

Aus dem klinischen Department für Nutztiere und Sicherheit von Lebensmittelsystemen der
Veterinärmedizinischen Universität Wien

Zentrum für Systemtransformation und Nachhaltigkeit in der Veterinärmedizin
(Leiterin: Ass.-Prof. Dr. sc.agr. Barbara Metzler-Zebeli)

In vitro-Untersuchung zur Auswirkung des Roggengehalts und der Partikelgröße von TMR auf das Pansen-Mikrobiom

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Katharina Stütz

Wien, im April 2025

Betreuerin: Ass.-Prof. Dr.sc.agr. Barbara Metzler-Zebeli

Begutachter: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Johannes Lorenz Khol, Dipl. ECBHM

Eigenständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen genutzt habe, als jene, die im Text und in der Literaturliste erwähnt werden. Ich erkläre weiter, dass alle Personen und Institutionen, die direkt oder indirekt bei der Erstellung der Arbeit geholfen haben, erwähnt sind und dass die Arbeit oder Teile davon an keiner anderen Institution als Abschlussarbeit eingereicht worden ist.

10.04.2025

Datum

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Stich', written over a horizontal line.

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Betreuerin, Ass.-Prof. Dr. sc. agr. Barbara Metzler-Zebeli, für ihre Unterstützung und ihre hilfreichen Hinweise während des Schreibens dieser Arbeit bedanken. Auch bei Dr. med. vet. Felipe Penagos-Tabares möchte ich mich für die Informationen und die Unterstützung im Labor bedanken.

Ein besonderer Dank geht an den Fördergeber des Projekts, die FFoQSI GmbH, sowie unseren Industriepartner KWS SAAT SE & Co. KGaA, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich während meiner gesamten Studienzeit unterstützt hat.

Zusammenfassung

Verschiedene Getreidearten werden im Kraftfutter und in totalen Mischrationen für Kälber eingesetzt, wobei Roggen bisher nur selten verwendet wird. Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die Auswirkungen von Roggen auf die Pansenfermentation zu untersuchen. Hierbei wurden unterschiedliche Anteile und Partikelgrößen von Roggen im Vergleich zu Weizen hinsichtlich ihres Einflusses auf das Pansenmikrobiom getestet.

Das Experiment wurde mit einem Pansensimulationssystem (Rumen Simulation Technique – RUSITEC) in drei Versuchsdurchläufen durchgeführt, um die Fermentationsfähigkeit der Pansenmikrobiota zu charakterisieren. Dafür wurde Pansenflüssigkeit von drei Milchkühen aus einer Pansenfistel entnommen, homogenisiert und mit jeweils einer von fünf Kombinationen einer totalen Mischration (TMR) auf Getreide-Heu-Basis zehn Tage inkubiert: 0 % Hybrid-Roggen (Kontrolle), 25 % und 46 % Hybrid-Roggen (jeweils gemahlen und gequetscht). Die ersten fünf Tage stellten die Eingewöhnungsphase dar und die letzten fünf Tage dienten als Messzeitraum. Die Futterbeutel wurden zur Bestimmung des Nährstoffabbaus eingesammelt und alle 24 Stunden ersetzt. Für die Fermentationskinetik, die mikrobielle Taxonomie und zur Bestimmung der Metaboliten wurden am achten Tag Fermenterflüssigkeitsproben 1, 2, 4, 6, 8, 12 und 24 Stunden nach der Inkubation gesammelt. Aus Proben von den Zeitpunkten 4 und 8 Stunden nach der Inkubation wurde die DNA extrahiert, welche für die 16S rRNA Amplikonsequenzierung eingesetzt wurde. Die erhaltenen Sequenzen wurden zunächst bioinformatisch und anschließend statistisch ausgewertet.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Ersatz von Weizen durch Roggen zu einem signifikanten Unterschied in der bakteriellen Gemeinschaft (β -Diversität) führte, v.a. bei 46 % gemahlenem Roggen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ein Unterschied in der Artenvielfalt (α -Diversität) konnte hingegen nicht festgestellt werden. Die drei häufigsten Stämme waren Bacteroidota, Firmicutes und Actinobacteriota, die etwa 95 % aller Sequenzen repräsentierten. Vor allem nahm Proteobacteria mit steigendem Roggenanteil ab. Auf Gattungsebene stieg vor allem *Acetitomaculum* und *Succinivibrionaceae* UCG-001 sank durch die Roggenration signifikant.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Roggen, v.a. in höherem Anteil und feinerer Partikelgröße, das Pansenmikrobiom beeinflusst. Roggen kann eine gute Alternative zu Weizen in der Kälberfütterung darstellen, da er dazu beiträgt die mikrobielle Gemeinschaft im Pansen zu optimieren, ohne die mikrobielle Diversität zu verringern. Es sind jedoch weitere in-

vivo-Studien notwendig, um diese Ergebnisse unter realitätsnahen Bedingungen zu überprüfen.

Abstract

Various types of cereals are used in concentrated feed and total mixed rations for calves, although rye has rarely been used so far. The goal of the present study was to investigate the effects of rye on rumen fermentation. In this context, different proportions and particle sizes of rye were tested in comparison to wheat for their influence on the rumen microbiome.

The experiment was conducted using a rumen simulation system (Rumen Simulation Technique – RUSITEC) in three experimental runs to characterize the fermentative capacity of the rumen microbiota. Rumen fluid was collected from three dairy cows through a rumen fistula, homogenized, and incubated for ten days with one of five combinations of a total mixed ration (TMR) based on grain and hay: 0% hybrid rye (control), 25%, and 46% hybrid rye (both ground and rolled). The first five days represented the adaption phase, and the last five days served as the measurement period. Feed bags were collected to determine nutrient degradation and replaced every 24 hours. To analyze fermentation kinetics, microbial taxonomy, and metabolite determination, fermenter fluid samples were collected on the eighth day at 1, 2, 4, 6, 8, 12, and 24 hours after incubation. DNA was extracted from samples taken 4 and 8 hours after incubation and was used for 16S rRNA amplicon sequencing. The obtained sequences were first analyzed bioinformatically and then statistically.

The results show that replacing wheat with rye led to a significant difference in bacterial community (β -diversity), especially with 46% ground rye compared to the control group. No difference in species diversity (α -diversity) was observed. The three most common phyla were Bacteroidota, Firmicutes, and Actinobacteriota, which represented about 95% of all sequences. Especially, Proteobacteria decreased with increasing rye content, while Firmicutes showed an increasing trend. At the genus level, *Acetitomaculum* increased, and *Succinivibrionaceae* UCG-001 decreased significantly with the addition of rye.

These results suggest that rye, particularly at higher inclusion rates and finer particle sizes, influences the rumen microbiome. Rye can be a good alternative to wheat in calf feeding, as it helps optimize the microbial community in the rumen without reducing microbial diversity. However, further in-vivo studies are necessary to verify these results under realistic conditions.

Abkürzungsverzeichnis

KON = Kontrollgruppe

NMDS = non-metric multidimensional scaling

NSP = Nicht-Stärke-Polysaccharide (non starch polysaccharides)

RG = Roggen gequetscht

RM = Roggen gemahlen (mehlig)

RUSITEC = Pansensimulationssystem (Rumen Simulation Technique)

SCFA = kurzkettige Fettsäuren (short chain fatty acids)

TMR = Gesamtmischration (total mixed ration)

VFA = flüchtige Fettsäuren (volatile fatty acids)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	Seite 1
1.1	Zusammensetzung des Pansenmikrobioms	Seite 2
1.2	Einfluss der Fütterung auf das Pansenmikrobiom.....	Seite 4
1.2.1	Unterschiede zwischen Roggen und Weizen als Getreide-Komponente im Konzentrat.....	Seite 4
1.2.2	Einfluss der Partikelgröße auf die Pansenfermentation.....	Seite 5
1.3	Rumen Simulation Technique (RUSITEC).....	Seite 7
1.4	Fragestellung und Hypothese.....	Seite 8
2	Material und Methoden.....	Seite 9
2.1	Versuchsplan und Behandlung.....	Seite 9
2.2	Pansen-Simulationssystem.....	Seite 10
2.2.1	RUSITEC-Verfahren.....	Seite 10
2.2.2	Herstellen des Puffers nach McDougall.....	Seite 11
2.2.3	Fütterung des RUSITEC-Systems.....	Seite 12
2.2.4	Probennahme.....	Seite 13
2.3	DNA-Extraktion und Sequenzierung.....	Seite 16
2.4	Sequenzierung und Bioinformatik.....	Seite 17
2.5	Statistische Auswertung.....	Seite 17
3	Ergebnisse.....	Seite 19
4	Diskussion.....	Seite 25
5	Conclusio.....	Seite 29
6	Literaturverzeichnis.....	Seite 30

1 Einleitung

Die Pansenentwicklung und mikrobielle Vormagenbesiedelung stellen eine wichtige Grundlage für die erfolgreiche Umstellung des Kalbes vom funktionellen Monogastrier zum Wiederkäuer dar [1, 2]. Obwohl Netzmagen, Pansen und Blättermagen bereits bei der Geburt vorhanden sind, sind diese jedoch kaum entwickelt und funktionell inaktiv. Zu Beginn ernähren sich Kälber noch von Milch oder Milchaustauscher, die über die Schlundrinne direkt in den Labmagen geleitet werden, um eine unerwünschte Fermentation im Pansen zu vermeiden, wodurch auch die Stimulierung der Pansenentwicklung zunächst ausbleibt [1,3]. Studien zeigten, dass Kälber, die während der ersten Lebensmonate ausschließlich mit Milch ernährt wurden, eine eingeschränkte Pansenentwicklung in vielen Bereichen aufwiesen, im Vergleich zu mit Getreide und Heu gefütterten Tieren [1, 3, 4]. Dies ist auch noch einmal in Abbildung 1 verdeutlicht [5, 6].

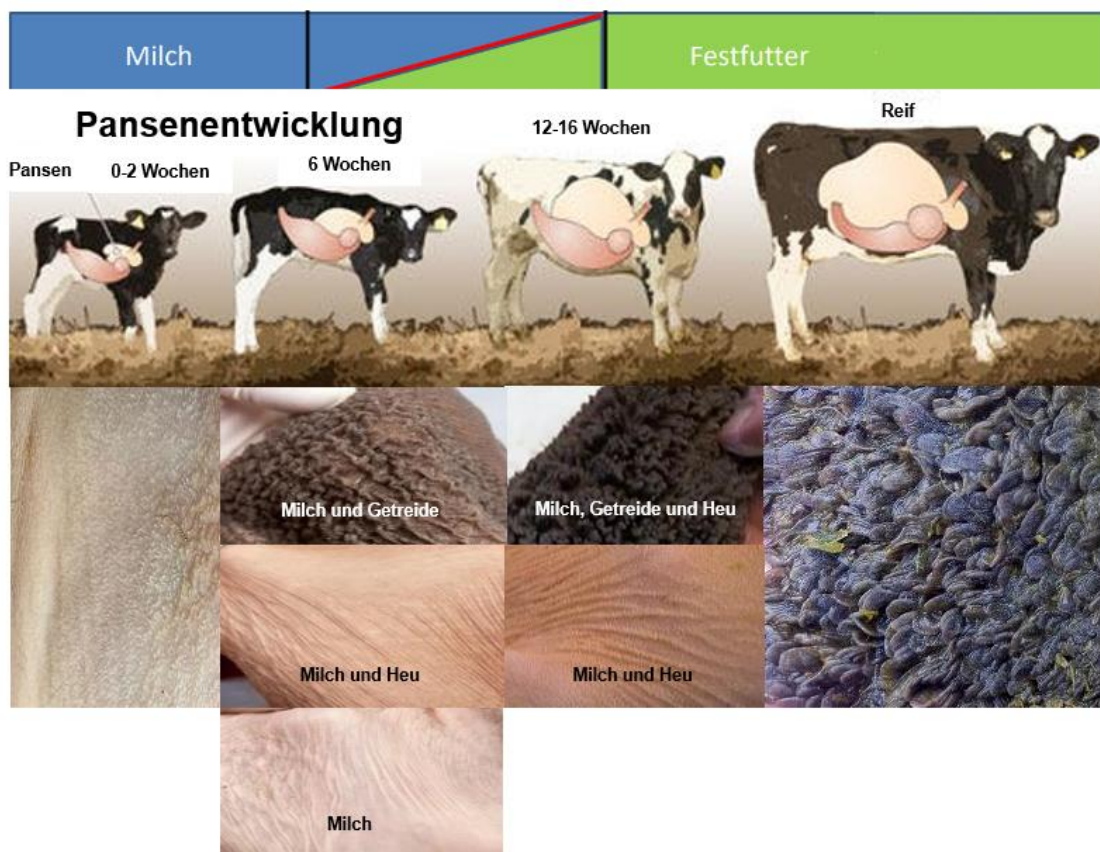


Abbildung 1: Darstellung des Pansens und seine Entwicklung aufgrund unterschiedlicher Futtermittel. Modifiziert nach [5, 6].

Neben der mikrobiellen Besiedlung des Pansens, die bereits kurz nach der Geburt stattfindet, fördert die Fütterung von hochwertigem Rau- und Kraftfutter das Wachstum und die Entwicklung des Pansens und der Papillen, welche für die Absorption von mikrobiellen Fermentationsprodukten, vor allem kurzkettige Fettsäure (SCFA), erforderlich sind [1, 7]. Dabei ist die Balance zwischen Milch und festem Futter während der Entwöhnung wichtig, um den Übergang vom Kalb zum adulten Wiederkäuer zu unterstützen. Auch die Aufnahme von ausreichend Wasser spielt eine Rolle [8].

1.1 Zusammensetzung des Pansenmikrobioms

Säugetiere können faserreiche Kohlenhydrate wie Zellulose und Hemizellulose nicht selbst verdauen. Daher leben Pflanzenfresser in einer Symbiose mit Mikroorganismen in ihrem Verdauungstrakt, die diese Kohlenhydrate abbauen. Die dabei entstehenden flüchtigen Fettsäuren (VFA) dienen dem Wirtstier als Energie- und Nährstoffquelle. Bei Rindern findet dieser Prozess größtenteils im Pansen (Rumen) statt [9].

Das ruminale Mikrobiom stellt die Summe aller Mikroorganismen im Pansen dar und bildet ein komplexes Ökosystem, in dem verschiedene Bakterien, Archaeen, Protozoen und Pilze zusammenleben [10, 11, 12, 13]. Dieses Mikrobiom reagiert auf verschiedene Störungen, welche physikalischer (z. B. Temperaturänderungen), chemischer (z. B. der pH-Wert im Pansen) oder biologischer Natur (z. B. allochthone Mikroben) sein können [10]. Andere Faktoren wie Genetik, Umweltbedingungen, Jahreszeit und der Stoffwechselzustand beeinflussen ebenfalls die Struktur und Funktion der Mikrobiota, aber die Ernährung bleibt der Hauptfaktor für diese Veränderungen [12, 14, 15, 16].

Funktionell werden die Pansenbakterien nach ihrer Energiequelle unterschieden [13, 17]. In Tabelle 1 sind die verschiedenen Funktionstypen mit Beispielen aufgelistet [18, 19].

Tabelle 1: Funktionstypen der Pansenbakterien. Modifiziert nach [18, 19].

Funktionstyp	Energiequelle	Fermentationsprodukt	Beispiele
Cellulolytisch/ zelluloseabbauend	Zellulose und Hemizellulose	Succinat, Acetat, Formiat, Butyrat, H ₂ , CO ₂	<i>Fibrobacter succinogenes</i> , <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> , <i>Ruminococcus albus</i>
Amylolytisch/ stärkeabbauend	Stärke und Zucker	Formiat, Acetat, Succinat, Laktat	<i>Bacteriodes ruminicola</i> , <i>Ruminobacter amylophilus</i>
Proteolytisch/ eiweißabbauend	Proteine	NH ₃ , Aminosäuren, VFA	<i>Bacteroides amylophilus</i> , <i>Bacteroides ruminicola</i> , <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>
Laktatverwertend	Laktat	Propionat, Acetat, Butyrat, Succinat, CO ₂ , H ₂	<i>Selenomonas lactilytica</i> , <i>Megasphaera elsdenii</i>
Pektinabbauend	Pektin	Acetat, Formiat, Lactat, H ₂ , CO ₂	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> , <i>Prevotella ruminicola</i> , <i>Bacteroides ruminicola</i>
Lipolytisch/ fettabbauend	Lipide	Acetat, Propionat	<i>Anaerovibrio lipolytica</i>
Methanogen	CO ₂ + H ₂ , alternativ: Formiat	Methan	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>

Das Kernmikrobiom im Pansen besteht aus 47 Bakteriengattungen und einer Gattung (*Methanobrevibacter*) innerhalb der Archaeen [11]. Es wird u.a. von Stämmen wie Firmicutes (insbesondere der Gattungen *Ruminococcus* und *Butyrivibrio*), und Bacteroidetes (= Bacteroidota; v.a. der Gattung *Prevotella*) gebildet [10, 11, 12].

1.2 Einfluss der Fütterung auf das Pansenmikrobiom

Im Gegensatz zu den Vorteilen von Raufutter für die Entwicklung der Pansenmuskularisierung und des Pansenvolumens, spielen Konzentrate eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Pansenepithels [4, 20]. Nicht durch physikalische Eigenschaften, sondern die chemische Zusammensetzung von Konzentraten führt zu einer Verschiebung der mikrobiellen Population, was zu einer erhöhten Produktion von Butyrat und Propionat auf Kosten von Acetat führt [7, 20, 21]. Laut Bergman (1990) werden etwa 30 % des Acetats, 50 % des Propionats und 90 % des Butyrats im Pansenepithel verstoffwechselt [22]. Butyrat gilt als diejenige Fettsäure, die die größte Rolle für die Entwicklung der Pansenpapillen aufweist, gefolgt von Propionat [3, 23, 24]. Da diese beiden Fettsäuren bei der Fermentation von Getreide entstehen, ist diese Stärkequelle ein wesentlicher Bestandteil in der Ernährung von Kälbern zur Förderung der Pansenentwicklung. Mais und Weizen produzierten dabei mehr SCFA als Gerste und Hafer [25, 26]. Trotz des positiven Einflusses sollte das Futter nicht zu fein vermahlen werden, um das Risiko einer Parakeratose zu vermeiden. Durch einen geringeren Abrasivwert kommt es dabei zu einer abnormalen Entwicklung der Pansenzotten und die dabei entstehende Keratinschicht wirkt als Barriere, welche die Aufnahme von flüchtigen Fettsäuren erschwert [27, 28]. Heu verursacht eine höhere mechanische Reizung, wodurch die Keratinschicht entfernt wird, weshalb einige Autoren Heu in der Ration von Kälbern dringend empfehlen, um die Gesundheit des Pansenepithels aufrecht zu erhalten [8, 20]. Ein kleiner Anteil des Futters, welcher eine Partikelgröße von über 1,18 mm aufweist, reicht für die Abrasivität im Pansen des Kalbes aus, um eine Ansammlung von Keratin im Pansenepithel zu verhindern und eine stabilere Pansenfermentation zu unterstützen [25].

1.2.1 Unterschiede zwischen Roggen und Weizen als Getreide-Komponente im Konzentrat

Kohlenhydrate dienen als Hauptenergiequelle für Pansenmikroben. Zu diesen gehören die Strukturkohlenhydrate, welche pflanzliche Faser enthalten (Zellulose und Hemizellulose), und die nicht strukturellen Kohlenhydrate (Stärke, Zucker, Pektin) [29, 30].

Totale Mischrationen (TMR) und Konzentrate für Kälber enthalten, neben anderen Zutaten, verschiedene Getreidesorten, wie Weizen, Gerste oder Mais [31], wohingegen Roggen selten verwendet wird. In Tabelle 2 sind einige Unterschiede zwischen Roggen und Weizen aufgelistet. Weizen enthält mehr Proteine und Stärke, während Roggen einen höheren Anteil an Nicht-Stärke-Polysacchariden (NSP) besitzt. NSP sind nach der Stärke die bedeutendsten

Kohlenhydrate in Roggenkörnern [32]. Dazu zählen unter anderem Fruktane und lösliche Arabinoxylane [33, 34]. Diese Polysaccharide können die Butyrat-Fermentation direkt oder indirekt über mikrobielles „Cross-Feeding“ fördern, wie es bereits bei Schweinen gezeigt werden konnte [35, 36, 37, 38]. Zellulose ist dagegen eine unlösliche Faser [32]. Die Fütterung dieser Strukturkohlenhydrate fördert das Wachstum von zellulolytischen Mikroorganismen im Pansen [14].

Tabelle 2: Vergleich von Weizen und Roggen. Modifiziert nach [33].

Getreideart	Protein (%)	Stärke (%)	Rohfaser (%)	Fruktan (%)	Arabinoxylan, löslich (%)
Weizen	13,7	71,3	2,1	1,0	1,4
Roggen	11,7	64,3	1,8	2,9	3,1

Die Verfütterung von Roggen ist zudem vorteilhaft, da Roggen während der Wachstumsphase weniger Nährstoffe benötigt und mit weniger Wasser auskommt als andere Getreidesorten. Darüber hinaus ist moderner Hybrid-Roggen weniger anfällig für den Befall mit dem Pilz *Claviceps purpurea*, der zur Mutterkornbildung führt. Dank dieser Eigenschaften bietet Roggen eine preisgünstige Option für die Fütterung von Nutztieren. Ein Versuch zeigte auch, dass die Zugabe von 25 % bzw. 40 % Roggen keine negativen Auswirkungen auf Milchleistung, Fett- und Eiweißgehalt hatte [34, 39].

1.2.2 Einfluss der Partikelgröße auf die Pansenfermentation

In der Literatur werden verschiedene Partikelgrößen des Futters für Kälber vorgeschlagen, um die physikalischen und Verdauungsfunktionen des Pansens und des Magen-Darm-Trakts zu stimulieren. Große Partikel und ein hoher Fasergehalt stimulieren die Motilität, die Muskularisierung und das Volumen des Pansens [1, 7]. Auch Krafftutterdiäten mit einer größeren Partikelgröße haben gezeigt, dass sie die Pansenkapazität und -muskularisierung stärker stimulieren als fein gemahlenes Krafftutter [40]. Laut Heinrichs (2005) könnten somit Krafftutterdiäten mit größerer Partikelgröße die bevorzugte Fütterungsstrategie für die Pansenentwicklung sein, da sie sowohl die Epithelentwicklung, die durch die VFA stimuliert wird, als auch das Fassungsvermögen des Pansens und die Pansenmuskulatur fördern können [20].

Die Struktur des Futters beeinflusst auch die Pansenfermentation. Fein gemahlenes Getreide bietet eine größere Oberfläche für den enzymatischen Abbau. Dies ermöglicht es den Mikroben, das Getreide schneller und intensiver zu fermentieren, wodurch Kohlenhydrate schneller abgebaut werden können als Zellwandbestandteile. Es kommt dabei zu einer Verschiebung der Pansenfermentation, was zu einer erhöhten Produktion flüchtiger Fettsäuren in kürzester Zeit führt [41, 42]. Dabei wird mehr Propionat und weniger Acetat gebildet [43]. Wenn diese Fettsäuren nicht ausreichend im Pansen absorbiert werden, sinkt der Pansen-pH, was das Risiko einer akuten oder sub-akuten Pansenazidose erheblich erhöht [44, 45]. Saure Pansenbedingungen begünstigen eine höhere Anzahl an amylolytischen Arten auf Kosten der fibrolytischen Bakterien, was die Abbaubarkeit der pflanzlichen Faser verringert [46, 47, 48, 49]. Im Gegensatz dazu sorgt die gröbere Bearbeitung von Getreide, wie das Quetschen, dafür, dass die Fermentation langsamer erfolgt, was das Risiko einer pH-Absenkung und der damit verbundenen Azidose verringert. Durch den langsameren Abbau werden die flüchtigen Fettsäuren über einen längeren Zeitraum produziert und können besser vom Pansen absorbiert werden. Die mikrobiellen Prozesse der Fermentation sind daher stark von der Partikelgröße abhängig und erfordern eine sorgfältige Kontrolle.

Raufutter wirkt sich dagegen vor allem auf die Kautätigkeit aus und weniger direkt auf den pH-Wert des Pansens. Größere Partikel erfordern intensiveres kauen, was die Speichelproduktion anregt und den Pansen-pH stabilisiert [7, 50, 51]. Dies fördert eine gleichmäßigere Nährstofffreisetzung und das Wachstum nützlicher Pansenmikroben, welche die Produktion von Acetat, in Vergleich zu Propionat und Butyrat, fördern [20]. Kleinere Partikel werden weniger gekaut, was zu einer verringerten Speichelproduktion und veränderten Pansenfermentation führt [52].

Zusammengefasst fördern faserreiche, grobe Partikel das Vorkommen von heuassoziierten Bakterien, wodurch es zu einer höheren Produktion von Acetat kommt, was die Fettproduktion und dadurch das Wachstum des Wiederkäuers unterstützt. Stärkehaltige, feine Partikel fördern hingegen die Produktion von Propionat, was die Glukoseversorgung des Tieres verbessert [53, 54]. Butyrat wird von der Darmschleimhaut als Energiequelle genutzt und die Produktion durch die Aufnahme von NSP gefördert [55]. Eine ausgewogene Mischung unterschiedlicher Partikelgrößen im Futter ist wichtig, um eine optimale Fettsäureproduktion und ein stabiles Pansenmilieu sicherzustellen. Wichtig ist auch zu beachten, dass die optimale Partikelgröße je nach Futterart variiert [50].

1.3 Rumen Simulation Technique (RUSITEC)

Das Pansensimulationssystem (engl.: Rumen Simulation Technique – RUSITEC) wurde in dieser Studie als Model zur Untersuchung des Pansenmikrobioms verwendet. Die von Czerkawski und Breckenridge (1977) entwickelte in-vitro-Methode beruht auf einem geschlossenen, semikontinuierlichen Durchflusssystem, welches unter kontrollierten Bedingungen abläuft [56]. Der Versuch findet in sechs geschlossenen und voneinander unabhängigen Fermentern statt, welche in einem Wasserbehälter mit 39,5 °C gehalten werden (Abbildung 2).

Im Grunde ist RUSITEC ein vereinfachtes Modell des Pansens, welches die Verdauungsprozesse simuliert. Die Fermenter werden dafür mit Pansensaft und festem Inhalt befüllt und täglich mit einem neuen Futterbeutel versorgt. Weiters erfolgt ein kontinuierlicher Fluss mit einem Puffer, der dem Wiederkäuerspeichel nachempfunden ist. Die Pansenbewegungen werden simuliert, während das Spülen mit Stickstoffgas für anaerobe Bedingungen sorgt. Ablaufende Fermentationsflüssigkeit und -gas werden gesammelt. Mittels dieser Methode ist es möglich die Auswirkungen von verschiedenen Futtermitteln oder Futtermittelzusatzstoffen auf das Mikrobiom und die Fermentation zu erfassen [57, 58].



Abbildung 2: Aufbau des Pansensimulationssystems (RUSITEC). © Penagos-Tabares

1.4 Fragestellung und Hypothese

Das Ziel der Studie war es, zu untersuchen, welche Veränderungen im Pansenmikrobiom des Rindes auftreten, wenn Weizen teilweise oder ganz durch Hybrid-Roggen ersetzt wird, wie stark sich die Partikelgröße des Roggens auswirkt, und ob es Unterschiede im Pansenmikrobiom nach 4 und 8 Stunden der Fermentation nach Substratgabe gibt.

Folgende Hypothese wurde dafür formuliert: Sowohl der Gehalt als auch die Partikelgröße von Roggen haben einen Einfluss auf das Mikrobiom im Rinderpansen. Es wird angenommen, dass der Roggen den Anteil an butyratbildenden und faserabbauenden Bakterien in Abhängigkeit der Roggenmenge und der Partikelgröße im Pansen-simulationssystem erhöht.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsplan und Behandlung

Für das in-vitro-Experiment wurden zwei RUSITEC-Systeme der veterinärmedizinischen Universität Wien verwendet. Diese bestehen aus jeweils sechs Fermentern, wobei in dieser Studie nur zehn der insgesamt zwölf Fermenter verwendet wurden.

Der praktische Teil des Experiments fand in drei Versuchsdurchgängen im Oktober 2022, Dezember 2022 und Jänner 2023 statt. Jeder der drei Durchgänge dauerte zehn Tage, wobei die ersten fünf Tage die Eingewöhnungsphase darstellten und die letzten fünf Tage als Messzeitraum dienten.

Für den Versuch wurden fünf unterschiedliche Futterzusammensetzungen einer totalen Mischration (TMR) auf Getreide-Heu-Basis bestimmt. Es wurden dabei zwei unterschiedliche Getreidegrößen für Roggen verwendet, gemahlen (4 mm) und gequetscht (Abbildung 3). Das Heu in der TMR wurde auf 6 mm geschnitten. Heu und Roggen wurden mit einer Schneidmühlen-Kombination verarbeitet (Pulverisette 25/19, Fritsch GmbH, Idar-Oberstein, Deutschland). Weitere Futterkomponenten waren Weizenschrot, Sojamehl und Kraftfutter Kälberstart Omega (Garant-Tiernahrung GmbH, Pöchlarn, Österreich). Die prozentuellen Mengenangaben sind in Tabelle 3 aufgelistet. Der Hybrid-Roggenanteil betrug in den einzelnen Mischungen 0 % Roggen (Kontrolle, KON), 25 % Roggen gemahlen (25 % RM), 46 % Roggen gemahlen (46 % RM), 25 % Roggen gequetscht (25 % RG) und 46 % Roggen gequetscht (46 % RG). Mischung Nummer 1 in Tabelle 3 stellt das Kontrollfutter ohne Roggen dar.

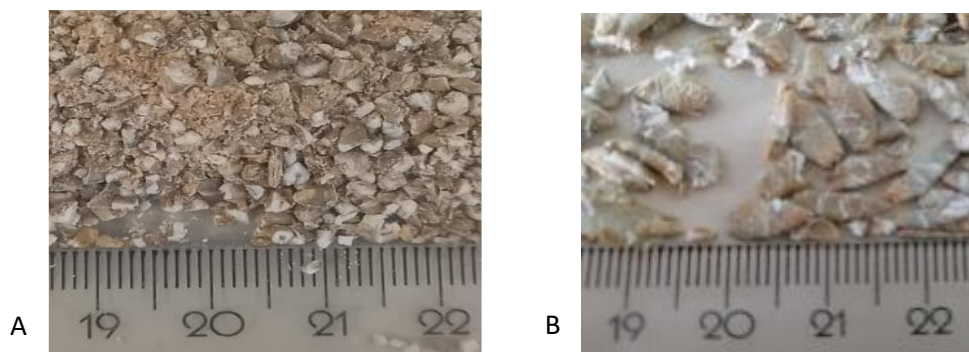


Abbildung 3: Unterschiedliche Roggengrößen: gemahlen (A) und gequetscht (B). © Penagos-Tabares

Das Futter wurde zu Beginn des jeweiligen Versuchsdurchlaufs vorbereitet und bis zur Verwendung bei 4 °C im Kühlraum gelagert. Die Komponenten wurden für die jeweilige Mischungen wie in Tabelle 3 mit einer Waage (Mettler Toledo ME4002, Mettler-Toledo International Inc., Greifensee, Schweiz) abgewogen, vermischt und in Nylon-Beutel (10x13 cm, 50 µm Maschenweite) überführt. Pro Mischung wurden zwei Futterbeutel befüllt und jeweils ein Beutel mit einem schwarzen und weißen Kabelbinder verschlossen. Um das Zufallsprinzip der Fermenter zu gewährleisten, wurden die Mischungen 1–5 bei jedem der drei Durchgänge in jeweils andere Fermenter platziert.

Tabelle 3: Fünf Kombinationen der im Versuch eingesetzten Total-Misch-Ration. Nummer 1 stellt das Kontrollfutter ohne Roggen dar.

	1	2	3	4	5
Roggen Partikelgröße	-	gemahlen (4 mm)		gequetscht	
Anteil (%)					
Roggen	0	25	46	25	46
Weizen	46	21	0	21	0
Sojamehl	25	25	25	25	25
Heu	25	25	25	25	25
Kraftfutter	4	4	4	4	4

2.2 Pansen-Simulationssystem

2.2.1 RUSITEC-Verfahren

Am Tag null jedes Versuchsdurchgangs wurden an der Vetfarm (Pottenstein, Österreich), einer Außenstelle der veterinärmedizinischen Universität Wien, jeweils 2,5 Liter Pansensaft und fester Panseninhalt von drei Spenderkühen (Halsbandnummer 100, 101 und 114) entnommen. Dies erfolgte über eine Pansenfistel mittels Pansensaftentnahmepumpe. Für den Transport an die Vetmeduni wurde der Pansensaft in einer Thermobox gelagert und in einem temperierten Wasserbad innerhalb einer Styroporbox warmgehalten.

Im Labor wurde der Pansensaft von jeder Kuh separat mit 4-lagiger medizinischer Gaze in einen 2 Liter Erlenmeyerkolben gefiltert und anschließend homogenisiert. Von der gepoolten Pansenflüssigkeit, welche das Inokulum darstellt, wurden jeweils 600 ml und 100 ml McDougall Puffer (Tabelle 4) in die zehn Fermenter gegeben und mit zwei Futterbeuteln

inkubiert. Ein Beutel mit einer der fünf Kombinationen der TMR und einer mit gepooltem Panseninhalt. Letzterer wurde am ersten Tag durch einen Futterbeutel ersetzt und an den folgenden Tagen wurde dann immer der älteste Beutel durch einen Neuen ersetzt, sodass jeder Futterbeutel 48 Stunden lang im Fermenter blieb. Nachdem die Futterbeutel dazugegeben wurden, wurde 3 Minuten mit gasförmigen Stickstoff N_2 gespült (3l/min.). Das Wasser, in dem sich die Fermenter befanden, wurde mit einer Temperatur von $39,5^\circ C$ kontinuierlich beheizt und die Fermenterflüssigkeit wurde vertikal durchmischt, um den Pansenzyklus zu simulieren (8 Zyklen pro Minute).

Für den künstlichen Speichelfluss und um den pH-Wert zu regulieren, sorgte der McDougall Puffer (Tabelle 4) mit einer Flussrate von etwa 400 ml pro Tag durch eine 12-Kanal-Peristaltikpumpe (ISMATEC ISM932, IDEX GmbH, Wertheim, Deutschland). Jeder der Fermenter war über Schläuche (Tygon®, Saint-Gobain, Frankreich) mit Flaschen zum Auffangen der abfließenden Flüssigkeit sowie mit Aluminiumbeuteln (Tecobag 8L, Tesseraux Spezialverpackungen GmbH, Bürstadt, Deutschland) zum Auffangen des Fermentationsgases verbunden. Die Abflussflaschen wurden in einer Kühlbox bei $1^\circ C$ gekühlt, um eine weitere Fermentation zu verhindern.

2.2.2 Herstellen des Puffers nach McDougall

Die Pufferlösung basierte auf dem Puffer nach McDougall (1948), und wurde gemäß der Modifikation von Klevenhusen et al. (2014) angepasst [59]. Die Komponenten für die Herstellung des Puffers sind in Tabelle 4 aufgelistet. Natriumchlorid ($NaCl$), Kaliumchlorid (KCl), Calciumchlorid Dihydrat ($CaCl_2 \times 2 H_2O$) und Magnesiumchlorid Hexahydrat ($MgCl_2 \times 6 H_2O$) wurden mit einer Waage (OHAUS Explorer EX225D/AD, OHAUS Corporation, Parsippany, USA) abgewogen und in einem Messkolben in einem Liter deionisierten Wasser mittels Magnetrührer (BioSan Magnetrührer MMS-3000, BioSan, Riga, Lettland) aufgelöst. Für den Puffer wurden 50 ml davon gebraucht. Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$) und Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat ($Na_2HPO_4 \times 2H_2O$) wurden in ca. 4 Liter deionisierten Wasser aufgelöst. Langsam wurden 50 ml der oberen Lösung mittels Separationstrichter zu pipettiert. Danach wurde der Messkolben bis zur 5-Liter-Markierung mit deionisiertem Wasser aufgefüllt.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Puffers nach McDougall. Modifiziert nach [59].

Komponenten	Menge (g)
NaHCO ₃	49
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	23,38
NaCl	47
KCl	57
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	5,4
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	12,8

2.2.3 Fütterung des RUSITEC-Systems

Die folgenden Schritte wurden mit jedem Fermenter nacheinander durchgeführt. Zwischen den Fermentern wurden die Handschuhe gewechselt, um eine mikrobielle Kreuzkontamination zu vermeiden. Zuerst wurde das System 30 Sekunden lang mit Stickstoffgas N₂ gespült (3l/min), um das gesamte produzierte Fermentationsgas im Aluminiumbeutel zu sammeln. Dann wurde der Motor abgeschaltet, die Abflussflasche in einen Messzylinder entleert und die Menge der abgeflossenen Flüssigkeit gemessen, um das Pufferzuflussvolumen zu kontrollieren. Anschließend wurde die entleerte Flasche wieder angebracht.

Als nächstes wurde der Fermenter geöffnet und die Futterbeutel ausgetauscht, wodurch die tägliche Futteraufnahme simuliert wurde. In einem Fermenter befanden sich immer zwei Futterbeutel. Jeweils der ältere Futterbeutel, welcher 48 Stunden lang inkubiert wurde, wurde herausgenommen. Dieser wurde über dem Fermenter ausgedrückt und mit 40 ml des vorgewärmten Puffers gespült, um die Mikroben zurück in den Fermenter zu überführen. Danach wurde der Futterbeutel mit kaltem Wasser gespült, ausgedrückt und bei -20°C eingefroren. Der zurückgebliebene Futterbeutel wurden nun mit dem neuen Futterbeutel zusammengedrückt, um futterassoziierte Mikroben in den neuen Beutel zu übertragen. Zum Schluss wurde das System 3 Minuten lang mit Stickstoffgas gespült, um die anaeroben Bedingungen wiederherzustellen und das Gerät wurde wieder eingeschaltet.

2.2.4 Probennahme

Die Probennahme ist in Tabelle 5 zusammengefasst. Da die Diplomarbeit Teil eines größeren Projektes war, wird in diesem Abschnitt die Probennahme von allen Proben beschrieben. Für die vorliegende Diplomarbeit sind jedoch nur die Mikrobiom-Proben relevant.

Am Tag Null wurde von dem gesammelten Panseninhalt jeweils eine Probe von jeder Kuh und eine Mischung von allen drei Kühen genommen. Diese Proben wurden in einem Nasco Whirl-Pak Beutel (Nasco, Fort Atkinson, USA) in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren und dann im Gefrierschrank bei -20°C gelagert. Dann wurden 2 ml für die Messung von pH-Wert und Redoxpotenzial in Reagenzröhrchen überführt. Diese wurden sowohl einzeln aus der Pansenflüssigkeit als auch aus den gepoolten Pansenflüssigkeitsproben der Spenderkühe gemessen. Die Werte wurden mit einem pH-Meter (Mettler Toledo Seven Excellence pH/mV Meter) bestimmt, das aus zwei separaten Elektroden (pH Elektrode InLab Expert Pro-ISM und Redox Sensor Pt4805-DPA-SC-S8/120, Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz) bestand. Vor dem Einsatz wurde die pH-Elektrode täglich mit einer Redoxpufferlösung ($220\text{ mV}/7\text{ pH}$) und einer pH Standardlösungen (pH 4,01 und 7,00) kalibriert. Zwischen den Flüssigkeiten verschiedener Fermenter wurde die Elektrode mit Aqua bidest gespült.

Sowohl von den einzelnen Proben als auch vom gemischten Pansensaft wurden jeweils zwei Kryoöhrchen für das Mikrobiom und zwei Eppendorf-Röhrchen für Ammoniak (NH_3), kurz- (SCFA) und langkettige (LCFA) Fettsäuren mit Pansensaft befüllt. Diese wurden in Stickstoff schockgefroren und danach im Gefrierschrank bei -20°C gelagert.

Weiters wurde der Volumenstrom mittels Flowmeter und das Gasvolumen der Beutel mittels Wasseraustauschmethode gemessen, um zu sehen wie viel Liter Wasser durch das Gas verdrängt wurden. Die Zusammensetzung des Gases wurde mit einem Biogasanalysator bestimmt (Biogasanalysator BM 2000, Geotechnical Instruments (UK) Ltd., England). Dafür wurde 30 Sekunden lang gemessen, um den prozentualen Anteil an CO_2 , O_2 und CH_4 zu bestimmen. Der Biogasanalysator wurde jeden Tag vor und nach der Gasmessung an der frischen Luft kalibriert.

Die inkubierten Futterbeutel wurden bis zur späteren Analyse bei -20°C gelagert. Das Volumen der abgeflossenen Flüssigkeit wurde ebenfalls gemessen.

Am letzten Tag wurde zusätzlich zu den oben genannten Proben die restliche Flüssigkeit aus den Fermentern mit einem Messzylinder gemessen, um zu sehen wie viel Pansensaft noch vorhanden war. Ebenfalls wurden 20 ml Pansensaft für die Bestimmung der LCFA (long-chain

fatty acids) in Schraubröhrchen überführt. Da kein Futterbeutelwechsel mehr stattfand, wurden zudem die 24h-Beutel für das Mikrobiom in Whirl-Paks eingefroren.

Nur am Tag acht wurden zusätzlich Fermenterflüssigkeitsproben nach 1, 2, 4, 6, 8, 12 und 24 h nach der Fütterung, für die Fermentationskinetik, die mikrobielle Taxonomie und zur Bestimmung der Metaboliten, gesammelt.

Tabelle 5: Zeitplan für die Probennahme aus dem RUSITEC System

	Fermenterflüssigkeit						Futterbeutel		Abfluss	Gas
Tag	pH	Redox	SCF 2x1 ml	NH ₃ 2x1 ml	Mikroben 2x2 ml	LCFA 1x20 ml	Weender 48h Beutel	Mikroben	Volumen	Volumen/ Zusammensetzung
0	x	x	x	x	x	x		Panseninhalt von Kuh 1-3		
1	x	x							x	x
2	x	x							x	x
3	x	x							x	x
4	x	x							x	x
5	x	x							x	x
6	x	x	x	x	x		x		x	x
7	x	x	x	x	x		x		x	x
8	x	x	x	x	x		x		x	x
9	x	x	x	x	x		x		x	x
10	x	x	x	x	x	x	x	x (24h Beutel)	x	x

RUSITEC: Pansensimulationssystem; SCF: kurzkettige Fettsäuren; LCFA: langkettige Fettsäuren.

2.3 DNA-Extraktion und Sequenzierung

Für die Analyse der Veränderungen der bakteriellen Gemeinschaften wurden basierend auf den Fermentationsdaten die Zeitpunkte 4 und 8 Stunden ausgewählt. Die Extraktion der mikrobiellen DNA aus den Fermenterproben erfolgte mittels des DNeasy PowerSoil Pro Kits (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) mit einigen Modifikationen. Dieser Kit ist eine Spin-Säulen-basierte Extraktionsmethode. Dafür wurden die Proben zuerst bei 4 °C aufgetaut und 800 µl der Pansenflüssigkeit in die dafür vorgesehenen Röhrchen, welche den CD1-Puffer enthalten, überführt. Im weiteren Schritt wurden die Röhrchen 5 Minuten lang in einem HLC-Heizblock (Haep Labor Consult, Bovenden, Deutschland) bei 95 °C inkubiert und dann 1 Minute lang in einer Tischzentrifuge (Zentrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 15.000 x g zentrifugiert. Der Überstand in jedem Röhrchen wurde dann vom Pellet getrennt, in ein sauberes Mikrozentrifugenröhrchen (2 ml) überführt und auf Eis gelegt. Danach wurden die Proben mit drei verschiedenen Enzymen nach Kong et al. (2010) inkubiert, um die Bakterienwände aufzubrechen [12]. Lysozym (100 µl, 100 mg/ml) und Mutanolysin (10 µl, 2,5 U/ml) wurde dem Pellet hinzugefügt und in einem Thermoshaker (Biometra TS1 ThermoShaker, Analytik Jena GmbH+Co.KG, Jena, Deutschland) 30 Minuten lang bei 37 °C inkubiert (350 U/min). Danach wurde Proteinase K (21,5 µl, 20 mg/ml) hinzugefügt und die Proben bei 65 °C für 30 Minuten lang bei 350 U/min inkubiert. Die Proben wurden dann in 2 Zyklen, zu jeweils 1 Minute mit 1 Minute Pause dazwischen, in einem Homogenisator (FastPrep-Homogenizer 24 TM 5G, MP Biomedicals, Solon, USA) verarbeitet. Der gesamte Inhalt wurde jetzt mit dem Überstand in dem vorherigen Mikrozentrifugenröhrchen kombiniert. Nun wurden 200 µl CD2-Lösung zugeben. Nach 5 Sek. vortexen wurde 1 Minute lang bei 15.000 x g zentrifugiert (Mikrozentrifuge 5424, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Danach wurden 700 µl Überstand in ein sauberes 2-ml-Sammelröhrchen überführt, 600 µl CD3 Lösung zu jedem Röhrchen hinzugefügt und wieder gevortext. Bis zu 650 µl Überstand wurde als nächstes auf eine MB-Spin-Säule übertragen und dann 1 Minute lang bei 15.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, und der vorherige Schritt wiederholt, um sicherzustellen, dass das gesamte Lysat die Spin-Säule durchlaufen hat. Die MB-Spin-Säule wurde in ein neues 2-ml-Sammelröhrchen eingesetzt, 500 µl Lösung C5 in die Spin-Säule geben und 1 Minute lang bei 15.000 x g zentrifugieren. Dann wurde die MB-Spin-Säule erneut in ein neues 2-ml-Sammelröhrchen gegeben und 2 Minuten bei bis zu 16.000 x g zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Nun wurde die MB-Spin-Säule in ein 1,5-ml-Elutionsröhrchen überführt und 40 µl der Lösung C6 in die Mitte der weißen Filtermembran geben. Dies wurde

1 Minute lang bei Raumtemperatur inkubiert und dann 1 Minute lang bei 15.000 x g zentrifugiert. Das Elutionsvolumen wurde zum Schluss mit der Pipette überprüft. Nach der Isolierung wurde die Gesamt-DNA-Menge mit dem Qubit Fluorometer 4.0 (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) und dem Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Wien, Österreich) gemäß den Anweisungen des Herstellers bestimmt.

2.4 Sequenzierung und Bioinformatik

Die 16S rRNA-Amplikonsequenzierung wurde in einem externen Labor (Microsynth AG, Balgach, Schweiz) durchgeführt. Dafür wurden Aliquots der DNA-Extrakte zur Bibliotheksvorbereitung geschickt (NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit, Illumina, San Diego, CA, USA). Das 16S rRNA-Genamplikon wurde mit den Primern 341F-ill (5'CCTACGGGNGGCWGCAG-3') und 805R-ill (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') amplifiziert. Äquimolare Probenpools wurden auf der Novaseq 6000-Plattform (Illumina) sequenziert, um 250 bp-lange paired-end Sequenzen zu erzeugen. Demultiplexing und Trimmen der Rohsequenzen sowie das Zusammenfügen der Reads wurden von Microsynth durchgeführt. Die zusammengeführten Reads der 16S rRNA-Amplicons wurden mit dem Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2 (Version 1.26.0) in R Studio (Version 1.4.1106) bioinformatisch ausgewertet [60]. Eine Sequenztabelle wurde erstellt und die Taxonomie wurde unter Verwendung der rRNA-Datenbank SILVA 138.1 zugewiesen [61]. Die Rohsequenzen der Taxa-Tabellen wurden zusammengefasst und hinsichtlich der Zusammensetzung normalisiert, sodass jede Probe 1 ergab. Die relativen Häufigkeiten auf Gattungsebene wurden wie unten beschrieben statistisch analysiert. Die Alpha-Diversitätsanalyse (Shannon, Simpson, Chao1) wurde unter Verwendung von phyloseq (Version 1.42.0) durchgeführt. Für die Beta-Diversitätsanalyse wurde die statistische Bewertung der Unähnlichkeitsmatrizen (Bray-Curtis) mittels der Funktion „adonis2“ im R-Paket „vegan“ (Version 2.6.4) durchgeführt und mittels der nicht-metrischen multidimensionalen Skalierung visuell dargestellt [62].

2.5 Statistische Auswertung

Die Mikrobiom-Daten wurden mittels einer Varianzanalyse und der MIXED Prozedur in SAS (Version 9.4; SAS Stat Inc., Cary, NC, USA) ausgewertet. Die beiden Zeitpunkte wurden als

wiederholte Messungen analysiert. Die festen Effekte im Modell waren Zeit, Behandlung (Ration) und deren Wechselwirkung. Die Versuchseinheit war der Bioreaktor innerhalb eines Durchgangs. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert der kleinsten Quadrate und Standardfehler dargestellt. Der paarweise Vergleich der Mittelwerte der kleinsten Quadrate wurde mithilfe der Turkey-Kramer-Korrektur durchgeführt. Ein signifikanter Unterschied wurde bei $p < 0,05$ und ein Trend bei $p < 0,10$ erklärt.

3 Ergebnisse

Eine Aussage zur Mikrobiomstruktur kann mittels Beta-Diversität getroffen werden. Um zu überprüfen, welche Faktoren einen Einfluss auf die Mikrobiomstruktur haben, wurde zusätzlich eine PERMANOVA (Permutationale Varianzanalyse) gerechnet und in Tabelle 6 dargestellt. Die Behandlung mit den unterschiedlichen Futterkomponenten hatte hier einen signifikanten Einfluss, während der Zeitpunkt der Fütterung und die Interaktion der beiden Faktoren keinen Effekt hatte.

Tabelle 6: Ergebnisse der permutationalen Varianzanalyse über die Unterschiede in den Bakteriengemeinschaften in der Fermenterflüssigkeit.

Source of variation	df	Sum of squares	R ²	F	P-value
Behandlung ¹	4	0.826	0.17	2.67	0.001
Zeitpunkt ²	1	0.039	0.01	0.51	0.853
Behandlung × Zeitpunkt	4	0.039	0.01	0.13	1.000
Residual	50	3.387	0.81		
Total	59	68.39	1.00		

¹Behandlungen: Kontrolle, 25 % gemahlener Roggen, 46 % gemahlener Roggen, 25 % gequetschter Roggen, 46 % gequetschter Roggen. ²Zeitpunkt: 4 und 8 Stunden nach Inkubation.

NMDS (non-metric multidimensional scaling) ist ein Distanz-basiertes Verfahren nach Bray und Curtis (1957), das visualisiert, wie stark sich die Mikrobiome unterscheiden (Abbildung 4).

Da der Zeitpunkt keinen Einfluss auf die Mikrobiom-Struktur zeigte, wurden in der Darstellung der Beta-Diversität mittels NMDS die beiden Zeitpunkte zusammengefasst. Der Abstand zwischen den Mikrobiomen, welche durch Punkte dargestellt werden, stellt die Unähnlichkeit (Dissimilarity) dar, während die Kreise die Standardabweichung innerhalb einer Behandlungsgruppe darstellen. Die Kontrollgruppe ohne Roggen (in grau dargestellt) und die Behandlung mit 46 % gemahlenem Roggen (in hellgrün) überlappen sich kaum, womit ein Unterschied zu erkennen ist. Zwischen den anderen Clustern ist kein signifikanter Unterschied zu sehen.

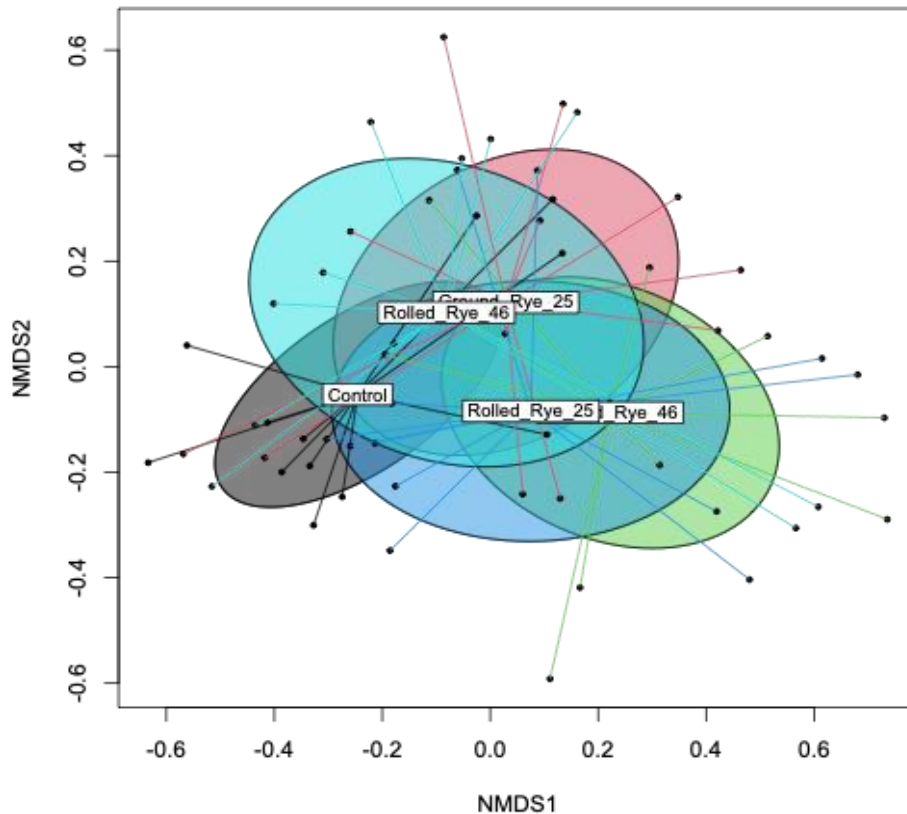


Abbildung 4: Beta-Diversität. Mikrobielle Gemeinschaft unter verschiedenen Behandlungen ($n = 5$): Kontrollgruppe (grau), 25 % gequetschter Roggen (blau), 46 % gequetschter Roggen (türkis), 25 % gemahlener Roggen (rosa), 46 % gemahlener Roggen (hellgrün).

Die Analyse der bakteriellen alpha-Diversität ist in Abbildung 5 dargestellt. Sie zeigt die α -Diversität in den 5 unterschiedlichen Futterzusammensetzungen. Im Artenreichtum lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den anderen Gruppen feststellen. Der Chao 1 Index zeigte beim gequetschten Roggen, dass nach 8 Stunden der Fermentation die Gruppe mit 25 % Roggen weniger Arten aufwies als bei der Gruppe mit 46 % Roggen. Zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit 46 % Roggen gab es jedoch keinen Unterschied.

Beim Shannon-Index sind keine nennenswerten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu sehen. Somit hatte Roggen in unserer Untersuchung weder einen positiven noch einen negativen Einfluss auf die Artenvielfalt.

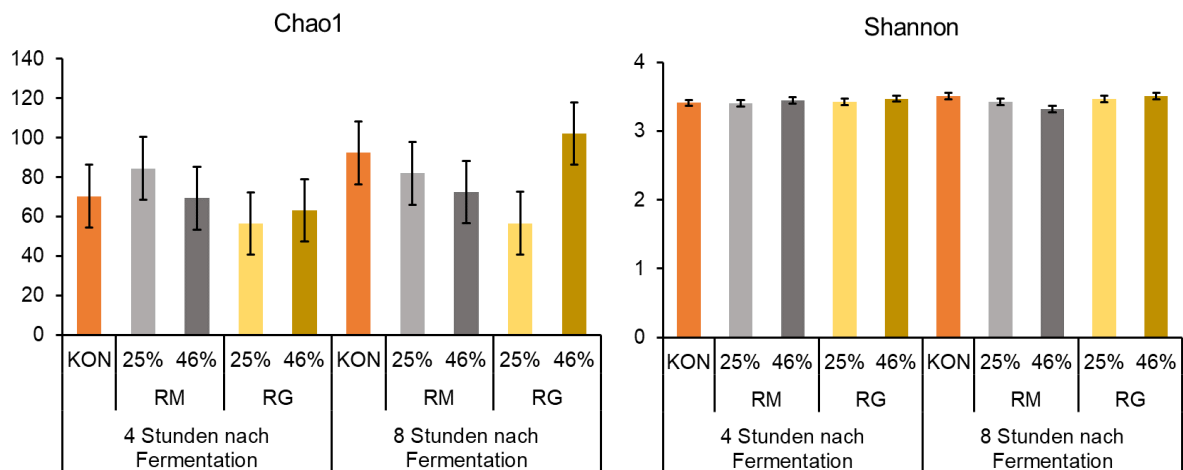


Abbildung 5: α -Diversität der unterschiedlichen Futterzusammensetzungen nach 4 und 8 Stunden nach der Fütterung mit den Diversitätsindices Chao 1 (A) und Shannon (B). KON=Kontrolle, RM=Roggen gemahlen, RG=Roggen gequetscht.

In dieser Studie wurden im Pansensaft 79 Gattungen aus 14 verschiedenen Stämmen identifiziert. Für die Übersichtlichkeit wurden die 27 am häufigsten vorkommenden Gattungen, die aus sieben Stämmen stammten und im Durchschnitt mehr als 0,3 % der Proben ausmachten, berücksichtigt. Die häufigsten Stämme waren Firmicutes (42 %) und Bacteroidota (40 %), gefolgt von Actinobacteriota (13 %) und Proteobacteria (3 %). In Tabelle 7 wurde der Einfluss verschiedener Behandlungen (KON, RM, RG) auf die Bakterien auf Phylumsebene nach 4 Stunden und 8 Stunden Fermentation analysiert.

Für die Variable Zeitpunkt zeigte sich, dass die Stämme Firmicutes ($p=0,004$) und Proteobacteria ($p=0,003$) nach 8 Stunden Fermentation signifikant häufiger auftraten als nach 4 Stunden. Dieses Ergebnis gilt auch für den Stamm Euryarchaeota, welcher jedoch nur einen Trend zeigte ($p=0,097$). Im Gegensatz dazu nahmen die Häufigkeiten der Stämme Bacteroidota ($p=0,008$), Spirochaetota ($p=0,0013$) und Elusimicrobiota ($p=0,07$) im Laufe der Zeit ab.

Hinsichtlich der Variable Behandlung zeigte sich bei Firmicutes ein Trend ($p=0,063$). Hier nahm die Häufigkeit bei 46% gemahlenem Roggen und 25% gequetschtem Roggen im Vergleich zu 25% gemahlenem Roggen und zur Kontrollgruppe zu. Unterschiede wurden auch bei den Stämmen Proteobacteria ($p=0,023$) und Spirochaetota ($p=0,088$) festgestellt. Bei beiden Stämmen nahm die Häufigkeit bei 46% gemahlenem Roggen sowie bei 25% und 46% gequetschtem Roggen im Vergleich zur Kontrollgruppe ab. Zudem war bei 46 % gemahlenem Roggen die Häufigkeit signifikant geringer als bei 25 % gemahlenem Roggen. Die Ergebnisse

für Elusimicrobiota zeigten einen Trend ($p=0,056$), wobei die Häufigkeit bei 46% gemahlener Roggen, 25 % und 46 % gequetschter Roggen im Vergleich zur Kontrollgruppe sank. Zusätzlich nahm die Häufigkeit bei 25 % und 46 % gequetschtem Roggen im Vergleich zu 25 % gemahlenem Roggen ab.

Schaut man sich die Interaktion der beiden Variablen an, erkennt man, dass der Effekt der Behandlung bei Bacteroidota zeitabhängig ist ($p=0,059$). Der Stamm war bei 8 Stunden nach Fermentation mit der Roggenration 25 % gemahlen häufiger vorhanden als in der Kontrollration ohne Roggen ($p=0,04$).

Die statistische Analyse zeigte für den Stamm Actinobacteriota weder für den Zeitpunkt noch die Behandlung signifikante Unterschiede. Die Interaktion der Beiden war ebenfalls nicht signifikant.

Tabelle 7: Einfluss des Futters und Zeitpunkt der Fütterung der unterschiedlichen Kombinationen nach 4 und 8 Stunden auf das Pansenmikrobiom auf Stammesebene.

Stamm	4 Stunden nach Fermentation					8 Stunden nach Fermentation					SEM	P-Wert		
	RM		RG			RM		RG				Behandlung	Zeitpunkt	*Zeitpunkt
	KON	25%	46%	25%	46%	KON	25%	46%	25%	46%				
Firmicutes	43,80 ^a	44,91 ^a	52,59 ^b	53,98 ^b	50,76	45,82 ^a	44,87 ^a	56,85 ^b	57,99 ^b	51,66	2,98	0,063	0,004	0,264
Bacteroidota	29,77	34,03	35,47	31,12	34,06	29,28 ^a	35,09 ^b	31,83	27,54	32,56	1,93	0,159	0,008	0,059
Actinobacteriota	8,60	7,98	7,54	7,16	8,64	7,39	6,59	7,24	7,38	8,65	1,13	0,884	0,108	0,418
Proteobacteria	10,82 ^a	6,96 ^{ac}	2,46 ^b	5,20 ^{bc}	4,47 ^{bc}	11,39 ^a	8,71 ^{ac}	2,90 ^b	5,71 ^{bc}	5,24 ^{bc}	1,58	0,023	0,003	0,420
Spirochaetota	4,67 ^a	4,01	1,39 ^b	1,60 ^b	1,19 ^b	3,98 ^a	2,82	0,16 ^b	0,66 ^b	0,90 ^b	1,00	0,088	0,001	0,716
Euryarchaeota	0,35	0,39	0,25	0,37	0,29	0,19	0,57	0,86	0,49	0,49	0,18	0,683	0,097	0,325
Elusimicrobiota	1,242 ^a	0,84	0,17 ^b	0,03 ^b	0,06 ^b	1,02 ^a	0,68	0,17 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,30	0,056	0,070	0,903

a, b, c (hochgestellt): Unterschiedliche Buchstaben innerhalb derselben Zeile weisen auf signifikante Unterschiede hin ($p<0,05$). KON=Kontrolle, RM=Roggen gemahlen, RG=Roggen gequetscht.

Die Auswirkungen der Behandlung und des Fütterungszeitpunkts auf Gattungsebene sind in Tabelle 8 dargestellt. Die am häufigsten vorkommende Gattung war *Prevotella-7* (Stamm: Bacteroidota), gefolgt von *Acetitomaculum* (Stamm: Firmicutes) und *Succinivibrionaceae* UCG-001 (Stamm: Proteobacteria).

Die Variable Zeitpunkt lässt erkennen, dass *Succiniclasticum* ($p<0,001$), *Streptococcus* ($p=0,005$), *Ligilactobacillus* ($p=0,029$) und *Succinivibrionaceae* UCG-001 ($p=0,001$) mit der Zeit signifikant anstiegen. *Methanobrevibacter* war nach 8 Stunden ebenfalls häufiger vorhanden, jedoch zeigte sich hier nur ein Trend ($p=0,096$). Die Gattungen *Pseudoramibacter*

($p < 0,001$), *Lactobacillus* ($p = 0,040$), *Rikenellaceae RC9-gut-group* ($p < 0,001$), *Olsenella* ($p = 0,021$) *Treponema* ($p = 0,006$) und *Elusimicrobium* ($p = 0,060$) sanken während der Zeit in Fermentation, wobei bei Letzterem nur einen Trend erkennbar war.

Die Behandlung mit Roggen führte bei der Gattung *Acetitomaculum* zu einem signifikanten Unterschied ($p = 0,006$), wobei die Häufigkeit bei allen Roggenrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe zunahm. Bei *Ligilactobacillus* zeigte sich ein Trend ($p = 0,081$), der darauf hinweist, dass der Gehalt bei 46 % gequetschtem Roggen im Vergleich zur Kontrollgruppe geringer war. Ein weiterer Trend zeigte sich bei *Prevotellaceae* UCG-004 ($p = 0,055$), wo die Häufigkeit bei 46 % gequetschtem Roggen im Vergleich zu 25 % gemahlenem Roggen abnahm. Auch bei der Gattung *Prevotellaceae* YAB2003-group war ein Trend ($p = 0,074$), mit einem Rückgang bei 25 % gemahlenem Roggen im Vergleich zur Kontrollgruppe, erkennbar. Die Behandlung zeigte bei *Succinivibrionaceae* UCG-001 einen signifikanten Einfluss ($p = 0,025$). Hier sank der Gehalt bei 46 % gemahlenem und gequetschtem Roggen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei der Gattung *Elusimicrobium* wurde ein Trend festgestellt ($p = 0,055$), bei dem die Häufigkeit bei 25 % und 46 % gequetschtem Roggen im Vergleich zur Kontrolle abnahm.

Für die Gattung *Succinoclasticum* wurde nach 8 Stunden Fermentation bei allen Roggenrationen ein Anstieg festgestellt ($p = 0,064$), was auf einen Trend zur Signifikanz bei der Interaktion von Zeitpunkt und Behandlung hinweist.

Tabelle 8: Einfluss des Futters und Zeitpunkt der Fütterung der unterschiedlichen Kombinationen nach 4 und 8 Stunden auf das Pansenmikrobiom auf Gattungsebene.

Stamm	Gattung	4 Stunden nach Fermentation					8 Stunden nach Fermentation					SEM	P-Wert		
		KON	RM		RG		KON	RM		RG			Behandlung	Zeitpunkt	Behandlung*
			25%	46%	25%	46%		25%	46%	25%	46%				
Firmicutes	Acetitomaculum	5,10 ^a	13,60 ^b	14,50 ^b	11,90	13,50 ^b	4,69 ^a	12,60 ^b	15,40 ^b	12,00	13,60 ^b	1,84	0,006	0,941	0,953
	Succiniclasticum	6,41	7,56	6,43	7,08	6,18	5,77 ^a	9,14 ^b	8,28 ^b	8,22 ^b	8,45 ^b	0,74	0,225	<0.001	0,064
	Shuttleworthia	9,18	3,75	5,88	6,23	10,77	9,46	3,68	5,58	6,61	8,23	2,68	0,532	0,504	0,623
	Limosilactobacillus	5,19	4,09	5,27	7,06	6,28	3,27	4,88	5,00	7,17	4,56	1,17	0,443	0,173	0,230
	Syntrophococcus	1,61	1,50	3,31	3,25	2,41	3,23	1,31	3,79	2,84	2,99	1,16	0,649	0,443	0,775
	Streptococcus	0,82	1,22	4,40	3,07	2,08	1,81	1,28	5,64	3,61	2,26	1,07	0,138	0,005	0,274
	Pseudoramibacter	2,26	2,66	3,25	3,23	2,82	1,28	2,04	2,79	2,82	2,32	0,52	0,464	<0.001	0,754
	Erysipelotrichaceae_UCG_002	1,86	1,55	1,27	3,61	1,59	1,75	2,10	1,75	2,75	1,47	0,87	0,577	0,964	0,464
	Lactobacillus	0,92	0,86	2,39	3,90	2,74	0,88	0,52	1,82	3,41	2,24	1,04	0,359	0,040	0,882
	Ligilactobacillus	3,93	0,66	2,04	1,10	0,25	4,40	1,18	2,45	2,31	1,21	0,96	0,081	0,029	0,900
	Acidaminococcus	1,57	2,08	0,94	1,48	1,33	2,50	1,35	1,07	1,20	1,46	0,60	0,759	0,871	0,269
	Eubacterium_nodatum_group	1,60	1,41	1,23	1,61	0,80	0,84	1,60	1,18	1,65	1,37	0,31	0,549	0,982	0,080
	Schwartzia	0,53	1,21	0,82	1,55	0,42	1,10	0,80	0,19	0,63	0,37	0,54	0,762	0,250	0,368
	Lachnospiraceae_NK3A20_group	1,29	0,04	0,17	0,25	0,00	0,80	1,32	0,49	0,78	0,49	0,57	0,673	0,226	0,630
	NK4A214_group	0,09	0,17	0,68	0,45	0,60	0,17	0,45	0,31	1,42	0,87	0,34	0,375	0,161	0,196
	Erysipelotrichaceae_UCG_006	0,51	0,45	0,27	0,31	0,53	0,52	0,50	0,21	0,52	0,81	0,23	0,769	0,132	0,466
Bacteroidota	Prevotella_7	16,88	23,37	23,61	17,48	22,33	18,91	24,16	23,05	16,82	22,33	2,83	0,287	0,640	0,697
	Prevotella	3,87	2,27	2,70	3,15	4,13	2,90	2,15	3,10	3,72	3,22	1,33	0,937	0,649	0,733
	Rikenellaceae_RC9_gut_group	1,73	1,64	2,76	2,75	1,82	1,45	1,34	1,51	1,44	1,53	0,85	0,976	<0.001	0,098
	Prevotellaceae_UCG_004	0,00	0,61	0,48	0,27	0,00	0,09	0,63	0,62	0,30	0,07	0,16	0,055	0,141	0,923
	Prevotellaceae_YAB2003_group	1,19	0,00	0,93	0,55	0,15	1,97	0,00	0,10	0,21	0,05	0,47	0,074	0,735	0,174
Actinobacteriota	Olsenella	6,71	8,55	6,02	5,98	7,22	4,97	7,03	5,71	5,66	6,90	1,22	0,632	0,021	0,480
	Pseudoscardovia	3,11	1,31	3,03	2,91	3,24	3,35	1,32	2,58	3,24	3,64	0,83	0,408	0,642	0,765
Proteobacteria	Succinivibrionaceae_UCG_001	13,10 ^a	9,04	3,03 ^b	6,34	5,27	14,10 ^a	11,11	3,57 ^b	6,85	6,48	1,97	0,025	0,001	0,442
Spirochaetota	Treponema	5,76	5,62	1,67	1,69	1,46	4,93	3,75	0,15	0,68	1,14	1,38	0,105	0,006	0,719
Euryarchaeota	Methanobrevibacter	0,39	0,53	0,29	0,44	0,34	0,23	0,76	1,04	0,57	0,60	0,23	0,608	0,096	0,372
Elusimicrobiota	Elusimicrobium	1,44	1,12	0,20	0,05	0,08	1,25	0,85	0,20	0,00	0,00	0,36	0,055	0,060	0,884

a, b (hochgestellt): Unterschiedliche Buchstaben innerhalb derselben Zeile weisen auf signifikante Unterschiede hin ($p < 0,05$). KON=Kontrolle, RM=Roggen gemahlen, RG=Roggen gequetscht.

4 Diskussion

Ernährungsstrategien in der Praxis zielen darauf ab, die Entwicklung des Vormagens bei Kälbern zu stimulieren [20]. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass eine intraruminale Butyratinfusion oder die Aufnahme von stärke- und zuckerreichem Futter, die die Pansenbutyratproduktion fördern, zu einer Beschleunigung der Entwicklung des Pansens und zu längeren Pansenpapillen führten [4, 20]. Auch wurde Butyrat bei Kälbern, die mehr Kälberstarter aufnahmen, in größeren Mengen produziert [1, 3], was darauf hindeutet, dass eine frühe Exposition gegenüber Starterfutter auch die Pansenfunktion verbessert [24]. Bisher wurde im Starterfutter vermehrt Getreide, wie Weizen, Gerste und Mais eingesetzt, während Roggen und spezifisch Hybrid-Roggen wenig verwendet wurden.

Die vorliegende Studie untersuchte die Auswirkungen unterschiedlicher Hybrid-Roggengehalte und Partikelgrößen auf das Pansenmikrobiom in einem in-vitro-Pansensimulationssystem (RUSITEC). Das Ergebnis der Beta-Diversitätsanalyse mittels Bray-Curtis zeigte, dass die Bakteriengemeinschaften von der Fütterung beeinflusst werden. Besonders zwischen der Kontrollgruppe ohne Roggen und der Behandlung mit 46 % gemahlenem Roggen wurde ein signifikanter Unterschied in der bakteriellen Zusammensetzung festgestellt. Der Unterschied zwischen den anderen Gruppen war aber nicht signifikant, was darauf hindeutet, dass hohe Anteile an gemahlenem Roggen die Struktur des Mikrobioms stärker verändern als moderate Anteile (25 %) oder gequetschter Roggen. Dies könnte auf die höhere Bioverfügbarkeit der Nährstoffe in gemahlenem Roggen durch die kleinere Partikelgröße zurückzuführen sein. Die PERMANOVA-Analyse bestätigte, dass der Roggenanteil in der Fütterung einen signifikanten Einfluss auf die mikrobielle Gemeinschaft hatte, während der Zeitpunkt der Fütterung keinen signifikanten Effekt zeigte. Dies bedeutet, dass die Veränderung der Mikrobiomstruktur weitgehend durch die Futterzusammensetzung bestimmt wurde. Weiters zeigten der Chao1- und Shannon-Index, dass die Verwendung von Roggen statt Weizen, keinen Einfluss auf die Artenvielfalt (α -Diversität) hatte, was ebenso bei Schweinen beobachtet wurde [35, 63]. Dass der Roggenanteil und die Partikelgröße zwar die Zusammensetzung, jedoch nicht die Diversität des Mikrobioms beeinflussen, deutet darauf hin, dass Roggen in der Fütterung genutzt werden kann, um gezielt bestimmte mikrobiologische Gruppen im Mikrobiom zu fördern, ohne die Gesamtvielfalt zu beeinträchtigen.

Die drei häufigsten Stämme des Pansenmikrobioms in dieser Arbeit waren Bacteroidota, Firmicutes und Actinobacteriota, was auch mit den Ergebnissen anderer Studien übereinstimmt [11, 57, 63, 64]. Besonders hervorzuheben ist der Anstieg der Butyratproduktion durch den höheren Roggengehalt. Butyrat wird durch die bakterielle Fermentation von Nicht-Stärke-Polysacchariden gebildet. Die Fettsäure spielt eine wesentliche Rolle bei der Energieversorgung der Epithelzellen im Darm, fördert die Barrierefunktion und wirkt entzündungshemmend [65]. Hauptproduzenten von Butyrat im Pansen sind vor allem Bakterien von Firmicutes [63]. Der zeitliche Anstieg des Stammes könnte darauf hindeuten, dass diese Bakterien durch verlängerte Fermentationszeiten gefördert werden. Der signifikante Rückgang von Bacteroidota und Spirochaetota im Verlauf der Fermentation könnte auf eine Konkurrenz um Nährstoffe oder ungünstige Bedingungen für deren Wachstum hinweisen. Es wurden auch Unterschiede bei den Proteobacteria festgestellt, deren Häufigkeit mit der Zeit signifikant anstieg, jedoch bei höheren Roggenanteilen abnahm. Diese Veränderungen könnten auf eine selektive Förderung bestimmter Bakteriengruppen hindeuten, die mit der Faserverdauung oder der Verfügbarkeit bestimmter Nährstoffe assoziiert sind. Proteobacteria werden häufig mit entzündlichen Prozessen im Darm in Verbindung gebracht [66]. Die Abnahme dieses Stammes könnte daher als potenziell positive Wirkung von Roggen auf die Darmgesundheit interpretiert werden. Proteobacteria sind zudem proteolytisch und verwenden Rohprotein als Nährstoffquelle [63]. Im Vergleich zu Weizen enthält Roggen weniger Protein [33], außerdem ist Roggen faserreich. Der Stamm Firmicutes enthält viele Arten, die die Zellwände von Pflanzen abbauen können (fibrolytisch) [63]. Bei der Behandlung mit Roggen, vor allem bei 46 % gemahlenem und 25% gequetschtem Roggen, wurde tendenziell ein Anstieg der Firmicutes festgestellt. Eine ähnliche Beobachtung wurde in einer anderen Studie mit Schweinen gemacht. Bei mit Roggen gefütterten Schweinen waren Firmicutes höher und Proteobacteria niedriger als bei Schweinen, die mit Weizen gefüttert wurden [63]. Der Stamm Bacteroidota war bei acht Stunden der Inkubation mit der Roggenration 25 % gemahlen häufiger vorhanden als in der Kontrollration ohne Roggen. Dieses Ergebnis weicht von der oben genannten Studie mit Schweinen ab, in der Bacteroidota bei unlöslichen Faserstoffen zunahm [63].

Auf Gattungsebene zeigen die Ergebnisse, dass *Succiniclasticum*, *Streptococcus*, *Ligilactobacillus* und *Succinivibrionaceae* UCG-001 mit der Zeit signifikant stiegen. Im Gegensatz dazu nahm die relative Abundanz von den Gattungen *Pseudoramibacter*, *Lactobacillus*, *Rikenellaceae* RC9-gut-group, *Olsenella* und *Treponema* mit der Zeit ab. Eine

Abnahme der Gattungen über die Zeit könnte darauf hindeuten, dass sich die Bedingungen im Pansen mit dem Roggengehalt ändern, wie zum Beispiel eine Verschiebung der metabolischen Endprodukte durch veränderte Substratverfügbarkeit oder eine Konkurrenz mit anderen Bakterien, die besser an die Fermentation von Roggenbestandteilen angepasst sind. Bei der Behandlung mit Roggen war besonders *Acetitomaculum* in allen Roggenrationen häufiger vertreten. *Acetitomaculum* ist eine Gattung, die vor allem Acetat produziert. *Succiniclasticum* zeigte nach acht Stunden der Fermentation in allen Roggenrationen einen tendenziellen Anstieg, was auf seine Fähigkeit hindeutet, Succinat, ein Zwischenprodukt der Fermentation, weiter zu Propionat zu verarbeiten. Dies könnte zu einer besseren Effizienz der Energiegewinnung aus der Nahrung führen und somit eine verbesserte Nutzung von Succinat ermöglichen. Andererseits könnte diese Aktivität auch mit einer verminderten Butyratproduktion in Konkurrenz stehen [67]. Bei *Succinivibrionaceae* UCG-001 sank der Gehalt bei 46 % gemahlenem und gequetschtem Roggen im Vergleich zur Kontrollgruppe, was möglicherweise auf eine Verschiebung des Fermentationsspektrums von stärke- zu faserabbauenden Mikroorganismen hinweist, da *Succinivibrionaceae* UCG-001 bei höherem Gehalt an nicht faserigen Kohlenhydraten zunimmt [64, 68]. Da diese Gattung eng mit der Produktion von Succinat verbunden ist [64], könnte auch die verstärkte Vermehrung von Succinat-verwertenden Bakterien wie *Succiniclasticum* ihren Rückgang erklären. *Succinivibrionaceae* UCG-001 dürfte auch zur Propionatproduktion beigetragen haben [69], weil etwa 40 % des Pansenpropionats aus der Succinatmetabolisierung kommen [70]. Andere Gattungen wie *Ligilactobacillus*, *Prevotellaceae* oder *Elusimicrobium* zeigten lediglich Trends zur Reduktion, die auf eine mögliche Beeinflussung durch Roggen hinweisen könnten. *Prevotella* kann neben Hemicellulose auch Stärke, Zucker und Proteine abbauen. Diese breite Substratnutzung ermöglicht es, stabil in verschiedenen Fütterungsszenarien präsent zu bleiben, auch wenn die Hemicelluloseverfügbarkeit schwankt [71, 72]. Butyrat wird von *Prevotella* in Konzentrat-reicher Nahrung produziert [69].

Zu erkennen ist, dass sich in dieser Untersuchung die relative Häufigkeit mancher Bakterien signifikant änderte. Eine Umstellung des Futters scheint, laut Kumar et al. (2015) jedoch wenig Einfluss auf die Häufigkeit von methanogenen Archaeen zu haben [73]. Dieses Ergebnis wurde auch in dieser Arbeit beobachtet. Die Ration hatte keinen signifikanten Einfluss und der Zeitpunkt wies auch nur einen Trend zur Signifikanz auf. *Methanobrevibacter* ist die am häufigsten vorkommende Gattung innerhalb der Archaeen im Verdauungstrakt von Pflanzenfressern [74]. Die Methanbildner befinden sich sowohl in der Pansenflüssigkeit,

angeheftet an Partikel oder am Pansenepithel des Wirts [75]. An dieser Stelle muss jedoch erwähnt werden, dass die Bestimmung der Archaeen über das 16S rRNA Gen nicht alle Gattungen umfasst.

Ein wesentlicher Aspekt bei der Bewertung der Ergebnisse ist daher die Berücksichtigung der Limitationen des RUSITEC-Systems. Im Pansen zeigen sich Unterschiede in den mikrobiellen Gemeinschaftsprofilen der verschiedenen Darmregionen, wobei zwischen Mukosa (Bakterien, die mit dem Pansenepithel verbunden sind) und Lumen (freilebende oder an Partikel anhaftende Bakterien in der Flüssigkeit) differenziert wird [14, 76, 77, 78]. Als in-vitro-Modell kann das RUSITEC-System die physiologischen Bedingungen eines lebenden Pansens nicht vollständig widerspiegeln, da vor allem die Pansenwand fehlt. Dadurch sind hier mukosaassoziierte Bakterienarten, darunter auch einige Buttersäureproduzenten nicht gewachsen. Auch die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf in-vivo-Bedingungen bleibt unklar, vor allem aufgrund der unterschiedlichen mikrobiellen Gemeinschaften in verschiedenen Darmregionen, die im RUSITEC-System nicht vollständig abgebildet werden. Für zukünftige Untersuchungen wäre es sinnvoll, in-vivo-Studien mit Kälbern durchzuführen, um die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf reale Bedingungen zu überprüfen. Besonders der Einfluss von Roggen auf die Butyratproduktion sollte weiter untersucht werden. Auch die Auswirkungen von Roggen auf die Pansenentwicklung sind von Interesse. Für die vorliegende Diplomarbeit wurden ausschließlich die Mikrobiomdaten herangezogen. Für ein umfassenderes Bild ist es aber wichtig, weitere Ergebnisse der Studie, wie SCFA-Konzentration, die Methanproduktion oder den pH-Wert zu betrachten. Bei kulturabhängigen Methoden wird die tatsächliche mikrobielle Vielfalt im Pansen unterschätzt, da nur ein Bruchteil der Mikroorganismen kultivierbar ist [14]. Es kann zu Veränderungen in der mikrobiellen Gemeinschaft kommen, die nicht genau der in-vivo-Situation entsprechen und so auch den Vergleich zwischen adulten Milchkühen und Kälbern erschweren [14]. Auch durch das Fehlen von Kälbern als Wirt werden wichtige Wechselwirkungen zwischen Mikrobiom und Wirt nicht erfasst, was besonders für die Beurteilung von Tiergesundheit und Leistung wichtig ist. Weiters verliefen die Experimente im RUSITEC-System über einen kurzen Zeitraum, womit Langzeiteffekte schwer zu untersuchen sind. Darüber hinaus unterscheiden sich die standardisierten und kontrollierten Bedingungen des RUSITEC-Systems von den schwankenden Umweltbedingungen im Pansen lebender Tiere, was die Übertragbarkeit der Ergebnisse einschränkt. Um die Auswirkungen von Hybrid-Roggen auf die Butyratproduktion und die Pansenentwicklung bei Kälbern umfassend zu untersuchen, sind daher weiterführende Untersuchungen, besonders in-vivo-Studien mit

Kälbern, notwendig. Der Einfluss einer roggenbasierten Gesamtmischung auf die Pansen- und Darmentwicklung unter realitätsnahen Bedingungen ist dabei von besonderem Interesse.

5 Conclusio

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Futterzusammensetzung, besonders der Roggenanteil, die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft signifikant beeinflusst hat. Die Ergebnisse zeigen, dass Roggen, vor allem in gemahlener Form und bei höheren Konzentrationen, die Zusammensetzung des Mikrobioms signifikant verändert, ohne die mikrobielle Diversität zu beeinträchtigen. Dies könnte sich positiv auf die Pansengesundheit und eine effektivere Nährstoffnutzung auswirken.

Die Hypothese, dass der Roggen den Anteil an butyratbildenden und faserabbauenden Bakterien im Pansensimulationssystem erhöht, konnte bestätigt werden. Eine genauere Untersuchung der einzelnen Bakterien, vor allem der Firmicutes und deren Vertreter wäre für zukünftige Studien von Bedeutung, um die beobachteten Effekte weiter zu überprüfen. Um die Auswirkungen der mikrobiellen Verschiebungen auf die Tiergesundheit und -leistung besser zu verstehen, sind weitere Untersuchungen unter realitätsnahen Bedingungen erforderlich, vor allem in-vivo-Studien mit Kälbern.

6 Literaturverzeichnis

- 1) Warner RG, Flatt WP, Loosli JK. Ruminant Nutrition, Dietary Factors Influencing Development of Ruminant Stomach. J. Agric. Food Chem. 1956; 4(9):788–792. doi: 10.1021/jf60067a003
- 2) Davis CL, Drackley JK. The Development, Nutrition, and Management of the Young Calf. 1. Auflage. Ames: Iowa State University Press; 1998
- 3) Tamate H, McGilliard AD, Jacobson NL, Getty R. Effect of Various Dietaries on the Anatomical Development of the Stomach in the Calf. Journal of Dairy Science. 1962; 45(3):408–20. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(62)89406-5
- 4) Connor EE, Baldwin RL, Li C, Li RW, Chung H. Gene expression in bovine rumen epithelium during weaning identifies molecular regulators of rumen development and growth. Functional & integrative genomics. 2013; 13(1):133–42. doi: 10.1007/s10142-012-0308-x
- 5) Alderton S. Weaning: Get it right to avoid calf disruption [Internet]. 2011 [zitiert: 23. August 2024]. Verfügbar unter: <https://www.fwi.co.uk/livestock/weaning-get-it-right-to-avoid-calf-disruption>
- 6) Heinrichs J, Jones CM. Photos of Rumen Development [Internet]. Aktualisierte Version. 2022 [zitiert: 23. August 2024]. Verfügbar unter: <https://extension.psu.edu/photos-of-rumen-development>
- 7) Zitnan R, Voigt J, Schönhusen U, Wegner J, Kokardová M, Hagemeister H et al. Influence of dietary concentrate to forage ratio on the development of rumen mucosa in calves. Archiv für Tierernährung. 1998; 51(4):279–91. doi:10.1080/17450399809381926
- 8) Schwarz, FJ. Rinderfütterung. In: Kirchgeßner, M (Hrsg.). Tierernährung. 12. Auflage. Frankfurt am Main: DLG-Verlag; 2008; 351-499
- 9) Trautinger, LS. Effects of inclusion levels of dried grape pomace in high-quality hay based diets on rumen fermentation characteristics studied using RUSITEC. Diplomarbeit; 2021
- 10) Weimer PJ. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: implications for engineering improved ruminal fermentations. Frontiers in microbiology. 2015; 6:296. doi: 10.3389/fmicb.2015.00296
- 11) Wirth R, Kádár G, Kakuk B, Maróti G, Bagi Z, Szilágyi Á et al. The Planktonic Core Microbiome and Core Functions in the Cattle Rumen by Next Generation Sequencing. Frontiers in microbiology. 2018; 9:2285. doi: 10.3389/fmicb.2018.02285

- 12) Kong Y, Teather R, Forster R. Composition, spatial distribution, and diversity of the bacterial communities in the rumen of cows fed different forages. *FEMS microbiology ecology*. 2010; 74(3):612–22. doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.00977.x
- 13) Firkins JL. Maximizing microbial protein synthesis in the rumen. *The Journal of nutrition*. 1996; 126(4 Suppl):1347S-54S. doi: 10.1093/jn/126.suppl_4.1347S.
- 14) Brade W, Distl O. Das ruminale Mikrobiom des Rindes (Teil 1). [Berichte über Landwirtschaft - Zeitschrift für Agrarpolitik und Landwirtschaft, Band 93, Heft 3] 2015. doi: 10.12767/buel.v93i3.66
- 15) Brade W. Das Rind: ein klassischer Holobiont [Berichte über Landwirtschaft - Zeitschrift für Agrarpolitik und Landwirtschaft, Band 99, Heft 1] 2021. doi: 10.12767/buel.v99i1.287
- 16) Henderson G, Cox F, Ganesh S, Jonker A, Young W, Janssen PH. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific reports*. 2015; 5:14567. doi: 10.1038/srep14567
- 17) Zangana A. Charakterisierung der mikrobiellen Flora des Pansenepithels beim Rind in Abhängigkeit von unterschiedlicher Fütterung. Masterarbeit; 2012
- 18) Castillo-González AR, Burrola-Barraza ME, Domínguez-Viveros J, Chávez-Martínez A. Rumen microorganisms and fermentation. *Arch. med. vet.* 2014; 46(3):349–61. doi: 10.4067/S0301-732X2014000300003
- 19) Kansagara YK, Savsani HH, Chavda MR, Chavda JA, Belim SY, Makwana KR et al. Rumen Microbiota and Nutrient Metabolism: A Review. *BKAP*. 2022; (Of). doi: 10.18805/BKAP486
- 20) Heinrichs J. Rumen Development in the Dairy Calf. *Advances in Dairy Technology*. 2005; 17: 179
- 21) Quigley J. Calf Note #27 – How Calf Starter Intake Drives Rumen Development [Internet]. 1997 [zitiert 15. November 2024]. Verfügbar unter: <https://calfnotes.com/en/1997/10/15/calf-note-27-how-calf-starter-intake-drives-rumen-development/>
- 22) Penner GB, Steele MA, Aschenbach JR, McBride BW. Ruminant Nutrition Symposium: Molecular adaptation of ruminal epithelia to highly fermentable diets. *Journal of animal science*. 2011; 89(4):1108–19. doi: 10.2527/jas.2010-3378
- 23) Baldwin RL, McLeod KR. Effects of diet forage:concentrate ratio and metabolizable energy intake on isolated rumen epithelial cell metabolism in vitro. *Journal of animal science*. 2000; 78(3):771–83. doi: 10.2527/2000.783771x

- 24) Khan MA, Weary DM, Keyserlingk MAG von. Invited review: effects of milk ration on solid feed intake, weaning, and performance in dairy heifers. *Journal of Dairy Science*. 2011; 94(3):1071–81. doi: 10.3168/jds.2010-3733
- 25) Suarez-Mena FX, Heinrichs AJ, Jones CM, Hill TM, Quigley JD. Straw particle size in calf starters: Effects on digestive system development and rumen fermentation. *Journal of Dairy Science*. 2016; 99(1):341–53. doi: 10.3168/jds.2015-9884
- 26) Khan MA, Lee HJ, Lee WS, Kim HS, Kim SB, Park SB et al. Starch source evaluation in calf starter: II. Ruminal parameters, rumen development, nutrient digestibilities, and nitrogen utilization in Holstein calves. *Journal of Dairy Science*. 2008; 91(3):1140–9. doi: 10.3168/jds.2007-0337
- 27) McGavin MD, Morrill JL. Scanning electron microscopy of ruminal papillae in calves fed various amounts and forms of roughage. *American journal of veterinary research*. 1976; 37(5):497–508
- 28) Quigley J. Calf Note #27 – How Calf Starter Intake Drives Rumen Development [Internet]. 2000 [zitiert 05. Dezember 2024]. Verfügbar unter: <https://calfnotes.com/en/2000/06/03/calf-note-63-what-is-rumen-abrasive-value/>
- 29) Zebeli Q, Tafaj M, Steingass H, Metzler B, Drochner W. Effects of physically effective fiber on digestive processes and milk fat content in early lactating dairy cows fed total mixed rations. *Journal of Dairy Science*. 2006; 89(2):651–68. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72129-4
- 30) Nozière P, Ortigues-Marty I, Loncke C, Sauvant D. Carbohydrate quantitative digestion and absorption in ruminants: from feed starch and fibre to nutrients available for tissues. *Animal*. 2010; 4(7):1057–74. doi: 10.1017/S1751731110000844
- 31) Huntington GB. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. *Journal of animal science*. 1997; 75(3):852–67. doi: 10.2527/1997.753852x
- 32) Kaur P, Singh Sandhu K, Singh Purewal S, Kaur M, Kumar Singh S. Rye: A wonder crop with industrially important macromolecules and health benefits. *Food research international (Ottawa)*. 2021; 150(Pt A):110769. doi: 10.1016/j.foodres.2021.110769
- 33) Rodehutsord M, Rückert C, Maurer HP, Schenkel H, Schipprack W, Bach Knudsen KE et al. Variation in chemical composition and physical characteristics of cereal grains from different genotypes. *Archives of animal nutrition*. 2016; 70(2):87–107. doi: 10.1080/1745039X.2015.1133111

- 34) Hilgers J, Hühn U. Gute Gründe für Roggen im Trog [Internet]. 2019 [zitiert 22. August 2024]. Verfügbar unter:
<https://www.bauernzeitung.de/agrarpraxis/tierhaltung/futter/roggen-im-trog/>
- 35) Hankel J, Chuppava B, Wilke V, Hartung CB, Muthukumarasamy U, Strowig T et al. High Dietary Intake of Rye Affects Porcine Gut Microbiota in a Salmonella Typhimurium Infection Study. *Plants (Basel)*. 2022; 11(17). doi: 10.3390/plants11172232
- 36) KWS LOCHOW. Mehr Tierwohl durch PollenPLUS-Hybridroggen. Roggen in der Schweinefütterung [Internet]. 2022 [zitiert 07. August 2024]. Verfügbar unter:
https://mediamaster.kws.com/01_Products/DE_Deutschland/Cereals/Mediathek/F%C3%BCtterungsbrosch%C3%BCre.pdf
- 37) Ingerslev AK, Theil PK, Hedemann MS, Lærke HN, Bach Knudsen KE. Resistant starch and arabinoxylan augment SCFA absorption, but affect postprandial glucose and insulin responses differently. *The British journal of nutrition*. 2014; 111(9):1564–76. doi: 10.1017/S0007114513004066
- 38) Nielsen TS, Lærke HN, Theil PK, Sørensen JF, Saarinen M, Forssten S et al. Diets high in resistant starch and arabinoxylan modulate digestion processes and SCFA pool size in the large intestine and faecal microbial composition in pigs. *The British journal of nutrition*. 2014; 112(11):1837–49. doi: 10.1017/S000711451400302X
- 39) Meyer A, von Gagern W, Schwarz T, Pieszka M, Łopuszańska-Rusek M, Kamyczek M, Heuer CH. Roggen in der Schweine- und Rinderfütterung [Internet]. [zitiert 22. August 2024]. Verfügbar unter:
https://www.topagrar.com/dl/2/7/5/8/5/7/0/KWS_Fuetterungsbroschuere_Roggen.pdf
- 40) Greenwood RH, Morrill JL, Titgemeyer EC, Kennedy GA. A new method of measuring diet abrasion and its effect on the development of the forestomach. *Journal of Dairy Science*. 1997; 80(10):2534–41. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(97)76207-6
- 41) Allen MS. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *Journal of Dairy Science*. 1997; 80(7):1447–62. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(97)76074-0
- 42) Anderson MJ, Khoyloo M, Walters JL. Effect of Feeding Whole Cottonseed on Intake, Body Weight, and Reticulorumen Development of Young Holstein Calves. *Journal of Dairy Science*. 1982; 65(5):764–72. doi: 10.3168/JDS.S0022-0302(82)82265-0
- 43) Tafaj M, Steingass H, Susenbeth A, Lang GU, Drochner W. Einfluss der Partikellänge von heu auf Verdauungsvorgänge und Futteraufnahme bei Wiederkäuern bei Variation von Kraftfutter- und Fütterungsniveau. 1. Mitteilung: Kauaktivität und Fermentation im

- Pansen. Archiv für Tierernährung. 1999; 52(2):167–84. doi: 10.1080/17450399909386160
- 44) Owens FN, Secrist DS, Hill WJ, Gill DR. Acidosis in cattle: a review. *Journal of animal science*. 1998; 76(1):275–86. doi: 10.2527/1998.761275x
 - 45) Stone WC. Nutritional Approaches to Minimize Subacute Ruminant Acidosis and Laminitis in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*. 2004; 87:E13-E26. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)70057-0
 - 46) Khafipour E, Li S, Plaizier JC, Krause DO. Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. *Applied and environmental microbiology*. 2009; 75(22):7115–24. doi: 10.1128/aem.00739-09
 - 47) Fernando SC, Purvis HT, Najjar FZ, Sukharnikov LO, Krehbiel CR, Nagaraja TG et al. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Applied and environmental microbiology*. 2010; 76(22):7482–90. doi: 10.1128/AEM.00388-10
 - 48) Humer E, Petri RM, Aschenbach JR, Bradford BJ, Penner GB, Tafaj M et al. Invited review: Practical feeding management recommendations to mitigate the risk of subacute ruminal acidosis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 2018; 101(2):872–88. doi: 10.3168/jds.2017-13191
 - 49) Tiefenthaller F. Bearbeitungsverfahren von Kraftfutter für Rinder. 41. Viehwirtschaftliche Fachtagung. 2014; 23-30
 - 50) Tafaj M, Zebeli Q, Baes C, Steingass H, Drochner W. A meta-analysis examining effects of particle size of total mixed rations on intake, rumen digestion and milk production in high-yielding dairy cows in early lactation. *Animal Feed Science and Technology*. 2007; 138(2):137–61. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2007.06.020
 - 51) Krause KM, Oetzel GR. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Animal Feed Science and Technology*. 2006; 126(3-4):215–36. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2005.08.004
 - 52) Carter RR, Allen OB, Grovum WL. The effect of feeding frequency and meal size on amounts of total and parotid saliva secreted by sheep. *The British journal of nutrition*. 1990; 63(2):305–18. doi: 10.1079/BJN19900117
 - 53) Noci B. Auswirkungen verschiedener Futterrationen auf das Wachstum und die Pansenentwicklung von Kälbern. Dissertation; 2009
 - 54) Deckardt K, Khol-Parisini A, Zebeli Q. Peculiarities of enhancing resistant starch in ruminants using chemical methods: opportunities and challenges. *Nutrients*. 2013; 5(6):1970–88. doi: 10.3390/nu5061970

- 55) Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*. 2016; 7(3):189–200. doi: 10.1080/19490976.2015.1134082
- 56) Czerkawski JW, Breckenridge G. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *The British journal of nutrition*. 1977; 38(3):371–84. doi: 10.1079/bjn19770102
- 57) Wetzels SU, Eger M, Burmester M, Kreienbrock L, Abdulmawjood A, Pinior B et al. The application of rumen simulation technique (RUSITEC) for studying dynamics of the bacterial community and metabolome in rumen fluid and the effects of a challenge with *Clostridium perfringens*. *PLoS One*. 2018; 13(2):e0192256. doi: 10.1371/journal.pone.0192256
- 58) AG Gastrointestinale Physiologie. [Internet]. [zitiert 10. September 2024]. Verfügbar unter: <https://www.tiho-hannover.de/kliniken-institute/institute/institut-fuer-physiologie-und-zellbiologie/ag-gastrointestinale-physiologie/>
- 59) Klevenhusen F, Deckardt K, Sizmaz O, Wimmer S, Muro-Reyes A, Khiaosa-ard R, Chizzola R, Zebeli Q. Effects of black seed oil and *Ferula elaeochytris* supplementation on ruminal fermentation as tested *in vitro* with the rumen simulation technique (Rusitec). *Animal Production Science*. 2014; 55(6) 736-744. doi: 10.1071/AN13332.
- 60) Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*. 2016; 13(7):581–3. doi: 10.1038/nmeth.3869
- 61) Oksanen J, Simpson GL, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR et al. Vegan: community ecology package [Internet]. Version 2.6-2. 2022 [zitiert am 07.03.25]. Verfügbar unter: https://www.researchgate.net/publication/360782912_vegan_community_ecology_package_version_26-2_April_2022
- 62) Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*. 2013; 41(Database issue):D590-6. doi: 10.1093/nar/gks1219
- 63) Ellner C. Effects of dietary rye and rapeseed on growth performance, nutrient digestibility, digesta characteristics and the intestinal microbiome of weaner piglets. Dissertation; 2022
- 64) Hartinger T, Pacífico C, Sener-Aydemir A, Poier G, Kreuzer-Redmer S, Terler G et al. Dietary carbohydrate sources differently prime the microbial ecosystem but not the

- epithelial gene expression profile along the complete gut of young calves. *Animal microbiome*. 2024; 6(1):12. doi: 10.1186/s42523-024-00297-5
- 65) Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental microbiology*. 2017; 19(1):29–41. doi: 10.1111/1462-2920.13589
- 66) Shin N-R, Whon TW, Bae J-W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in biotechnology*. 2015; 33(9):496–503. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.06.011
- 67) Van Gylswyk NO. *Succiniclasticum ruminis* gen. nov., sp. nov., a ruminal bacterium converting succinate to propionate as the sole energy-yielding mechanism. *International journal of systematic bacteriology*. 1995; 45(2):297–300. doi: 10.1099/00207713-45-2-297
- 68) Gruninger RJ, Ribeiro GO, Cameron A, McAllister TA. Invited review: Application of meta-omics to understand the dynamic nature of the rumen microbiome and how it responds to diet in ruminants. *Animal*. 2019; 13(9):1843–54. doi: 10.1017/S1751731119000752
- 69) Vargas JE, López-Ferreras L, Andrés S, Mateos I, Horst EH, López S. Differential Diet and pH Effects on Ruminal Microbiota, Fermentation Pattern and Fatty Acid Hydrogenation in RUSITEC Continuous Cultures. *Fermentation*. 2023; 9(4):320. doi: 10.3390/fermentation9040320
- 70) Blackburn TH, Hungate RE. Succinic acid turnover and propionate production in the bovine rumen. *Applied Microbiology*. 1963; 11(2):132–5. doi: 10.1128/am.11.2.132-135.1963
- 71) Huws SA, Edwards JE, Creevey CJ, Rees Stevens P, Lin W, Girdwood SE et al. Temporal dynamics of the metabolically active rumen bacteria colonizing fresh perennial ryegrass. *FEMS microbiology ecology*. 2016; 92(1). doi: 10.1093/femsec/fiv137
- 72) Liu J, Zhang M, Xue C, Zhu W, Mao S. Characterization and comparison of the temporal dynamics of ruminal bacterial microbiota colonizing rice straw and alfalfa hay within ruminants. *Journal of Dairy Science*. 2016; 99(12):9668–81. doi: 10.3168/jds.2016-11398
- 73) Kumar S, Indugu N, Vecchiarelli B, Pitta DW. Associative patterns among anaerobic fungi, methanogenic archaea, and bacterial communities in response to changes in diet and age in the rumen of dairy cows. *Frontiers in microbiology*. 2015; 6:781. doi: 10.3389/fmicb.2015.00781
- 74) Brade W, Distl O. Das ruminale Mikrobiom des Rindes (Teil 2). [Berichte über Landwirtschaft - Zeitschrift für Agrarpolitik und Landwirtschaft, Band 93, Heft 3] 2015. doi: 10.12767/buel.v93i3.67

- 75) Oeztuerk H, Emre B, Breves G. Effects of hydrolysed yeasts on ruminal fermentation in the rumen simulation technique (Rusitec). *Vet. Med.* 2016; 61(4):195–203. doi: 10.17221/8820-VETMED
- 76) Amin N, Seifert J. Dynamic progression of the calf's microbiome and its influence on host health. *Computational and structural biotechnology journal.* 2021; 19:989–1001. doi: 10.1016/j.csbj.2021.01.035
- 77) De Mulder T, Goossens K, Peiren N, Vandaele L, Haegeman A, De Tender C et al. Exploring the methanogen and bacterial communities of rumen environments: solid adherent, fluid and epimural. *FEMS microbiology ecology.* 2017; 93(3). doi: 10.1093/femsec/fiw251
- 78) Ricci S, Pacífico C, Castillo-Lopez E, Rivera-Chacon R, Schwartz-Zimmermann HE, Reisinger N et al. Progressive microbial adaptation of the bovine rumen and hindgut in response to a step-wise increase in dietary starch and the influence of phytogenic supplementation. *Frontiers in microbiology.* 2022; 13:920427. doi: 10.3389/fmicb.2022.920427