

Abschlussbericht

Ergebnisse des Vorhabens

Zahlungsempfänger: Justus-Liebig-Universität, Institut für Tierzucht und Haustiergenetik (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Sven König)	Förderkennzeichen: 2817ERA04D
Vorhabenbezeichnung: „Entwicklung eines wirtschaftlich tragfähigen Freilauf-Tierhaltungs- Systems (FT-System) zur Erhöhung des Tierwohls, der Tiergesundheit und Dungqualität un- ter Berücksichtigung gesellschaftlicher Akzeptanz“ („Develop economic sound free walk far- ming systems elevating animal welfare, health and manure quality, while being appreciated by society“) - FREEWALK	
Laufzeit des Vorhabens: 05.07.2017 - 31.01.2021	
Berichtszeitraum: 05.07.2017 - 31.01.2021	

Im Projekt tätig und aus Projektmittel finanzierte Personen:

- Dr. Kerstin Brügemann, Postdoktorandin im Forschungsvorhaben seit 01.09.2017 bis 30.11.2019
- Patricia Wagner, Doktorandin im Forschungsvorhaben seit 01.12.2019 bis 31.01.2021

Im Projekt tätig, aber nicht aus Projektmitteln finanzierte Personen:

- Prof. Dr. Sven König, Professor für Tierzucht
- Dr. Petra Engel, wiss.-techn. Mitarbeiterin (Unterstützung bei Betriebsbesuchen)
- Dr. Christina Weimann, Postdoktorandin (Etablierung von Labormethoden)
- Jonas Herold, Doktorand (Milchprobennahme)
- Heike Wagner, Anja Scheuermann, Zhaoxin Wang (Laborpersonal)
- Jonas Carle, BSc-Student (Abschlussarbeit)
- Deike Harms, MSc-Studentin (Abschlussarbeit)
- Anna-Lena Seibert, BSc-Studentin (Abschlussarbeit)
- Kathrin Bley, BSc-Studentin (Abschlussarbeit)
- Hendrik Willms, MSc-Student (Abschlussarbeit)
- Larissa Kugler, MSc-Studentin (Abschlussarbeit)
- Yeasmin Yahan, MSc-Studentin (Abschlussarbeit)

1. Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen des BMEL

Forschung im Bereich von Kompostierställen deckt mehrere förderpolitische Ziele des BMEL ab. Zukunftsfähig sind diese Betriebe vor allem dadurch, dass sie den gesellschaftlichen Wunsch nach mehr Tierwohl erfüllen. Den Kühen steht ein Vielfaches an komfortabler Liegefläche zur Verfügung, was auch zum Funktionieren des Systems erforderlich ist. Die Arbeitsschritte zur Pflege des Liegebereichs sind maschinell und mit weniger Zeitaufwand durchführbar und machen das Bewirtschaften für den Berufsnachwuchs attraktiv. Nicht nur Tier und Mensch profitieren von diesem innovativen Haltungssystem, es wird auch ein Beitrag zur Verbesserung des Humusgehaltes und des Wasserhaltevermögens der bewirtschafteten Ackerflächen geleistet. Dies ist von den teilnehmenden Betrieben besonders in den letzten Jahren beobachtet worden, wie eine Befragung der Betriebe im Rahmen der Betriebsbesuche durch die jeweiligen Projektpartner für eine Studie der niederländischen Partner (WUR) gezeigt hat. Gezielte Forschungsfragen zum Ackerbau sind in diesem EU-Projekt mit Schwerpunkt Tierhaltung jedoch nicht untersucht worden. Stattdessen wurden neben konkreten, auf Tierbeobachtungen und Messungen im Stall gestützte Auswertungen zu Leistungen, Gesundheit und Verhalten der Kühe, auch Themen zu Verbraucherakzeptanz, Vermarktungswegen und ökonomischer Bewertung bearbeitet. Kompostierställe schneiden im Vergleich zu konventionellen Liegeboxenlaufställen in vielen Punkten gleich gut und sogar besser ab, wie Befragungen von Verbrauchern, Landwirten und Experten in den

einzelnen Ländern (Auswertung durch Partner TUM (München) und NIBIO (Norwegen)) zeigen. In einer Erhebung der norwegischen Projektpartner (NIBIO) wurden in Zusammenarbeit mit Beratern durch die Projektpartner höhere Stallbaukosten (durch mehr Platzbedarf) ermittelt, die sich von Land zu Land aufgrund der unterschiedlichen Genehmigungsrichtlinien wiederum stark unterscheiden. Diese werden jedoch zum Beispiel durch geringere Arbeitskosten und wo es möglich ist, durch Einsparung von Lagerkapazitäten kompensiert, wenn der wertvolle Dünger im Anschluss an die Kompostierungsperiode (Dauer: 1/2 bis 1 Jahr) direkt auf dem Feld ausgebracht werden kann. Bezüglich der verwendeten Einstreumaterialien besteht weiter Forschungsbedarf, auch wenn die generelle Eignung einer Vielzahl an stroh- und holzbasierten Materialien durch physikalische und chemische Untersuchungen in einer Studie der italienischen Projektpartner (UniFi) belegt werden konnte. Dennoch sind einige Fragen zur optimalen Bearbeitung, Belüftung und zum Nachstreuen noch ungeklärt. Vor allem deren Zusammenspiel mit mikrobieller Aktivität, die einerseits bei der Kompostierung und andererseits - zumindest ein gewisses Erregerspektrum - auch beispielsweise bei Mastitiserkrankungen eine Rolle spielt. Die eigenen Untersuchungen im Arbeitspaket 3.5 haben einen Zusammenhang zum Einstreuklima ergeben, was für Beratungszwecke durchaus interessant sein kann. Ob jedoch die (hygienische) Beschaffenheit des Rohmaterials oder andere Faktoren wie Vormelkroutine oder bereits das Vorhandensein bestimmter Pathogene im Bestand von größerer Bedeutung für ein mögliches Infektionsgeschehen sind, ist durch weitere Untersuchungen zu klären. Die Anzahl der bakteriell positiven Euterviertel war in deutschen Kompostierungsbetrieben geringer als in Liegeboxenbetrieben (detailliertere Darstellungen dazu im Ergebnisteil). In Kompostierungsbetrieben finden zudem teils intensivere Reaktionen des Immunsystems statt, wie einzelne Zellfraktionen in der Milch zeigen. Genomweite Assoziationsstudien geben erste Hinweise darauf, dass in den zwei unterschiedlichen Haltungssystemen verschiedene Gene an der Abwehr bestimmter Erreger (-kategorien) beteiligt sind. Die Untersuchung spezieller Gesundheitsparameter aus der Milchleistungsprüfung sowie Verschmutzungen der Kühe (Partner SLU) zeigen, dass noch Verbesserungspotential besteht und vor allem noch Erfahrungswerte fehlen zur optimalen Bewirtschaftung dieses noch jungen Haltungssystems, um ein rundum funktionierendes Verfahren zu erreichen. Hier sollte honoriert werden, welchen Beitrag Landwirte zur Bodenfruchtbarkeit und langfristigen Nährstoff- und Wasserverfügbarkeit liefern. Zudem wurden von den schwedischen Partnern (SLU) auch deutliche Vorteile bei der Langlebigkeit und artgemäßem Verhalten sowie eine Verminderung von Lahmheiten und Verletzungen festgestellt. Kompostierungsställe bieten demnach eine moderne, tierfreundliche, ressourcenschonende und nachhaltige Alternative zu den bisherigen Liegeboxen- oder Tiefstreu-aufstallungen für die Erzeugung sicherer Milchprodukte.

2. Darstellung und Erläuterung zu:

2.1. wissenschaftlich-technischen Ergebnissen, erreichten Nebenergebnissen und gesammelten wesentlichen Erfahrungen

2.1.1. Methodik

Gesamtüberblick zu Datenerhebungen im Rahmen der sechs Betriebsbesuche:

AP1: Für die Auswahl der Projektbetriebe gab es Vorgaben, die das Projektkonsortium zu Beginn in einem Dokument (Meilenstein M1.1) festgehalten hat. Als Versuchsbetrieb war ganz eindeutig ein Betrieb mit freier Liegefläche und kompostierbarem Einstreumaterial definiert. Ein Referenzbetrieb zu jedem Versuchsbetrieb sollte über eine allgemein übliche Liegeboxenlaufstallhaltung verfügen, in derselben Region liegen und Ähnlichkeiten in Bezug auf Größe, Landschaft, Wirtschaftsweise, Melksystem, Rasse und Leistungsniveau aufweisen. Über vorhandene Infrastrukturen von Arbeitskreisen des Innovationsteams Hessen und Ansprechpartner bei den Zuchtverbänden in Hessen und Nordrhein-Westfalen wurden Betriebe identifiziert, die die gestellten Anforderungen weitgehend erfüllten. Eine Herausforderung stellten im gesamten Projektzeitraum drei der sechs deutschen Kompostierungsbetriebe (plus 1 Mutterkuhbetrieb) dar, die ihre Milchkühe in beiden Systemen unterbringen. Dass die Frischlaktierenden im Kompostierungsbereich gehalten werden, war sowohl für den Systemvergleich hinsichtlich der Zelldifferenzierung (eigenes Arbeitspaket AP3.5), als auch für Arbeitspakete der europäischen Projektpartner (z.B. Tiergesundheit und -verhalten im AP3.1 des schwedischen Partners SLU) von Vorteil, da nach der Kalbung kein Systemwechsel stattgefunden hatte. Auf der anderen Seite sind Betriebe mit einem

Mix aus beiden Systemen in der Praxis häufig anzutreffen, da bei An- und Neubau auch Altgebäude weiterhin genutzt werden. Wie viele Betriebe die einzelnen Partner für das Projekt ausgewählt haben, zeigt Tabelle 1. Dies ist Teil der Vereinbarungen, zu welchen Konditionen die jeweiligen Partner am Projekt teilnehmen (Vorhabenbeschreibung, Meilenstein M1.2).

Tabelle 1: Anzahl der teilnehmenden Kompostierungsbetriebe je Projektpartner

Land / Partnerorganisation	Milchviehbetriebe	Mutterkuhbetriebe	davon NPK-Betriebe
Die Niederlande / WUR	5		1
Deutschland / Uni-GI	6	1	1
Italien / UniFi	4		1
Slowenien / UL	1	1	
Österreich/ HBLFA	3		1
Schweden / SLU	1		
Norwegen / NIBIO	- 1)		
Slowakei / NPPC	-		
Insgesamt	20	2	4

¹⁾ Norwegen betreut Betriebe in Österreich

Aktivitätslisten legten fest, welche Arbeitsschritte während der sechs Betriebsbesuche einzuhalten waren. Jeder Projektpartner konnte Aktivitäten ergänzen, die zur Bearbeitung der eigenen AP nötig waren. Dies umfasste Messungen, Probennahmen, Tierbeobachtungen, Aushändigen / Einsammeln von Listen und Befragungen. Als Zuarbeit zu Arbeitspaketen der Projektpartner bzw. den eigenen (AP3.5 und Beiträge zu AP5) fanden folgende weitere Erhebungen von Daten im Zuge der sechs Betriebsbesuche und mittels telefonischer/Online-Befragungen statt:

AP2: Ein Hauptbestandteil der Betriebsbesuche waren Messungen des Stallklimas (Luft-/Einstreutemperatur, Luft-/Einstreufeuchtigkeit, Windgeschwindigkeit und Lichtintensität für verschiedene Höhen / Standorte), Aufzeichnungen zu Stallmaßen, Einsammeln von Listen (Einstreu, Abgänge, Mastitis) und Sammeln von Einstreuproben für Partner UniFi.

AP3: 1) MLP-Daten, Kalbungen, Abgänge und Gesundheitsdaten wurden vom nationalen Rechenzentrum VIT in Verden sowie den jeweiligen Landeskontrollverbänden angefordert und gemäß den vorgegebenen Formatierungen aufbereitet (für Partner SLU). 3) Antibiotika-Verbräuche wurden zusammengestellt und Bestandstierärzte zu ihrer Einschätzung der beiden Systeme befragt (für WUR und SLU). 4) Für die Tierwohl-Erhebung durch Partner SLU wurden im Winter 2017/2018 und Sommer 2018 zwei Betriebstouren organisiert. 5) Zur Beurteilung der Milchqualität wurden zum einen in deutschen Projektbetrieben Viertelgemelksproben für Zelldifferenzierung (Labor der Uni-GI) und bakteriologische Untersuchungen (Landeslabor LHL, Gießen) gezogen. An 11 Terminen wurden dazu sechs Betriebe während der Melkzeit besucht, direkt im Anschluss wurden die Proben in den Laboren analysiert. Mastitisbakterien und (extrem) thermophile (X)TAS-Bakterien in Tankmilch und Einstreu wurden als Auftragsarbeit für alle Projektpartner aus eingefrorenen Proben von bis zu drei verschiedenen Terminen analysiert und ausgewertet.

AP4: Vom 03.03.18 bis 09.03.19 fanden zum Teil an zusätzlichen Besuchsterminen im Betrieb DEC6 Messungen für die NPC-Studie des Partners WUR statt, bei denen Porosität und Einstreutiefe erfasst wurden. Außerdem wurden die vorgegebenen Input- und Outputmengen an Futter, Einstreu, Milch und Dung für die komplette Kompostierungsperiode dokumentiert und für NPC-Analysen entsprechende Proben gezogen.

AP5: Während des letzten Betriebsbesuchs fand neben Befragungen zum Management (NIBIO), zu Einstreu- und Düngeverfahren (WUR) und Tierwohl (SLU) auch eine Befragung zu züchterischen Schwerpunkten beim Einsatz von Besamungsbullen in den Betrieben statt (Uni-GI).

AP6: Mit der Unterstützung von Beratern des LLH, Innovationsteams Hessen und m. H. von Literaturwerten wurden Baukosten für Referenz- und Kompostierungsbetriebe kalkuliert. Diese sollen, wie auch Ergebnisse aus Befragungen deutscher Landwirte + Experten, für die Multikriterienanalyse von Partner NIBIO genutzt werden.

Tabelle 2: Betriebscharakteristika der 14 deutschen Projektbetriebe

FARM CODE	Case farms							Reference farms - cubicles						
	DE1C	DE2C	DE3C	DE4C	DE5C	DE6C	DE7CBauer	DE1R	DE2R	DE3R	DE4R	DE5R	DE6R	DE7R
Country DEUTSCHLAND	DE, NRW	DE, NRW	DE, Hessen	DE, Hessen	DE, Hessen	DE, Sachsen	DE, Hessen	DE, NRW	DE, NRW	DE, Hessen	DE, Hessen	DE, Hessen	DE, Hessen	DE, Hessen
						NPC farm								
cows 2017 expected	125	80	265 (85 on compost)	670 (500 on compost)	186 (36 on compost)	90	28	110	70	116	270	153	127	15
young stock 2016	80	60	167.3	700	110	38 + 10 calves	20 + 77 *	30+60 (>6 months in external farm)	100	80	270	143	125	15 + 40 *
total ha in 2016	45	50	240	665	190 (2 farms)	68	50	76	75	163	251	200	108	135
ha grass	10	14	120	220	68	21	44	24	45	45	69	100	60	25
ha maize	25	30	70	270	34	16.5	2	31	27	38	100	23	25	?
ha other	10	6	50	175	88	30.5	4	21	3	80	82	77	23	most olericulture
organic or not	conventional	conventional	conventional	conventional	conventional	conventional	conventional	conventional	conventional	conventional	conventional	conventional	conventional	conventional
FTE	2	1.3	5	28	4.7	2		2.2	3	3.5	6.5	1.5	2	
landscape	flat	flat	flat	grassland flat, cropland hilly	flat-hilly	hilly	slightly inclined	flat	flat	inclined	inclined	flat	hilly	flat
soil type	sand	poor sand	clay	luvisol, sand and clay	60 % Sand, 40% stony basalt soil	sandy clay	sandy clay	sand with little clay	sand	sandy clay	sandy clay	sand with little clay	clay	
grazing days / year	-	210	-	-	-	-	210	120	-	180				210
grazing hours / day	-	5	-	-	-	-	24	6-7	-	2				
milking system	2x10 side-by-side GEA	1 robot (Lely)	2 x 12 fishbone	28 rotary	2x12 fishbone	1 AMS (Happel) with 2 units		2x8 fishbone (Fullwood)	1 robot Lely A4	2x7 fishbone (GM)	2x10 fishbone (DeLaval)	fishbone	AMS (Boumatic)	
avg concentrates/cow 2016	2190	2920	2700	3285	2254	2500		2190	2190	2847	3000	2471	1095	
cubicle lying stalls	-	-	163	345	134	-		83	60	128	240	149	109	
material in lying stall	-	-	straw	straw	compost	-		horse dung, straw meal on rubber mat	deep box with sep. manure + straw pellets	straw	green waste+chopped straw+chalk	straw		
no feed places	70	78	120	410	42 (compost)	100	35	88	60	72	170	116	112	
cows / feedplace	1.2	1	2.1	1.4	0.9	1.1	0.9	1.3	1.2	1.6	1.2	1.3	1.1	
breed	HF (black + red), Simmental crosses	HF (black + red)	DH	HF (American + dutch genetics)	FV (red Hol. crosses)	black HF, Jersey crosses	crosses	HF (black + red)	HF (black + red)		HF black + red (a few crosses)	black and red HF, 5 Jersey	HF red	FV
m2 per cow (indicative)	9.7	9.7	7.5 - 9	10-Nov	9.5	10.9	8							
production level per cow in 2016	9000	9600	11300	10825	9940	8400		9800	11000	10200	12719	9600	9500	
fat%	4.2	4.2	3,75 - 4,2*	3.69	4.24	4.2		4.06	3.9	4	3.86	4.1	4.27	
protein%	3.5	3.7	3,28 - 3,6*	3.37	3.56	3.5		3.33	3.3	3.48	3.46	3.36	3.46	
kg F+P	687	759	794- 881*	764	775	647		724	759	762.96	931.0308	716.16	734.35	
Housing in use	Aug-14	2013	Sep-13	Dec-17	Jul-14	May-14	Aug-06	1999, 2010	1982	1997, 2007	2004	2003	1980, 2005, 2012	
bedding material	wood shavings and cereal husks	wood shavings and cereal husks	grain by-prod., wood shavings, saw dust	wood chips and cereal husks	saw dust + spelts	green waste, wood chips, spelt husks								
barn	16 dry cows + 115 lactating	12 dry cows + 68 lactating	dry cows and high yielding	dry cows and high yielding	dry cows and high yielding	all								
comments			*(changed from 3 to 2 milkings)				* bought in add.							* bought in add

Die wichtigsten Eigenschaften und Kennzahlen zur Charakterisierung der deutschen Betriebe sind in Tabelle 2 zusammengestellt (M1.3, M2.4).

Probennahmen und Laboranalysen für Zelldifferenzierungen in Viertelgemelken und bakteriologische Untersuchungen in Milch und Einstreu (AP3.5):

In drei Kompostierungsbetrieben und drei Vergleichsbetrieben fand während des Melkvorgangs die Beprobung der Euterviertel von Erst- und Zweitlaktierenden statt. Die Proben für die Zelldifferenzierung wurden im Anschluss an die Probennahmen im Zeitraum zwischen 15.10.18 und 08.04.19 an den restlichen vier Tagen der jeweiligen Beprobungswoche aufbereitet und durch wissenschaftliches und Laborpersonal getrennt nach Leukozyten, Makrophagen und Lymphozyten ausgezählt. Die Ergebnisse der bakteriologischen Analysen auf Euterviertelbasis der dafür zusätzlich gezogenen Proben waren meist Ende der Woche im Landeslabor verfügbar und konnten dann den Projektbetrieben für tierärztliche Behandlungen bereitgestellt werden.

Die Milchprobenahme berücksichtigte 2198 Euterviertel von 537 verschiedenen Holstein-Milchkühen. 44% aller Proben stammten aus Kompostierungsbetrieben und 56% aus Liegeboxenbetrieben. 61 % der Proben wurden von Kühen in der ersten Laktation und 39 % von Kühen in der zweiten Laktation genommen. Kranke Kühe, die mit Antibiotika behandelt waren, wurden von allen Analysen ausgeschlossen. Vor dem Melken wurden die Zitzen mit 70%igem Ethanol desinfiziert und die ersten fünf Strahlen Milch verworfen. 10 mL Milch pro Euterviertel wurden gemäß den DVG-Richtlinien (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, 2000) entnommen und anschließend im Labor des Landesbetriebs Hessen auf spezifische Mastitiserreger und Gesamtzellzahl untersucht. Isolate spezifischer Mastitiserreger wurden in Hauptpathogene (MAJOR) eingeteilt, einschließlich *Aerococcus* sp., *Aesculin*-hydrolysierende Streptokokken, *Candida krusei*, *Enterococcus* sp., *Escherichia Coli*, *Lactococcus* sp, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, Schimmelpilze und *Proteus* sp. sowie kleinere Erreger (MINOR) einschließlich *Coagulase*-negativer Staphylokokken und *Corynebacterium* sp. eingeteilt. Zusätzlich wurden die folgenden Erreger einzeln analysiert: *Koagulase*-negative Staphylokokken (KNS), *Corynebacterium* sp. (COR), *Aesculin*-hydrolysierende Streptokokken (AESC), *Aerobe Bazillen* (AER). Eine Eutervierteldiagnose von mindestens einem Erreger innerhalb der definierten Gruppen MAJOR und MINOR implizierte den Score 1 für die jeweilige Gesamtgruppe, ansonsten wurde der Score 0 vergeben. Auch für die Einzelerregeranalysen für KNS, COR, AESC und AER wurden die Scores 1 (Erreger nachgewiesen) und 0 (kein Erreger nachgewiesen) verwendet. Für die laufenden Analysen lagen bakteriologische Nachweise aus 2145 Eutervierteln vor.

Die Zelldifferenzierung wurde im Labor des Instituts für Tierzucht und Tiergenetik der Universität Gießen durchgeführt. Dazu wurden 50 mL Milch pro Euterviertel in mit Bronopol konservierten Kunststoffröhrchen nach dem Protokoll von Sarikaya et al. (2005) entnommen. Die Pigmentierung der Zellen im Labor zur mikroskopischen Auszählung erfolgte nach Pappenheim (1912). Die Zellzählung berücksichtigte Lymphozyten (LYM), Makrophagen (MAC) und polymorphkernige Leukozyten (PMN). Letztere wurden nach ihrem Reifestadium unterschieden in die reifen segmentkernigen (sN) und die unreifen stabkernigen Neutrophilen (bN). Die Gesamtzahl, die alle Zellfraktionen umfasst, wurde auf 100% festgelegt. Die Fraktionen für LYM, MAC, PMN, sN und bN innerhalb der Euterviertel wurden als Prozentsätze in den laufenden Analysen berücksichtigt, die 2053 Euterviertel mit mindestens 30 gezählten Zellen umfassten. Die deskriptive Statistik für alle Eutergesundheitsmerkmale ist in Tabelle 3 aufgeführt.

273 Holstein-Kühe wurden im Labor des Veterinärmedizinischen Instituts (Zentrum für Molekulare Diagnostik), Georg-August-Universität Göttingen mit dem Illumina BovineSNP50 Bead Chip V3 genotypisiert. Zusätzlich wurden Genotypen aus dem Illumina BovineSNP50 Bead Chip V2 für 277 Kühe von der Vereinigten Informationssysteme Tierhaltung w.V. (VIT) zur Verfügung gestellt. Nach der Qualitätskontrolle in PLINK (Purcell & Chang, 2019) verblieben 550 Kühe und 43.095 SNP für die genomweite Assoziationsstudie (GWAS). Potenzielle Kandidatengene wurden unter Verwendung der aktuellen Genannotationen, beispielsweise aus der NCBI-Datenbank, (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) annotiert (M3.5).

Tabelle 3: Deskriptive Statistik für Zellfraktionen und Mastitispathogene in den Eutervierteln

	Merkmal	Mittelwert	Min.	Max.	Std.
Zellfraktion (% Zellzahl)	MAC	0,292	0,000	0,980	0,208
	LYM	0,608	0,000	1,000	0,246
	PMN	0,100	0,000	0,971	0,143
	bN	0,005	0,000	0,130	0,013
	sN	0,095	0,000	0,951	0,140
Mastitispathogen (Prävalenz)	Negative Probe	0,514	0,000	1,000	0,500
	KNS	0,274	0,000	1,000	0,446
	COR	0,183	0,000	1,000	0,387
	AER	0,035	0,000	1,000	0,184
	AESC	0,015	0,000	1,000	0,122
	MINOR	0,407	0,000	1,000	0,491
	MAJOR	0,030	0,000	1,000	0,171

Proben von Einstreumaterial und Tankmilch zur Bestimmung (extrem) hitzeliebender, sporenbildender (X)TAS- und Mastitisbakterien auf Stallebene wurden in allen europäischen Projektbetrieben im gesamten Projektzeitraum gesammelt und durch Uni-GI ausgewertet. Tankmilch- und Einstreuproben zum Nachweis von Mastitiserregern wurden durch das Landeslabor in Gießen analysiert. Zum Nachweis von X(TAS)-Bakterien im institutseigenen Labor wurden aus allen Betrieben einmalig Tankmilchproben und außerdem Proben von frischem Einstreumaterial sowie im 2./3. Monat nach Beginn und 2./3. Monat vor Ende der Kompostierungsperiode entnommen. Die Probenentnahmen erfolgten in den Jahren 2017-2019. Die genauen Daten variieren jedoch, da einige Betriebe die Einstreu nur einmal jährlich erneuern, während andere Betriebe die Einstreu zweimal pro Jahr oder sogar kontinuierlich in monatlichen Abständen (teilweise) ersetzen.

Tabelle 4: Koloniebildende Einheiten (log Kbe) von extrem thermophilen aeroben Sporenbildnern (XTAS)

XTAS in frischem und kompostiertem Material:				Ø pro Land (ohne Mutterkuhbetriebe):			
Betrieb	frisch	Beginn	Ende	Land	frisch	Beginn	Ende
1	5,13	4,10	0,00	Deutschland	2,45	3,77	2,23
2	4,46	4,10	3,24				
3	5,10	5,13	3,07				
4	0,00	5,57	3,41				
5	0,00	0,00	0,00				
6	0,00	3,70	3,65				
7	4,00	9,30	4,18				
				ohne Mutterkuhbetrieb			
8	4,31	3,74	2,96	Die Niederlande	2,29	4,32	3,59
9	0,00	-	3,54				
10	0,00	4,65	3,74				
11	3,44	5,07	3,56				
12	3,70	3,81	4,16				
13	-	-	2,00				
				Schweden	-	-	2,00
14	0,00	0,00	0,00	Österreich	0,58	2,10	1,92
15	1,74	3,51	3,19				
16	0,00	2,80	2,56				
17	0,00	0,00	1,00				
18	2,00	1,40	-	Italien	1,16	1,02	0,77
19	2,65	2,66	0,00				
20	0,00	0,00	1,30				
				Slowenien	0,00	2,00	0,00
21	0,00	2,00	0,00				
22	3,00	0,00	2,00	ohne Mutterkuhbetrieb			

Die Isolierung von thermophilen Bakterien aus dem Einstreumaterial, die Einfluss auf die Haltbarkeit von Milchprodukten haben, wurde in mehreren Schritten durchgeführt. Basierend auf der Methode von Drihuis et al. (2015) wurden von jedem der Komposttypen 20 g Kompost zu 180 ml sterilem „Aqua Bide“ gegeben und 1 Stunde lang homogenisiert. Eine Menge von 5 ml wurde aus dem Gemisch jeder Probe entnommen und bei 100 °C für 36 min in einem Wasserbad gekocht, um lediglich thermophile aerobe Sporenbildner zu isolieren (TAS). Nach dem Abkühlen auf

Raumtemperatur wurde die Probe für eine serielle Verdünnung in Chlorid-Pepton-Lösung (Pan-Reac AppliChem) genutzt. Zu diesem Zweck wurden 500 µl des Probenextrakts zu 4,5 ml einer 6,44 mM Chlorid-Pepton-Lösung gegeben, bis zur fünffachen seriellen Verdünnung (Drihuis et al., 2015). Danach wurde 1 ml der Probe aus jeder Verdünnungsreihe auf eine 94 mm Agarplatte (Carl Roth GmbH, Deutschland) plattiert, die 20-25 ml 2,7 %iges Dextrose Tryptone Agar-Medium (DTA - Oxoid LTD, England) enthielt, und für 48 h bei 55 °C im Brutschrank (Heracus, Deutschland) inkubiert. Zur Kontrolle wurde ein ungeimpftes Medium mit inkubiert. Die Berechnung der KbE/g erfolgte mittels folgender Formel:

$$\text{KbE/g} = \text{Log} (\Sigma c / (1 \times n_1 + 0,1 \times n_2 + \dots \times n_{\dots}) \times d)$$

Σc ... Summe aller ausgezählten Kolonien
 n₁, n₂, n... ... Zahl der Platten der jeweiligen Verdünnungsstufe
 d ... Verdünnungsstufe der ausgezählten Platte

Der Unterschied bei der Ermittlung der KbE/g von XTAS-Bakterien bestand darin, dass 5 ml jeder Probe für 28 min bei 115 °C in einem Ölbad gekocht wurden und die Platten anschließend für 96 h bei 55 °C inkubiert wurden. Die in Tabelle 4 am Beispiel der XTAS dargestellten Werte wurden später zu Temperatur und Feuchtigkeit der Einstreu, die während des jeweiligen Besuchstermins im Stall gemessen wurden (an 9 verschiedenen Spots), in Beziehung gesetzt.

Befragung zu Zuchtzielen der Projektbetriebe zur Ableitung systemspezifischer Gewichtungsfaktoren mittels Contingent Valuation-Methode:

Die Contingent Valuation (CV)-Methode ist eine anerkannte Methode zur Bewertung von Gütern und Leistungen im Tierzuchtbereich (Edel & Dempfle, 2004), die oft zur Ableitung von ökonomischen Gewichtungsfaktoren für Merkmale genutzt wird, deren Wert schwer zu erfassen ist. Die Gewichtung einzelner Zuchtzielmerkmale im Gesamtzuchtziel basiert zwar auf ökonomischen Kalkulationen und Schätzungen genetischer und phänotypischer Beziehungen zwischen diesen Merkmalen. Die einzelnen Zuchtziele in den europäischen Mitgliedstaaten unterscheiden sich jedoch stark aufgrund der verschiedenen Preisgefüge und Marktanforderungen, die mit Hilfe der CV-Methode für den Systemvergleich ausgeblendet werden sollen. Fiktive 1000 € mussten dazu von den 40 befragten Landwirten für die vorgeschlagenen zehn Einzelmerkmale entsprechend ihrer relativen Bedeutung vergeben werden. Die deskriptive Statistik für die Ergebnisse dieser Befragung enthält Tabelle 5.

Tabelle 5: Deskriptive Statistik zu den länderübergreifenden Gewichtungen (in €)

Zuchtzielmerkmal	N	Mittelwert	Std	Minimum	Maximum
Milchmenge	37	176,23	115,64	0	600
Milchinhaltstoffe	37	153,62	109,67	0	400
Eutergesundheit	37	124,38	69,34	0	300
Langlebigkeit	37	126,43	124,12	0	500
Fruchtbarkeit	37	103,35	68,13	0	250
Leichtkalbigkeit	37	39,75	48,02	0	150
Klauengesundheit	37	93,85	80,50	0	300
Stoffwechselstabilität	37	33,51	36,34	0	100
Futterverwertung	37	37,85	45,99	0	200
Exterieur	37	111,02	83,36	0	300

In den Fragebögen (M5.4) zusätzlich erfasste Informationen zu Zuchtinteressen, Herdenkennzahlen und sozioökonomischen Aspekten dienten zur Untersuchung von Einflussfaktoren auf die Gewichtungen.

2.1.2. Statistik

Systemvergleich für Zellfraktionen und Mastitisbakterien aus Viertelgemelken:

Lineare gemischte Modelle wurden angewendet, um den Effekt des Haltungssystems (CBPB versus CCB) auf die verschiedenen Zellfraktionen MAC, LYM, PMN, sN und bN abzuleiten. Im Zusammenhang mit dem Vergleich der Haltungssysteme wurde besonderes Augenmerk auf die

Interaktionen mit dem Milchleistungsniveau und mit der allgemeinen Eutergesundheit der Kuh, für die als Indikator üblicherweise die Gesamtzellzahl (SCC) genutzt wird, gelegt. Analog dazu wurden für die Analysen des binär codierten Auftretens von Mastitiserregern (MAJOR, MINOR, KNS, COR, AESC, AER) verallgemeinerte lineare, gemischte Modelle mit einer Logit-Link-Funktion verwendet. Für alle statistischen Analysen wurde das lme4-Paket R, Version 3.6.2, verwendet (Bates et al., 2015). Dieses Paket wurde auch zur Berechnung der Mittelwerte der kleinsten Quadrate für die verschiedenen Ebenen der Effekte verwendet. Details zur statistischen Modelldefinition: Berücksichtigung der fixen Effekte Laktationsnummer (1 oder 2), Laktationsstadium (0-100 Tage, 101-200 Tage, 201-300 oder >300 Tage nach dem Abkalben), Haltungssystem (CBPB oder CCB), Zählperson im Labor, Interaktion zwischen System und Milchleistungsklassen (≤ 25 kg, 25,1-30 kg, 30,1-35 kg, 35,1-40 kg, > 40 kg) bzw. Interaktion zwischen System und SCC-Klassen (≤ 13000 , 13000-25000, 26000-50000, 51000-100000, 101000-200000, > 200000). Für die Trennung des Systemeffekts von den übrigen Effekten des Betriebsmanagements wurde ein hierarchisches Design in Betracht gezogen, was bedeutet, dass der Systemeffekt innerhalb des Herdentesttageffekts genestet wurde. Ein weiterer fixer Effekt war das individuelle Euterviertel. Aufgrund der wiederholten Messungen innerhalb der Kuh (512 Kühe) wurde der Kuheffekt als zufällig behandelt.

Für die Analysen der binär codierten Mastitiserreger (MAJOR, MINOR, KNS, COR, AESC, AER) wurden die gleichen festen und zufälligen Effekte berücksichtigt, wie sie für das lineare gemischte Modell definiert wurden. Der einzige Unterschied ist die Berücksichtigung einer Logit-Linkfunktion im verallgemeinerten linearen gemischten Modell, was den Ausschluss eines zufälligen Fehlerterms bedeutet.

GWAS mit Interaktion zwischen dem System-Effekt und SNP-Effekten:

Die Methode zum Nachweis von Genotyp-Umwelt-Interaktionen auf Genomebene wurde im Rahmen dieses Projektes neu entwickelt und wird daher etwas detaillierter beschrieben:

1. Algorithmus in GCTA (Genome-wide Complex Trait Analysis):

a) Analyse der genotypisierten Tiere mit dem unten angegebenen Modell:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\mathbf{b} + \mathbf{Z}\mathbf{g} + \mathbf{e} \quad [1]$$

Dabei ist \mathbf{y} der Beobachtungsvektor; \mathbf{b} der Vektor der fixen Effekte; \mathbf{g} der Vektor der genetischen Effekte, der $N(0, \mathbf{K}\sigma_g^2)$ folgt, wobei \mathbf{K} die Verwandtschaftsmatrix nach Yang et al. (2014) (in GCTA) oder VanRaden, 2008 (in den meisten anderen Softwarepaketen) ist und σ_g^2 die genetische Varianz; und \mathbf{e} ist der Vektor der Resteffekte und folgt $N(0, \mathbf{I}\sigma_e^2)$, mit der Einheitsmatrix \mathbf{I} (Dimension ist die Anzahl der Tiere mit Geno- und Phänotypen) und σ_e^2 ist die Restvarianz. \mathbf{X} und \mathbf{Z} sind Inzidenzmatrizen. Da \mathbf{y} keine wiederholten Beobachtungen hat und nur Tiere mit Geno- und Phänotyp gleichzeitig in die GWAS einfließen, ist $\mathbf{Z} = \mathbf{I}$. Dann ist $E(\mathbf{y}) = \mathbf{X}\mathbf{b}$ und $\text{var}(\mathbf{y}) = \mathbf{Z}\mathbf{K}\sigma_g^2\mathbf{Z}' + \mathbf{I}\sigma_e^2 = \mathbf{K}\sigma_g^2 + \mathbf{I}\sigma_e^2$.

Unterschiedliche Verwandtschaftsmatrizen:

1) standardmäßig ist $K_{jk} = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \frac{(x_{ij}-2p_i)(x_{kj}-2p_i)}{2p_i(1-p_i)}$, um die Verwandtschaft zwischen Tier j und k zu berechnen mit m , der Gesamtzahl an SNP nach der Qualitätskontrolle; p_i ist die Allelfrequenz des i -ten Markers in der typisierten Population (Yang et al., 2010)

2) Nach VanRaden (2008) ist $\mathbf{K} = \frac{\mathbf{W}\mathbf{W}'}{\sum_{i=1}^m 2p_i(1-p_i)}$, wobei $\mathbf{W} = \mathbf{M} - 2\mathbf{P}$ mit \mathbf{M} = Genotypen der Tiere (codiert als 0, 1 oder 2); \mathbf{P} = Matrix mit Allelfrequenzen für Marker i in Spalte i (angepasste Verwandtschaftsmatrix)

3) andere Verwandtschaftsmatrizen (Amin et al., 2007; Leuttenger et al., 2003) (angepasste Verwandtschaftsmatrix)

4) Ähnlichkeitsmatrizen mit der Kernel-Methode (angepasste Verwandtschaftsmatrix)

In Schritt a) schätzt GCTA Varianzkomponenten, d.h. $\widehat{\sigma}_g^2$ und $\widehat{\sigma}_e^2$ basierend auf dem AIREML-Algorithmus.

b) Schätzen der SNP-Effekte mittels verallgemeinerter kleinster Quadrate (GLS) basierend auf $\widehat{\sigma}_g^2$ und $\widehat{\sigma}_e^2$, die mit Modell 1 geschätzt wurden. Das Modell in Schritt b) lautet:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\mathbf{b} + \mathbf{w}_i c_i + \mathbf{Z}\mathbf{g} + \mathbf{e} \quad [2]$$

Wobei \mathbf{w}_i der Vektor der zentralisierten Genotypen ist, d.h. $x_i - 2p_i$ (x_i ist ein Vektor von Genotypen für Marker i und alle genotypisierten Tiere) und c_i ist der Regressionskoeffizient der SNP (SNP-Effekt) für i Marker.

Anwendung der GLS-Methode m Mal, um Regressionskoeffizienten für m Marker zu schätzen. Ablauf der Prozedur:

1. Es wird $\mathbf{b}_1 = [\mathbf{b} \ c_i]$ und $\mathbf{X}_1 = [\mathbf{X} \ \mathbf{w}_i]$ gesetzt, dann $\widehat{\mathbf{b}}_1 = (\mathbf{X}'_1 \mathbf{V}^{-1} \mathbf{X}_1)^{-1} \mathbf{X}'_1 \mathbf{V}^{-1} \mathbf{y}$ (Lösung für GLS) und $\text{var}(\widehat{\mathbf{b}}_1) = (\mathbf{X}'_1 \mathbf{V}^{-1} \mathbf{X}_1)^{-1}$, $\mathbf{V} = \mathbf{K}\sigma_g^2 + \mathbf{I}\sigma_e^2$
2. Berechnen der Teststatistik: $\chi^2 = \frac{\widehat{c}_i^2}{\text{var}(\widehat{c}_i)}$ in Anlehnung an den Wald-Test $W_t = \frac{(\widehat{\theta} - \theta_0)^2}{\text{var}(\widehat{\theta})}$ (im vorliegenden Fall entspricht die Nullhypothese $H_0: \theta_0 = 0$, daher folgt $W_t = \frac{(\widehat{\theta})^2}{\text{var}(\widehat{\theta})}$ einer Chi-Quadrat- (χ^2) Verteilung. Ablesen des p-Wertes für die SNP anhand der χ^2 -Verteilung mit 1 Freiheitsgrad. Oder berechnen: $z = \frac{\widehat{c}_i}{\text{se}(\widehat{c}_i)} = \frac{\widehat{c}_i}{\sqrt{\text{var}(\widehat{c}_i)}}$, wobei z einer Standardnormalverteilung $N(0, 1)$ folgt. \widehat{c}_i ist das letzte Element in $\widehat{\mathbf{b}}_1$ und $\text{var}(\widehat{c}_i)$ ist das letzte Diagonalelement in $\text{var}(\widehat{\mathbf{b}}_1)$.

2. Um Genotyp x Umwelt-Interaktionen (GUI) für jeden SNP zu testen, nutzen wir $\widehat{\sigma}_g^2$ und $\widehat{\sigma}_e^2$, die mit Modell 1 geschätzt wurden. Dieses GLS-Modell wird angewandt:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\mathbf{b} + \mathbf{w}_i c_i + \mathbf{q}_i h_i + \mathbf{Z}\mathbf{g} + \mathbf{e} \quad [3]$$

wobei \mathbf{q}_i der Vektor zentralisierter Genotypen in einer Umwelt ist (2 Haltungssysteme: Kompost und Laufstall), d.h. $(x_i - 2p_i) \otimes \mathbf{X}_{\text{en}2}$ ($\mathbf{X}_{\text{en}2}$ ist ein Vektor in \mathbf{X} für Umwelt 2, d.h. für Laufstall) und h_i ist der Interaktionseffekt für i Marker.

Modell 3 läuft m mal (Anzahl der Marker), um Schätzwerte für SNP-Effekte zu bekommen und SNPxUmwelt-Interaktionseffekte. Die Laufzeit für ~500 Tiere steigt von 1 Minute (GCTA) auf 5-10 Minuten (hängt davon ab, ob genomische Verwandtschaftsmatrix 1 oder 29 Mal gelesen wird, von leave-one-chromosome-out (LOCO) und der Anzahl fixer Effekte im Modell).

3. Modell zum Testen, ob die GUI-Varianz sich signifikant von 0 unterscheidet

In Anlehnung an die GCTA-Algorithmen wird ein Modell zur Schätzung der Varianz für den GUI-Effekt aufgestellt:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\mathbf{b} + \mathbf{X}_{\text{en}}\mathbf{g}_{\text{en}} + \mathbf{Z}\mathbf{g} + \mathbf{e} \quad [4]$$

In GCTA erlaubt die Option --gxe in der GREML-Analyse GUI als zufälligen Effekt einzubeziehen und schätzt die Varianz für GUI mittels AIREML. Damit können $\widehat{\sigma}_g^2$, $\widehat{\sigma}_e^2$ und $\widehat{\sigma}_{gxe}^2$ geschätzt werden.

In Modell 3 wird dennoch $\mathbf{V} = \mathbf{K}\sigma_g^2 + \mathbf{I}\sigma_e^2$ angenommen und die GLS werden m mal wiederholt, um SNP-Effekte für SNP 1 bis m zu schätzen. Dann werden $\widehat{\sigma}_{gxe}^2$ als fixe Effekte in Modell 3 berücksichtigt, wodurch die Aussagekraft der GWAS erhöht werden kann.

Methoden zum "selektiven Genotypisieren"

Zur Identifikation von Selektionssignaturen wurden SNP-Daten von allen, nicht nur extremen Phänotypen, in die Analyse einbezogen. Der folgende statistische Ansatz wurde verwendet: cross-population extended haplotype homozygosity (XP-EHH) nach Sabeti et al. (2007). XP-EHH zeigt

kürzlich erfolgte Selektionen innerhalb einer Population auf, während z.B. die Fst-Methode Selektionssignaturen aufzeigt, die zeitlich weiter zurückliegen (Naderi et al., 2020).

Untersuchung von Auswirkungen bestimmter Temperatur- und Feuchtigkeitsbereiche auf (X)TAS und Mastitisbakterien in Milch und Einstreu

Die Auswirkungen steigender Temperaturen und Feuchtigkeiten in der Einstreu auf XTAS-Bakterien wurden mithilfe von Regressionen analysiert. Das Vorkommen von Mastitis- und XTAS-Bakterien in Einstreu und Milch wurde mittels t-Test auf System- und Feuchtigkeits- bzw. Temperaturunterschiede untersucht.

Modell zur Ableitung systemspezifischer Gewichtungsfaktoren für Zuchtzielmerkmale

Im Rahmen des kontingenten Befragungsansatzes sollten fiktive 1000 € auf zehn vorgegebene Zuchtzielmerkmale entsprechend ihrer Bedeutung für den Betrieb im jeweiligen Haltungssystem und Land verteilt werden. Die Modellgleichung (M6.2) zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Effekte auf die Zuchtzielgewichtungen lautet:

$$y_{ijklmnop} = \mu + \text{Land}_i + \text{WWeise}_j + \text{Haltung}_k + \text{HGröße}_l + \text{MLeistung}_m + \text{Alter}_n + \text{MEinkommen}_o + \text{AktivZO}_p + e_{ijklmnop}$$

$y_{ijklmnop}$	= Betrag je Zuchtzielmerkmal
μ	= Basis des Versuchsmittels
Land_i	= fixer Effekt der Betriebsherkunft (i = sechs verschiedene Länder)
WWeise_j	= fixer Effekt der Wirtschaftsweise (j = konventionell oder ökologisch)
Haltung_k	= fixer Effekt der Haltungsform (k=Liegeboxen- oder Kompostierungsstall)
HGröße_l	= fixer Effekt der Herdengröße (l= <60, 60-120, 120-180, >180 Kühe)
MLeistung_m	= fixer Effekt der Milchleistung (m= <8500l, 8500l-10500l, >10500l /Kuh und Jahr)
Alter_n	= fixer Effekt des Alters des Betriebsleiters (n= <35, 35-45, >45 Jahre)
MEinkommen_o	= fixer Effekt des Milchanteils vom Betriebseinkommen (o= <25%, 25-50%, 50-75%, >75%)
AktivZO_p	= fixer Effekt der Aktivität in einer Zuchtorganisation (p= nicht (1), manchmal (2), sehr wichtig (3))
$e_{ijklmnop}$	= Residualeffekt (Resteffekt)

2.1.3. Ergebnisse und Diskussion

Systemvergleich für Zellfraktionen in Abhängigkeit von Leistungs- und Zellzahlniveau

Die häufigste Zellfraktion in der vorliegenden Studie waren Lymphozyten (61% ± 25%) in beiden Systemen, CBPB (Kompostierungsstall) und CCB (Liegeboxenstall), wie zuvor von Dosogne et al. (2003) und Schwarz et al. (2011) in konventionellen Haltungssystemen beobachtet. Im Gegensatz dazu waren in der Studie von Riollot et al. (2001) die MAC die vorherrschende Zellfraktion in konventionellen Haltungssystemen, deren Anteil hier nur bei 29% (± 21%) lag, womit der verbleibende Anteil von 10% (± 14%) auf die PMN entfällt. Die Anteile der Leukozyten in gesunden Vierteln sind demnach in verschiedenen Studien und in unterschiedlichen Umgebungen sehr unterschiedlich (Paudyal et al., 2018).

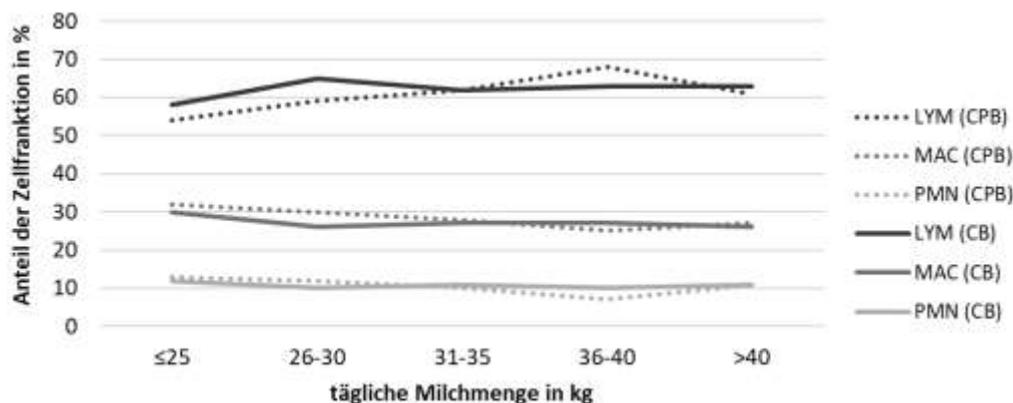


Abbildung 1: Lsmeans für die einzelnen Zellfraktionen in Abhängigkeit der täglichen Milchmenge

Wie von Yang et al. (1997) und Paudyal et al. (2018) berichtet, hingen die Anteile für MAC und LYM stark vom Laktationsstadium ab. Wie in der vorliegenden Studie nachgewiesen, unterschied sich das Reaktionsmuster jedoch zwischen den Haltungssystemen CBPB und CCB. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Dosogne et al. (2003) und Paudyal et al. (2018) in konventionellen Systemen zeigte unsere Studie eine Abnahme der LYM mit zunehmenden Tagen in der Milch, aber im Gegensatz zu den vorherigen Studien stiegen die Anteile von MAC und PMN, besonders in CBPB. Die Anteile für LYM waren bei den Kühen mit der höchsten Produktivität in der Milchleistung am höchsten, was die Ergebnisse von Paudyal et al. (2018) bestätigt, und stiegen vor allem in CBPB mit steigender Milchleistung an (Abb. 1). Die höhere Bakterienzahl im Komposteinstreumaterial könnte bei CBPB Immunreaktionen auslösen, die die Zirkulation von LYM in Gang setzen (Derakhshani et al., 2018). Im Gegensatz dazu nahmen die Anteile an MAC mit abnehmender Produktivität zu. Die Anteile der PMN waren in früheren Studien über die Milchleistungsklassen hinweg recht konstant (z. B. Paudyal et al., 2018), aber in der vorliegenden Studie wurden ausgeprägte PMN-Schwankungen beobachtet, insbesondere im System CBPB. In CBPB zeigte die Bakterienflora deutliche Schwankungen aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der eingestreuten Materialien (Ferraz et al., 2020), auch im Zusammenhang mit der Bearbeitung des Liegebereichs, wodurch Trockenmasse- und Sauerstoffgehalt erhöht werden (Leso et al., 2020). Daher können unterschiedliche Einstreumaterialien und das Bearbeitungsmanagement einen Einfluss auf die PMN-Schwankungen haben. Die Zellfraktion PMN hat kürzere Halbwertszeiten als LYM oder MAC und reagiert empfindlicher auf Umweltveränderungen (Anwer et al., 2017), was möglicherweise die beobachteten Unterschiede in den PMN-Fractionen zwischen den beiden Haltungssystemen CBPB und CCB erklärt. Unabhängig vom Haltungssystem war die Anzahl für sN bei Hochleistungskühen deutlich erhöht. Solche Abhängigkeiten, d.h. sN-Fractionen in Abhängigkeit von der Milchleistung, wurden zuvor von Le Maréchal et al. (2011) ausgearbeitet.

Systemvergleich für Mastitiserreger in Abhängigkeit von Leistungs- und Zellzahlniveau

Insgesamt hatten Kühe, die in CBPB gehalten wurden, eine geringere Anzahl an infizierten Eutervierteln (49 %) im Vergleich zu Kühen aus CCB (66 %) (Tab. 6). Desgleichen wurde ein positiver Einfluss von Freilaufhaltungssystemen auf bakteriologische Euterinfektionen von Astiz et al. (2014) und Eckelkamp et al. (2016) festgestellt. Außerdem beobachteten beide Studien geringere Inzidenzen für klinische Mastitis in CBPB. In der vorliegenden Studie wurden Kühe mit schwerer klinischer Mastitis und Antibiotikabehandlungen ausgeschlossen, was zu potenziellen Verzerrungen bei den Erregerprävalenzen führte.

Tabelle 6: Lsmeans (und Standardfehler SE) für die Häufigkeit spezifischer Mastitiserreger in den Haltungssystemen Kompostierungsstall (CBPB) und konventioneller Liegeboxenstall (CCB), sowie P-Werte für die Lsmeans-Unterschiede in den beiden Haltungssystemen

Pathogen ¹	CPB		CB		P-Wert
	Lsmeans [%]	SE [%]	Lsmeans [%]	SE [%]	
KKK	51,100	2,850	33,900	2,920	<0,0001
KNS	18,600	1,900	36,700	2,720	<0,0001
COR	10,600	1,630	12,800	2,020	0,3939
AER	0,004	2,349	0,001	0,704	0,9989
AESC	1,130	0,460	0,000	0,043	0,9945
MINOR	35,000	2,500	54,100	2,920	<0,0001
MAJOR	2,925	0,748	0,153	0,323	0,9845

¹ Kulturell kein Keimgehalt=negativer Test auf Bakterien (KKK), *Koagulase-negative Staphylokokken* (KNS), *Corynebacterium sp.* (COR), *Aerobe Bakterien* (AER), *Aesculin-hydrolysierende Streptokokken* (AESC), Minor-Pathogene (MINOR, beinhaltet CNS and COR), Major-Pathogene (MAJOR, beinhaltet *Aerococcus sp.*, *AESC*, *Candida krusei*, *Enterococcus sp.*, *Escherichia Coli*, *Lactococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, mold fungus und *Proteus sp.*).

Nichtsdestotrotz sind MINOR aufgrund der Implementierung von Mastitis-Präventionsprogrammen in den letzten zwei Jahrzehnten in gut geführten Betrieben von größerer Bedeutung als MAJOR, wie in der vorliegenden Studie und von Tenhagen et al. (2006) und Piessens et al. (2011) gezeigt wurde. Darüber hinaus haben Feldversuche gezeigt, dass mit COR als Minor-Erreger infizierte Viertel aufgrund einer verstärkten Stimulation des Immunsystems teilweise resistent gegen Major-Erreger waren (Sordillo et al., 1989). Die Prävalenzen für KNS unterschieden sich

zwischen CBPB und CCB, was bestätigt, dass das Auftreten von KNS-positiven Eutervierteln stark vom Management des Haltungssystems und der Art der Einstreu abhängig ist (Supré et al., 2011; Condas et al., 2017). Wie zuvor von Schukken et al. (2009) gezeigt, stieg die Anzahl der COR mit zunehmendem Laktationsstadium der Kuh in den beiden Systemen CBPB und CCB. Generell sind hochleistende Kühe anfälliger für Bakterien, die in den Zitzenkanal eindringen, was durch den starken Anstieg der AER jenseits von 40 kg Milch pro Tag bestätigt wird. Ein solcher Einfluss der Milchleistung auf die AER-Prävalenzen wurde in der vorliegenden Studie insbesondere bei CBPB beobachtet und zuvor von Galama et al. (2015) vermutet. Interessanterweise nahm die Anzahl der bakteriologisch negativen Viertel mit zunehmender Milchleistung in CCB ab, aber in CBPB zu, was darauf hindeutet, dass die Kombination aus gutem Hygienemanagement und Tiergerechtheit in CBPB positive Auswirkungen auf die Eutergesundheit physiologisch gestresster Kühe hat.

Die kleinsten quadratischen Mittelwerte für die Prävalenzen von MINOR, KNS und MAJOR stiegen mit zunehmendem SCC in beiden Systemen CBPB und CCB. Bei Eutervierteln mit weniger als 50.000 Zellen/ml waren die COR-Prävalenzen in CCB höher als in CBPB. Danach nahm die COR-Prävalenz mit zunehmendem SCC in CCB ab, blieb aber in CBPB auf einem recht konstanten Niveau (12 %). Ein Ausschluss negativer bakteriologischer Ergebnisse aus dem Datensatz implizierte einen Anstieg der Anteile für bN, mit 1,6 % in CCB und 1,5 % in CBPB (nicht abgebildet). Im Gegensatz dazu waren die Anteile von sN in CBPB größer als in CCB, insbesondere bei steigenden SCC-Werten. Daher unterschieden sich die Reaktionen der Zellfraktionen in beiden Systemen in Bezug auf den allgemeinen Infektionsstatus und die Besonderheiten des Haltungssystems. Größere Werte für bN in CCB als in CBPB, wenn SCC 200.000 Zellen übersteigt, deuten auf stärkere Entzündungsreaktionen durch die Erreger in CCB hin (Paape et al., 2003). Physiologisch bedeutet ein Anstieg der bN, dass die Anzahl der unreifen stabförmigen neutrophilen Granulozyten, die aus dem Knochenmark freigesetzt werden, größer ist als der Bedarf im Körper- und Eutergewebe (Sellon, 2004). Die Art der Erregerspezies bewirkt vor allem die Erhöhung spezifischer Zellfraktionen und von SCC. In dieser Hinsicht induzieren verschiedene KNS-Spezies unterschiedliche Mechanismen des Immunsystems, mit spezifischen Auswirkungen auf SCC. Einige der KNS-Spezies (z. B. *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus simulans*) induzieren einen Anstieg des SCC ähnlich wie *Staphylococcus aureus* und sind pathogener als andere Arten der KNS-Gruppe (Supré et al., 2011; Condas et al., 2017).

Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) unter Berücksichtigung von Systemunterschieden

Durch Berücksichtigung von SNP-Effekten im Modell, das für die phänotypischen Analysen genutzt worden war, konnten Heritabilitätsschätzungen und genomweite Assoziationsstudien vorgenommen werden, in denen das Pedigree als genomische Verwandtschaftsmatrix einfließt. Die Heritabilitäten lagen jeweils für den Maximalwert innerhalb Kuh in einem Bereich zwischen 0,00 und 0,14 (PMN) für die Zellfraktionsmerkmale und zwischen 0,00 und 0,09 (AESC) für das Vorkommen von Mastitiserregern. Bobbo et al. (2019) schätzten eine Heritabilität von 0,08 für die Differenz zwischen 100 und dem Anteil der Makrophagen, was etwas größer ist als unser Schätzwert für MAC (0,05). Sørensen et al. (2009) schätzten Heritabilitäten für die vier wichtigsten Mastitiserreger im Bereich von 0,034 bis 0,074 und Detilleux et al. (1995) schätzte 0,10 für die zu einer Gruppe zusammengefassten Haupterreger. Unterschiedliche Produktionssystemcharakteristika und Merkmalsdefinitionen, wie sie in den verschiedenen Studien vorherrschten, trugen demnach zu Unterschieden in den genetischen Varianzen und Heritabilitäten bei.

Die GWAS für Zellfraktionen ergab einen signifikanten SNP für bN in CBPB (Abbildung 3) basierend auf einem Signifikanzniveau von $p = 2,88 \times 10^{-3}$. Signifikante SNPs für Bakterien sind ausschließlich in CCB zu finden (Tabelle 7). Die Aufteilung der Daten nach Produktionssystemmerkmalen trägt demnach vermutlich zu Unterschieden in den SNP-Effektschätzungen bei, was auf mögliche GxE hinweist (Zhang et al. 2019; Tsuruta et al. 2015).

Bei den Genannotationen unter Berücksichtigung des signifikanten SNP aus dem CBPB-Datensatz (Abb. 2) wurde das potenzielle Kandidatengen Catenin Alpha 3 (CTNNA3) auf BTA 28 identifiziert. CTNNA3 kodiert ein Protein, das den transmembranen Zell-Zell-Kontakt vermittelt, was auf mögliche Einflüsse auf Prozesse gegen Mastitis hinweist (Janssens et al., 2001; Pokutta et al., 2008).

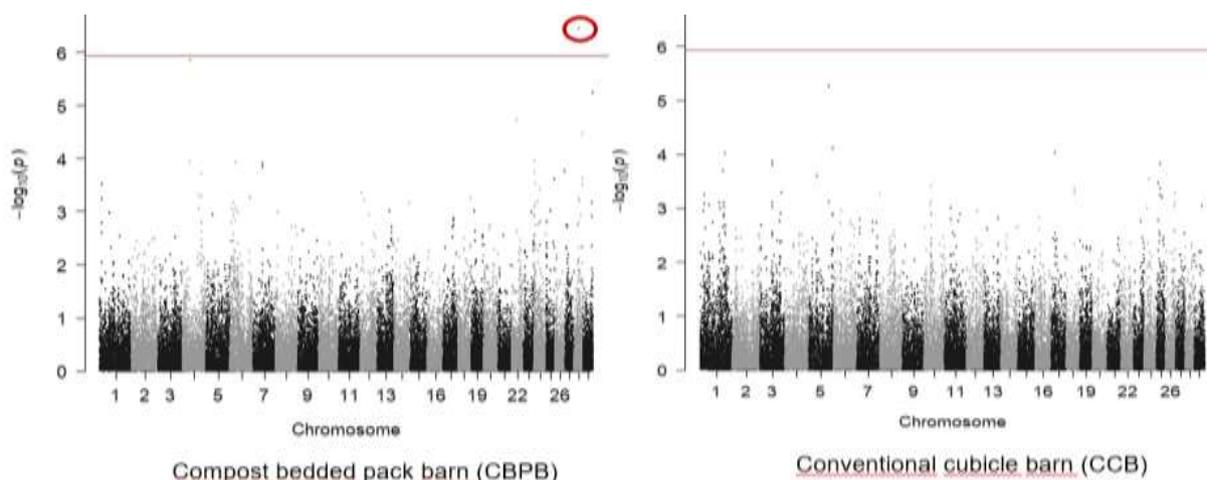


Abbildung 2: Manhattan-Plots für das Merkmal bN, basierend auf separaten GWAS für die beiden Haltungssysteme CBPB (links, mit einem signifikanten SNP nach der Bonferroni-Korrektur) und CCB (rechts)

Im CCB-Datensatz identifizierten wir neun signifikante SNPs, die mit AESC, AER, MAJOR und fmimp assoziiert sind (Tabelle 7).

Tabelle 7: SNP, die signifikant assoziiert sind mit verschiedenen Mastitiserregern in Liegeboxenbetrieben (CCB)

Mastitispathogen (-gruppe)	BTA	SNP	Position (bp)	P-value
AESC	23	ARS-BFGL-NGS-64276	39505270	0,0007
	28	ARS-BFGL-NGS-109305	26204010	0,0027
	5	BTB-00222372	10231769	0,0058
	27	BTB-00959057	18966661	0,0029
AER	14	ARS-BFGL-NGS-106244	55685870	0,0038
fmimp*	5	ARS-BFGL-NGS-72638	62294079	0,0001
	17	Hapmap51224-BTA-40595	18493638	0,0044
	6	BTA-109075-no-rs	91984247	0,0028
MAJOR	5	ARS-BFGL-NGS-72638	62294079	0,0009

* dazu gehören *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* und *Streptococcus dysgalactiae*

In der GWAS konnten insgesamt 35 signifikante SNP bei den Merkmalen PMN, sN, bN, MAJOR, MINOR, KNS, AER und KKK identifiziert werden. Für sechs weitere SNP, u.a. bei PMN (Abb. 3) und AER, wurden signifikante Interaktionen zum Stallungssystem nachgewiesen, was eine neuartige Nachweismethode für Genotyp x Umwelt-Interaktionen darstellt. Für einige der Kandidatengene wurden Auswirkungen auf das Immunsystem beschrieben (Szklarczyk et al., 2019).

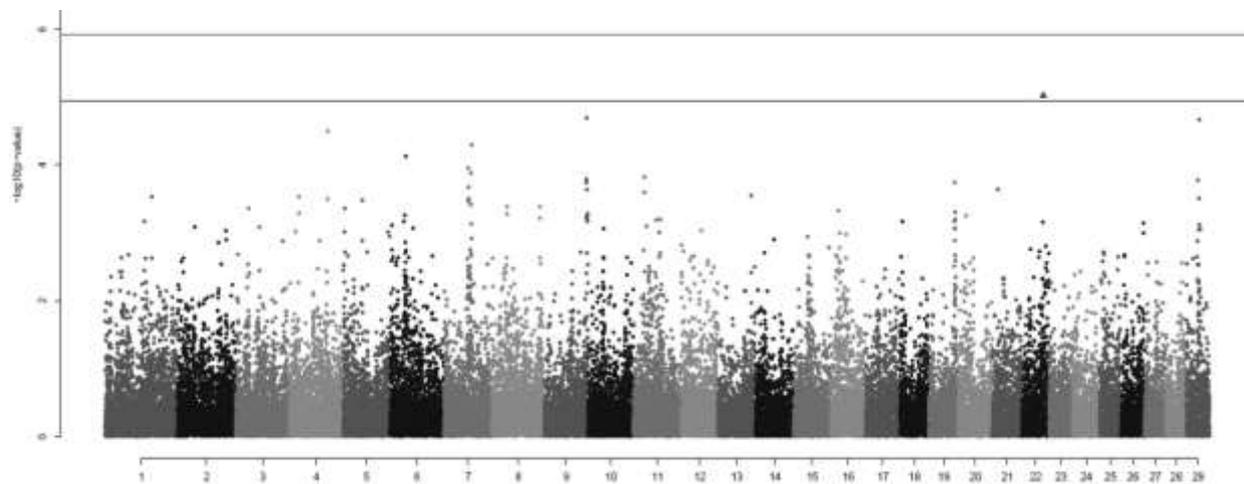


Abbildung 3: Manhattan-Plot für das Merkmal PMN, basierend auf einer GWAS mit signifikanter Interaktion zwischen Haltungssystem (CPB und CCB) und SNP-Effekt (Signifikanzlevel von $p = 2,88 \times 10^{-3}$).

Selektionssignaturen

Selektionssignaturen zeigen mögliche funktionale Gene insbesondere für komplexe Merkmale auf. Ein komplexes Merkmal, wie beispielsweise die Anfälligkeit für Mastitis oder für Klauenkrankheiten beruht meist auf kumulativen Geneffekten sowie auf multiplen Geninteraktionen (Naderi et al., 2020).

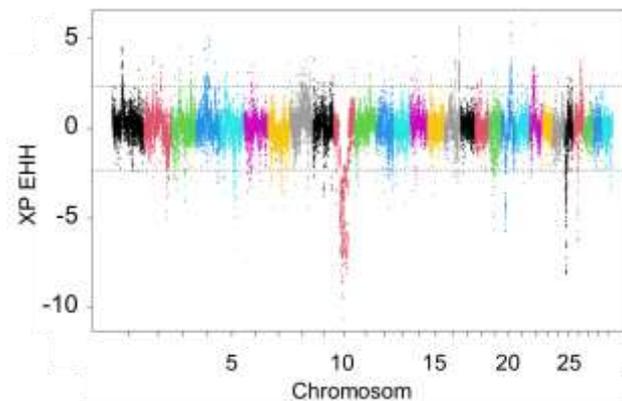


Abbildung 4: Manhattan-Plot für XP-EHH-Werte für jeden SNP in Kompostierungs- (positive Werte) und Liegeboxenbetrieben (negative Werte)

Abbildung 4 zeigt die Ergebnisse der Selektionssignaturen. Nach der XP-EHH-Methode zeigen sich für Kompostierungs- und Liegeboxenstall signifikante SNP. Die Regionen mit den höchsten positiven XP-EHH-Scores, die die Selektion in der Kompostierungsstall-Population widerspiegeln, befinden sich auf den Chromosomen 16, 20 und 22. Die umfangreichste Selektionssignatur für Liegeboxenbetriebe wurde auf Chromosom 10 identifiziert.

(X)TAS- und Mastitisbakterien in Abhängigkeit des Haltungssystems sowie verschiedener Temperaturen und Feuchtegehalte der Einstreu in Kompostierungsställen

Abbildung 5 zeigt eine starke positive Beziehung zwischen XTAS und der durchschnittlichen Temperatur der Einstreu während der 6 Betriebsbesuche. Das liegt daran, dass diese Bakterien thermophil (hitze liebend) sind.

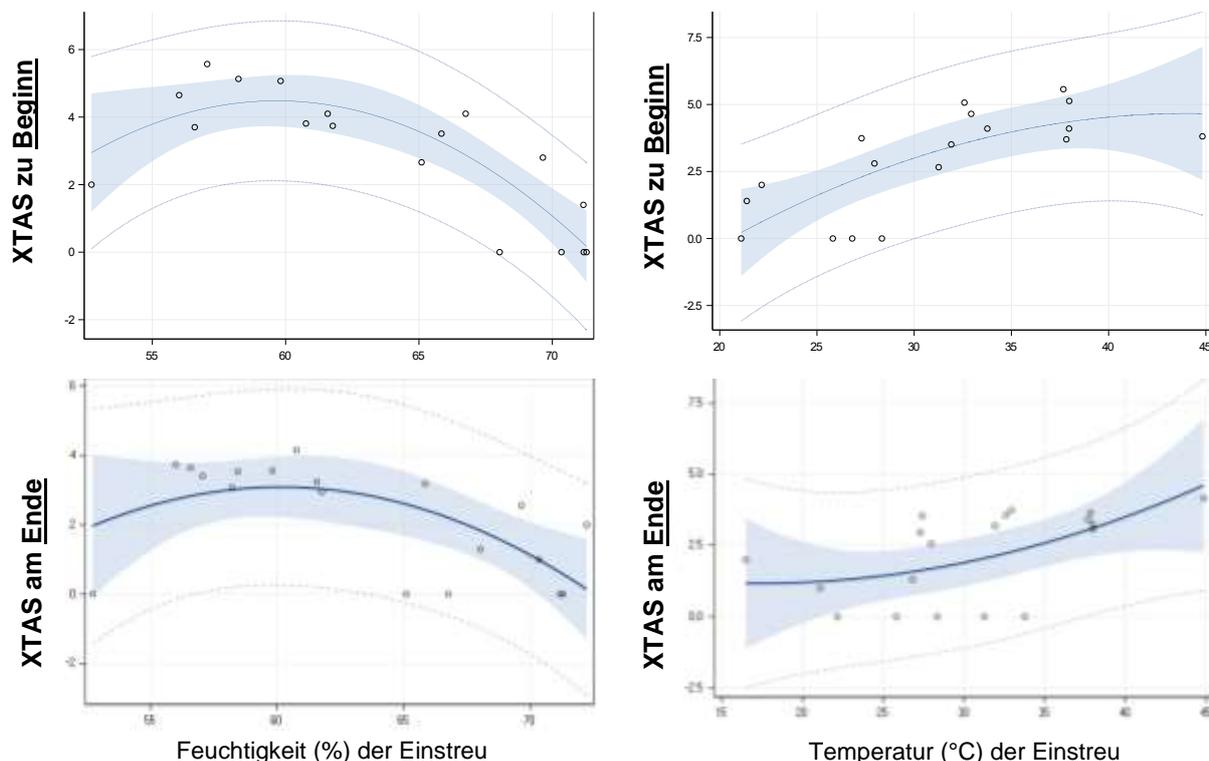


Abbildung 5: Beziehung von XTAS mit Feuchtigkeit (linke Seite) und Einstreutemperatur (rechte Seite) für den Beginn (1. Reihe) und das Ende (2. Reihe) der Kompostierungsperiode.

Einstreutemperaturen über 40 °C im Durchschnitt über die sechs Betriebsbesuche fehlen in dieser Studie und treten nur vereinzelt auf, obwohl Temperaturen zwischen 40 und 50 °C als Ergebnis eines guten Kompostierungsprozesses angesehen werden.

Für das Funktionieren des Kompostierungsprozesses und die Sauberkeit der Kühe ist es wichtiger, einen niedrigeren Feuchtigkeitsgehalt als hohe Temperaturen anzustreben. Feuchtigkeiten über 60 % (nass) sind leider häufig anzutreffen. Diese führen zwar zu einer Abnahme der XTAS-Bakterien (Abbildung 5, linke Seite), aber nur, weil der für die aeroben Prozesse dieser Bakterien notwendige Sauerstoff unter nassen Bedingungen reduziert ist.

Aber ist es möglich, dass diese Bakterien in die Tankmilch gelangen? Hierfür wurden nicht die extrem thermophilen Bakterien (XTAS) analysiert, da sie in der Milch schwer nachzuweisen sind. Stattdessen wurden weniger extreme thermophile Bakterien (TAS) gemessen. Fast alle Betriebe erzielen TAS-Werte von 0, was nicht bedeutet, dass keine TAS in der Milch vorhanden sind, sondern eher, dass sie einfach unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Vereinzelt Werte von 1, 2 oder sogar 4 könnten auf Fehler beim Reinigen und Vormelken der Euter zurückzuführen sein.

Auch Mastitisbakterien wurden in Einstreu und Tankmilch analysiert. Da Tankmilchproben aus beiden Systemen zur Verfügung stehen, kann das Auftreten positiver Proben für die bedeutenden Mastitiserreger *S. aureus*, *E. coli* und Klebsiellen verglichen werden. Tabelle 8 zeigt, dass jeweils etwas mehr Proben von Kompostierungsbetrieben positiv auf *S. aureus*, *E. coli*-Bakterien und Klebsiellen getestet wurden als von Referenzbetrieben (Liegeboxenlaufställen). Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant, was vor allem auf den geringen Stichprobenumfang zurückzuführen ist.

Tabelle 8: Vergleich von Proben mit positivem Ergebnis für *S. aureus*, *E. coli* und Klebsiellen in Tankmilch von Kompostierungs- und Liegeboxenlaufställen (Proben mit akzeptabler Anzahl von Kolonien gelten als negativ)

	Kompostierungsställe (n=20)	Liegeboxenlaufställe (n=19)	Signifikanter Unterschied?
S. aureus	15%	5%	Nein (p=0,34)
E. coli	20%	5%	Nein (p=0,21)
Klebsiellen	5%	0%	Nein (p=0,97)

Klebsiellen scheinen ein eher länderspezifisches Problem zu sein. Deutschland, Italien und die Länder mit je nur einem Kompostierungs- und Vergleichsbetrieb haben dieses Problem nicht. Dies könnte mit der Verwendung verschiedener Arten von Einstreumaterialien zusammenhängen, deren chemische und physikalische Eigenschaften eingehend in der Studie von Ferraz et al. (2020) untersucht wurden.

Ein höheres Risiko für die Menge an XTAS-Sporen in der Einstreu, wenn die Temperatur hoch und die Feuchtigkeit in der Einstreu im mittleren Bereich liegt, hängt damit zusammen, dass diese Bakterien thermophil sind und es eine negative Korrelation zwischen der Temperatur der Einstreu und der Feuchtigkeit der Einstreu gibt. Vor diesem Hintergrund sind Einstreutemperaturen im Bereich von durchschnittlich 40-50 °C kritisch zu sehen. Andererseits könnte eine niedrigere Temperatur (im Bereich von 15-45 °C) das Wachstum von Krankheitserregern, z.B. *E. coli* mit einer optimalen Temperatur von 37 °C fördern; oberhalb von 45 °C sterben die meisten Coli-Bakterien ab. Abb. 7 zeigt dieses Optimum bei *E. coli* nur in der Einstreu. Anhand des kleinen Datenmaterials von 19 Betrieben mit je einer Beprobung sind allerdings keine signifikanten Unterschiede nachzuweisen. Einstreutemperaturen zwischen 26 und 35 °C (Abbildung 7, rechts) sind optimal für das Bakterienwachstum, aber die Übertragung auf die Milch ist begrenzt. Ein ähnliches Bild wie für XTAS-Bakterien zeigt sich auch für Mastitis-Bakterien unter feuchten Bedingungen, wobei das Zusammenspiel beider Einflussfaktoren angesichts des kleinen Datenmaterials nicht berücksichtigt werden konnte. Es besteht ein geringeres Risiko, dass die Bakterien in der Milch vorkommen, wenn die Feuchtigkeit gering ist. Im trockensten Bereich (<55 %, Abbildung 7, links) sind die Bedingungen für das Bakterienwachstum in der Einstreu gut, aber sie gelangen nicht in die Milch, wahrscheinlich, weil die Zitzen sauber bleiben.

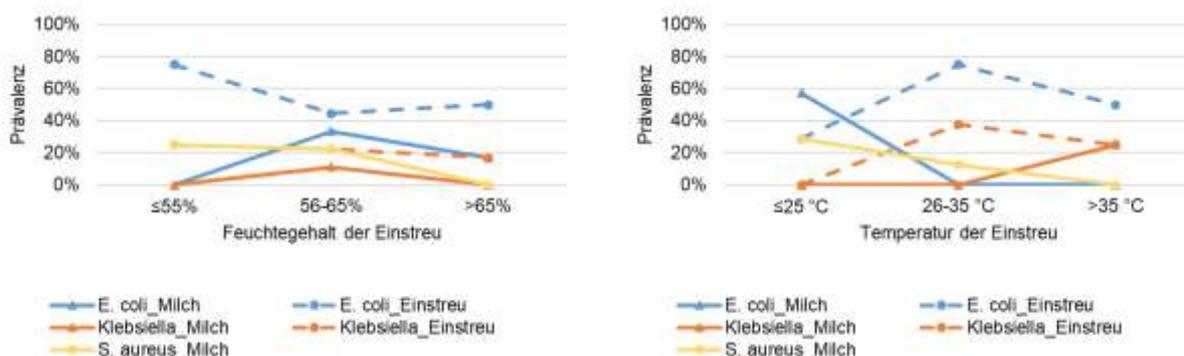


Abbildung 7: Beziehung von wichtigen Mastitisserregern zu Feuchtigkeit (linke Seite) und Einstreutemperatur (rechte Seite) vom jeweiligen Beprobungstermin (Proben mit akzeptabler Anzahl von Kolonien gelten als negativ)

Temperatur, Feuchtigkeit und auch (an)aerobe Bedingungen der Einstreu stehen miteinander in Zusammenhang. Feuchtigkeiten über 60% (also eine nasse Einstreu) führen zu einer niedrigeren Temperatur und zu anaeroberen (sauerstoffarmen) Bedingungen. Der Gehalt an XTAS-Bakterien kann in einer nassen Einstreu abnehmen, da diese Bakterien aerobe (sauerstoffreiche) Bedingungen und hohe Temperaturen mögen. Aber nicht nur optimale Temperaturen und Feuchtigkeiten sind wichtig, sondern auch die passenden Bearbeitungstechniken und Einstreumaterialien. Das Ziel sollte sein, die Einstreu trocken zu halten (<60% Feuchtigkeit), um schmutzige Kühe und Probleme mit der Eutergesundheit und der Melkhygiene zu vermeiden.

Ableitung systemspezifischer Gewichtungsfaktoren für Zuchtzielmerkmale

Hauptaugenmerk der dazu verfassten Masterarbeit (M6.1) lag auf den bevorzugten Zuchtzielmerkmalen der 40 befragten Landwirte, von denen 39 die jeweiligen Gewichtungen angaben. Aber auch weitere Zuchtschwerpunkte, betriebliche Kennzahlen und eigene Einschätzungen zum züchterischen Interesse wurden erhoben, um dies wenn möglich (bei signifikantem Einfluss auf mindestens ein Zuchtzielmerkmal) im Modell berücksichtigen zu können. So ließ sich grundsätzlich ein größeres Interesse an züchterischen Aktivitäten bei den Vergleichsbetrieben feststellen. Auf einer Skala von 1 bis 3 (nicht wichtig, manchmal wichtig, sehr wichtig) gaben Vergleichsbetriebe eine höhere Aktivität in Zuchtorganisationen (1,65 vs. 1,26) und auf Zuchtschauen (1,40 vs. 1,16) sowie mehr Verkauf von Zuchttieren (1,95 vs. 1,53) als die Kompostierungsbetriebe an. Als signifikant erwies sich von diesen Informationen zum züchterischen Interesse bei der Betrachtung aller erhobenen Einflussfaktoren auf die Gewichtungen der Zuchtzielmerkmale (Tab. 9) dann nur „Aktiv in Zuchtorganisation“ beim Zuchtzielmerkmal Exterieur. Außerdem zeigte sich, dass die Unterschiede zwischen den beiden Systemen in keinem Fall signifikant sind.

Tabelle 9: Signifikanz der Effekte in den Modellen der einzelnen Zuchtzielmerkmale (p-Werte)

Effekt	Milchmenge	Milch-inhaltsstoffe	Euter-gesundheit	Langlebigkeit	Fruchtbarkeit	Leicht-kalbbigkeit	Klaugen-gesundheit	Stoffwechsel-stabilität	Futter-verwertung	Exterieur
Land	0,058†	0,475	0,897	0,510	0,688	0,630	0,318	0,631	0,786	0,778
Wirtschaftsweise	0,040*	0,978	0,965	0,669	0,660	0,543	0,560	0,980	0,850	0,162
System	0,772	0,393	0,784	0,555	0,226	0,913	0,437	0,713	0,637	0,108
Herdengröße	0,237	0,882	0,623	0,180	0,685	0,955	0,225	0,784	0,777	0,010*
Milchleistung	0,184	0,874	0,062†	0,291	0,454	0,926	0,568	0,723	0,502	0,399
Alter	0,026*	0,936	0,218	0,141	0,514	0,942	0,707	0,444	0,956	0,032*
Milchanteil Betriebseinkommen	0,485	0,247	0,190	0,011*	0,529	0,771	0,404	0,654	0,631	0,302
Aktiv in Zuchtorganisation	0,150	0,619	0,606	0,249	0,937	0,849	0,539	0,630	0,567	0,021*

p < 0,05 (*): signifikant, p < 0,1 (†): marginal signifikant

Für die signifikanten Effekte (auch marginal signifikante Effekte mit p < 0,1 wurden einbezogen) erfolgte ein Mittelwertvergleich im jeweiligen Zuchtzielmerkmal. So war beispielsweise ganz in-

teressant, dass Ökobetriebe (unabhängig vom Stallsystem) ein höheres Gewicht auf Milchleistung legen (Abb. 8a) und die Gewichtung der Milchleistung auch mit zunehmendem Alter des Betriebsleiters ansteigt (Abb. 8b). Jüngere Betriebsleiter legen dagegen mehr Wert auf Exterieur (12,5%), während die höheren Altersgruppen Exterieur mit weniger als 4% gewichten (nicht abgebildet).

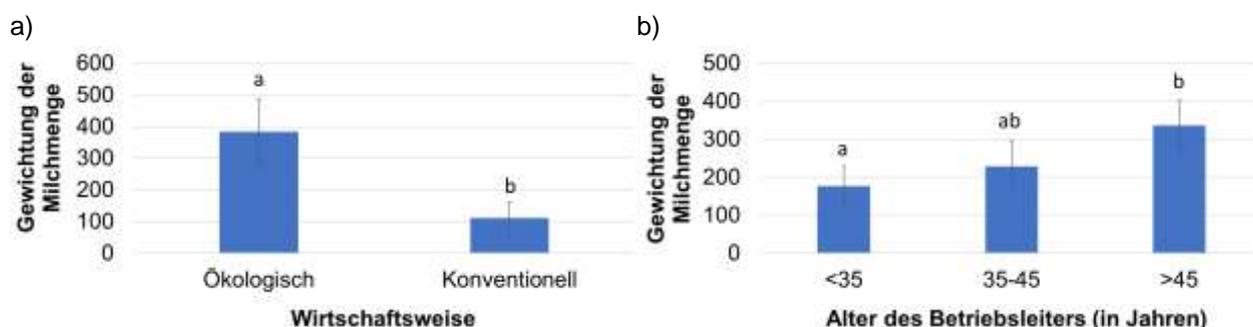


Abbildung 8: LSQ-Mittelwerte für die Gewichtung des Zuchtzielmerkmals Milchmenge in Abhängigkeit der Wirtschaftsweise (a) und des Alters des Betriebsleiters (b)

Exterieur ist das Zuchtzielmerkmal mit dem geringsten Signifikanzwert ($p=0,108$) für den Systemeffekt. Kompostierungsbetriebe vergeben hier eine um 5% höhere Gewichtung. Allerdings haben viele Landwirte angemerkt, dass ihnen das Hauptmerkmal Exterieur als Bezeichnung nicht ausreicht und sie eigentlich vor allem Wert auf gute Zuchtwerte im Bereich Fundament und Klauen legen. Weitere Zuchtzielmerkmale, bei denen sich die beiden Systeme zwar nicht signifikant, aber am auffälligsten unterschieden, waren Milchinhaltstoffe (-5 %) und Fruchtbarkeit (-3 %) mit jeweils höherer Gewichtung im Liegeboxensystem (siehe Tab. 10).

Tabelle 10: LSQ-Mittelwerte für die unterschiedlichen Gewichtungen (in €) der Zuchtzielmerkmale von Betrieben mit Liegeboxenlaufstallhaltung und von Betrieben mit Kompostierungshaltung

Zuchtzielmerkmal	Kompostierungsstallhaltung (C)		Liegeboxenlaufstallhaltung (R)	
	LSQ-Schätzwert	Standardfehler	LSQ-Schätzwert	Standardfehler
Milchmenge	253,33	53,92	241,55	59,55
Milchinhaltstoffe	124,86	71,19	171,17	78,61
Eutergesundheit	95,77	34,13	88,70	37,69
Langlebigkeit	175,90	62,41	203,80	68,92
Fruchtbarkeit	95,36	41,92	134,41	46,28
Leichtkalbigkeit	45,92	28,96	43,52	31,98
Klauengesundheit	34,79	49,05	5,80	54,16
Stoffwechselstabilität	41,03	21,91	34,94	24,20
Futterverwertung	50,84	30,96	39,80	34,19
Exterieur	82,24	36,59	36,29	40,41

Die gefundenen Unterschiede lassen leicht unterschiedliche Zuchtschwerpunkte in den beiden Systemen erkennen, für die in Zukunft möglicherweise unterschiedliche Zuchtprogramme nötig werden könnten. Denkbar ist dies bei voranschreitender Entwicklung hinsichtlich der Ausgliederung der Jungviehaufzucht und Mastanpaarungen, zunehmenden Automatisierungen im Betrieb und vermehrtem Angebot der Weidenutzung für die Kühe.

2.2. Angemessenheit von Aufwand und Zeit

Im Projekt ist erheblicher Mehraufwand entstanden durch den Umfang der Betriebsbesuche sowie deren Vor- und Nachbereitung. Neben den eigentlichen Datenerhebungen zur Eutergesundheit mittels Viertelgemelksuntersuchungen, Probengewinnung zur Genotypisierung und einer Befragung zu züchterischen Schwerpunkten der Projektbetriebe, war eine Vielzahl an Fragebögen, Klimamessungen, Beprobungen und Aufzeichnungen zu erledigen. Darüber hinaus mussten die verantwortlichen Tierärzte, Kontrollverbände, Rechenzentren und Stallbauberater kontaktiert

werden, um allen Projektpartnern für die Fertigstellung ihrer Arbeitspakete zuzuarbeiten. Zum Teil gingen diese Anfragen deutlich über das ursprünglich vereinbarte Maß hinaus, weil im Zuge intensiver Diskussionen neue Protokolle und Aktivitätslisten erarbeitet wurden.

Maßgebliche Zusatzleistung im Projekt ist zum einen die Erhöhung der Betriebszahl auf 14 deutsche Betriebe (davon zwei Mutterkuhbetriebe), um die vergebliche Suche nach Kompostierungs- und passenden Vergleichsbetrieben in einigen Partnerländern auszugleichen, und zum anderen die Untersuchung von Einstreumaterial und Tankmilch auf thermophile, sporenbildende Bakterien als kostensparende Dienstleistung für alle beteiligten Projektpartner. Dies hatte nicht nur die zusätzliche Einbindung weiterer Laborkräfte und wissenschaftlicher Mitarbeiter zur Folge, sondern auch die Verzögerung der eigenen Auswertungen und Publikationen.

2.3. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Alle Arbeitspakete wurden entsprechend des Antrags abgearbeitet und erfolgreich abgeschlossen. Die damit verknüpften Meilensteine sind, wie auch in den Zwischenberichten dokumentiert, erreicht.

2.4. wissenschaftliche Anschlussfähigkeit für eine mögliche nächste Phase

Zum Projektende wurde ein Synthese-Datensatz aus gemittelten Messungen pro Betriebsbesuch erstellt, in den verschiedene Einflussfaktoren und mögliche abhängige Variablen aus den Arbeitspaketen aller europäischen Projektpartner einfließen. Hier könnte mittels explorativer Verfahren oder konkreter Hypothesen beispielsweise die Zusammensetzung der Kompostfläche und deren Einfluss auf Leistung, Gesundheit und Verhalten in der Herde untersucht werden, aber auch Auswirkungen bestimmter Managementpraktiken und Klimafaktoren.

Proben von der Einstreu wurden vom Frischmaterial sowie zu Beginn und Ende der Kompostierungsperiode aus dem Liegebereich genommen und im Labor auf Mastitis- und (X)TAS-Bakterien untersucht. Eine systematische Nachverfolgung von Infektionsketten durch umfassendere Beprobungen, z.B. auch des Futters, und Dokumentation der Abläufe im Stall und im Melkstand könnte Aufschluss darüber geben, ob Hygiene- und Managementfaktoren entscheidender sind für das Auftreten von Euterentzündungen als das Aufstallungssystem, insbesondere die verwendeten Einstreumaterialien.

3. Sind inzwischen von dritter Seite (FE-)Ergebnisse bekannt geworden, die für eine mögliche Fortführung des Vorhabens relevant sein können? Wenn ja, bitte ausführen

Es sind keine anderen FE-Ergebnisse bekannt, aber die umfangreiche Beteiligung der Freewalk-Betriebe hat dazu geführt, dass diese Betriebe teilweise auch im CCCfarming-Projekt berücksichtigt werden. Schwerpunkt von CCCfarming des Projektpartners Uni-Gießen sind die individuellen Methanmessungen der Kühe, was nicht Gegenstand von Freewalk war.

4. War der Einsatz der Bundesmittel für die Erreichung des geplanten Vorhabenziels ursächlich oder wäre dieses Ziel auch ohne Bundesmittel erreicht worden (einschließlich Bewertung evtl. Mitnahmeeffekte)?

Die Bundesmittel waren für das Vorhabenziel notwendig. Zusätzlich sind eigene Mittel in Form von wissenschaftlichem und Laborpersonal eingeflossen, um weitere Betriebsbesuche (durch Erhöhung der Betriebszahl), Zuarbeiten für die Partner und Aufbereitung/Analyse der (X)TAS-Proben bewältigen zu können.

5. Auflistung der erfolgten und geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses (Zitierung bzw. Belegexemplar).

Bachelorarbeiten:

- Jonas Carle (2018): Vergleich von Kompostierungs- und Liegeboxenlaufställen für Milchkühe bezüglich ausgewählter Merkmale des Tierwohls und der Leistung.
- Anna-Lena Seibert (2020): Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen Milchqualität und Sauberkeit der Kühe in verschiedenen Haltungssystemen.
- Kathrin Bley (2021): Untersuchungen zu thermophilen (XTAS/TAS-) und Mastitis-Bakterien in Einstreumaterial und Tankmilch in europäischen Kompostierungsbetrieben.
- Larissa Kugler (2021): Auswirkungen bisheriger Testtagsleistungen von Milchkühen auf Zellfraktionen und bakteriologische Beschaffenheit von Viertelgemelken in Kompostierungs- und Liegeboxenlaufställen.

Masterarbeiten:

- Deike Harms (2019): Haltungssysteme im Vergleich – eine empirische Untersuchung zum Auftreten der Dermatitis digitalis in Liegeboxenlaufställen und Kompostierungsbetrieben in der Milchviehhaltung.
- Hendrik Willms (2020): Untersuchung der Zuchtziele europäischer Milchviehbetriebe mit Liegeboxenaufstallung oder Kompostierungsverfahren mittels Contingent Valuation Methode.
- Yeasmin Yahan (2020): Identification of Species of Thermophilic Aerobic Sporeformers (TAS) in a Compost Bedded Pack Dairy Barn.

Beiträge in wiss. begutachteten Zeitschriften:

- Patricia Wagner, Kerstin Brügemann, Tong Yin, Petra Engel, Christina Weimann, Karen Schlez, Sven König (2020): Microscopic differential cell count and specific mastitis pathogens in cow milk from compost-bedded pack barns and cubicle farms (eingereicht im Dezember 2020 im Journal of Dairy Research).
- Patricia Wagner, Kerstin Brügemann, Tong Yin, Petra Engel, Christina Weimann, Karen Schlez, Sven König (2021): Genome-wide association studies for udder health and specific mastitis pathogens in Holstein cows in compost-bedded pack and cubicle farming systems (in Arbeit).
- Isabella Giambra et al. (2021): Identification of thermophilic aerobic sporeformers in bedding material of compost-bedded dairy cows (in Arbeit).

Ko-Autorenschaft:

- Blanco-Penedo I, W Ouweltjes, E Ofner-Schröck, K Brügemann, U Emanuelson. (2020). Animal welfare in Free Walk systems in Europe. Journal of Dairy Science 103 (6): 5773-5782.
- Marija Klopčič, Karmen Erjavec, Megan Waldrop, Jutta Roosen, Petra Engel, Paul Galama and Abele Kuipers (2021): Consumers' and farmers' perceptions in Europe regarding the use of composted bedding material from cattle (eingereicht im April 2021 im Journal Sustainability).
- Jantine Middelkoop et al. (2021): Effects of composted bedding materials and reference manure/slurry on NPC balances (in Arbeit).

Die aufgeführten Manuskripte und im Bericht zitierte Literatur kann bei Bedarf zur Verfügung gestellt werden.

6. Tabellarische Aufführung durchgeführter Maßnahmen des Wissenstransfers bzw. Bildung/Weiterbildung im Einzelvorhaben und – sofern erfolgt – im Kontext des EU-Gesamtvorhabens

Maßnahme	Ort/Datum	Zielgruppe
Vorstellung des Projekts auf Veranstaltung des Innovations-teams Hessen	Langenselbold, 27.03.2018	Landwirte und Berater mit Interesse an Kompostierungsställen
<u>Newsletter:</u> 1. Einschätzung verschiedener Aspekte von Freilauf- (FreeWalk) und Liegeboxenlaufställen durch die Landwirte (Plus-Minus-Analyse) – erarbeitet durch Partner WUR 2. Thermophile Bakterien (XTAS) und Mastitis-Bakterien in Einstreumaterial und Milch von FreeWalk-Betrieben 3. Vergleichsanalyse für Leistungs-, Fruchtbarkeits- und Gesundheitsdaten aus den teilnehmenden Milchviehherden – erarbeitet durch Partner SLU 4. Überblick zum Stall- und Einstreuklima an 6 Besuchsterminen – erarbeitet durch Partner UniFi 5. Tierwohl-Erhebung – erarbeitet durch Partner SLU	April 2020 Juni 2020 Juni 2020 Juli 2020 Dezember 2020	Teilnehmende Projektbetriebe
Projektvorstellung im Kompaktmodul Milchrind	Göttingen/Witzenhausen, 11.03.2021	Masterstudenten
Beitrag auf der Bautagung Raumberg-Gumpenstein 2021 ONLINE	Raumberg-Gumpenstein, 19. und 20. Mai 2021	Lehrer*innen, Berater*innen und Interessierte
Session zum FREEWALK-Projekt auf der EAAP-Tagung 2020	Wegen der Corona-Pandemie auf 2021 verschoben	Wissenschaftliches Publikum
Abschlussworkshop	Hat wegen der Corona-Pandemie noch nicht stattgefunden	Projektpartner, Geldgeber, Berater

Die Meilensteine 7.1-7.9, die Projekttreffen, Beiratssitzungen und Workshops unter Beteiligung der Projektpartner betreffen, sind bis auf 7.4 (Abschlussworkshop), der aufgrund der Corona-Pandemie noch nicht stattgefunden hat, abgearbeitet.