudoavium</i>	5	nein
<i>E. canintestini</i>	6	Nein
E. faecium	2	ja (Nonnemann et al. 2019)
Summe	92	

Auch bei den Einstreuproben wurden viele Isolate, die vom Staphylokokkenagar abgenommen worden waren, mittels MALDI ToF MS als Corynebakterien identifiziert. Von diesen war der Anteil der Spezies *C. glutamicum* mit 34,0 % am höchsten, gefolgt von *C. stationis* mit 18,0 %, *C. casei* mit 16,0 % und *C. phoceense* mit 13,0 %. *S. chromogenes*, *S. borealis* und *S. epidermidis* wurden als Vertreter der NAS nachgewiesen (Abb. 15). Vor allem *S. chromogenes* und *S. epidermidis* werden regelmäßig in Zusammenhang mit Zellzahlerhöhungen bzw. klinischen Mastitiden nachgewiesen (Tab.17).

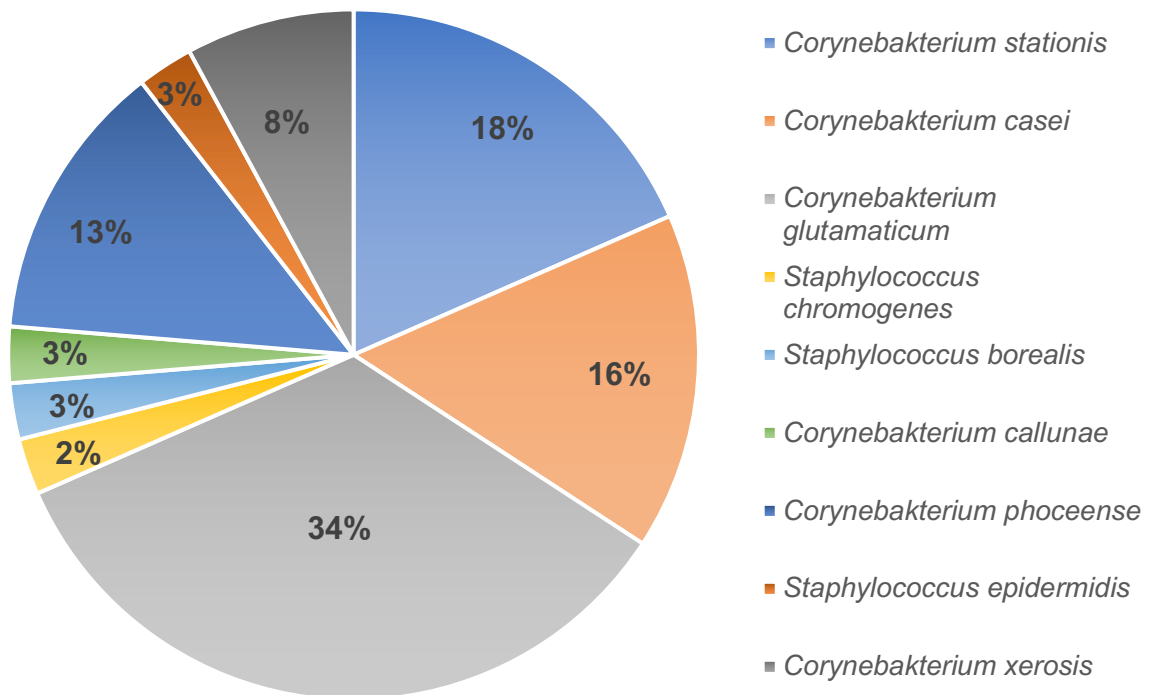


Abbildung 15: Graphische Darstellung der auf Baird-Parker-Agar zufällig ausgewählten Kolonien im Untersuchungszeitraum von Dezember 2021 bis Juni 2022, die mittels MALDI-ToF MS spezifiziert worden sind.

Tab. 17: Verteilung und Mastitisrelevanz der Spezies aus den Einstreuproben die auf Baird-Parker-Agar angewachsen im Untersuchungszeitraum von Dezember 2021 bis Juni 2022 angewachsen und mittels MALDI-ToF MS detektiert worden sind.

Spezies	n	Mastitisrelevanz
C. stationis	7	ja (Lücken et al. 2022)
<i>C. casei</i>	6	nein
<i>C. glutamicum</i>	13	nein
<i>S. chromogenes</i>	1	nein
S. borealis	1	unbekannt, erst 2020 neu beschrieben
<i>C. callunae</i>	1	nein
<i>C. phoceense</i>	5	nein
S. epidermidis	1	ja (Wuytack et al. 2020)
C. xerosis	3	ja (Lücken et al. 2022)
Summe	38	

4.6. Stallklimadaten

Mittels der Messung der Lubratec® SmartBox der Firma Huesker Synthetic GmbH (Dülmen, Deutschland) konnte der Temperatur-Luftfeuchtigkeits-Index oft als auch THI (Temperature-Humidity-Index) abgekürzt, regelmäßig erfasst werden. Anhand dieses berechenbaren Wertes kann man das Stressniveau der Kühe bei steigenden Temperaturen und erhöhter Luftfeuchtigkeit besser einschätzen und damit präventiv gegen die Auswirkungen des Hitzestresses vorgehen. In Abbildung 16 sind die verschiedenen Schweregrade von Hitzestress anhand des THI bewertet. Allgemein wird ein THI unter 68 (grüner Bereich) als Optimalbereich (Wohlfühlbereich) der Kuh angesehen. Ein THI von 69 bis 71 (gelber Bereich) wird als milder Hitzestress bewertet und gibt an, dass Kühe zum Beispiel Schattenplätze aufsuchen, eine erhöhte Atemfrequenz zeigen, oder dass man erste negative Auswirkungen an der Milchleistung feststellen kann. Der orange Bereich weist einen THI von 72 bis 79 auf und definiert einen mäßigen Hitzestress. Dabei trinken die Tiere mehr und fangen an weniger zu fressen. Es wird eine erhöhte Atem- und Herzfrequenz gemessen und ein Rückgang der Fruchtbarkeit und Milchleistung beobachtet. Der THI zwischen 80 und 89 ist als hellroter Teil gefärbt. In diesem Bereich sind die Kühe einem starken Hitzestress ausgesetzt, zeigen ein vermehrtes Unwohlsein und die vorher beschriebenen Symptome intensivieren sich. Ein THI über 90 (dunkelroter Bereich) ist ein sehr drastischer Bereich. Hierbei können Todesfälle in der Herde auftreten. Der THI im Zeitraum dieser Studie (Dezember 2021 bis Juni 2022) befand

sich bis Mai im Optimalbereich (grüner Bereich), thermoneutralen Zone der Kuh. Ende Mai stieg die Temperatur vor allem in den Nachmittagsstunden an, dabei wurde an zwei Tagen ein THI bis knapp 71 (gelber Bereich) gemessen.

Die Lubratec® SmartBox berechnete pro Tag vierzehnmal den Index. In Tabelle 14 sind die täglichen Mittelwerte des Monats Juni (2022) aufgelistet. Bis zum 18. Juni 2022 blieb der THI-Index im grünen Bereich, mit Ausnahme am 04.06.2022, denn dort wurde ein Wert von 69 gemessen. Ab diesem Zeitpunkt verzeichnete der Betrieb am 18.06.2022, am 20.06.2022, am 23.06.2022, am 24.06.2022, am 26.06.2022, am 28.06.2022 und am 30.06.2022 Werte, die laut der Abbildung 10 einen mäßigen Hitzestress in der Herde definieren. Am 19.06.2022 und am 27.06.2022 befand sich der THI-Wert im orangen Bereich.

THI-Index		Luftfeuchtigkeit [rel %]																
2009		20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
Temperatur [°C]	16	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	61	61	61	61
	17	61	61	61	61	61	61	61	61	62	62	62	62	62	62	62	62	63
	18	62	62	62	62	62	62	62	63	63	63	63	64	64	64	64	64	64
	19	63	63	63	63	63	64	64	64	64	65	65	65	65	66	66	66	66
	20	64	64	64	64	65	65	65	65	66	66	66	67	67	67	67	68	68
	21	65	65	65	66	66	66	67	67	67	67	68	68	68	69	69	69	70
	22	66	66	66	67	67	67	68	68	69	69	69	70	70	70	71	71	72
	23	67	67	67	68	68	69	69	70	70	70	71	71	72	72	73	73	73
	24	68	68	68	69	69	70	70	71	71	72	72	73	73	74	74	75	75
	25	69	69	70	70	71	71	72	72	73	73	74	74	75	75	76	76	77
	26	70	70	71	71	72	72	73	74	74	75	75	76	76	77	78	78	79
	27	71	71	72	72	73	74	74	75	76	76	77	77	78	79	79	80	81
	28	72	72	73	74	74	75	76	76	77	78	78	79	80	80	81	82	82
	29	73	73	74	75	75	76	77	78	78	79	80	81	81	82	83	83	84
	30	74	74	75	76	77	77	78	79	80	81	81	82	83	84	84	85	85
	31	75	75	76	77	78	79	80	80	81	82	83	84	84	85	86	87	88
	32	76	76	77	78	79	80	81	82	83	83	84	85	86	87	88	89	90
	33	77	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	90	91
	34	78	79	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93
	35	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95
	36	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	94	95	96	97
	37	81	82	83	84	85	86	87	88	90	91	92	93	94	95	96	97	99
	38	82	83	84	85	86	87	89	90	91	92	93	95	96	97	98	99	100

Abb. 16: Darstellung zur Errechnung des Temperatur-Luftfeuchtigkeits-Index (THI) mittels Temperatur in °C und der Luftfeuchtigkeit in % nach Seebacher und Holzeder (2017).

Tab. 18: Tabellarische Darstellung des durchschnittlichen Temperatur-Luft-Index im Juni 2022

Temperatur-Luft-Index Juni 2022						
<i>MO</i>	<i>DI</i>	<i>MI</i>	<i>DO</i>	<i>FR</i>	<i>SA</i>	<i>SO</i>
		01.06	02.06	03.06	04.06	05.06
		62	64	67	69	67
06.06	07.06	08.06	09.06	10.06	11.06	12.06
66	62	63	59	59	65	67
13.06	14.06	15.06	16.06	17.06	18.06	19.06
65	64	65	66	66	68	72
20.06	21.06	22.06	23.06	24.06	25.06	26.06
71	66	67	69	70	64	69
27.06	28.06	29.06	30.06			
73	68	66	69			

5. Diskussion

Die Separation von Gülle in eine flüssige und eine feste Phase hat den Vorteil, dass sich die Dünngülle besser lagern und ausbringen lässt. Die Feststoffe werden für die Energiegewinnung in Biogasanlagen verwendet oder sind als Einstreumaterial für Liegeboxen eine günstige Alternative zum kostenintensiven Stroh in Grünlandgebieten. Bei Milchkühen wird der Einsatz von Gülleseparat allerdings kontroversiell diskutiert und ist rechtlich auch nicht eindeutig geregelt. Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, wie hoch Gülleseparat in Liegeboxen mit Mastitis-relevanten Bakterien belastet ist, und wie sich die Einstreu von Güllefeststoffen auf die Besiedelung der Zitzenhaut mit mastitisrelevanten Bakterien auswirkt. Es handelt sich hierbei um eine Fallstudie am konkreten Beispiel eines einzelnen landwirtschaftlichen Betriebes, der im Zuge eines Stallneubaus von Anbindehaltung auf Liegeboxenlaufstall mit Einstreu von Güllefeststoffen umstellte. Dementsprechend vorsichtig müssen die erhobenen Befunde interpretiert werden. Auch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen Studien ist durch eine hohe Variabilität an Untersuchungsmethoden schwierig, trotzdem konnten unsere Hypothesen mit Abstrichen bestätigt werden.

I. Die Einstreu von Güllefeststoffen führt zu einer Belastung der Zitzenhaut mit potenziell euterpathogenen Keimen.

Aus den Einstreuproben, aber auch aus den Tupferproben wurden eine Vielzahl an mastitisrelevanten Bakterien isoliert, wobei coliforme Keime (*E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*), und Gram-positive, Katalase-negative und Äskulin-positive Kokken (darunter Enterokokken, *L. garviae*, *L. lactis* und *A. viridans*) im Vordergrund standen. Letztere werden regelmäßig in Verbindung mit subklinischen und klinischen Euterentzündungen nachgewiesen (Werner et al. 2014). Gleichzeitig verbesserte sich jedoch die optisch beurteilte Hygiene der Liegeflächen, der Tiere und der Euter mit dem Umzug dramatisch. Vor der Umstallung im Dezember 2021 ist ein Hygienescore nahezu aller Euter zwischen drei und vier gemessen worden, nach der in der Umstellungsphase (Jänner 2022), und in den Folgemonaten verbesserte sich die Sauberkeit der Euter und der Hinterextremitäten deutlich (Score eins bis zwei). Auch in der Studie von Frondelius et al. (2020) wurde nachgewiesen, dass bei der Verwendung von Feststoffen aus der Gülleseparation (Recycled Manure Solids, RMS) im Vergleich zu anderen Einstreumaterialien, sich die Sauberkeit der Euter deutlich verbesserte. In unseren Untersuchungen sank die Keimbelastung an der Zitzenspitze, und tendenziell auch auf der Zitzenhaut. Allerdings müssen diese Zahlen sehr vorsichtig interpretiert werden, da die Gesamtzahl der beprobten Zitzen und die Anzahl der Beprobungszeitpunkte niedrig waren.

Auch die Intervalle zwischen letzter Melkung im Roboter, und damit automatisierter Zitzenreinigung und der Probenentnahme, sind (entsprechend der unterschiedlichen Zwischenmelkzeiten in Automatischen Melksystemen mit freiem Tierverkehr) unterschiedlich lang. Interessant ist, dass die Gesamtkeimzahl tendenziell zwar sank, die Keimbelastung mit Coliformen, Enterokokken bzw. äskulinpositiven Kokken an der Zitzenhaut im gesamten Untersuchungszeitpunkt jedoch tendenziell anstieg. Die Erregerdichten beziehungsweise -spektren sind saisonal unterschiedlich (Hogan et al. 1989). Zdanowicz et al. (2004) beschreiben in ihrer Studie einen Zusammenhang zwischen der mikrobiellen Zitzenhautbelastung und verschiedenen Einstreumaterialien.

Die Untersuchung der Isolate, die vom Staphylokokken-Selektiv-Agar (Baird Parker Agar) abgenommen worden waren, ergab, dass es sich bei den konservierten Isolaten häufig um Corynebakterien handelte, was auf eine mangelnde Selektivität der Baird Parker Nährböden hinweist. White et al. 1988 verglichen 6 verschiedene Selektivnährböden für Staphylokokken inklusive BPA und wiesen Wachstum von *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp. und *Micrococcus* sp. auf allen getesteten Nährböden nach. Corynebakterien gehören zur physiologischen Flora der Zitzenhaut, sie werden auch aus Milchproben gesunder Euterviertel isoliert. Studien haben für *C. bovis* und *C. amycolatum* länger persistierende Infektionen mit Zellzahlerhöhung nachgewiesen (Lücken et al. 2022), zwei Spezies, die in dieser Studie nicht nachgewiesen wurden. Darüber hinaus sollte auch angesprochen werden, dass Faktoren wie die Probennahme am Betrieb Einfluss auf die Ergebnisse genommen haben. Generell sollten individuelle Einflüsse durch den Probennehmer minimiert werden, in dem die Proben immer wieder vom gleichen Untersucher gezogen werden (Pfannenschmidt 2003). In dieser Arbeit wurden die Tupfer von Zitzenhaut- und Zitzenspitze immer von der gleichen Person genommen, jedoch alle anderen Proben (Schalmtest, aseptische Milchproben, Sammelproben der Einstreu) nicht. Weiteres ist zu erwähnen, dass die Probennahme der Zitzenhaut- und Zitzenspitzenstuffer durch die Melkung im Roboter kritisch zu betrachten ist. Jede Kuh hat im Betrieb eine individuelle Melkerlaubnis, daher ist der Abstand zwischen der Zitzenreinigung bei der Melkung im Roboter und der Beprobung sehr variabel. Ein standardisiertes Verfahren war hier unmöglich durchführbar.

II. Der Keimgehalt des Gülleseparatormaterials steigt nach der Einstreu in den Liegeboxen durch Einbringung von Kot und Urin an.

Die zweite Hypothese hinsichtlich des Anstieges des Keimgehaltes in der Einstreu nach der Ausbringung in die Liegeboxen konnte ebenso belegt werden. Die Untersuchung der

Keimbelastung im Gülleseparat hat ergeben, dass die Gesamtkeimzahl aller Sammelproben zum Zeitpunkt der Entnahme 0 (= frische Einstreu) am niedrigsten war und den höchsten Anstieg nach 24 Stunden zeigte. In der Literatur wird dies ebenfalls beschrieben. Ein frisches und trockenes, organisches Einstreumaterial, das in die Liegeboxen eingebracht wird, enthält eine relativ geringe Anzahl an pathogenen Keimen (Smith und Hogan 1995). Die Gesamtkeimzahlen der frisch separierten Einstreu dieser Arbeit lagen im April 2022 bei $8,8 \times 10^8$ pro Gramm TS und sanken im Juni 2022 auf $6,21 \times 10^8$ pro Gramm TS. Verglichen mit den Gesamtkeimzahlen in der Literatur, waren die Ergebnisse dieser Pilotstudie niedriger. Leach et al. (2015) veröffentlichten Zahlen von $6 - 8 \log^{10}$ KBE pro Gramm (Timms 2008) beziehungsweise $8,3 - 9,1 \log^{10}$ pro Gramm (Feiken und van Laarhoven 2012) für frische Güllefeststoffe. Krömker et al. (2010) veröffentlichten ebenfalls Benchmarks von Boxeneinstreu für Coliforme Bakterien von $< 10^4$ KBE pro Gramm und eine mesophile Gesamtkeimzahl von 10^6 KBE pro Gramm. Laut Krömker et al. (2010) sollten diese Werte in einer hygienisch einwandfreien Einstreu vor der Benutzung nicht überschritten werden, um das Risiko umweltassoziierter Mastitiden niedrig zu halten. Hierbei muss aber gesagt werden, dass dies Benchmarks für Stroh- und Sägespäne sind, die möglicherweise nicht auf Gülleseparat übertragbar sind. Nach Einbringung der Güllefeststoffe in die Boxen steigt der Grad beziehungsweise die maximale Zunahme der bakteriellen Belastung durch die Kontamination von Kot und Harn in den ersten 24 Stunden sprunghaft an (Kögler 2005; Kristula et al. 2005; Smith und Hogan 1995; Zehner et al. 1986). In der Arbeit konnte auch festgestellt werden, dass die Gesamtkeimzahl im Gülleseparat nach den 24 Stunden leicht anstieg, aber die Stunden beziehungsweise Tage danach konstant blieben. Kristula et al. (2005) kamen ebenfalls zur Erkenntnis, dass die Erregerdichten nach dem ersten Tag stagnieren oder abnehmen. In Studien (Bradley et al. 2018, Rowbotham und Ruegg 2016) wurden die Keimzahlen von umweltassozierten Bakterien in verschiedenen Einstreumaterialien wie Sand, Sägespänen und recyceltem Güllefeststoff, sowie in feinen Hartholzspänen, Zeitungspapier und gehäckseltem Stroh untersucht und verglichen. Diese ergaben, dass im recycelten Gülleseparat eine deutlich höhere Gesamtkeimzahl im Vergleich zu den anderen genannten Einstreumaterialien vorlag (Bradley et al. 2018, Zehner et al. 1986). Die Messung von Trockensubstanzgehalt und pH-Wert im Gülleseparat in dieser Arbeit hat ergeben, dass der Trockensubstanzgehalt im frischen Separat am höchsten war und in den Folgetagen absank, der pH-Wert hingegen von Messung zu Messung in den alkalischen Bereich anstieg. Die Abnahme des Trockensubstanzgehaltes lässt sich damit erklären, dass das Separat mit der Einbringung in die Box durch Harn und Kot verschmutzt wird und nicht abtrocknen kann.

Allerdings stiegen im untersuchten Betrieb die Keimzahlen nur in den ersten 24 Stunden deutlich an. In der Studie von Alanis et al. (2021) stieg der Trockensubstanzgehalt mit der Zeit in den Liegeboxen an, wobei die Keimzahlen in der Einstreu gleichzeitig sanken. Die daraus resultierende Annahme von Alanis et al. (2021), dass ein trockeneres Material das Bakterienwachstum hemmt, kann in dieser Pilotstudie nicht untersucht werden, da der Trockensubstanzgehalt sank. Hinsichtlich des pH-Werts beschreibt die Studie von Paduch et al. (2013), dass es deutlich geringere Keimdichten von *Sc. uberis* und coliformen Bakterien gibt, wenn die Einstreu mit alkalisierenden Substanzen (bspw. Löschkalk) behandelt wurde. Die Liegeboxen des Betriebes dieser Studie wurden zwar im Dezember mit einer Stroh-Kalk-Matratze als Grundlage für das Gülleseparat aufgebaut, trotzdem kann der Anstieg des pH-Wertes in den Einstreuproben mit zunehmender Einstreudauer nicht endgültig erklärt werden. Die Ergebnisse von pH-Werten in Güllefeststoffen in Studien von Alanis et al. (2021) und Patel et al. (2019) lagen ebenfalls bei 8 bis 9 und damit im alkalischen Bereich. Alanis et al. (2021) vermuten, dass der alkalische pH-Wert für die Kontrolle bestimmter Bakterienarten, die sich im sauren Milieu nicht gut vermehren, in Zukunft von Bedeutung sein wird. Grundsätzlich ist auch auffallend, dass der Trockensubstanzgehalt in unserer Studie sowohl in der frisch gepressten Einstreu als auch in den Sammelproben hoch war.

Krömker et al. (2007) beschreiben, dass die umweltassoziierten Bakterien aus dem Haltungsumfeld der Kühe stammen und deren Übertragung vorwiegend zwischen den Melkzeiten im Stallbereich oder auf Weiden stattfindet. Dazu zählen die Autoren *Sc. uberis*, Enterokokken (*E. faecium* und *E. faecalis*) und coliforme Bakterien wie *E. coli*, *Klebsiella spp.* und *Enterobacter spp.* Dies deckt sich auch mit aktuellen Untersuchungen von Pinzón-Sánchez und Ruegg 2011; Wente et al. 2016. Diese Studien belegen, dass die am häufigsten aus Milchproben von klinischen Mastitiden isolierten Umwelterreger *Sc. uberis*, Enterokokken und coliforme Bakterien sind. Auch in unserer Studie haben wir vorrangig Coliforme und umweltassoziierte Gram-positive und Katalase-negative Kokken (Streptokokken, Enterokokken und Laktokokken) nachgewiesen, wobei interessanterweise *Sc. uberis* werden aus den Tupferproben der Zitzenhaut noch aus der Einstreu isoliert wurde (was jedoch heißt, dass die Einstreu frei von *Sc. uberis* war). Die nachgewiesenen potenziell euterpathogenen Bakterien führten im Zeitraum der durchgeführten Pilotstudie weder zu Zellzahlerhöhungen noch zum Ausbruch klinischer Mastitiden im Betrieb. Ein Zusammenhang zwischen der Keimbelastung in der Einstreu und an der Zitzenhaut beziehungsweise der Zitzenspitze wird in der Literatur diskutiert (Harrison et al. 2008; Rowbotham und Ruegg 2016; Zdanowicz et al.

2004). Rowbotham und Ruegg (2016) konnten eine signifikante Korrelation zwischen dem Keimgehalt auf der Zitzenhaut und in eingestreuten Güllefeststoff aus den Liegeboxen nachweisen. Dies bedeutet, dass das Risiko, dass Mastitiserreger auf die Zitzenhaut beziehungsweise den Strichkanal gelangen könnten, sehr hoch ist (Barth et al, 2011). Doch es sollte erwähnt werden, dass die Mastitis eine sogenannte Faktorenkrankheit ist und das gesamte Herdenmanagement auf eine Mastitis-Prophylaxe ausgelegt sein sollte (Barth et al. 2011). So kommt auch Harrison et al. (2008) zum Schluss, dass individuelle Faktoren jedes einzelnen Betriebes und deren Management, der Eintrag von Erregern über andere potenzielle Quellen neben der Art beziehungsweise der Wahl der Einstreu auch einen starken Einfluss auf die Eutergesundheit haben. Weitere Faktoren, die das Tierwohl und die Gesundheit der Milchkühe, die Keimgehalte von Liegeboxen, sowie die Einstreumaterialien positiv beeinflussen, sind eine ausreichende Menge an Einstreumaterial, trockene und saubere Liegeflächen und darüber hinaus geeignete Abmessungen der Boxen (Zähner et al. 2009). Singh et al. (2020) empfehlen einen regelmäßigen Wechsel der Einstreu durchschnittlich einmal pro Woche. Eine britische Studie stellte auch fest, dass eine Reinigung der Liegeflächen mindestens zweimal täglich zu einer Reduktion der Mastitisinzidenz führt (Peeler et al. 2000). Neben einer häufigen Erneuerung des Gülleseparates ist es auch wichtig, dieses sauber zu halten und die organischen Nährstoffe, die das pathogene Wachstum fördern, regelmäßig zu entfernen. Bei einer sachgemäßen Handhabung kann die Verwendung von Gülleseparat wirtschaftliche Vorteile bieten, ohne dass diese die Gesundheit der Herde im Betrieb beeinträchtigt (Harrison et al. 2008). Unsere Ergebnisse zeigen allerdings auch auf, dass potenziell euterpathogene umweltassoziierte Bakterien mit Güllefeststoffen auf die Zitzenspitze gelangen und daher ein proaktives Management notwendig ist.

III. Neben dem Liegeboxenmanagement bedingen hohe Luftfeuchtigkeit und Lufttemperatur einen Anstieg der Keimzahlen

Die in der Einleitung verfasste dritte Hypothese dieser Arbeit, wonach hohe Luftfeuchtigkeit und Temperatur mit einem Anstieg der Keimzahlen einhergehen, konnte in der Studie nicht eindeutig belegt werden. Die erhobenen Daten des THI-Indexes verzeichneten zwar genau in jenem Zeitraum, in welchem auch die Gesamtkeimzahl an der Zitzenhaut hoch war (Juni 2022) einen relativ hohen THI, zur Ableitung eines eindeutigen Zusammenhanges sind Studien mit größeren Tierzahlen und mehr Untersuchungszeitpunkten notwendig. Auch lässt sich die Gesamtkeimzahl nicht allein durch den Einfluss der erhöhten Temperatur und der Feuchtigkeit in den Frühjahrs- und Sommermonaten erklären, auch das Maß an verfügbaren Nährstoffen

in der Einstreu beeinflusst das mikrobielle Wachstum. Ein erhöhter THI weist auch auf vermehrten Hitzestress der Herde hin und kann mit verlängerten Liegephasen der Kuh und damit einem erhöhten Risiko für eine Übertragung von pathogenen Umweltkeimen aus der Einstreu und den Klauen auf die Zitzen einhergehen. Daher sollte ein möglichst niedriger THI-Wert im Stall angestrebt werden, um die Belastung der Zitzenhaut und Zitzenspitze mit potenziell pathogenen Umweltkeimen zu reduzieren, aber auch, um andere mit Hitzestress verbundene negative Effekte zu verringern (Gorniak et al. 2014). Vor allem in den Frühjahrs- und Sommermonaten sollte auf eine strikte Euterhygiene geachtet werden, da die Tiere in dieser Zeit zusätzlich anfälliger für umweltbedingte Mastitiden sind (Olde Riekerink et al. 2007).

Die Einstreu und das Liegeboxenmanagement beeinflussen die Eutergesundheit, die Milchqualität und den Kuhkomfort in entscheidender Weise. Hygienisch einwandfreie Einstreu ist eine wichtige Voraussetzung, um die Euter sauber zu halten und die Konzentration euterpathogener Keime auf der Zitzenhaut zu minimieren (New York Cattle Health Assurance Program n.d.). Weitere Studien (Paduch et al. 2012; Sorter et al. 2014; Zehner et al. 1986) bezeichnen ein gezieltes Einstreumanagement ebenfalls als essenziell, um die mikrobielle Belastung in der Einstreu und folgend auch auf der Zitzenhaut zu reduzieren und so umweltbedingten Mastitiden vorzubeugen.

6. Fazit

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden inwieweit das Gülleseparat als Einstreumaterial Auswirkungen auf die Eutergesundheit hat. Weiters wurde das Vorkommen von umweltassoziierten euterpathogenen Keimen im Gülleseparat und an der Zitzenhaut untersucht. Zu Beginn wurden drei Hypothesen aufgestellt, wobei die ersten zwei belegt werden konnten, die dritte jedoch nicht klar belegt aber auch nicht widerlegt werden konnte.

Das Gülleseparat als Einstreumaterial kann eine Alternative zur Stroh-Mist-Matratze darstellen. Vor allem für Betriebe in Grünlandgebieten, die Stroh zukaufen müssen, ist die Separierung der Gülle eine kostengünstige und gute Entscheidung. In dieser Studie konnten wir zeigen, dass euterpathogene Keime im Separat und an der Zitzenhaut nachweisebar sind, es ergaben sich auch Hinweise, dass die Konzentrationen an Coliformen mit erhöhtem THI ansteigen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Verwendung von Gülleseparat als Einstreumaterial für das Betriebsmanagement sehr herausfordernd ist und bei der Anschaffung wohl überlegt sein muss. Treten vermehrt coliforme Mastitiden auf, sollte die Einstreu als Kontaminationsquelle unbedingt berücksichtigt werden

7. Literaturverzeichnis

- Abe, N., 1999. The deeper the “mud”, the dirtier the udder. *Hoard’s Dairyman*. 144: 439.
- Alanis, V.M., Zurakowski, M., Pawloski, D., Tomazi, T., Nydam, D. V., Ospina, P.A., 2021. Description of the Characteristics of Five Bedding Materials and Association With Bulk Tank Milk Quality on Five New York Dairy Herds. *Front Vet. Sci.* 8:636833. doi: 10.3389/fvets.2021.636833.
- Barth, K., Krömker, V., Aulrich, K., 2011. Bedding materials and management - their signification for the development of mastitis pathogens and infections in organic dairy farms. Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft (BÖLN), Deutschland.
- Baumgartner, W., Kölle, P., Lischer, C., Rheinfeld, S., Schuh, M., Schusser, G., Schwendenwein, I., Sipos, W., Wittek, T., 2018. Probennahme, Laboruntersuchung und invasive diagnostische Maßnahmen, in: Baumgartner, W., Wittek, T. (Eds.), *Klinische Propädeutik Der Haus- Und Heimtiere*. Enke Verlag in Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, S. 385.
- Bey, R., Reneau, J., Farnsworth, R., 2022. The Role of Bedding Management in Udder Health. *American Association of Bovine Practitioners Conference Proceedings*. doi: 10.21423/aabppro20025012.
- Bizzini, A., Durussel, C., Bille, J., Greub, G., Prod’hom, G., 2010. Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Bacterial Strains Routinely Isolated in a Clinical Microbiology Laboratory. *J Clin Microbiol.* 48(5):1549-54. doi: 10.1128/JCM.01794-09.
- Bradley, A.J., Leach, K.A., Green, M.J., Gibbons, J., Ohnstad, I.C., Black, D.H., Payne, B., Prout, V.E., Breen, J.E., 2018. The impact of dairy cows’ bedding material and its microbial content on the quality and safety of milk – A cross sectional study of UK farms. *Int J Food Microbiol.* 23:269:36-45. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.022.
- Cook, N.B., 2002. Influence of Barn Design on Dairy Cow Hygiene, Lameness and Udder Health. *American Association of Bovine Practitioners Conference Proceedings*. Vol 35, S. 97-103.
- Cook, N.B., 2004. The Cow Comfort Link to Milk Quality. *NMC Regional Meeting Proc. Bloomington, MN, Juli 29-30*.

- Deutz, A., Obritzhauser, W., 2003. Modul "Eutergesundheit" im Rahmen des "Betreuungspaketes Rind," in: Deutz, A., Obritzhauser, W. (Eds.), Eutergesundheit Und Milchqualität. Krankheiten Erkennen, Vorbeugen, Behandeln. Leopold-Stocker-Verlag, Graz-Düsseldorf, S. 13–14.
- European Commission, 2009. Regulation of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 laying down health rules as regards animal by-products and derived products not intended for human consumption and repealing Regulation (EC) No 1774/2002 (Animal byproducts Regulation), 2009/1069/EC. *Official Journal L300*.
- Fehlings, K., Baumgärtner, B., Geringer, M., Hamann, J., Knappstein, K., Zschöck, M., 2009. Leitlinien: Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und Isolierung und Identifizierung von Mastitisserregern. Verlag der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V., German Veterinary Medical Society, Friedrichstr. 17, Gießen.
- Feiken, M., van Laarhoven, W., 2012. Verslag van een praktijkonderzoek naar het gebruik van vaste fractie uit gescheiden mest als boxbeddingsmateriaal in ligboxen voor melkvee. ValaconDairy. English translation Recycled manure solids (RMS) as biobedding in cubicles for dairy cattle. Considerations and tips for practice: Valacon Dairy. <http://www.keydollar.eu/wp-content/uploads/2014/09/Biobedding-English-version.pdf> (Zugriff 11.18.23).
- Fréchette, A., Fecteau, G., Côté, C., Dufour, S., 2021. Clinical Mastitis Incidence in Dairy Cows Housed on Recycled Manure Solids Bedding: A Canadian Cohort Study. *Front. Vet. Sci* 8:742868. doi: 10.3389/fvets.2021.742868.
- Freiwald, A., Sauer, S., 2009. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nat Protoc.* 4(5): 732–42. doi: 10.1038/nprot.2009.37.
- Frondeus, L., Lindeberg, H., Pastell, M., 2020. Recycled manure solids as a bedding material: Udder health, cleanliness and integument alterations of dairy cows in mattress stalls. *Agricultural and Food Science*, 29(5), 420–431. doi: 10.23986/afsci.95603.
- Gelasakis A.I., Angelidis A.S., Giannakou R., Filioussis G., Kalamaki M.S., Arsenos G. 2016. Bacterial subclinical mastitis and its effect on milk yield in low-input dairy goat herds. *J Dairy Sci.* 99, 3698–3708. doi: 10.3168/jds.2015-10694.
- Gienapp, Ch., Schuhmann, P., 1999. Gülleanfall und Verwertung in der Landwirtschaft, in: Kreysa, G., Wiesner, J. (Eds.), Gülleverwertung Neue Ansätze Für Die Landwirtschaft. DECHEMA Deutsche Gesellschaft für Chemisches Agrarwesen, Frankfurt, S. 15–25.

- Godden, S., Bey, R., Lorch, K., Farnsworth, R., Rapnicki, P., 2008. Ability of Organic and Inorganic Bedding Materials to Promote Growth of Environmental Bacteria. *J Dairy Sci.* 91(1):151-9. doi: 10.3168/jds.2007-0415.
- Gorniak, T., Meyer, U., Südekum, K.-H., Dänicke, S., 2014. Impact of mild heat stress on dry matter intake, milk yield and milk composition in mid-lactation Holstein dairy cows in a temperate climate. *Arch Anim Nutr.* 68(5):358-69. doi: 10.1080/1745039X.2014.950451.
- Gosselin, V.B., Lovstad, J., Dufour, S., Adkins, P.R.F., Middleton, J.R., 2018. Use of MALDI-TOF to characterize staphylococcal intramammary infections in dairy goats. *J Dairy Sci.* 101(7):6262-6270. doi: 10.3168/jds.2017-14224.
- Harrison, E., Bonhotal, J., Schwarz, M., 2008. Using Manure Solids as Bedding – Final Report. Cornell Waste Management Institute, Ithaca, NY.
- Hogan, J.S., Smith, K.L., Hoblet, K.H., Todhunter, D.A., Schoenberger, P.S., Hueston, W.D., Pritchard, D.E., Bowman, G.L., Heider, L.E., Brockett, B.L., Conrad, H.R., 1989. Bacterial Counts in Bedding Materials on Nine Commercial Dairies. *J Dairy Sci.* 72, 250–258. doi: 10.3168/jds.S0022-030(89)79103-7.
- Huber-Schlenstedt, R., Knappstein, K., Krömker, V., Nebel, U., Reinecke F., Zschöck M., 2018. Leitlinien zur Labordiagnostik der Mastitis - Probennahme und Mikrobiologische Untersuchung. 3. Auflage. ed. Verlag der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft Service GmbH, Gießen.
- Juliano LCB, Gouvêa FLR, Latosinski GS, Fabri FHH, Salvador TB, Guimaraes FF, Ribeiro MG, Langoni H, Rall VLM, Hernandes RT, Leite DS, Pantoja JCF, 2022. Species diversity and antimicrobial resistance patterns of *E. spp.* isolated from mastitis cases, milking machine and the environment of dairy cows. *Lett Appl Microbiol.* 75, 924-932. doi: 10.1111/lam.13768.
- K. A. Janni, M. I. Endres, J. K. Reneau, W. W. Schoper, 2007. Compost Dairy Barn Layout and Management Recommendations. *Applied Engineering in Agriculture.* 23(1): 97-102. doi: 10.13031/2013.22333.
- Kappel, M., 2020. Ökobilanzierung von Milchviehstallsystemen im österreichischen Berggebiet - Vergleich von Anbindehaltung und Laufstall-Weidesystemen mit besonderer Berücksichtigung des Wirtschaftsdüngermanagements. Universität für Bodenkultur Wien, Wien.
- Kögler, H., 2005. Einfluss der Liegeboxengestaltung auf die Gelenk- und Eutergesundheit von Milchkühen. Gumpensteiner Bautagung HBLFA, 37-41.

- Krawczel, P., R.Grant., 2009. Effects of cow comfort on milk quality, productivity and behavior. National Mastitis Council, Annual Meeting Proceedings.
- Kristula, M.A., Rogers, W., Hogan, J.S., Sabo, M., 2005. Comparison of Bacteria Populations in Clean and Recycled Sand used for Bedding in Dairy Facilities. *J Dairy Sci.* 88(12):4317-25. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(05)73118-0.
- Krömker, V., 2006. 5 Euterkrankheiten, in: Krömker, Volker (Ed.), Kurzes Lehrbuch Milchkunde Und Milchhygiene. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 47–49.
- Krömker, V., Bruckmaier, R., Frister, H., Kützemier, Th., Rudzik, L., Sach, T., Zangerl, P., 2007. Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene. Parey, Stuttgart.
- Krömker, V., Paduch, J.-H., Bormann, A., Friedrich, J., Zinke, C., 2010. Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere / Nutztiere 38, 73–78.
- Leach, K.A., Archer, S.C., Breen, J.E., Green, M.J., Ohnstad, I.C., Tuer, S., Bradley, A.J., 2015. Recycling manure as cow bedding: Potential benefits and risks for UK dairy farms. *Vet J.* 206(2): 123-130. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.08.013.
- Lücken A., Woudstra S., Wente N., Zhang Y., Krömker V., 2022. Intramammary infections with *C. spp.* in bovine lactating udder quarters. *PLoS One* 17(7) e027086. doi: 10.1371
- LFI Österreich, 2017. Eutergesundheit - Gesunde Euter für beste Milchqualität. Ländliches Fortbildungsinstitut Österreich, Wien.
- Madke, P. K., Lathwal S. S., Sing, Y., Kumar, A., Kaushik, V., 2010. Study of behavioural and physiological changes of crossbred cows under different management practices. *Indian Journal of Animal Science* 80(8): 771-774.
- Makovec, J.A., Ruegg, P.L., 2003. Results of Milk Samples Submitted for Microbiological Examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *J Dairy Sci.* 86(11):3466-72. doi: 3168/jds.S0022-0302(03)73951-4.
- Massé J., Dufour S., Archambault M., 2020. Characterization of *Klebsiella* isolates obtained from clinical mastitis cases in dairy cattle. *J Dairy Sci* 103(4):3392-3400. doi: 10.3168/jds.2019-17324

- New York Cattle Health Assurance Program, n.d. Mastitis Module Fact Sheet. Bedding Materials and Udder Health. NYSCHAP. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.usagypsum.com/wp-content/uploads/2016/12/Bedding-materials-udder-health-NYS.pdf (Zugriff 21.2.23).
- Nonnemann, B., Lyhs, U., Svennesen, L., Kristensen, K. A., Klaas, I. C., & Pedersen, K. (2019). Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Dairy Sci.* 102(3):2515-2524. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15424>.
- Norring, M., Manninen, E., de Passillé, A.M., Rushen, J., Munksgaard, L., Saloniemi, H., 2008. Effects of Sand and Straw Bedding on the Lying Behavior, Cleanliness, and Hoof and Hock Injuries of Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 91(2):570-6. doi: 10.3168/jds.2007-0452.
- ÖKL, 2019. Verbesserung von bestehenden Anbindeställen. 3. Auflage, ÖKL-Merkblatt Nr. 91. Österreichisches Kuratorium für Landtechnik und Landentwicklung, Wien.
- Olde Riekerink, R.G.M., Barkema, H.W., Stryhn, H., 2007. The Effect of Season on Somatic Cell Count and the Incidence of Clinical Mastitis. *J Dairy Sci.* 90(4):1704-15. doi: 10.3168/jds.2006-567.
- Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcón, J.J., Cajero-Juárez, M., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J.E., Bravo-Patiño, A., Baizabal-Aguirre, V.M., 2007. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J Infect.* 54(4): 399-409. doi: 10.1016/j.jinf.2006.06.010.
- Paduch, J.-H., Krömker, V., 2011. Colonization of the teat skin and the teat canal of lactating dairy cattle by mastitis pathogens. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere.* 39(2):71-6.
- Paduch, J.-H., Mohr, E., Krömker, V., 2012. The association between teat end hyperkeratosis and teat canal microbial load in lactating dairy cattle. *Vet Microbiol.* 158(3-4):353-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.02.032.
- Paduch, J.-H., Mohr, E., Krömker, V., 2013. The association between bedding material and the bacterial counts of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and coliform bacteria on teat skin and in teat canals in lactating dairy cattle. *J Dairy Res.* 80(2):159-64. doi: 10.1017/S0022029913000046.

- Paschoalini, B.R.; Nuñez, K.V.M.; Maffei, J.T.; Langoni, H.; Guimarães, F.F.; Gebara, C.; Freitas, N.E.; dos Santos, M.V.; Fidelis, C.E.; Kappes, R.; et al. 2023. The Emergence of Antimicrobial Resistance and Virulence Characteristics in *E. Species* Isolated from Bovine Milk. *Antibiotics*, 12, 1243. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12081243>
- Patel, K., Godden, S.M., Royster, E., Crooker, B.A., Timmerman, J., Fox, L., 2019. Relationships among bedding materials, bedding bacteria counts, udder hygiene, milk quality, and udder health in US dairy herds. *J Dairy Sci.* 102(11): 10213-10234. doi: 10.3168/jds.2019-16692.
- Peeler, E.J., Green, M.J., Fitzpatrick, J.L., Morgan, K.L., Green, L.E., 2000. Risk Factors Associated with Clinical Mastitis in Low Somatic Cell Count British Dairy Herds. *J Dairy Sci.* 83(11):2464-72. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(00)75138-1.
- Petersson-Wolfe C.S., Adams S., Wolf S.L., Hogan J.S. 2008. Genomic typing of enterococci isolated from bovine mammary glands and environmental sources. *J Dairy Sci.* 91(2), 615-619. doi: 10.3168/jds.2007-0253.
- Pfannenschmidt, F., 2003. Eignung des Nass-Trockentupfer Verfahrens (NTT) DIN 10113; 1997-07 zur Bestimmung des Hygienestatus in Melkanlagen. Zentrum für Lebensmittelwissenschaften Zentrumsabteilung Hygiene und Technologie der Milch, Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland.
- Pinzón-Sánchez, C., Ruegg, P.L., 2011. Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis. *J Dairy Sci.* 94(7): 3397-410. doi: 10.3168/jds.2010-3925.
- Richter, T., Busch, B., Karrer, M., Müller, A., Petermann, S., Renner, C., 2006. Krankheitsursache Haltung. Beurteilung von Nutztierställen - Ein tierärztlicher Leitfaden. 1. Auflage. ed. Enke, Stuttgart.
- Rowbotham, R.F., Ruegg, P.L., 2016. Associations of selected bedding types with incidence rates of subclinical and clinical mastitis in primiparous Holstein dairy cows. *J Dairy Sci.* 99(6): 4707-4717. doi: 10.3168/jds.2015-10675.
- Rowe SM, Godden SM, Royster E, Timmerman J, Crooker BA, Boyle M. 2019. Cross-sectional study of the relationships among bedding materials, bedding bacteria counts, and intramammary infection in late-lactation dairy cows. *J Dairy Sci.* 102(12), 11384-11400. doi: 10.3168/jds.2019-17074.
- Ruegg, P.L., 2017. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *J Dairy Sci.* 100(12): 10381-10381. doi: 10.3168/jds.2017-13023.

- Schreiner, D.A., Ruegg, P.L., 2002. Effects of Tail Docking on Milk Quality and Cow Cleanliness. *J Dairy Sci.* 85(10):2503-11. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74333-6.
- Schreiner, D.A., Ruegg, P.L., 2003. Relationship Between Udder and Leg Hygiene Scores and Subclinical Mastitis. *J Dairy Sc.* 86(11):3460-5. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73950-2.
- Schusser, G., Baumgartner, W., Wittek, T., Gauly, M., Schuh, M., Sipos, W., Hildebrandt, N., Moritz, A., Christen, C., Pees, M., Kölle, P., 2018. Allgemein klinischer Untersuchungsgang, in: Baumgartner, W., Wittek, T. (Eds.), *Klinische Propädeutik Der Haus- Und Heimtiere*. Enke Verlag in Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, S. 163.
- Schwarz, M., Bonhotal, J., Staehr, A.E., 2010. Use of Dried Manure Solids as Bedding For Dairy Cows and “How frequently should stalls be refreshed with new bedding” case study. Cornell University, Cornell Waste Management Institute, Ithaca, NY.
- Seebacher, M., Holzeder, S., 2017. Haltungsoptimierung: Stallklima und Kuhkomfort. Heißer Sommer, heiße Kühe? Zugfreie Frischluft hält Kälber fit – Folge 7. Landwirtschaftskammer Oberösterreich, S. 1-6.
- Singh, A., Kumari, T., Rajput, M., Baishya, A., Bhatt, N., Roy, S., 2020. Review on Effect of Bedding Material on Production, Reproduction and Health of Dairy Animals. *International Journal of Livestock Research* 10(7): 11-20. doi: 10.5455/ijlr.20200207073618.
- Smith, K.L., Hogan, J.S., 1993. Environmental Mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 9(3):489-98. doi: 10.1016/s0749-0720(15)30616-2.
- Smith, K.L., Hogan, J.S., 1995. Epidemiology of Mastitis. Proceedings 3rd IDF International Mastitis Seminar, Tel Aviv, S6.
- Sorter, D.E., Kester, H.J., Hogan, J.S., 2014. Short communication: Bacterial counts in recycled manure solids bedding replaced daily or deep packed in freestalls. *J Dairy Sci.* 97(5):2965-8. doi: 10.3168/jds.2013-7814.
- Statistik Austria, 2022. Agrarstrukturerhebung 2020 - Land- und forstwirtschaftliche Betriebe und deren Strukturdaten. Endgültige Ergebnisse. Wien.
- Sun, L., Han, X., Li, J., Zhao, Z., Liu, Y., Xi, Q., Guo, X., Gun, S., 2020. Microbial Community and Its Association With Physicochemical Factors During Compost Bedding for Dairy Cows. *Front. Microbiol.* 11:254. doi: 10.3389/fmicb.2020.00254.

- Sun M, Gao J, Ali T, Yu D, Zhang S, Khan SU, Fanning S, Han B., 2017. Characteristics of *A. viridans* isolated from bovine subclinical mastitis and its effect on milk SCC, yield, and composition. *Trop Anim Health Prod.* 2017, 49, 843-849. doi: 10.1007/s11250-017-1271-2
- Timms, L.L., 2008. Preliminary Evaluation of Separated Manure Solids Characteristics at the New ISU Dairy. *Iowa State University Animal Industry Report* 5(1). doi: 10.31274/ans_air-180814-27
- Wald, R., Baumgartner, M., Urbantke, V., Stessl, B., Wittek, T., 2017. Diagnostic accuracy of a standardized scheme for identification of *Streptococcus uberis* in quarter milk samples: A comparison between conventional bacteriological examination, modified Rambach agar medium culturing, and 16S rRNA gene sequencing. *J Dairy Sci.* 100(2): 1459-1466. doi: 10.3168/jds.2016-11786.
- Waßmuth, R., 2001. Ansprüche der Milchkühe an das Haltungssystem, in: Wendl, G. (Ed.), *Milchviehhaltung -Tiergerecht Und Zukunftsorientiert-*. Landtechnik Weihenstephan, Weihenstephan, S. 23–31.
- Watts, J.L., Salmon, S.A., Yancey, R.J., 1993. Use of Modified Rambach Agar to Differentiate *Streptococcus uberis* from Other Mastitis Streptococci. *J Dairy Sci.* 76(6):1740-3. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(93)77506-2.
- Wente, N., Zoche-Golob, V., Behr, M., Krömker, V., 2016. Susceptibility to cephalosporins of bacteria causing intramammary infections in dairy cows with a high somatic cell count in Germany. *Prev Vet Med.* 1:131:146-151. doi: 10.1016/j.prevetmed.2016.06.010.
- Werner, B., Moroni, P., Gioia, G., Lavín-Alconero, L., Yousaf, A., Charter, M.E., Carter, B.M., Bennett, J., Nydam, D.V., Welcome, F., Schukken, Y.H., 2014. Short communication: Genotypic and phenotypic identification of environmental streptococci and association of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* with intramammary infections among different dairy farms. *J Dairy Sci.* 97:6964–6969. doi: 10.3168/jds.2014-8314.
- White DG, Matos JS, Harmon RJ, Langlois BE. A Comparison of Six Selective Media for the Enumeration and Isolation of Staphylococci, 1988. *J Food Prot.* 51(9):685-690. doi: 10.4315/0362-028X-51.9.685.
- Winter, P., Burvenich, C., Hogeveen, H., Neijenhuis, F., Rasmussen, M.D., Schweigert, F. et al., 2009. *Praktischer Leitfaden Mastitis. Vorgehen beim Einzeltier und im Bestand.* Parey, Stuttgart.

- Wuytack, A., De Visscher, A., Piepers, S. Haesebrouck, F., De Vliegher, S. 2020. Fecal non-aureus Staphylococci are a potential cause of bovine intramammary infection. *Vet Res* 51, 32 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00761-5>
- Wyder, A.B., Boss, R., Naskova, J., T. Kaufmann, T., Steiner, A., Graber, H. U., 2011. Streptococcus spp. and related bacteria: Their identification and their pathogenic potential for chronic mastitis – A molecular approach. *Research in Veterinary Science*, 91, 349-357. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.09.006>.
- Zähner, M., Schmidtke, J., Schrade, S., Schaeren, W., Otten, S., 2009. Alternative Einstreuematerialien in Liegeboxen, in: Bautagung Raumberg-Gumpenstein. Lehr- und Forschungszentrum für Landwirtschaft, Raumberg-Gumpenstein, S. 33–38.
- Zdanowicz, M., Shelford, J.A., Tucker, C.B., Weary, D.M., von Keyserlingk, M.A.G., 2004. Bacterial populations on teat ends of dairy cows housed in free stalls and bedded with either sand or sawdust. *J Dairy Sci* 87(6):1694–1701. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73322-6.
- Zdanowicz M, Shelford JA, Tucker CB, Weary DM, von Keyserlingk MA. 2004. Bacterial populations on teat ends of dairy cows housed in free stalls and bedded with either sand or sawdust. *J Dairy Sci.* 87:1694-701. doi: 10.3168/jd
- Zehner, M.M., Farnsworth, R.J., Appleman, R.D., Larntz, K., Springer, J.A., 1986. Growth of Environmental Mastitis Pathogens in Various Bedding Materials. *J Dairy Sci.* 69(7):1932-41. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(86)80620-8.

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: mod. nach Patel et al. (2019): Darstellung eines möglichen Pfades, der die wichtigsten Risikofaktoren der umweltbedingten Mastitis beschreibt. Die dicken markierten Pfeile (A, B und C) stellen in dieser Abbildung die wichtigsten Zusammenhänge dar.	4
Abb. 2: Tupferprobe der Zitzenhaut in 1000-facher Verdünnung ausplattiert auf Columbia-Agar nach 48 Stunden Inkubation.	17
Abb. 3: Grafische Darstellung der Entwicklung der Keimzahlen in der Sammelprobe 1 nach Einbringen frischer Einstreu sowie nach 24, 48 und 96 Stunden in den Liegeboxen. Alle Keimzahlen sind logarithmiert dargestellt. Die Keimzahlen (Blau: Gesamtkeimzahl, orange Anzahl Staphylokokken/Corynebakterien, grau und gelb: Enterokokken bzw. Äskulinpositive Kokken) steigen in den ersten 24 Stunden deutlich an.	26
Abb. 4: Grafische Darstellung der Entwicklung der Keimzahlen (GKZ und Keimzahlen auf den Selektivnährböden) in der Sammelprobe 2	27
Abb. 5: Grafische Darstellung der Entwicklung der Keimzahlen (GKZ und Keimzahlen auf den Selektivnährböden) in der Sammelprobe 3	27
Abb. 6: Grafische Darstellung der Entwicklung der Keimzahlen (GKZ und Keimzahlen auf den Selektivnährböden) in der Sammelprobe 4	28
Abb. 7: Grafische Darstellung der Entwicklung der Keimzahlen (GKZ und Keimzahlen der Selektivnährböden) in der Sammelprobe 5	28
Abb. 8: Verlauf der Gesamtkeimzahl pro cm ² Zitzenhaut an den drei Untersuchungszeitpunkten	31
Abb. 9: Darstellung der Gesamtkeimzahl an der Zitzenspitze zum Zeitpunkt der Betriebsbesuche.	32
Abb. 10: Graphische Darstellung der auf MacConkey-Agar zufällig ausgewählten Kolonien im Untersuchungszeitraum von Dezember 2021 bis Juni 2022, die mittels MALDI-ToF MS spezifiziert worden sind.	35
Abb. 11: Speziesverteilung der auf BAA- und KAA-Agar zufällig ausgewählten und mittels MALDI ToF MS differenzierten Spezies.	37
Abb. 12: Graphische Darstellung der auf Baird-Parker-Agar zufällig ausgewählten Kolonien im Untersuchungszeitraum von Dezember 2021 bis Juni 2022, die mittels MALDI-ToF MS spezifiziert worden sind.	38
Abb. 13: Graphische Darstellung der auf MacConkey-Agar zufällig ausgewählten Kolonien im Untersuchungszeitraum von Dezember 2021 bis Juni 2022, die mittels MALDI-ToF MS spezifiziert worden sind.	40
Abb. 14: Graphische Darstellung der auf Galle-Äskulin-Agar zufällig ausgewählten Kolonien im Untersuchungszeitraum von Dezember 2021 bis Juni 2022, die mittels MALDI-ToF MS spezifiziert worden sind.	42

- Abbildung 15: Graphische Darstellung der auf Baird-Parker-Agar zufällig ausgewählten Kolonien im Untersuchungszeitraum von Dezember 2021 bis Juni 2022, die mittels MALDI-ToF MS spezifiziert worden sind.** 43
- Abb. 16: Darstellung zur Errechnung des Temperatur-Luftfeuchtigkeits-Index (THI) mittels Temperatur in °C und der Luftfeuchtigkeit in % nach Seebacher und Holzeder (2017).** 45
- Abb. 17: Beurteilung der Euterhygiene anhand des Scorings in aufsteigender Nummerierung (1 – 4) nach LFI Österreich (2017).** 67

Tab. 1: Beurteilungsschema zur Auswertung des Schalmtests modifiziert nach Schusser et al. (2018).....	11
Tab. 2: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung von Viertelgemelksproben vor (grau schattiert), während (weiß hinterlegt) und nach der Umstellung (ockerfarben) auf Melkroboter und Einstreu von Separatormaterial.	22
Tab. 3: Gesamtkeimzahl pro Gramm TS, Anzahl Coliformer Keime (MacC), sowie Keimzahlen auf Baird Parker Agar (BPA), Kanamycin-Äskulin-Azid Agar(KAA) und Galle-Äskulin-Azid Agar (BAA) pro Gramm TS in frisch gepressten Separatormaterial.....	23
Tab. 4: Trockensubstanzgehalt (TS) und pH-Wert in den Einstreuproben aus den Liegeboxen und in frisch gepresstem Separatormaterial, am 06.04.2022	24
Tab. 5: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung der Poolproben aus den Liegeboxen am 06.04.22: Gesamtkeimzahl (GKZ) und KZ (Keimzahl) auf den Selektivnährböden GKZ/g TS: Gesamtkeimzahl pro g TS, MacC/g TS: Coliforme pro g TS, BP/g TS: Staphylokokken pro g TS, KAA/g TS: Äskulinpositive Kokken pro g TS, BAA/g TS: Enterokokken pro g TS.....	24
Tab. 6: Trockensubstanzgehalt (TS) und pH-Wert der gepoolten Einstreuproben aus den Liegeboxen am 23.06.2022	24
Tab. 7: Gesamtkeimzahl (GKZ) und Keimzahlen auf den Selektivnährböden am 23.06.22 GKZ/g TS: Gesamtkeimzahl pro g TS, MacC/g TS: Coliforme pro g TS, BP/g TS: Staphylokokken pro g TS, KAA/g TS: Äskulinpositive Kokken pro g TS, BAA/g TS: Enterokokken pro g TS.....	25
Tab. 8: Verlauf des pH-Wertes in den jeweiligen Sammelproben in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt	25
Tab. 9: Verlauf des Trockensubstanzgehaltes in % (TS-Gehalt) in den jeweiligen Sammelproben in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt	26
Tab. 10: Auflistung der Gesamtkeimzahl (GKZ), der Anzahl der Coliformen (auf MacConkey Agar), der Staphylokokken (BP) und der Enterokokken (BAA, bzw. Äskulin-positive Kokken, KAA) pro cm ² Zitzenhaut.....	30
Tab. 11: Darstellung der Gesamtkeimzahl (GKZ), sowie der Keimzahlen auf MacConkey Agar, auf BP Agar, BAA und KAA an der Zitzenspitze.	32
Tab. 12: Auflistung der Bakterien, die auf MacConkey-Agar im Untersuchungszeitraum von Dezember 2021 bis Juni 2022 angewachsen und mittels MALDI-ToF MS nachgewiesen worden sind.	36
Tab. 13: Auflistung der Bakterien, die auf Galle-Äskulin-Agar im Untersuchungszeitraum von Dezember 2021 bis Juni 2022 angewachsen und mittels MALDI-ToF MS detektiert worden sind.	37
Tab. 14: Auflistung der Bakterien, die auf Baird-Parker-Agar im Untersuchungszeitraum von Dezember 2021 bis Juni 2022 angewachsen und mittels MALDI-ToF MS detektiert worden sind.	39

Tab. 15: Auflistung der Bakterien, die auf MacConkey-Agar im Untersuchungszeitraum von Dezember 2021 bis Juni 2022 angewachsen und mittels MALDI-ToF MS detektiert worden sind.	41
Tab. 16: Auflistung der Bakterien, die auf Galle-Äskulin-Agar im Untersuchungszeitraum von Dezember 2021 bis Juni 2022 angewachsen und mittels MALDI-ToF MS detektiert worden sind.	42
Tab. 17: Verteilung und Mastitisrelevanz der Spezies aus den Einstreuproben die auf Baird-Parker-Agar angewachsen im Untersuchungszeitraum von Dezember 2021 bis Juni 2022 angewachsen und mittels MALDI-ToF MS detektiert worden sind.	44
Tab. 18: Tabellarische Darstellung des durchschnittlichen Temperatur-Luft-Index im Juni 2022	46

9. Anhang

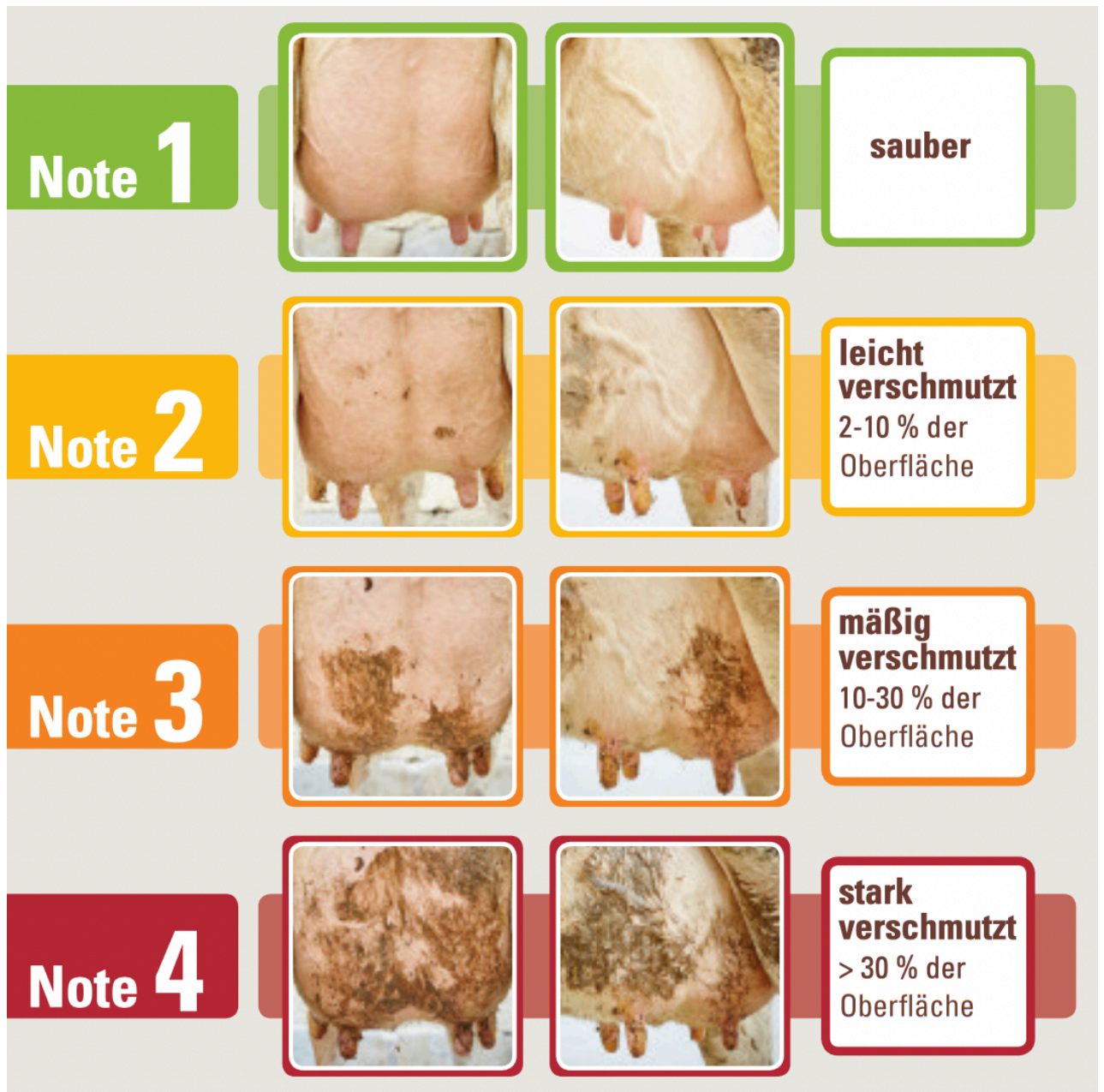


Abb. 17: Beurteilung der Euterhygiene anhand des Scorings in aufsteigender Nummerierung (1 – 4) nach LFI Österreich (2017).

Danksagung

Das Verfassen dieser Diplomarbeit wäre mir ohne vielfältige Unterstützung nicht möglich gewesen, dafür möchte ich ausdrücklich meinen Dank aussprechen.

Ein besonders großes Dankeschön hierfür geht an **Dr. med. vet. Martina Baumgartner**. Für die allumfassende und großartige fachliche Begleitung meiner Arbeit, für jede noch so schwierige Fragestellung oder Umsetzung des Projektes und für die vielen und langen Stunden, die wir gemeinsam in diese Arbeit investiert haben. Weiters möchte ich mich für die Bereitstellung des Materiales und der Gerätschaften, für die fachlichen Ratschläge und allen Fragestellungen bei dem Team - **DI Verena Urbantke, Bettina Löffler und Lihui Han König** - des Milchlabors der Klinik für Wiederkäuer herzlich bedanken. Die Zusammenarbeit war sehr angenehm und ihr habt euch immer sofort all meinen Unklarheiten angenommen.

Großer Dank gilt **Univ. Prof. med. vet. Thomas Wittek, Dipl. ECBHM** für die entscheidenden formellen und fachlichen Verbesserungen meiner Arbeit.

Ebenfalls ein großes Dankeschön gebührt **Frau Dr. med. vet. Claudia Hess, Dipl. ECPVS** für ihre volle Unterstützung, sowie hilfreichen und fachlichen Anmerkungen bei der Laborarbeit an der Klinik für Geflügel und für ihre Funktion als wissenschaftliche Gutachterin dieser Diplomarbeit.

Einen großen Teil der erfolgreichen Umsetzung dieses Projektes beinhalteten die Ausfahrten und Probenentnahmen auf den Betrieb von **Familie Heneckl**. Ich möchte mich herzlich bei meinem Studienkollegen **Daniel**, sowie bei seiner Familie bedanken. Wir waren immer sehr willkommen bei euch und wurden immer wieder hervorragend verköstigt.

So ein großes Projekt lässt sich schwer ohne entsprechende Unterstützung umsetzen. Dafür möchte ich mich herzlich bei der **Österreichischen Buiatrischen Gesellschaft (Univ. Prof. Dr. Dr. h.c. Walter Baumgartner)** und dem **Tiergesundheitsdienst Oberösterreich (HR Dr. Gottfried Schoder)** bedanken.

Und was wäre die Studienzeit ohne die entsprechenden Freundinnen und Freunde (fürs Leben) – ihr seid die Besten Kommilitoninnen und Kommilitonen, die man sich wünschen kann. Ohne euch wäre keine einzige Betriebsausfahrt erfolgt – Ihr habt uns immer ohne Wenn und Aber geholfen und unterstützt. Ich kann euch gar nicht oft genug dafür danken. Merci an **Anna Freytag, Anna Schoder, Anna Riepl, Benjamin Arnold, Günther Rasser, Katja Rosenstingl, Lisa Hajek, Martin Thaler, Manuel Paratscha** und **Mariella Zimmermann!**

Der wohl größte und umfassendste Dank gebührt meiner Familie. Allen voran meinen Eltern, **Dr. Armin Schuler** und **Lydia Schuler**, sowie meinen Brüdern **Mag. med. vet. Severin Schuler** und **Johannes Schuler**. Dank eurer uneingeschränkten Unterstützung konnte ich mir meinen Traum, Tierärztin zu werden, erfüllen. Ich danke euch!