

Aus dem Institut
für Tierernährung, Ernährungsschäden und Diätetik
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Veränderungen in der fäkalen Mikrobiota im Verlauf einer
zweijährigen energiereichen Fütterung bei Pferden und Ponys**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Katharina Langner
aus Hamburg

Leipzig, 2022

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. Ingrid Vervuert

Gutachter: Prof. Dr. Ingrid Vervuert, Institut für Tierernährung, Ernährungsschäden und Diätetik, Leipzig
Prof. Dr. Karl-Heinz Südekum, Institut für Tierwissenschaften, Bonn

Tag der Verteidigung: 30.11.2021

Inhaltsverzeichnis	Seite
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 Die Mikrobiota im Magen- Darm- Trakt (MDT) adulter Pferde	2
2.1.1 Definition	2
2.1.2 Mikrobielle Systematik und Ökologie	2
2.1.3 Zusammensetzung und Funktion	3
2.2 Veränderungen in der Mikrobiota des Dickdarms durch Futtermittel	7
2.2.1 Fütterung von Heu.....	7
2.2.2 Fütterung von Silage und Heulage	8
2.2.3 Stärkereiche Fütterung.....	8
2.3 Veränderungen in der Mikrobiota des Dickdarms bei Erkrankungen	11
2.3.1 Kolik	11
2.3.2 Durchfall	12
2.3.3 Hufrehe.....	13
2.3.4 Allergische Erkrankungen	14
2.4 Die Mikrobiota des MDT und Adipositas	14
2.4.1 Maus	14
2.4.2 Mensch	18
2.4.3 Pferd	19
3 Publikationen	22
3.1 Changes in the faecal microbiota of horses and ponies during a two- year body..... weight gain programme	22
3.2 Beeinflussung der equinen Mikrobiota durch Fütterung und Probiotika: aktueller ... Stand der Forschung und rechtliche Grundlagen	47
4 Diskussion	60
4.1 Veränderungen in der fäkalen equinen Mikrobiota	60
4.2 Veränderungen in der fäkalen SCFA Konzentration.....	63
4.3 Veränderungen in der fäkalen Laktatkonzentration.....	63

Inhaltsverzeichnis

4.4	Restriktionen der Studie.....	64
4.5	Schlussfolgerung.....	64
5	Zusammenfassung.....	66
6	Summary.....	68
7	Literaturverzeichnis.....	70
8	Danksagung.....	78

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	Adenosinmonophosphat aktivierte Proteinkinase
ANOVA	Analysis of Variance
ATP	Adenosintriphosphat
BCS	Body Condition Score
C2	Azetat
C3	Propionat
C4	Butyrat
C5	Valerat
CNS	Cresty Neck Score
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d.h.	Das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMS	Equines metabolisches Syndrom
Fiaf	Fasting induced adipositas factor
FROGs	Find rapidly Operational taxonomic units with Galaxy Solutions
g	Gramm
H ₂	Wasserstoff
HS	stärkereiche Ration
IC4	Isobutyrat
IC5	Isovalerat
kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
LS	stärkearme Ration
MDT	Magen-Darm-Trakt
ml	Milliliter
OP	Operation
OTU	Operational taxonomic unit
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit
qPCR	quantitative Polymerase Kettenreaktion
SCFA	Kurzkettige Fettsäuren

Abkürzungsverzeichnis

sp	Spezies
T1	Probennahme Zeitpunkt 1 nach 5 Monaten hochkalorischer Fütterung
T2	Probennahme Zeitpunkt 2 nach 11 Monaten hochkalorischer Fütterung
T3	Probennahme Zeitpunkt 3 nach 23 Monaten hochkalorischer Fütterung
Tab.	Tabelle
TS	Trockensubstanz
Uc	unbekannt
USA	United States of America
V	Variable Region

1 Einleitung

Laut aktuellen Studien aus den USA, Großbritannien und Australien sind 23- 32 % der Pferdepopulation übergewichtig (ROBIN et al. 2015, THATCHER et al. 2012, POTTER et al. 2016). Da Übergewicht beim Pferd mit Erkrankungen wie Insulin Dysregulation und Hufrehe assoziiert ist (ROBIN et al. 2015), stellt es ein großes Gesundheitsrisiko für die betroffenen Tiere dar. Besonders Ponys, die als „leichtfuttrig“ gelten und einen geringeren Energiebedarf pro kg metabolischer Körpermasse (KM) haben als Pferde (GFE 2014), sind öfters von Adipositas und den damit verbundenen Erkrankungen betroffen (LUTHERSSON et al. 2017, WYLIE et al. 2013, ROBIN et al. 2015).

Die Forschung im letzten Jahrzehnt bei Mäusen und Menschen hat gezeigt, dass die intestinale Mikrobiota und die KM miteinander verknüpft sind. Bei übergewichtigen Mäusen und Menschen konnte gezeigt werden, dass ihre Mikrobiota eine geringere Diversität besitzt (TURNBAUGH et al. 2009, TURNBAUGH et al. 2008). Außerdem kam das Phylum Firmicutes häufiger und das Phylum Bacteroidetes seltener in der Mikrobiota übergewichtiger Individuen vor (LEY et al. 2005, RIVA et al. 2016). In Studien mit keimfrei aufgezogenen Mäusen konnte eine geringere Gewichtszunahme dieser Tiere, verglichen mit Mäusen, deren Magen- Darm- Trakt (MDT) besiedelt ist, gezeigt werden (BÄCKHED et al. 2004, RABOT et al. 2010).

Bei der Untersuchung der fäkalen Mikrobiota bei übergewichtigen Pferden zeigte sich eine höhere Diversität in der Mikrobiota der übergewichtigen Pferde (MORRISON et al. 2018, BIDDLE et al. 2018). Bei der Zusammensetzung der unterschiedlichen Bakterienphyla in der fäkalen Mikrobiota kamen die Autoren zu unterschiedlichen Ergebnissen. Beim Phylum Bacteroidetes beobachtete BIDDLE et al. (2018) einen Abfall in der Mikrobiota übergewichtiger Pferde, während MORRISON et al. (2018) einen Anstieg zeigen konnte und zwei weitere Autoren (COLEMAN et al. 2019, SHEPHERD et al. 2014) keine Veränderungen in der fäkalen Mikrobiota unterschiedlicher Gewichtsklassen nachweisen konnten. Sowohl BIDDLE et al. (2018) als auch MORRISON et al. (2018) konnten in der fäkalen Mikrobiota übergewichtiger Pferde einen Anstieg des Phylums Firmicutes zeigen. MORRISON et al. (2018) konnten außerdem einen signifikanten Anstieg des Phylums Actinobacteria und einen signifikanten Abfall des Phylums Fibrobacteres in der Mikrobiota übergewichtiger Pferde nachweisen. Die unterschiedlichen Ergebnisse der aktuellen Studien zur fäkalen Mikrobiota übergewichtiger Pferde sind vermutlich auf die unterschiedlichen Fütterungsregime und Studiendesigns zurück zu führen.

Deshalb sollten im Rahmen dieser Studie bei kontrollierter Haltung und hochkalorischer Fütterung folgende Hypothesen überprüft werden: (1) Die equine fäkale Mikrobiota verändert sich im Laufe der Gewichtszunahme hin zu einer Zusammensetzung wie sie für adipöse Individuen beschrieben ist. (2) Ponys besitzen eine andere Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota als Pferde.

2 Literaturübersicht

2.1 Die Mikrobiota im Magen- Darm- Trakt (MDT) adulter Pferde

2.1.1 Definition

Der Begriff Mikrobiota beschreibt alle mikroskopisch sichtbaren, lebenden Organismen einer Region (STUDDERT et al. 2012). Dazu gehören beispielsweise im Dickdarm des Pferdes neben den Bakterien außerdem Protozoen, Viren, Pilze und Archaea (DOUGAL et al. 2012, PARK und KIM 2020). Während eine bakterielle Besiedelung beim Pferd für den gesamten MDT einschließlich des Magens beschrieben wurde (COSTA et al. 2015, ERICSSON et al. 2016), gibt es bis jetzt noch keine Studien zum Vorkommen der anderen Mikroorganismen der equinen Mikrobiota im Dünndarm oder Magen.

2.1.2 Mikrobielle Systematik und Ökologie

Die Bakterien, die den überwiegenden Bestandteil der equinen Mikrobiota darstellen (WEESE 2017), werden taxonomisch zunächst in Stämme (Phyla) unterteilt, die wiederum in Klassen mit unterschiedlichen Ordnungen gegliedert sind. Eine Ordnung enthält mehrere Familien, die verschiedene Gattungen (Genera) umfassen. Einem Genus können dann verschiedene Bakterienspezies (Arten) zugeordnet werden. Diese systematische Einteilung ist darum bemüht, die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen Organismen oder Organismengruppen wieder zu geben (KADEREIT 2008).

Um die Zusammensetzung der Mikrobiota in ihrer Gesamtheit zu vergleichen, ohne sich nur auf die Zu- oder Abnahme einzelner Phyla, Ordnungen, Klassen, Familien, Genera oder Spezies zu fokussieren, werden unterschiedliche Begriffe aus der mikrobiellen Ökologie angewendet (COSTA und WEESE 2018). Zum einem das Artenreichtum oder die Artenvielfalt. Dies ist definiert als die Anzahl aller Arten in einem Umfeld (KÖNIG 2008). Es kann entweder direkt ermittelt werden als „beobachtetes Artenreichtum“ durch Zählung aller Arten in einer Probe oder einem Probenpool. Davon zu unterscheiden ist das „geschätzte Artenreichtum“, dass aus dem „beobachten Artenreichtum“ errechnet wird und das wahre Artenreichtum wiedergeben soll, dass bei der Untersuchung der gesamten Population ermittelt worden wäre (COSTA und WEESE 2018). Zur Charakterisierung der equinen Mikrobiota wird entweder das „beobachtete Artenreichtum“ genutzt, dass aus der Anzahl der operativen taxonomischen Einheiten innerhalb einer Probe ermittelt wird oder das „geschätzte Artenreichtum“, dass über den Chao 1 Index errechnet wird (BIDDLE et al. 2018, ELZINGA et al. 2016, MORRISON et al. 2018). Ein weiterer wichtiger ökologischer Parameter ist die Gleichverteilung, ein Wert, der die relative Häufigkeit der Arten in einer Probe wiedergibt (COSTA und WEESE 2018). Aus dem Artenreichtum und der Gleichverteilung kann mit Hilfe unterschiedlicher Rechenmodelle die Diversität ermittelt werden. Diese ist umso größer je heterogener die Zusammensetzung der Gemeinschaft ist (KÖNIG 2008). Bei der Diversität wird zwischen der α - Diversität, die eine einzelne Proben oder ein Habitat betrachtet, und der β - Diversität, die größere Gruppen

miteinander vergleicht, unterschieden (COSTA und WEESE 2018). Eine verminderte Diversität der equinen Mikrobiota wurde bei stärkereicher Fütterung (WARZECHA et al. 2017, HANSEN et al. 2015), Kolik (STEWART et al. 2018), Equinem Metabolischen Syndrom (ELZINGA et al. 2016) und Durchfall (RODRIGUEZ et al. 2015) beschrieben.

2.1.3 Zusammensetzung und Funktion

Mittels Sequenzierung konnte eine bakterielle Besiedlung im kompletten MDT des Pferdes gezeigt werden, wobei die Diversität der Mikrobiota vom Magen in Richtung Dickdarm zu nimmt (COSTA et al. 2015). Es wurde des Weiteren gezeigt, dass es große Unterschiede hinsichtlich des Vorkommens unterschiedlicher Bakterienstämme in den verschiedenen Abschnitten des MDT gibt (siehe Tabelle (Tab.) 1). Im Magen und Duodenum dominiert der Stamm Firmicutes. Im Bereich von Jejunum und Ileum ist ebenfalls der Stamm Firmicutes vorherrschend, wobei dort auch der Stamm Proteobacteria ebenfalls sehr prominent ist. Ab dem Caecum, hinter der Ilocaecalklappe, ist der Stamm Proteobacteria deutlich seltener vertreten, während dort je nach Studie der Stamm Bacteroidetes (DOUGAL et al. 2013, ERICSSON et al. 2016, GLATTER et al. 2019) bzw. der Stamm Verrucomicrobia (COSTA et al. 2015) vermehrt auftritt und nach Firmicutes zu den am zweit häufigsten im Dickdarm auftretenden Bakterienstämmen zählt. Auch wenn die bakterielle Mikrobiota im Bereich des Dickdarms auf Ebene der Bakterienstämme relativ uniform ist, ergeben genauere Untersuchungen der verschiedenen Dickdarmabschnitte, dass deutliche Unterschiede zwischen der bakteriellen Mikrobiota auf Ebene der Bakterienfamilien und Gattungen proximal und distal der Flexura pelvina bestehen (DOUGAL et al. 2013, JULLIAND und GRIMM 2016). Deshalb können durch die Untersuchung von Kotproben lediglich zuverlässige Aussagen über die Mikrobiota der distalen Dickdarmabschnitte wie dem Colon dorsale und dem Colon descendens getroffen werden. Trotzdem konnten GRIMM et al. (2017) eine signifikante Korrelation zwischen der Mikrobiota von Caecum und Colon zeigen, sodass Kotproben als noninvasive Biomarker genutzt werden können.

Tab. 1: Prozentuale Zusammensetzung der intestinalen equinen Mikrobiota in unterschiedlichen Abschnitten des MDT (Uc= unbekanntes Genus das nur bis auf Ebenen der Familie oder Klasse zugeordnet werden konnte)

Magen (pars glandularis)				
		COSTA et al (2015)	ERICSSON et al. (2016)	GLATTER et al (2019)
Phylum	Firmicutes	95%	61,5%	92%
	Proteobacteria	2%	7,8%	3%
	Bacteroidetes		14,1%	2%
Genus	<i>Lactobacillus</i>	48%	Keine Zahlen angegeben	75%
	<i>Sarcina</i>	35%		
	<i>Streptococcus</i>	4%		
	Uc Ruminococcaceae			4%

Literaturübersicht

	Uc Lachnospiraceae <i>Xylanibacter</i>			2% 2,5%
--	---	--	--	------------

Dünndarm				
		COSTA et al (2015)	ERICSSON et al. (2016)	GLATTER et al (2019)
Phylum	Firmicutes	87%	13,5%	62%
	Proteobacteria	8%	14,1%	37%
	Verrucomicrobia	3%		
	Bacteroidetes		9,6%	2%
Genus	<i>Lactobacillus</i>	49%	Keine Zahlen angegeben	50%
	<i>Streptococcus</i>	21%		5%
	<i>5 genus incertea sedis</i>	2%		
	<i>Sarcina</i>	2%		
	Uc Clostridiales	2%		
	Uc Lachnospiraceae			15%

Caecum					
		COSTA et al. (2015)	ERICSSON et al. (2016)	GLATTER et al (2019)	DOUGAL et al. (2013)
Phylum	Firmicutes	48%	43,3%	75%	41%
	Proteobacteria	7%	12,4%	3%	2%
	Verrucomicrobia	8%			
	Spirochaetes	5%	2,5%	2%	4%
	Fibrobacteres	5%		2%	3%
	Bacteroidetes	5%	27,9%	18%	48%
	Synergistetes		2,6%		
	Tenericutes			2%	
Genus	Uc Clostridiales	12%	Keine Zahlen angegeben		Keine Zahlen angegeben
	Uc Lachnospiraceae	10%			
	<i>5 genus incertea sedis</i>	7%			
	Uc Ruminococcaceae	7%			
	<i>Sporobacter</i>	6%			
	<i>Fibrobacter</i>	4%			
	<i>Triponema</i>	4%			
	<i>Lactobacillus</i>				
	<i>Prevotella</i>			15%	
	<i>Ruminococcus</i>			2%	
	Uc Erysipelotrichaceae			6%	
	Uc S24-7			4%	
	<i>Xylanibacter</i>			9%	
				5%	

Colon ventrale			
		ERICSSON et al. (2016)	GLATTER et al (2019)
Phylum	Firmicutes	41,7%	78%
	Bacteroidetes	41%	18%
	Spirochaetes	6,7%	4%
	Verrucomicrobia	2,7%	
	Lentisphaerae		2%
	Fibrobacteres	2%	
Genus	Uc Lachnospiraceae	Keine Zahlen angegeben	35%
	<i>Lactobacillus</i>		10%
	Uc Ruminococcaceae		10%
	Uc S24-7		8%
	<i>Xylanibacter</i>		3%
	<i>RC gut group</i>		2%
	<i>Treponema</i>		3%
	<i>Ruminococcus</i>		3%
Colon dorsale			
		ERICSSON et al. (2016)	GLATTER et al (2019)
Phylum	Firmicutes	37,6%	72%
	Bacteroidetes	40,7%	22%
	Proteobacteria		2%
	Spirochaetes	4,5%	4%
	Verrucomicrobia	8,9%	
Genus	Uc Lachnospiraceae	Keine Zahlen angegeben	42%
	<i>Lactobacillus</i>		12%
	Uc Ruminococcaceae		5%
	Uc S24-7		7%
	<i>Xylanibacter</i>		3%
	<i>RC gut group</i>		2%
	<i>Treponema</i>		2%
	<i>Ruminococcus</i>		2%
Kleines Colon			
		COSTA et al. (2015)	DOUGAL et al. (2013)
Phylum	Firmicutes	43%	44%
	Bacteroidetes	3%	42%
	Proteobacteria	2%	2%
	Spirochaetes	8%	2%
	Fibrobacteres	8%	6%
	Verrucomicrobia	13%	
Genus	<i>5 genus incertea sedis</i>	22%	Keine Zahlen angegeben
	Uc Clostidiales	11%	
	<i>Treponema</i>	7%	
	Uc Lachnospiraceae	7%	
	Uc Ruminococcaceae	6%	
	<i>Fibrobacter</i>	6%	
	<i>Sporobacter</i>	2%	

Innerhalb des Bakterienstamms Firmicutes, der den dominierenden Stamm im MDT des Pferdes darstellt, ist die häufigste Bakterienklasse im Bereich von Magen und Duodenum Bacilli, während im Dickdarm die Klasse Clostridia deutlich dominiert (COSTA et al. 2015).

Die oben genannten Befunde beziehen sich dabei auf Pferde, die entweder aufgrund von Erkrankungen, die nicht mit dem MDT in Zusammenhang standen, eingeschläfert (ERICSSON et al. 2016, COSTA et al. 2015, DOUGAL et al. 2012) oder gesund zur Fleischgewinnung geschlachtet wurden (DOUGAL et al. 2013, GLATTER et al. 2019). Sofern Angaben zur Fütterung gemacht wurden, bestanden die Rationen der Pferde entweder aus Gras und Heu (DOUGAL et al. 2013), Heu und Hafer (GLATTER et al. 2019) oder aus Heu und teilweise kleinen Mengen Kraftfutter (DOUGAL et al. 2012, COSTA et al. 2015).

Im Gegensatz zu den körpereigenen Enzymen im Dünndarm, sind die Enzyme der cellulolytischen und fibrolytischen Bakterien im Dickdarm des Pferdes in der Lage die komplexen β -glykosidischen Bindungen der Strukturkohlenhydrate in den Pflanzenzellwänden zu spalten (BREVES 2015). Die entstandenen Spaltprodukte werden dann über eine anaerobe, mikrobielle Kohlenhydratfermentation weiter abgebaut (BREVES 2015). Dabei entstehen als wichtigste Endprodukte der Fermentation die kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) Azetat, Butyrat und Propionat. Des Weiteren werden Gase wie Methan, CO_2 und H_2 sowie geringe Mengen an Laktat und den SCFAs Isobutyrat, Valerat und Isovalerat gebildet (FRAPE 2010). Die im Dickdarm entstandenen SCFAs werden über die Caecum- und Colonmukosa in die Blutbahn resorbiert und leisten einen wichtigen Beitrag zur Energieversorgung der Pferde (ARGENZIO et al. 1974, STEVENS 1978). Propionat wird dabei vorwiegend von der Leber zur Gluconeogenese genutzt (SIMMONS und FORD 1985), während Azetat und Butyrat zur Fettsynthese genutzt werden (DEN BESTEN et al. 2013). Butyrat leistet außerdem einen wichtigen Beitrag zur Ernährung der Epithelzellen des Darmes und ist an der Regulation von Entzündungs- und Differenzierungsprozessen im Dickdarm beteiligt (SHIRAZI-BEECHEY 2008).

Anaerobe Pilze, Protozoen und Archaea, die nur einen sehr geringen Anteil an der intestinalen Mikrobiota des Pferdes haben (WEESE 2017), wurden in allen Abschnitten des Dickdarmes nachgewiesen (DOUGAL et al. 2012). Je nach Autor konnten 1 % (SHEPHERD et al. 2012) bis 1,4 % (PARK und KIM 2020) der im Kot ermittelten Sequenzen als Archaea identifiziert werden. Bei Untersuchungen der unterschiedlichen Dickdarmabschnitte wurden Protozoen und Archaea vorwiegend im Colon dorsale dextrum nachgewiesen (DOUGAL et al. 2012). MURA et al. (2019) zeigten bei der Untersuchung der anaeroben Pilze in den unterschiedlichen Dickdarm Abschnitten eines Pferdes, dass im Colon ventrale dextrum und im Colon dorsale dextrum mehr anaerobe Pilze auftraten als in den anderen Abschnitten des Dickdarms (MURA et al. 2019). DOUGAL et al. (2012) fanden hingegen bei der Untersuchung der intestinalen Mikrobiota von acht Pferden eine gleichmäßige Besiedelung aller Dickdarmabschnitte mit anaeroben Pilzen. Die anaeroben Pilze des MDT werden alle dem Stamm Neocallimastigomycota zugeordnet (LIGGENSTOFFER et al. 2010). Bei der Untersuchung der anaeroben Pilze in den unterschiedlichen Abschnitten des Dickdarmes zeigte sich, dass

61,7 % der gefundenen Sequenzen zu Genera gehören, die bis jetzt nicht kultiviert wurden (MURA et al. 2019). Unter diesen Genera war das Genus AL1 vorherrschend (MURA et al. 2019). Dies war ebenfalls eines der am häufigsten auftretenden Genera bei der Untersuchung der anaeroben Pilze in den Kotproben von drei Pferden (LIGGENSTOFFER et al. 2010). Dort trat jedoch neben AL1 auch das ebenfalls unkultivierte Genus AL3 häufig auf (LIGGENSTOFFER et al. 2010). Von den im Pferdekot vorkommenden Sequenzen wurden 0,5 % als Viren identifiziert (PARK und KIM 2020). Diese gehören zu 93,5 % zur Ordnung Caudovirales, die Doppelstrang DNA Viren umfasst (PARK und KIM 2020). Außerdem wurden in der fäkalen Mikrobiota des Pferdes 0,2 % Herpesvirales und 0,1 % Nidovirales nachgewiesen (PARK und KIM 2020).

Weitere wichtige Funktionen der intestinalen Mikrobiota sind die kompetitive Verdrängung pathogener Organismen und die Modulation des lokalen Immunsystems (COSTA und WEESE 2018).

2.2 Veränderungen in der Mikrobiota des Dickdarms durch Futtermittel

2.2.1 Fütterung von Heu

Studien, die mittels Sequenzierung die bakterielle Mikrobiota im Kot von ausschließlich mit Heu gefütterten Pferden untersuchten, ergaben, dass bei diesen der Stamm Firmicutes dominiert (Abbildung (Abb.) 1) (SCHOSTER et al. 2016, SHEPHERD et al. 2012, DOUGAL et al. 2014).

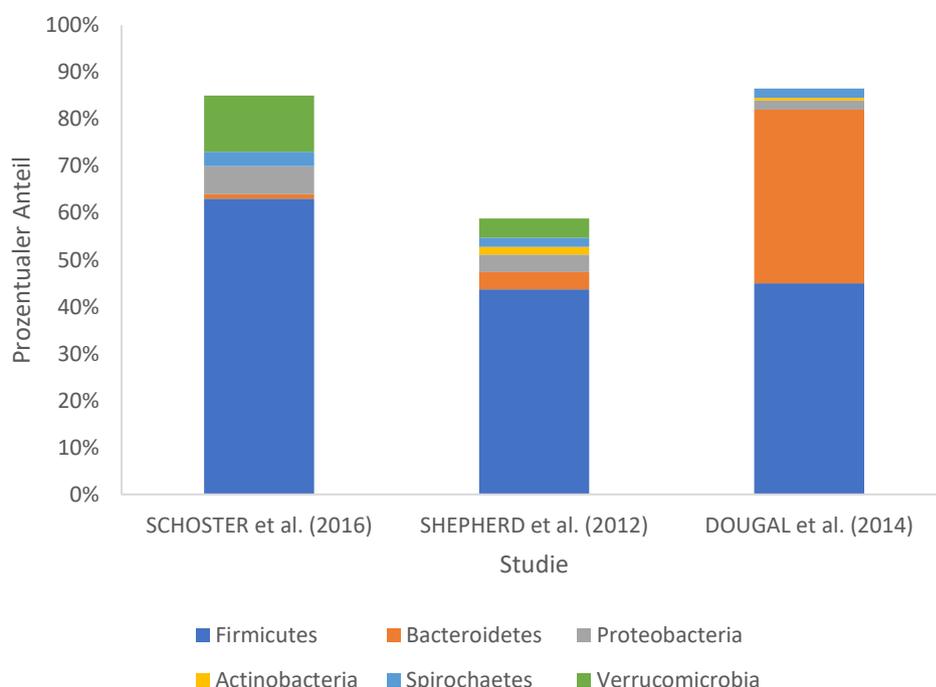


Abb. 1: Zusammensetzung der fäkalen equinen Mikrobiota bei Heufütterung (nach Daten von SCHOSTER et al. 2016, SHEPHERD et al. 2012 und DOUGAL et al. 2014)

Dieser grampositive Bakterienstamm wird bei Heufütterung vorwiegend durch die Klasse Clostridia repräsentiert (SCHOSTER et al. 2016). Obwohl zu dieser Klasse auch einige Spezies gehören, die Erkrankungen auslösen können, hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass die Clostridien in der Mikrobiota des equinen MDT vermutlich eine wichtige Rolle spielen. So werden beispielsweise die Bakterienfamilien Lachnospiraceae und Ruminococcaceae allgemein mit Darmgesundheit assoziiert (SCHOSTER et al. 2017, COSTA et al. 2012). Als zweithäufigster auftretender Bakterienstamm bei Heufütterung wurde in einigen Studien Verrucomicrobia (SCHOSTER et al. 2016, SHEPHERD et al. 2012) identifiziert, in einer anderen Untersuchung (DOUGAL et al. 2014) der Stamm Bacteroidetes.

2.2.2 Fütterung von Silage und Heulage

Silage weist im Vergleich zu Heu aufgrund der Herstellung durch Milchsäuregärung einen deutlich niedrigeren pH-Wert und geringere Zuckergehalte sowie höhere Laktat- und SCFA-Gehalte auf (MUHONEN et al. 2009, MÜLLER et al. 2008). Die aus stark getrocknetem Material hergestellten Heulagen bieten schlechtere Bedingungen für die Milchsäuregärung (HARRIS et al. 2017) und haben verglichen mit Silagen höhere pH-Werte und höhere Zuckergehalte sowie geringere Laktat- und SCFA-Gehalte (MUHONEN et al. 2009, MÜLLER et al. 2008). Mehrere Untersucher überprüften mittels Kultivierungsmethoden an fistulierten Pferden die Auswirkungen konservierter Futtermittel, die von der gleichen Anbaufläche gewonnen wurden, auf die Mikrobiota und das Milieu im Colon und Kot. Dabei konnten keine nennenswerten Veränderungen in den ersten 28 Stunden nach der Futterumstellung von Heu (Trockensubstanz (TS)-Gehalt 81%) auf Silage (TS-Gehalt 36%) oder Heulage (TS-Gehalt 55%) (MUHONEN et al. 2009) gezeigt werden. Bei der Fütterung über einen Zeitraum von 21 Tagen, konnten bei Heulage Fütterung weniger Streptokokken kultiviert werden, als bei der Fütterung von Heu oder Silage (MÜLLER et al. 2008). Da aber die Fütterung die Gesamtzahl der laktatproduzierenden Bakterien, zu denen die Streptokokken gehören, und die Laktatkonzentration im Colonchymus nicht signifikant beeinflusste, hat dieses Ergebnis vermutlich keine Relevanz.

2.2.3 Stärkereiche Fütterung

Pferde weisen, verglichen mit anderen Tierarten, im Speichel keine und im Dünndarm eine deutlich geringere Aktivität des Enzyms Amylase auf, welches für den Abbau von Stärke notwendig ist (COENEN 2020). Dies ist wahrscheinlich der evolutionären Anpassung des Pferdes an eine stärkearme Ration, die vorwiegend aus pflanzlichen Zellwandbestandteilen besteht, geschuldet (FRAPE 2010). Deshalb führt eine Fütterung von mehr als 2 g Stärke pro kg KM und Mahlzeit zu einem Überschreiten der präcaecalen Verdauungskapazität, sodass Stärke in den Dickdarm gelangt (JULLIAND et al. 2006). Verschiedene Autoren haben die Auswirkungen der Anflutung von Stärke in den Dickdarm auf die bakterielle Mikrobiota und das Milieu des Dickdarms untersucht. Dabei waren zunächst vorwiegend mit Hilfe von Kultivierungsmethoden die unterschiedlichen funktionellen Bakteriengruppen im Chymus des Caecums und Colons fistulierter

Pferde im Fokus. Die in den unten zitierten Studien eingesetzten Stärkemengen sind, sofern sie von den Autoren angegeben wurden, in Tab. 2 aufgeführt.

Durch die Anflutung von Stärke im Dickdarm wurde ein Anstieg der Stärke verwertenden Bakterien, zu denen auch *Lactobacillus* und *Streptococcus* gehören, beobachtet (DESTREZ et al. 2015, FOMBELLE et al. 2001, GRIMM et al. 2017, JULLIAND et al. 2001, DESTREZ et al. 2019). Diese Bakterien fermentieren Stärke und produzieren neben Gasen und SCFAs wie Propionat, hauptsächlich Laktat (JULLIAND et al. 2001, JULLIAND und GRIMM 2017). Als Konsequenz stärkereicher Mahlzeiten kommt es zu einer Erhöhung der Laktat-Konzentration im Dickdarm-Chymus (KRISTOFFERSEN et al. 2016, JULLIAND et al. 2001, FOMBELLE et al. 2001, DALY et al. 2012, GRIMM et al. 2017). Außerdem steigt die Gesamtzahl der anaeroben Bakterien an (JULLIAND et al. 2001, FOMBELLE et al. 2001, GRIMM et al. 2017, DESTREZ et al. 2015, DESTREZ et al. 2019). Dadurch, dass insgesamt mehr anaerobe Bakterien vorhanden sind, werden auch mehr SCFAs gebildet (HANSEN et al. 2015, GRIMM et al. 2017, FOMBELLE et al. 2001, JULLIAND et al. 2001, KRISTOFFERSEN et al. 2016, WARZECHA et al. 2017). Sowohl Laktat als auch die vermehrt gebildeten SCFAs führen zu einer Azidierung des Dickdarmmilieus, sodass es nach dem Überschreiten der vorhandenen Pufferkapazität zu einem Absinken des pH-Wertes im Dickdarm-Chymus kommt (KRISTOFFERSEN et al. 2016, HANSEN et al. 2015, JULLIAND et al. 2001). Durch das Absinken des pH-Wertes geht die Anzahl der für die Faserverdauung zuständigen cellulolytischen Bakterien, die säureintolerant sind, zurück (JULLIAND et al. 2001, GRIMM et al. 2017, DESTREZ et al. 2015, KRISTOFFERSEN et al. 2016, JULLIAND und GRIMM 2017). Säuretolerante Bakterien wie *Lactobacillus* und *Streptococcus* vermehren sich hingegen verstärkt (FOMBELLE et al. 2001). Des Weiteren kommt es zu einem Anstieg der laktat-verwertenden Bakterien (GRIMM et al. 2017, DESTREZ et al. 2015). Da die cellulolytischen Bakterien vorwiegend Azetat produzieren, während die laktat-verwertenden Bakterien vermehrt Propionat bilden (JULLIAND und GRIMM 2017), führt die veränderte Zusammensetzung der funktionellen Bakteriengruppen im Dickdarm auch zu einem veränderten Muster der von den Bakterien produzierten SCFAs.

Neuere Studien, die den Einfluss einer stärkereichen Fütterung mittels Sequenzierung im Chymus von Caecum und Colon untersucht haben, konnten zeigen, dass bei stärkereicher Fütterung die Diversität der bakteriellen Mikrobiota abnimmt (HANSEN et al. 2015, KRISTOFFERSEN et al. 2016, WARZECHA et al. 2017). Außerdem wurde auch mittels Sequenzierung ein Anstieg der laktat-produzierenden und stärkeverwertenden *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus*-Gruppe bei stärkereicher Fütterung festgestellt, während das cellulolytische Genus *Fibrobacter* seltener vorkam (DALY et al. 2012).

Auch in der fäkalen Mikrobiota konnte bei stärkereicher Fütterung sowohl mittels Kultivierung (GRIMM et al. 2017) als auch mittels Next Generation Sequencing (MORRISON et al. 2020a, BULMER et al. 2019) ein Anstieg von *Streptococcus* bei gleichzeitigem Abfall fibrolytischer Genera gezeigt werden.

Tab.2: Eingesetzte Stärkemenge in den oben zitierten Studien in g/kg KM je Mahlzeit (stärkearme Ration (LS), stärke reiche Ration (HS))

Autoren	Stärkemenge (g/kg KM je Mahlzeit)
MORRISON et al. (2020a)	2 g
BULMER et al. (2019)	LS 0,46 g oder HS 0,96 g morgens und abends
WARZECHA et al. (2017)	LS 0,45 g oder HS 0,9 g morgens und abends
GRIMM et al. (2017)	2,51 g morgens und 1,26 g abends
KRISTOFFERSON et al. (2016)	3 g
HANSEN et al. (2015)	1,68 g morgens, 1g mittags und 0,9 g abends
DESTREZ et al. (2015)	2,51 g morgens und 1,26 g abends
MURRAY et al. (2014)	LS 1,2 g oder HS 2,2 g
FOMBELLE et al. (2003)	2,86 g

Unterschiedliche Autoren haben den Einfluss der Verarbeitungsform, in der das stärkereiche, Futter angeboten wird, sowie der Stärkequelle auf die Mikrobiota untersucht. Dabei konnten, trotz höherer präcaecaler Verdaulichkeit von pelletierter (Stärke: 49 % der TS) und hydrothemisch aufgeschlossener (Stärke: 62,1 % der TS) Gerste, mittels Kultivierung in der fäkalen Mikrobiota keine Unterschiede zur Fütterung mit gemahlener (Stärke: 60,9 % der TS) oder unbearbeiteter (Stärke: 57,9 % der TS) Gerste festgestellt werden (PHILIPPEAU et al. 2015). Auch eine Studie, die mittels Kultivierung die Unterschiede eines pelletierten Kraftfutters auf Haferbasis (Stärke: 38 % der TS) und eines auf Mais und Weizen Basis (Stärke: 36 % der TS) verglich, konnte keine Unterschiede in der fäkalen Mikrobiota der beiden Fütterungsgruppen nachweisen (PYLES et al. 2019). Beim Vergleich der fäkalen Mikrobiota zwischen Pferden, die geschroteten Mais oder flockierten Hafer als Stärkequelle erhielten, konnten deutliche Unterschiede festgestellt werden. Dabei wurden die Stärkequellen entweder mit einem Stärkegehalt von 1 g/kg KM als stärkearme oder mit 2 g/kg KM als stärkereiche Ration gefüttert. Bei der Fütterung von Mais wurde bei beiden Rationen nach 6 und nach 13 tägiger Fütterung ein signifikanter Abfall der cellulolytischen Bakterien nachgewiesen, während bei der Fütterung von Hafer lediglich bei der stärkereichen Ration zwischen den letzten beiden Probenahme Zeitpunkten nach sechs und nach dreizehntägiger Fütterung ein signifikanter Abfall auftrat (HARLOW et al. 2016). Dies ist wahrscheinlich darauf zurück zu führen, dass Maisstärke im Dünndarm schlechter enzymatisch abgebaut werden kann als Haferstärke und deshalb bei Maisfütterung mehr unverdaute Stärke im Dickdarm anflutet (ROSENFELD und AUSTBØ 2009).

2.3 Veränderungen in der Mikrobiota des Dickdarms bei Erkrankungen

Sowohl bei intestinalen als auch bei extraintestinalen Erkrankungen wurden Änderungen in der bakteriellen Mikrobiota des Pferdes beobachtet. Dabei ist jedoch meist unklar, ob diese Veränderungen die Ursache für die Erkrankungen darstellen oder sekundär, durch mit der Erkrankung einher gehenden Schmerzreaktionen, Änderungen in der Darmmotilität und in der Futteraufnahme, auftreten (COSTA und WEESE 2018).

2.3.1 Kolik

Kolik ist ein unspezifisches Syndrom, das durch abdominalen Schmerz gekennzeichnet ist (WEESE 2017). Verschieden Autoren haben versucht hierbei die Rolle der Mikrobiota zu untersuchen. Allerdings ist ein limitierender Faktor der meisten Studien, dass sie unter Klinikbedingungen durchgeführt wurden und die untersuchten Patienten vor dem Einsetzen der Symptome und der Einlieferung in die Klinik unterschiedlich gehalten und gefüttert wurden (STEWART et al. 2020, STEWART et al. 2018, SALEM et al. 2019, VENABLE et al. 2013). In einer Studie, bei der die fäkale Mikrobiota während und nach einer nicht näher definierten Dickdarm Kolik untersucht wurde, konnte während der Kolikepisode vermehrt Bacteroidetes, *Clostridium phytofermans* sowie unkultivierte Bakterien aus dem Phyla Bacteroidetes und der Ordnung Clostridiales nachgewiesen werden (VENABLE et al. 2013). STEWART et al. (2018), die die fäkale Mikrobiota von Pferden, die aufgrund unterschiedlichster Ursachen Koliksymptome zeigten, mit der einer gesunden Kontrollgruppe verglichen, konnten eine geringere α -Diversität und Artenvielfalt bei den Kolikern nachweisen. In einer anderen Studie, die die Mikrobiota einer Kontrollgruppe mit Kolikern, die aufgrund einer Dickdarmverlagerung operiert wurden, untersuchte, konnte hingegen keine Veränderung in der Diversität der fäkalen equinen Mikrobiota nachgewiesen werden (SALEM et al. 2019). In den Proben des Coloninhaltes, die intra OP entnommenen wurden, sofern eine Indikation zur Colotomie vorlag, konnten SALEM et al. (2019) eine geringere Artenvielfalt nachweisen, nicht jedoch in den fäkalen Proben. Die Autoren konnten verschiedene Genera in der fäkalen Mikrobiota identifizieren, die zum größten Teil derzeit unklassifiziert sind, und deren Häufigkeit sich signifikant zwischen den beiden untersuchten Gruppen unterscheidet. Ein Vergleich zwischen der fäkalen Mikrobiota bei der Ankunft der Pferde in der Klinik zur Koliikbehandlung und am 3. Tag vor ihrer Entlassung, zeigte eine Abnahme der Artenvielfalt (STEWART et al. 2020). Des Weiteren waren Artenvielfalt und α -Diversität geringer bei Pferden, die < 60 Stunden Koliksymptome zeigten, als bei Pferden die > 60 Stunden kolikten. Über eine Hauptkoordinaten und Varianzanalyse konnte außerdem gezeigt werden, dass sich die Struktur der bakteriellen Mikrobiota bei unterschiedlicher Länge der Kolikepisodes und Lokalisationen der Koliikursache, signifikant unterschied (STEWART et al. 2020).

WEESE et al. (2015) sammelten Kotproben von 13 Tieren zu, die im Schnitt 17,5 Tage nach Entnahme der Kotproben Koliiksymptome zeigten. Diese Kotproben wurden mit Kotproben von tragenden Stuten, die auf

derselben Farm gehalten wurden und dasselbe Futter erhielten, verglichen. Dabei kam in den Kotproben, die vor dem Auftreten einer Kolikepisode genommen wurden, vermehrt das Phylum Proteobacteria vor. Dies deckt sich auch mit den Daten von STEWARD et al. (2020), die einen Anstieg des Phylums Proteobacteria von der Aufnahme der Kolikpatienten in die Klinik bis zu ihrer Entlassung zeigen. Ein Unterschied in der Diversität und Artenvielfalt der fäkalen Mikrobiota wurde hingegen bei WEESE et al. (2015) nicht beobachtet. Wenn man nur die fünf Stuten betrachtete, die spätestens 10 Tage nach der Probennahme eine Kolik entwickelten, dann zeigte sich nicht nur ein Anstieg des Phylums Proteobacteria, sondern auch ein Absinken der Phyla Firmicutes, Bacteroidetes und Tenericutes (WEESE et al. 2015). Außerdem traten die Genera *Ruminococcus*, *Acetivibrio*, unklassifizierte Sphingobacteriales und unklassifizierte Bacteroidales seltener bei den Stuten auf, die eine Kolik entwickelten, während die Genera *Rhodopseudomonas*, *Enhydrobacter* und unklassifizierte Enterobacteriaceae häufiger vorkamen (WEESE et al. 2015).

2.3.2 Durchfall

Bei Pferden, die an Durchfall litten, zeigten sich im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren teilweise schon auf Ebene der Bakterienstämme Unterschiede in der Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota (COSTA et al. 2012, MCKINNEY et al. 2020). Die in den verschiedenen Studien gefundenen Veränderungen waren jedoch nicht einheitlich. Dies könnte damit zusammenhängen, dass auch diese Studien unter Klinikbedingungen durchgeführt wurden und die untersuchten Patienten vor dem Einsetzen der Symptome und der Einlieferung in die Klinik unterschiedlich gehalten und gefüttert wurden. COSTA et al. (2012) zeigte, dass Pferde mit Durchfall mehr Bakterien des Phylums Fusobacteria im Kot hatten und weniger Bakterien der Stämme Actinobacteria und Spirochaetes verglichen mit gesunden Kontrollpferden. Bei MCKINNEY et al. (2020) konnten hingegen bei Pferden mit Durchfall ein geringeres Vorkommen des Stammes Verrucomicrobia nachgewiesen und keine Veränderung in den Phyla Fusobacteria, Actinobacteria und Spirochaetes. Außerdem wurde bei Pferden, die eine Durchfallepisode überlebten, ein Anstieg des Phylums Verrucomicrobia beobachtet, während der Durchfallscore sank (MCKINNEY et al. 2020). ARROYO et al. (2020) konnten hingegen keine Unterschiede auf Phylum- Ebene detektieren. Auf Ebene der Genera konnten COSTA et al. (2012) und ARROYO et al. (2020) einen Anstieg des Genus *Fusobacterium* bei Durchfallpatienten nachweisen. In der Studie von COSTA et al. (2012) war die Bakterienklasse Clostridia bei gesunden Pferden häufiger vertreten. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen anderer Autoren, die in der fäkalen Mikrobiota der gesunden Tiere vermehrt unbekannte Genera isolieren konnten, die den zur Klasse Clostridia gehörenden Familien Lachnospiraceae (COSTA et al. 2012, ARROYO et al. 2020) und Ruminococcaceae (RODRIGUEZ et al. 2015) zuzuordnen waren. In Hinblick auf die Zusammensetzung des Mikrobioms konnte RODRIGUEZ et al. (2015) bei Durchfallpatienten eine geringere Artenvielfalt und Diversität nachweisen. Andere Autoren konnten dies jedoch nicht bestätigen (COSTA et al. 2012, ARROYO et al. 2020, MCKINNEY et al. 2020).

2.3.3 Hufrehe

Veränderungen in der Mikrobiota durch stärkereiche Rationen werden vielfach mit der Auslösung von Hufreihen in Verbindung gebracht (BAILEY et al. 2004). Autoren, die die equine Mikrobiota während der experimentellen Auslösung einer Hufrehe durch eine Überlastung des MDT mit Oligofruktose (10 g /kg KM) untersucht haben, konnten unmittelbar vor dem Eintreten der Hufrehesymptomatik einen Anstieg des *Streptokokkus bovis/equinus* Komplexes im Caecum-Chymus und im Kot der Pferde feststellen (MILINOVICH et al. 2008). Durch den Anstieg dieser Laktat-produzierenden Bakterien konnte eine Zunahme der Laktat-Konzentration und ein Absinken des pH-Wertes auf bis zu vier im Caecum Chymus der Versuchspferde gemessen werden (MILINOVICH et al. 2006). Dieser niedrige pH-Wert im Dickdarm und die hohe Laktat-Konzentration führen zu einer erhöhten Permeabilität der Darmmukosa (BAILEY et al. 2004). Dadurch können vermutlich sowohl bakterielle Endotoxine, die durch den Zerfall von Bakterien im Darm entstehen, sowie bakterielle Exotoxine und Monoamine, die von den Darmbakterien gebildet werden, vermehrt in die Blutbahn der Pferde gelangen (BAILEY et al. 2004). Die genannten Toxine und Monoamine werden als Triggerfaktoren bei der Auslösung der Hufrehe diskutiert, wobei die Rolle der einzelnen Faktoren bis jetzt nicht abschließend geklärt werden konnte (BAILEY et al. 2004, Patterson-Kane et al. 2018).

Nach Eintreten der Hufrehe Symptomatik sank im weiteren Verlauf die Konzentration von *Streptokokkus* wieder ab und es folgte ein Anstieg von *Laktobazillus* und Enterobacteriaceae (MILINOVICH et al. 2008, MILINOVICH et al. 2007).

Bei der vergleichenden Untersuchung der caecalen Mikrobiota von gesunden Kontrollpferden und Pferden, bei denen durch eine Überlastung des MDTs mit Stärke (15 g Maisstärke /kg KM) oder Oligofruktose (10 g /kg KM) eine Hufrehe induziert wurde, konnte mittels Sequenzierung neben einem Anstieg von *Lactobacillus* sp. und *Streptococcus* sp. auch ein Anstieg von *Veillonella* sp. und *Serratia* sp. nachgewiesen werden (MOREAU et al. 2014). Da in dieser Studie jedoch nicht mit fistulierten Pferden gearbeitet wurde, erfolgte lediglich eine Probennahme nach Schlachtung der Tiere, sodass eine zeitlich Korrelation zwischen dem Einsetzen der Hufrehesymptomatik und den Veränderungen der caecalen Mikrobiota nicht möglich war.

Eine weitere Studie hat die fäkale, bakterielle Mikrobiota von Pferden, die chronisch an Hufrehe leiden, mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen (STEELMAN et al. 2012). Dabei wurden zwei unbekannte Genera der Ordnung Clostridiales gefunden, die bei den Hufrehepatienten signifikant häufiger auftraten. Außerdem zeigte sich in der Hufrehe Gruppe eine höhere Diversität der bakteriellen Mikrobiota als in der Kontrollgruppe (STEELMAN et al. 2012).

2.3.4 Allergische Erkrankungen

Mehrere Autoren beschäftigten sich mit den Auswirkungen von allergischen Erkrankungen wie Cullicoides Hypersensitivität (KAISER-THOM et al. 2020) und Equinem Asthma (KAISER-THOM et al. 2020, LECLERE und COSTA 2020) auf die fäkale und mukosale Mikrobiota. Während bei Cullicoides Hypersensitivität und Asthma gegenüber den gesunden Kontrolltieren keine Veränderungen bei symptomfreien Tieren in der rektalen mukosalen Mikrobiota auftraten (KAISER-THOM et al. 2020), fanden LECLERE und COSTA (2020) vor allem bei Pferden mit progredientem Krankheitsverlauf Unterschiede in der fäkalen Mikrobiota. Dabei wurde ebenfalls die Differenzen in der Mikrobiota der Asthmatiker und einer gesunden Kontrollgruppe, die identisch gefüttert und aufgestallt wurden, ermittelt. Bei Weidehaltung der Pferde, die dazu führte, dass die Tiere, die an equinem Asthma erkrankt waren, kaum Symptome zeigten, wurden 2 Genera gefunden, die vermehrt in der fäkalen Mikrobiota der erkrankten Pferde auftraten (LECLERE und COSTA 2020). Bei Haltung im Stall und bei Fütterung eines staubigen Heus, zeigten die Asthmatiker vermehrt Symptome und es wurden 9 Genera gefunden, die vermehrt in ihrer fäkalen Mikrobiota auftraten (LECLERE und COSTA 2020). Diese Genera waren zum Großteil unbekannt und konnten dem Stamm Firmicutes zugeordnet werden (LECLERE und COSTA 2020).

2.4 Die Mikrobiota des MDT und Adipositas

2.4.1 Maus

In einer der ersten Studien, die einen Zusammenhang zwischen der bakteriellen Besiedlung des MDT und der Gewichtsentwicklung herstellte, wurden keimfrei aufgezogene Mäuse im Vergleich zu konventionell aufgezogenen Mäusen untersucht (BÄCKHED et al. 2004). Dabei zeigte sich, dass trotz Aufnahme einer geringeren Futtermenge, die konventionell aufgezogenen Tiere in der achten bis zehnten Lebenswoche 42% mehr Körperfett besaßen als ihre keimfrei aufgezogenen Artgenossen. Eine vierzehntägige Besiedelung des MDT der keimfrei aufgezogenen Mäuse mit einer Mikrobiota, die aus dem Caecum konventionell aufzogener Mäuse gewonnen wurde, führte bei geringerer Futteraufnahme zu einem Anstieg des Körperfettgehaltes um 57 %. Dadurch gab es keinen signifikanten Unterschied mehr in der KM der konventionell und der keimfrei aufgezogenen Mäuse (BÄCKHED et al. 2004). Eine 28-tägige Besiedelung des MDT der keimfreien Mäuse mit der caecalen Mikrobiota konventioneller Mäuse, führte zu keinem weiteren Anstieg des Körperfettgehaltes. Auch eine zweiwöchige Besiedelung des MDTs der keimfrei aufgezogenen Mäuse ausschließlich mit der Spezies *B. thetaiotaomicron* führte zu einem Anstieg des Körperfettgehaltes. Dieser Anstieg fiel jedoch mit 23% deutlich geringer aus als bei der Besiedelung des MDTs mit der kompletten Mikrobiota, die aus dem Caecum konventioneller Mäuse gewonnen wurde (BÄCKHED et al. 2004).

Während andere Autoren (RABOT et al. 2010, SCHÉLE et al. 2013) die ebenfalls mit dem Mäusestamm C57BL/6J gearbeitet haben, bei Aufnahme eines fettreichen oder konventionellen Mäusefutters, bei den

keimfrei aufgezogenen Mäusen eine geringere Gewichtszunahme beschrieben, kamen FLEISSNER et al. (2010), die mit dem Mäusestamm C3H arbeiteten, zu anderen Ergebnissen. FLEISSNER et al. (2010) konnten lediglich bei Fütterung einer Ration, die die westliche Ernährungsweise mit hohen Fett- und Zuckergehalten imitiert, eine verminderte Gewichtszunahme der keimfrei aufgezogenen Mäuse im Vergleich zu den konventionell aufgezogenen Mäusen zeigen (FLEISSNER et al. 2010). Bei Fütterung einer fettarmen Diät konnten bei identischer Futteraufnahme keine Unterschiede in der Gewichtszunahme von keimfrei und konventionell aufgezogenen Mäusen nachgewiesen werden. Bei Gabe einer fettreichen Diät zeigten hingegen die keimfrei aufgezogenen Mäuse eine höhere Gewichtszunahme als ihre konventionell aufgezogenen Artgenossen (FLEISSNER et al. 2010).

BÄCKHED et al. (2007) konnten zeigen, dass die Energiegehalte im Kot der keimfrei und konventionell aufgezogenen Mäuse identisch sind. Andere Autoren (RABOT et al. 2010) bezweifelten jedoch, dass eine Bestimmung des Energiegehaltes im Kot aussagekräftig ist, da der Kot der keimfrei und der konventionell aufgezogenen Tiere sehr unterschiedlich zusammengesetzt ist. Der Kot der keimfrei aufgezogenen Mäuse enthält hauptsächlich Mucine und unverdaute Pflanzenbestandteile, die normalerweise durch die bakterielle Mikrobiota fermentiert werden, während die bakteriellen Bestandteile, die im Kot der konventionell aufgezogenen Tiere vorkommen, fehlen. Deshalb bestimmten RABOT et al. (2010) die Menge der ausgeschiedenen Lipide im Kot. Dabei konnten sie feststellen, dass die keimfrei aufgezogenen Tiere 40 % mehr Lipide mit dem Kot ausschieden als konventionell aufgezogenen Mäuse. Vor allem die Cholesterolausscheidung war signifikant höher bei den keimfrei aufgezogenen Mäusen als bei konventionell aufgezogenen Mäusen (RABOT et al. 2010).

BÄCKHED et al. (2007) konnten außerdem zwei mit der Lipidsynthese im Zusammenhange stehende Faktoren identifizieren, die bei den keimfrei und konventionell aufgezogenen Mäusen in unterschiedlichen Konzentrationen auftraten. Zum einen der Fasting induced adipose factor (Fiaf), der bei den keimfrei aufgezogenen Tieren vermehrt auftrat, und über eine Inhibierung der Lipoprotein Lipase die Speicherung von Fetten hemmt. FLEISSNER et al. (2010) konnten jedoch unabhängig von der Gewichtsentwicklung der Tiere generell höhere Fiaf Konzentrationen bei den keimfrei aufgezogenen Mäusen messen, sodass die Rolle von Fiaf fraglich bleibt. Außerdem wiesen BÄCKHED et al. (2007) eine vermehrte Aktivität der AMP activated Proteinkinase (AMPK) bei den keimfrei aufgezogenen Individuen nach. Die AMPK überwacht den Energiestatus der Zelle und hemmt anabole, ATP verbrauchende und KM aufbauende Stoffwechselforgänge, während sie katabole, ATP produzierende und KM abbauende, Vorgänge fördert (BÄCKHED et al. 2007).

Zur weiteren Abklärung des Einflusses der Mikrobiota auf die Gewichtsentwicklung der Mäuse wurden außerdem Untersuchungen zur Expression verschiedener Peptide, die für die Regulation der Futteraufnahme verantwortlich sind, im Hirnstamm, Hypothalamus (SCHÉLE et al. 2013) und Darm (DUCA

et al. 2012) durchgeführt. Dabei konnte im Darm keimfrei aufgezogener Mäuse eine verminderte Expression von sättigungsassoziierten Peptiden wie Cholecystokenin, Peptide YY und Glucagon like Peptide - 1 nachgewiesen werden (DUCA et al. 2012). Dies lässt sich dadurch erklären, dass von der Mikrobiota produzierte SCFAs als Liganden der Fettsäure Rezeptoren fungieren und durch Aktivierung dieser Rezeptoren eine Ausschüttung der sättigungsassoziierten Peptide herbeirufen (SAMUEL et al. 2008). Bei der Untersuchung der Futteraufnahme regulierenden Peptide im Hirnstamm und Hypothalamus kamen die Autoren hinsichtlich der Fragestellung, ob diese für die unterschiedliche Gewichtsentwicklung der konventionell und keimfrei aufgezogenen Mäuse verantwortlich sind, zu keinem eindeutigen Ergebnis. Einige Faktoren, die die Entwicklung von Fettleibigkeit hemmen, wurden vermehrt bei den konventionell aufgezogenen Mäusen nachgewiesen und andere vermehrt bei den keimfrei aufgezogenen Tieren (SCHÉLE et al. 2013). Auffällig war jedoch, dass eine externe Zufuhr des Hormones Leptin bei den konventionell aufgezogenen Mäusen zu einer geringeren Gewichtsreduktion und Reduktion von Appetit stimulierenden Peptiden führte, als bei den keimfrei aufgezogenen Tieren (SCHÉLE et al. 2013).

Versuche mit Mäusen, die durch eine Mutation im Bereich des Lepinrezeptors zu Hyperphagie und Fettleibigkeit neigen, und konventionellen Mäusen, zeigten Unterschiede in der Zusammensetzung der Mikrobiota (LEY et al. 2005). Im Gegensatz zu ihren dünnen Artgenossen, die mit demselben Futter gefüttert wurden, konnten im Caecum der übergewichtigen Mäuse 50 % weniger Bakterien gefunden werden, die zum Phylum Bacteroidetes gehörten, während signifikant mehr Bakterien auftraten, die dem Phylum Firmicutes zuzuordnen waren (LEY et al. 2005). Die Zunahme der Bakterien im Phylum Firmicutes gestaltete sich dabei homogen ohne vermehrtes Auftreten einer speziellen Subgruppe (LEY et al. 2005).

Bei keimfrei aufgezogenen Mäusen, die entweder die Mikrobiota von Mäusen erhielten, die durch genetische Defekte im Leptinrezeptor übergewichtig waren oder von normalgewichtigen Tieren, zeigten sich Unterschiede in der Gewichtsentwicklung (TURNBAUGH et al. 2006). Die Tiere, die die Firmicutes dominierte Mikrobiota von übergewichtigen Tieren erhielten, zeigten bei Aufnahme von identischen Futtermengen nach vierzehn Tagen eine signifikant höhere Zunahme an Körperfett. Dies führten die Autoren auf eine höhere Energieausbeute der Mikrobiota der übergewichtigen Tiere zurück, da im Mikrobiom der übergewichtigen Mäuse vermehrt Kopien von Genen, die für Stärke spaltende sowie Azetat und Butyrat produzierende Enzyme codieren, zu finden waren (TURNBAUGH et al. 2006). Außerdem fanden sich im Caecum der übergewichtigen Tiere höhere Azetat und Propionat Konzentrationen. Des Weiteren wurde mittels Untersuchungen im Bombenkalorimeter ein geringerer Energiegehalt im Kot der übergewichtigen als im Kot der schlanken Mäuse gemessen (TURNBAUGH et al. 2006).

Bei dem Vergleich von keimfrei aufgezogenen Mäusen, die alle dieselbe Mikrobiota konventionell aufgezogener Mäuse erhielten, zeigten sich ebenfalls Veränderungen in der Mikrobiota der Individuen, die nach Aufnahme einer hochkalorischen Diät fettleibig wurden (TURNBAUGH et al. 2008). Die

übergewichtigen Tiere, die im Gegensatz zu ihren Artgenossen ein fett- und zuckerreiches Futter erhielten, hatten ähnlich wie ihre Artgenossen, die durch einen Defekt im Leptinrezeptor übergewichtig wurden (TURNBAUGH et al. 2006), mehr Bakterien des Phylums Firmicutes in ihrem Caecum, wobei es gleichzeitig zu einer Reduktion der Bakterien des Phylums Bacteroidetes kam. Im Gegensatz zu ihren übergewichtigen Artgenossen mit dem Defekt im Leptinrezeptor, nahmen die Bakterien des Phylums Firmicutes jedoch nicht homogen zu. Stattdessen kam es zu einem vermehrten Auftreten von Bakterien der Klasse Mollicutes. Dies führte zu einer deutlichen Reduktion der Diversität in der Mikrobiota im MDT der übergewichtigen Mäuse (TURNBAUGH et al. 2008).

Auch FLEISSNER et al. (2010) beobachteten bei Mäusen, die durch Fütterung mit einer fettreichen Diät oder einer Diät, die die westliche Ernährungsweise imitiert, übergewichtig wurden, eine Zunahme des Phylums Firmicutes mit dem vermehrten Auftreten einer Familie. Sie konnten ein drei- bis siebenfach häufigeres Auftreten der Familie Erysipelotrichaceae nachweisen, was ebenfalls die Diversität der bakteriellen Mikrobiota reduzierte (FLEISSNER et al. 2010). Die Reanalyse der als Mollicutes beschriebenen Bakterien (TURNBAUGH et al. 2006) zeigte, dass diese ebenfalls zum größten Teil zu der Familie Erysipelotrichaceae gehören (FLEISSNER et al. 2010).

Andere Autoren konnten zeigen, dass auch bei Mäusen die Zusammensetzung des Futters die Zusammensetzung der Mikrobiota maßgeblich beeinflusst (RAVUSSIN et al. 2012, HILDEBRANDT et al. 2009, XIAO et al. 2017). Dabei führte auch die Verabreichung einer fettreichen Ration bei den Mäusen, unabhängig vom Gewicht, zu einem Anstieg der Phyla Firmicutes (HILDEBRANDT et al. 2009, RAVUSSIN et al. 2012) und Proteobacteria (HILDEBRANDT et al. 2009). Daher ist es fraglich, ob die Änderungen der Mikrobiota die TURNBAUGH et al. (2008) und FLEISSNER et al. (2010) bei den durch Fütterung übergewichtigen Mäusen beobachtet haben, auf die Fütterung oder das Übergewicht der Tiere zurück zu führen sind.

Bei übergewichtigen Mäusen, deren Magen verkleinert wurde und die anschließend eine Gewichtsreduktion zeigten, kam es im Vergleich mit einer scheinoperierten Kontrollgruppe ebenfalls zu Veränderungen in der Mikrobiota, unabhängig von der Ration, die die Tiere erhielten (LIOU et al. 2013). Dabei fanden sich in der fäkalen Mikrobiota der operierten Mäuse auf dem Phylum Level vermehrt Verrucomicrobiota, Bacteroidetes und Proteobacteria. Auf dem Genera Level traten korrelierend dazu vermehrt *Alistipes*, *Akkermansia* und *Escherichia* auf. Außerdem wurde ein vermehrtes Vorkommen von Archaea in den Fäzes der operierten Mäuse beobachtet (LIOU et al. 2013). Anschließend wurde die Mikrobiota in keimfrei aufgezogene Mäuse transplantiert. Dabei zeigte sich bei den keimfrei aufgezogenen Mäusen, die die Mikrobiota der Mäuse mit Magenverkleinerung erhielten, innerhalb von zwei Wochen eine signifikante Gewichtsreduktion. Das Gewicht der keimfreien Tiere, die die Mikrobiota der Kontrollgruppen erhielten, änderte sich hingegen nicht (LIOU et al. 2013).

2.4.2 Mensch

Einigen Autoren (RIVA et al. 2016, KOLIADA et al. 2017, LEY et al. 2006) konnten in der fäkalen Mikrobiota übergewichtiger Menschen, verglichen mit einer dünnen Kontrollgruppe, mehr Bakterien des Phylums Firmicutes und weniger Bakterien des Phylums Bacteroidetes nachweisen. Andere Autoren konnten jedoch lediglich ein vermindertes Auftreten des Phylums Bacteroidetes in der fäkalen Mikrobiota von übergewichtigen Menschen nachweisen (ARMOUGOM et al. 2009, KASAI et al. 2015, TURNBAUGH et al. 2009, XU et al. 2012, MILLION et al. 2013). Bei anderen Autoren konnten hingegen auf Phylum-Ebene keine Unterschiede in der fäkalen Mikrobiota der unterschiedlichen Gewichtsgruppen gefunden werden (DUNCAN et al. 2008, FERNANDES et al. 2014, TIMS et al. 2013, WALTERS et al. 2014, MILLION et al. 2012). Als eine Ursache für diese widersprüchlichen Ergebnisse zur Zusammensetzung der Mikrobiota bei übergewichtigen Menschen, wird die unterschiedliche Ernährung der Probanden angeführt (GRAHAM et al. 2015). Denn obwohl auch beim Menschen der Einfluss der Ernährung auf die fäkale Mikrobiota belegt ist (DAVID et al. 2014), gibt es kaum Studien in denen die Probanden vor Abgabe der Stuhlproben eine standardisierte Diät aufnahmen. Allerdings konnte bei der Besiedelung von keimfrei aufgezogenen Mäusen mit der Mikrobiota von Zwillingen, die eine unterschiedliche Gewichtsentwicklung zeigten, eine höhere Fettmasse bei den Mäusen, die die Mikrobiota des übergewichtigen Zwillings erhielten, nachgewiesen werden (RIVA et al. 2016). Dabei zeigte sich keine erhöhte Futteraufnahme bei den Mäusen, die die Mikrobiota des übergewichtigen Zwillings erhalten hatten (RIDAURA et al. 2013). Dies deutet darauf hin, dass auch wenn die Ergebnisse der Studien teilweise widersprüchlich sind, es doch einen Einfluss der Mikrobiota des Menschen auf die Gewichtsentwicklung gibt.

Mehrere Autoren zeigten außerdem, dass die Diversität der fäkalen Mikrobiota bei übergewichtigen Individuen im Vergleich zu einer normalgewichtigen Kontrollgruppe geringer ist (TURNBAUGH et al. 2009, MENNI et al. 2017).

Bei Menschen, die nach einer operativen Magenverkleinerung Gewicht verlieren, können sowohl im Vergleich zum Ausgangszustand als auch im Vergleich zu Kontrollgruppen mit gleichem Body Mass Index, Veränderungen in der fäkalen Mikrobiota festgestellt werden. Einige Autoren konnten Änderungen im Auftreten der Phyla Proteobacteria (TREMAROLI et al. 2015, KONG et al. 2013, CAMPISCIANO et al. 2018) und Bacteroidetes (FURET et al. 2010, MURPHY et al. 2016) in der fäkalen Mikrobiota der Probanden nach der OP feststellen. Dabei kam es, zum Teil auch in Abhängigkeit von den angewendeten Operationsmethoden (MURPHY et al. 2016, CAMPISCIANO et al. 2018), entweder zu Anstiegen oder Abfällen dieser Phyla in der fäkalen Mikrobiota der Probanden. Bei Übertragung der fäkalen Mikrobiota der Probanden und einer übergewichtigen Kontrollgruppe auf keimfrei aufgezogene Mäuse, zeigte sich eine verminderte Fettmasse bei den Tieren, die die Mikrobiota operierter Probanden erhielten (TREMAROLI et al. 2015). Diese Tiere wiesen, bei einer Futteraufnahme, die jener der anderen Mäuse entsprach, außerdem

einen geringeren Gehalt von SCFAs im Kot auf, sodass diese Ergebnisse möglicherweise auf eine schlechtere energetische Ausbeute der Nahrung zurück zu führen sind (TREMAROLI et al. 2015).

2.4.3 Pferd

Zurzeit existieren nur wenige Studien zur Mikrobiota bei übergewichtigen Pferden, die zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen (siehe Tab. 3). Eine Studie vergleicht normal- und übergewichtige Stuten miteinander (SHEPHERD et al. 2014). Dabei wurden die Verdaulichkeit von Heu, die SCFA Konzentration in Kot und Blut, sowie mittels qPCR das Vorkommen der Bakterienphyla Firmicutes und Bacteroidetes sowie das Auftreten der fibrolytischen Bakterien *Fibrobacter succinogines* und *Ruminococcus flavefacines* und die Gesamtzahl der im Kot vorkommenden Bakterien untersucht. Während in den Fäzes keine signifikanten Veränderungen auftraten, zeigte sich im Blutplasma der übergewichtigen Stuten eine höhere Azetat Konzentration. Dabei ist jedoch unklar, ob diese höhere Azetat Konzentration im Plasma auf eine höhere Azetat Aufnahme aus dem Darm oder auf andere Änderungen des Azetat Stoffwechsels in der Leber, zurückzuführen ist (SHEPHERD et al. 2014).

Eine weitere Studie untersucht mittels Kultivierung die fäkale Mikrobiota auf Unterschiede, die sich auf Geschlecht, Alter oder Body Condition Score (BCS) der beprobten Pferde zurückführen lassen (MSHELIA et al. 2018). Eine signifikante Korrelation zwischen dem BCS der Pferde und den untersuchten Bakterienfamilien konnte dabei nicht ermittelt werden. Es konnten jedoch bei Pferden, mit einer schlechteren Körperkondition, signifikant mehr Bakterien kultiviert werden als bei Pferden mit einer moderaten Körperkondition (MSHELIA et al. 2018).

In drei Studien (BIDDLE et al. 2018, MORRISON et al. 2018, COLEMAN et al. 2019) wurde die Mikrobiota von Pferden unterschiedlicher Gewichtsklassen mittels Sequenzierung untersucht. Dabei wurde bei zwei Autoren (BIDDLE et al. 2018, MORRISON et al. 2018) ein Anstieg der Diversität und des Bakterienphylums Firmicutes gezeigt, während COLEMAN et al. (2019) keine Veränderungen in den Bakterienphyla und der Diversität der Mikrobiota nachweisen konnten. Die weiteren Ergebnisse dieser Untersuchungen mittels Sequenzierung sind ebenfalls widersprüchlich. Ein Grund für diese sehr unterschiedlichen Ergebnisse können die unterschiedlichen Versuch Designs sein, die in den Studien zur Anwendung kamen. So untersuchten MORRISON et al. (2018) die fäkale Mikrobiota von 25 Welsh Ponys, die ab einem BCS von 7/9 als übergewichtig galten, und vier Wochen vor der Probennahme Heu aus derselben Charge erhielten. BIDDLE et al. (2018) untersuchten die fäkale Mikrobiota von 78 Pferden und Ponys, die vor Probennahme keine standardisierte Fütterung erhielten, sondern je nach Herkunftsbetrieb mit Gras, Heu oder Heu und Kraftfutter gefüttert wurden. Neben der übergewichtigen Gruppe mit einem BCS $\geq 7/9$ unterschieden BIDDLE et al. (2018) außerdem noch eine normalgewichtige Gruppe mit einem BCS zwischen 6- 7/9 und eine schlanke Gruppe mit einem BCS von $\leq 5,5/9$. COLEMAN et al. (2019) untersuchten die Mikrobiota von 20 übergewichtigen Pferden mit einem BCS von $\geq 7/9$ und verglichen diese mit normalgewichtigen Pferden

mit einem BCS von 3-5/9, die auf demselben Betrieb standen und dieselbe Fütterung erhielten wie die übergewichtigen Pferde. Die Ergebnisse der oben beschriebenen Studien sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

WEEMS (2018) untersuchte die fäkale Mikrobiota von „schwer“- und „leichtfuttrigen“ Pferden, deren Kotproben von den Besitzern gesammelt wurden und gemeinsam mit einem ausgefüllten Fragebogen zur Verfügung gestellt wurden. Die Einteilung in „schwer“- und „leichtfuttrig“ erfolgte dabei auf Grundlage der Besitzerangaben im Fragebogen unabhängig von der Rasse der Pferde. Um die Einflüsse der unterschiedlichen Haltung und Fütterung der Tiere, auf die fäkale Mikrobiota zu minimieren, wurden den 9 „schwerfuttrigen“ Pferden 9 „leichtfuttrige“ Vergleichspferde mit ähnlichem Signalement und ähnlicher Fütterung zugeordnet. Bei den „leichtfuttrigen“ Pferden traten vermehrt die Phyla Firmicutes, Proteobacteria, Verrucomicrobia und Euryarchaeota sowie die Familien Clostridiaceae, Lachnospiraceae, Methanocorpusculaceae, Christensenellaceae, Eubacteriaceae und Veilonellaceae auf (WEEMS 2018). Bei „schwerfuttrigen“ Pferden kamen die Phyla Bacteroidetes, Tenericutes, Fibrobacteres und Actinobacteria sowie die Familien Ruminococcaceae, Paraprevotellaceae und Ersypelotrichaceae häufiger vor. Unterschiede in der fäkalen Mikrobiota hinsichtlich der Diversität und des Artenreichtums wurden nicht gefunden (WEEMS 2018).

Tab. 3: Änderungen in der fäkalen Mikrobiota von übergewichtigen Pferden verglichen mit einer normalgewichtigen Kontrollgruppe (↑ signifikanter Anstieg, ↓ signifikanter Abfall, ↔ keine signifikanten Veränderungen)

Autor	Methode	Phyla	SCFA	Sonstiges
SHEPHERD et al (2014)	qPCR	↔	↔	
MSHELIA et al. (2018)	Kultivierung	Nicht untersucht	Nicht untersucht	
BIDDLE et al. (2018)	Sequenzierung	Firmicutes↑ Bacteroidetes↓	Nicht untersucht	Artenvielfalt↑ Diversität↑ Gleichverteilung↑
MORRISON et al. (2018)	Sequenzierung	Bacteroidetes↑ Actinobacteria↑ Firmicutes↑ Fibrobacteres↓	↔	Diversität↑ Artenvielfalt↔
COLEMAN et al. (2019)	Sequenzierung	↔	Nicht untersucht	Diversität↔ Artenvielfalt↔

MORRISON et al. (2020b) untersuchten die fäkalen Mikrobiota und SCFA Konzentration vor und nach einer kontrollierten Gewichtsabnahme um 7-11,6 % über 11 Wochen. Dabei wurde in der fäkalen Mikrobiota eine Abnahme der Phyla Firmicutes, Tenericutes und Elusimicrobia sowie der Diversität beobachtet. Außerdem sank, vermutlich durch die verringerte Aufnahme von strukturiertem Futter, im Rahmen der Gewichtsreduktion die SCFA Konzentration im Kot (MORRISON et al. 2020b).

Eine andere Studie untersuchte mittels Sequenzierung die fäkale Mikrobiota von Pferden, die adipös waren und an Equinen metabolischen Syndrom (EMS) litten, im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe (ELZINGA et al. 2016). In dieser Studie konnte bei den EMS Pferden, eine verminderte Diversität der bakteriellen Mikrobiota nachgewiesen werden. Zwischen der EMS und der Kontrollgruppe gab es keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Vorkommens unterschiedlicher Bakterienphyla. Mittels linearer Diskriminierungsanalyse konnten allerdings taxonomische Einheiten ermittelt werden, die für die jeweilige Gruppe charakteristisch sind. So traten in der EMS Gruppe vermehrt *Clostridium* Kluster IX, unklassifizierte *Verrucomicrobia*, *Cellulosilyticum*, *Elusimicrobium* und *Lactobacillus* auf. Bei der Kontrollgruppe kamen hingegen unklassifizierte *Lachnospiraceae*, *Anaerovorax*, unklassifizierte *Rhodospirillaceae*, *Fibrobacter*, unklassifizierte *Flavobacteriaceae*, *Saccherofermentans* und *Ruminococcus* vermehrt vor (ELZINGA et al. 2016).

3 Publikationen

3.1 Changes in the faecal microbiota of horses and ponies during a two- year body weight gain programme

Katharina Langner, Dominique Blaue, Carola Schedlbauer, Janine Starzonek, Veronique Julliand, Ingrid Vervuert

PLoS ONE 2020 15(3): e0230015

DOI 10.1371/journal.pone.0230015

Eigenanteil bei der Erstellung des Manuskripts

Zur Erstellung des Manuskripts „Changes in the faecal microbiota of horses and ponies during a two-year body weight gain programme“ leistete die Autorin folgende Arbeiten:

- Entnahme der Kotproben gemeinsam mit D. Blaue, C. Schedlbauer und J. Starzonek
- Messung der SCFA und Laktat Gehalte im Kot, sowie Extraktion der DNA aus den Kotproben unter Aufsicht von V. Julliand
- Statistische Auswertung der Ergebnisse unter Aufsicht von V. Julliand und I. Vervuert
- Erstellung des Manuskripts und der dazu gehörigen Grafiken und Tabellen unter Aufsicht von I. Vervuert

Folgende weitere Beiträge wurden durch die Koautoren geleistet:

- I. Vervuert: Planung des Projektes und Einwerbung der Gelder
- D. Blaue, C. Schedlbauer und J. Starzonek: wöchentliche Erfassung der Futteraufnahme der Pferde und Durchführung morphometrischer Messungen (BCS, CNS, KM)
- Alle Koautoren haben der Veröffentlichung zugestimmt

RESEARCH ARTICLE

Changes in the faecal microbiota of horses and ponies during a two-year body weight gain programme

Katharina Langner¹, Dominique Blaue¹, Carola Schedlbauer¹, Janine Starzonek¹, Veronique Julliand², Ingrid Vervuert^{1*}

1 Institute of Animal Nutrition, Nutrition Diseases and Dietetics, Leipzig University, Leipzig, Germany, **2** PAM UMR A 02.102, AgroSup Dijon, Université Bourgogne Franche-Comte, France

* ingrid.vervuert@vetmed.uni-leipzig.de



OPEN ACCESS

Citation: Langner K, Blaue D, Schedlbauer C, Starzonek J, Julliand V, Vervuert I (2020) Changes in the faecal microbiota of horses and ponies during a two-year body weight gain programme. *PLoS ONE* 15(3): e0230015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230015>

Editor: Suzanne L. Ishaq, University of Maine, UNITED STATES

Received: September 12, 2019

Accepted: February 19, 2020

Published: March 19, 2020

Copyright: © 2020 Langner et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The study was funded by the German Research Foundation (Ve225/9-1). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The funding was used for keeping horses and ponies as well as all costs of analyses. From the funding source a salary was paid to K.L. (first author of the manuscript). Furthermore,

Abstract

Obesity is a major health concern in many domesticated equids animals since it is related to metabolic abnormalities such as insulin dysregulation, hyperlipidaemia or laminitis. Ponies especially are known as “easy keepers” and are often affected by obesity and its related metabolic disorders. Research in the last decade indicated that the intestinal microbiota may play an important role in the development of obesity, at least in humans. Therefore, the objective of our study was to characterize changes in the faecal microbiota during a two-year weight gain programme which compared ponies and warmblood horses. For this purpose, 10 Shetland ponies and ten warmblood horses were fed a ration which provided 200% of their maintenance energy requirement over two years. Feed intake, body weight, body condition and cresty neck score were recorded weekly. At three standardized time points faecal samples were collected to characterize the faecal microbiota and its fermentation products such as short chain fatty acids and lactate. Next generation sequencing was used for the analysis of the faecal microbiota. During body weight gain the richness of the faecal microbiota decreased in ponies. Besides changes in the phylum Firmicutes in ponies that were already described in human studies, we found a decrease of the phylum Fibrobacteres in horses and an increase of the phylum Actinobacteria. We were also able to show that the phylum Fibrobacteres is more common in the microbiota of horses than in the microbiota of ponies. Therefore, the fibrolytic phylum Fibrobacteres seems to be an interesting phylum in the equine microbiota that should receive more attention in future studies.

Introduction

Recent data from the United States and Australia indicate that 23–51% of the equine population may be overweight or obese [1–3]. This is a major concern for the horse welfare because equine obesity increases the risk for metabolic abnormalities such as insulin dysregulation (ID) and laminitis [3]. Obesity is also an important factor in the equine metabolic syndrome (EMS) that also includes other clinical signs like laminitis and ID [4].

Leipzig University and the German Research Foundation funded the publishing of the paper within the program of Open Access Publishing.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

As hindgut fermenters horses have a bacterially dominated gut microbiota, that produces short chain fatty acids and lactate through anaerobic fermentation of structural carbohydrates [5]. Its main phyla are Firmicutes and Bacteroidetes [6] but there is a high variability, influenced by factors like ration [7], age [8–10], hindgut section [11], health status [12] and individual variation [13].

Research in the last decade emphasized the role of the gut microbiota in obesity in different animal species and humans. It has been demonstrated that obese mice and humans tended to have a less diverse gut microbiota [14,15] with a relative increase of the phylum Firmicutes and a decrease of the phylum Bacteroidetes [14,16,17]. Interestingly, studies with germ free mice showed that these animals were less likely to gain weight than mice with a colonised gut [18–20]. Germ free mice whose gut was artificially colonised by a Firmicutes dominated microbiota, harvested from overweight mice, gained more weight than mice whose gut was colonised by a wild- type mouse microbiota [21].

However, in human studies where the impact of diet on the microbiota is less controlled, inconsistent results have been published [22–24].

There is an ongoing discussion about how the microbiota influences body weight (BW). A study investigating the metagenomics of a Firmicutes dominated microbiota of genetically obese mice and the Bacteroidetes dominated microbiota of their lean littermates, showed an increased capacity for energy harvest in the obese mice microbiota [21]. Enzymes that are necessary to catabolise otherwise indigestible polysaccharides were elevated in the obese mice microbiota. In the caecum of obese mice the main fermentation products acetate and butyrate, which contribute to the host's energy supply, were also enriched [21]. But other authors working with a different mouse strain showed lower caecal concentrations of SCFA in obese mice [25]. In horses no differences in the faecal SCFA concentrations of different weight groups have been demonstrated [9,26].

There has been an increasing interest in the equine microbiota and its link to obesity. However, to the author's knowledge there are only three studies that compared the equine microbiota of different weight groups. In contrast to studies in mice [14] and humans [15,27] the studies in horses showed a higher diversity in the faecal microbiota of obese individuals [9,28]. These results were also contrary to findings from Elzinga et al. [29] in obese EMS horses, that showed a less diverse faecal microbiota than a control group.

Regarding the distribution of the faecal microbiota phyla, differing results were found in studies conducted by Morrison et al. (2018) [9] and Biddle et al. (2018) [28] for the phylum Bacteroidetes. Biddle et al. (2018) who studied mainly horses fed on different amounts of hay, grass and concentrate showed a decrease of Bacteroidetes in the faecal microbiota of obese horses. In contrast, Morrison et al. (2018) [9] fed a standardised hay diet and these authors found a higher abundance of Bacteroidetes in the faecal microbiota of obese Welsh ponies. On the other hand, both authors showed that the phylum Firmicutes increased in the microbiota of obese horses. The increase in the phylum Firmicutes in the microbiota was also described in obese humans [30,31]. Furthermore, a higher abundance of the phylum Actinobacteria and a lower abundance of the phylum Fibrobacteres was detected in obese horses by Morrison et al. (2018). In contrast, Shepard et al. (2014) [26] did not find any significant changes in the microbiota phyla of non-obese and obese horses fed a hay diet.

Ponies are known as “easy keepers” that have a lower energy requirement per unit of metabolic body weight than horses [32]. Therefore ponies are more prone to obesity [3] and related disorders such as laminitis [33–35]. A recent study also demonstrated that the metabolic function of the liver is more affected by body weight gain in ponies than in horses [36].

The aim of our study was to investigate changes in the faecal bacteria and the fermentation products between horses and ponies during a two- year BW gain programme caused by

excessive energy intake. We hypothesized that the bacteria of both horses and ponies would become less diverse with an increase of the phylum Firmicutes and a decrease in the phylum Bacteroidetes during the body weight gain period. Due to shifts in the bacterial phyla we also expected changes in the SCFA and Lactate pattern.

Material and methods

Animals and management

As a part of a larger project about the metabolic differences between horses and ponies during a two-year BW gain programme [37], ten Shetland pony and ten Warmblood horse geldings owned by the Institute of Animal Nutrition, Nutrition Diseases and Dietetics of the University of Leipzig were housed and fed according to a standardized protocol. The mean (\pm SD) age was 6 (\pm 3) years for the Shetland ponies and 10 (\pm 3) years for the horses. Before the onset of the study, insulin sensitivity was evaluated by a combined glucose and insulin test according to Eiler et al [38] and Pituitary Pars Intermedia Dysfunction (PPID) was excluded via determination of ACTH after 8 hours of fasting [39]. An experienced clinician confirmed the absence of clinical or radiological signs of previous or acute laminitis in all animals. The animals were bedded on straw in individual box stalls and were turned out onto a dry lot for approximately 5 hours a day. The project was approved by the Ethics Committee for Animal Right Protection of the Leipzig District Government (No. TVV 32/15) in accordance with German legislation for animal rights and welfare.

The experimental study was conducted over two years. During an adaption period, ponies and horses received meadow grass hay and a commercial mineral supplement to meet or exceed energy and nutrient requirements during maintenance according to the Society of Nutrition Physiology (GfE 2014) [40]. The basal health status of the animals was assessed at the beginning of the trial (t0). Following this first data collection animals underwent a feeding period receiving 180% of their individual maintenance metabolizable energy requirements according to GfE (2014) [40]. Seventy percent of the energy intake was supplied by hay and 30% was provided by a concentrate (nutrient composition based on dry matter (DM): crude protein: 11.7%, crude fat: 12.8%, crude fibre: 9.9%, crude ash: 7.1%, metabolizable energy: 11.75 MJ/kg DM).

Faecal samples were taken after a five-month adaption period to the experimental diet (t1). In addition, faecal samples were collected twelve (t2) and twenty-four (t3) months after the start of the trial (t0). Between the first (t1) and the second (t2) sampling point the energy intake was increased to 200% supplied by a ration consisting out of 60% hay and 40% concentrate. There was a change in concentrate between the first and second sampling point due to production problems by the manufacturer (nutrient composition based on DM of the new concentrate: crude protein: 13.4%, crude fat: 14.4%, crude fibre: 9.78%, nitrogen-free extract: 54.3%, metabolizable energy: 14.09 MJ/kg DM). The nutrition composition was analysed monthly for the hay and yearly for the concentrate. Crude nutrients were analysed by Weende analysis. Starch content was determined polarimetric and sugar content with the Luff-Schoorl method. The analysis of feedstuff was performed according to the official collection of methods from the European Union [41]. Neutral detergent fibre was determined based on amylase treatment and incineration (aNDFom). The analysed values were used for the calculation of the energy content. Energy intake was adapted monthly to the current BW. Feed refusals were recorded on a weekly basis.

Scaling, Body Condition Score (BCS) and Cresty Neck Score (CNS)

Body weight, BCS and CNS were measured weekly. An electronic large animal scale (scale system Iconix FX 1, Texas Trading, scale precision: 0.5 kg) was used to determine BW. BCS

was assessed on a scale from 0 to 5 as described by Carrol and Huntington (1988) [42]. The CNS was evaluated on a scale from 0 to 5 according to Carter et al (2009) [43]. Two trained evaluators performed both scores and the mean of their evaluation was calculated for data analyses.

Faecal sampling

Faecal samples were taken using a collection bag that was attached around the anus with tape three hours after the morning meal. Directly after the collection three Eppendorf tubes (Eppendorf, Hamburg, Germany) were filled with 1 g of faeces and gradually frozen from -20°C to -80°C pending DNA extraction. In addition, 10 g of faeces were mixed with 10 ml of distilled water and centrifuged for 10 minutes at 6000 rpm. From the supernatant 1 ml was transferred in Eppendorf tubes for lactate analysis. For the SCFA analysis 1 mL of the supernatant was transferred in tubes containing 0.1 ml of a buffer composed of 4.25% H₃PO₄ and 1% HgCl₂. Freezing protocol was the same as described above.

SCFA analysis

For the SCFA analysis the samples were mixed with 100 µl of ethanol and centrifuged for 10 minutes at 6000rpm (5417c, Eppendorf, Hamburg, Germany). In the filtrated supernatant the concentration of the short chain fatty acids (SCFA) acetate (C2), propionate (C3), isobutyrate (IC4), butyrate (C4), isovalerate (IC5) and valerate (C5) were measured by gas liquid chromatography (Clarus 500, Perkin Elmer, Waltham, US) [44]. All samples were measured in duplicate and the mean coefficient of variation was 4.8% for C2, 3.07% for C3, 3.15% for IC4, 2.84% for C4, 1.77% for IC5 and 8.87% for C5.

Lactate analysis

For lactate analysis the samples were deproteinized in 100 µl perchloric acid. Subsequently the enzymatic colorimetric lactate analysis was performed using a D- and L- Lactic Acid Kit (Megazyme International, Ireland) according to the manufacturer's instructions. The quantity of the lactate was measured at a wavelength of 340 nm in a 96 well plate with a MRX^c tc microplate reader (Dynex, Lincoln, United Kingdom). All samples were measured in duplicate and the mean coefficient of variation was 1.57%.

DNA extraction and sequencing

The total DNA was extracted from 0.25g of faeces using the bead- beating method described by Yu and Morrison (2004) [45]. The quantity of the extracted DNA was measured using a Biophotometer 6131 (Eppendorf, Hamburg, Germany) and the purity was assessed by the calculation of the A260/280 ratio to screen the samples for protein contamination [46]. A260/280 ratios between 1.5 and 2.0 were accepted for the DNA. Afterwards a PCR was performed to amplify the V3-V4 region of the 16S rRNA. The PCR Mix consisted of 0.4 µl of dNTP 25mM, 1.25 µl of every primer (Table 1), 0.5 µl of Taq Polymerase (D 7442, Sigma-Aldrich, Saint

Table 1. Sequences of the primers used for the DNA amplification.

Forward Primer 1 PCR1F343 [47]	5' CTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGGRAGGCAGCAG
Reverse Primer 1 PCR1R784 [47]	5' GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT
Forward Primer 2 [47]	5' AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGAC
Reverse Primer 2 [47]	5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-Index-GTGACTGGAGTTCAGACGTGT

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230015.t001>

Louis, USA), 5 μ l of the corresponding Taq buffer, 39.1 μ l of water and 10 ng of DNA for each sample. The samples were diluted with water 1 to 4 or 1 to 64, dependent on the biophotometer results. Then 5 μ l of each diluted sample were added to the PCR Mix. The amplification was performed with a C 100 touch thermocycler (BioRad, Hercules, USA) using the following programme: 94°C for 60 seconds for the initial denaturation, followed by 30 cycles of 94°C for 60 s (denaturation), 65°C for 60 s (annealing) and 72°C for 60 s (elongation) and a final elongation at 72°C for 10 minutes. For visualization 4 μ l of each PCR product were pipetted into a well of a 2% agarose gel. Electrophoresis of the gel was performed for 1h15min at 45°C and 70 V on a Mupid One system (ADVANCE co. Ltd., Tokyo, Japan). Afterwards the gel was stained with gel red (Biotium, Fremont, US) and the quality of the amplicons was checked using ultraviolet light. After purification of the first PCR with PCR clean magnetic beads a second PCR was performed to ligate Illumina adapters and an index that allowed the identification of the samples. The PCR mix was similar to the first PCR with only the primers changed (Table 1). The PCR conditions were identical to the previous PCR, but 12 cycles were performed instead of 30. Afterwards PCR products were purified and sequenced with an Illumina MiSeq run of 250 base paired-ends following the manufacturer's instructions (Illumina Inc., San Diego, CA). The quality of the run was assessed with control libraries generated with the PhiX virus (Illumina PhiX control; Illumina Inc., San Diego, CA).

Data analysis

The sequencing data was processed on the Galaxy signenae workbench provided by INRA Toulouse using the Find Rapidly OTUs with Galaxy Solutions (FROGS) pipeline. First the sequences were cleaned through elimination of sequences shorter than 380 base pairs or longer than 490 base pairs, and those containing an unidentified base or not containing one of the primer sequences. Chimeras were identified using VSEARCH [48] and removed from further analysis. The remaining sequences were aligned in clusters with SWARM [49]. Clusters that contained only one sequence were excluded from further analysis and the remaining clusters were grouped in operation taxonomic units (OTUs). The taxonomic assignment of the OTUs was performed with the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) provided by the National Centre for Biotechnology Information database. The Shannon index and observed richness were calculated on the Galaxy signenae workbench. The further grouping of the data and the calculation of the relative abundance of OTUs were conducted with Excel (Office 365, Microsoft, Redmond, US).

The Excel software programme was also used for the calculation of the coefficient of variation (CV) for crude protein (CP), crude lipid (CL), crude fibre (CF), neutral detergent fibre (aNDFom), sugar and starch intake to determine variations in nutrition intake. The CV was also calculated for the DM intake of hay during the study period. For the analysis of the CV the data were grouped in months for horses and for ponies. The CV was calculated by the mean nutrition intake for the last two months prior to sampling for horses and ponies at each sampling point and between the different sampling points.

The statistical analyses were performed using the commercial software package STATISTICA (Version 12, StatSoft GmbH, Hamburg, Germany). Data were analysed for normal distribution by using the Shapiro-Wilks test. BCS, CNS, SCFA, lactate and microbial community were analysed using non-parametric tests. Friedman's ANOVA and Wilcoxon signed rank test with Bonferroni correction was performed factoring the effects of time. For breed related differences Mann-Whitney-U test was used. Data are presented as medians and 25 and 75 percentiles. Statistical significance was accepted at $P < 0.05$.

Results

One pony and one horse developed an episode of laminitis during the second year of BW gain. Additionally, one pony developed hyperlipemia (serum triglycerides: 14.4 mmol/L) at the end of the second year of excessive energy intake. Faecal samples were collected from these individuals only after clinical improvement. Between the second and the third sample collection one of the horses had to be euthanized due to a severe episode of colic. Therefore only 59 faecal samples (30 ponies, 29 horses) were collected at three different time points (t1, t2 and t3).

CV of CP, CL, CF, aNDFom, sugar and starch intake showed a variation between 4% and 13% between the two breeds prior to each sampling point (S1 Table). The variation between t1, t2 and t3 prior to sampling ranged from 10% to 22%. The highest variation between sampling points was recorded for CL between the two months prior to t1 and t2 where the concentrate was changed due to production problems by the manufacturer.

BW, BCS and CNS

Between t1 and t2 a significant increase in BW was recorded for ponies ($p = 0.005$) and horses (0.005). Between t2 and t3 only a numeric increase in BW was seen in both breeds (Table 2). CNS and BCS rose significantly between all three time points for horses and ponies to a median of 3.5 for CNS and 4.8 for BCS.

Sequencing metrics

From the 59 sequenced faecal samples 1184086 (mean 20069.2 /sample) raw sequences were obtained. After quality filtering during the bioinformatic processing 635820 (mean 10776.6 /sample) sequences remained. These sequences were assigned to 2219 OTUs that were grouped into 11 phyla, 19 classes, 29 orders and 62 families, 145 genera and 36 species.

Bacterial community composition

The alpha diversity, described by the Shannon index showed no significant differences between the three timepoints or breeds (Fig 1). During the BW gaining programme a significant decrease in richness was recorded for the ponies between t1 and t2 ($p = 0.025$) and t1 and t3 ($p = 0.005$), but no significant changes were seen for horses (Fig 2)

From the 11 phyla, 19 classes, 29 orders, 62 families, 145 genera and 36 species identified, only 6 phyla, 7 classes, 7 orders and 15 families had a median relative abundance over 0.4% of the faecal microbiota. 24.7% of the genera and 97.2% of the species are unknown. 1.1% of the genera and 1% of the species could not be identified because the pipeline found various affiliations. Due to the high rate of unidentified sequences the genera and species were excluded

Table 2. BW, BCS and CNS for horses and ponies. Data are presented as medians and 25/75 percentiles in brackets.

Variable	Breed	t1	t2	t3
BW (kg)	Ponies	110 ^{a#} (103/119)	134 ^{b#} (126/146)	139 ^{b#} (132/158)
	Horses	612 ^{a*} (578/650)	689 ^{b*} (554/730)	696 ^{b*} (678/732)
BCS (0–5)	Ponies	4 ^a (3.9/4.0)	4.6 ^b (4.4/4.7)	4.8 ^c (4.7/5.2)
	Horses	4 ^a (3.9/4.0)	4.6 ^b (4.5/4.6)	4.8 ^c (4.7/4.9)
CNS (0–5)	Ponies	2 ^a (1.8/2.3)	2.8 ^b (2.5/3.0)	3.5 ^c (3.3/4.0)
	Horses	2 ^a (2.0/2.3)	2.9 ^b (2.8/3.0)	3.5 ^c (3.5/4.0)

a, b, c medians with different superscript letters differ significantly within a row ($p < 0.05$)

*, # medians with different superscript symbols differ significantly within a column ($p < 0.05$)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230015.t002>

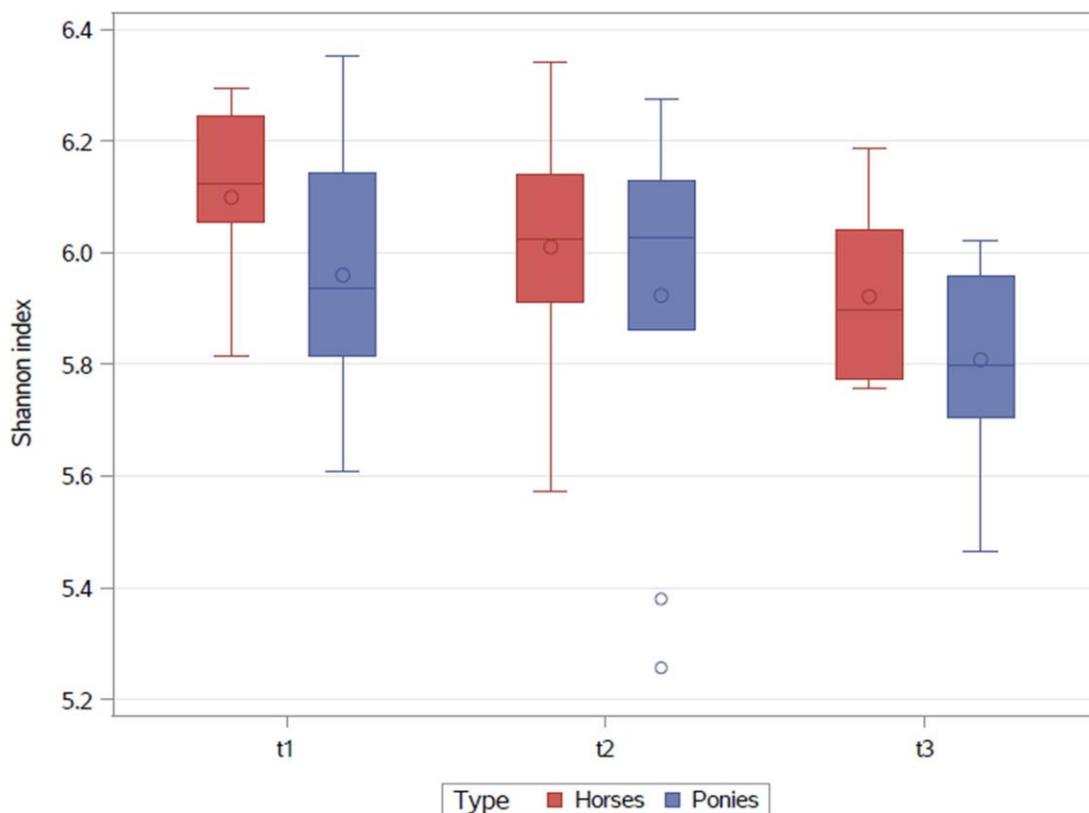


Fig 1. Shannon index at the three sampling points (t1-t3) for horses and ponies. The interquartile range is indicated by the box. The dot inside the box indicates the mean and the line the median. The whiskers represent the lower and upper extremes. Outliers are indicated as single dots.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230015.g001>

from the further analysis to avoid bias. The most abundant phyla were Firmicutes (58.2%) followed by Bacteroidetes (36.5%), Spirochetes (2.46%), Fibrobacteres (1.18%), Proteobacteria (0.69%) and Actinobacteria (0.63%). At t3 one sample taken from a horse showed a very high abundance (22.76%) of the phylum Actinobacteria. In general, the phylum Actinobacteria ranged between 0.12% and 2.58%. Therefore, we decided to exclude this sample from further analysis, as it was probably contaminated.

Faecal microbiota of horses and ponies

The phylum Fibrobacteres was more abundant in the faecal microbiota of horses than in the faecal microbiota of ponies at timepoint t3 ($p = 0.026$) (Table 3 and S2 Table). The significant higher relative abundance for horses at t3 was also seen for the corresponding class, order and family (S3–S5 Tables). For the phylum Proteobacteria a significant higher relative abundance was found at t2 in the faeces of ponies than in the faeces of horses ($p = 0.01$).

At the family level Ruminococcaceae ($p = 0.033$), Rikenellaceae ($p = 0.026$), F082 ($p = 0.002$) and Bacteroidales UCG-001 ($p = 0.041$) had higher concentrations in the faeces of

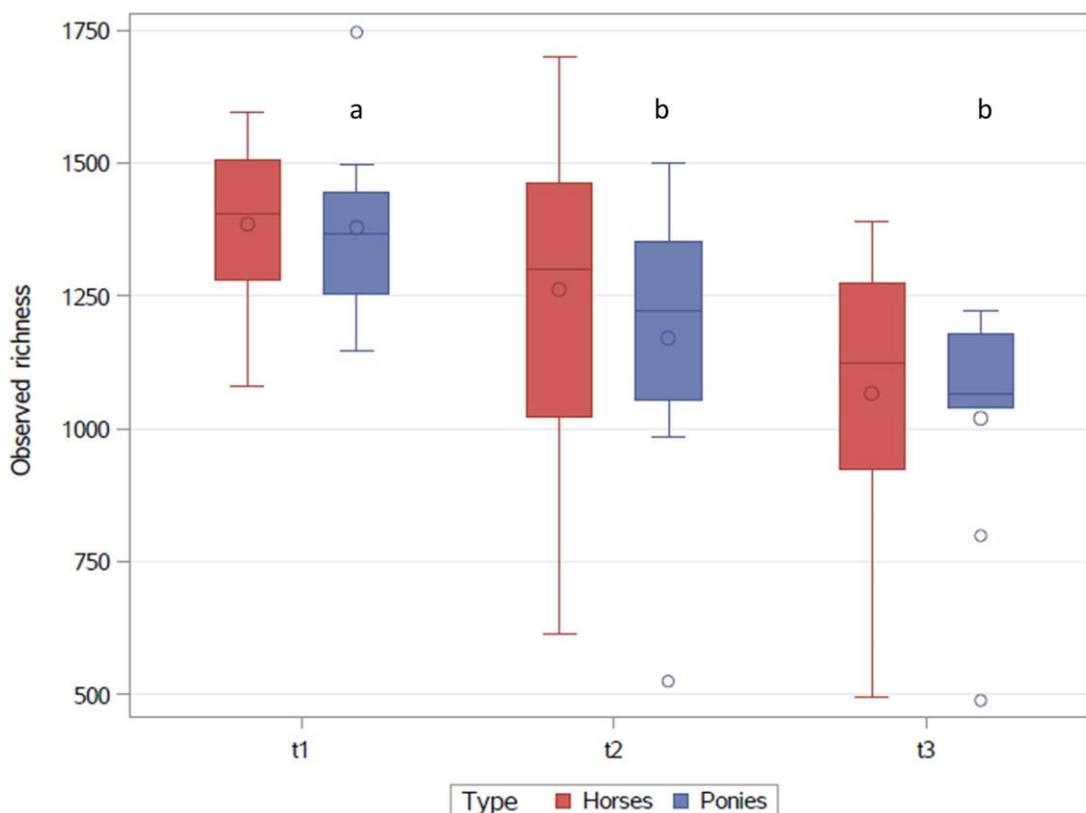


Fig 2. Observed richness at the three sampling points (t1-t3) for horses and ponies. The interquartile range is indicated by the box. The dot inside the box indicates the mean and the line the median. The whiskers represent the lower and upper extremes. Outliers are indicated as single dots.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230015.g002>

ponies than in the faeces of horses at t3 (Table 3 and S5 Table). For the family F082 the higher relative abundance in the pony faeces was also seen at timepoint t1 ($p = 0.003$).

Changes in the faecal microbiota during the two-year weight gain programme

The phylum Firmicutes increased significantly between t2 and t3 in the faecal microbiota of ponies ($p = 0.047$) while no changes were seen for the horses. While the phylum Fibrobacteres decreased between t1 and t2 in the faecal microbiota of horses ($p = 0.028$), the phylum Proteobacteria in the faecal microbiota of ponies showed a significant increase between t1 and t2 ($p = 0.005$) followed by a significant decrease between t2 and t3. Actinobacteria increased between t2 and t3 in ponies ($p = 0.017$) and between t1 and t3 in horses ($p = 0.02$). More information about significant changes in classes, orders and families during the two-year weight gaining programme are presented in the supporting information (S2, S3, S4 and S5 Tables).

Table 3. Phyla, classes, orders and families in faeces of horses and ponies with a median relative abundance over 0.4% with significant changes between the three sampling points or between breeds. Data are presented as medians and 25/ 75 percentiles in brackets.

Phylum	Breed	t1	t2	t3
Firmicutes	Horses	55.7 (52.3/59.8)	57.2 (55.5/62.2)	58.5 (55.5/62.9)
	Ponies	54.0 ^{ab} (51.9/62.9)	58.5 ^a (53.2/63.8)	62.8 ^b (57.7/65.7)
Fibrobacteres	Horses	1.90 ^a (1.05/2.45)	0.98 ^b (0.85/1.29)	1.11 ^{bc} (0.59/1.84)
	Ponies	0.78 (0.51/2.31)	0.79 (0.65/1.70)	0.38* (0.09/0.88)
Proteobacteria	Horses	0.34 (0.31/0.69)	0.61 [#] (0.52/0.92)	0.52 (0.43/0.99)
	Ponies	0.60 ^a (0.37/0.85)	1.14 ^{bc} (0.81/1.45)	0.43* (0.27/0.70)
Actinobacteria	Horses	0.37 ^a (0.30/0.49)	0.34 ^{ab} (0.30/0.43)	0.88 ^b (0.54/1.31)
	Ponies	0.33 ^a (0.31/0.49)	0.39 ^a (0.33/0.59)	0.77 ^b (0.67/1.25)
Classes				
Fibrobacteriia	Horses	1.90 ^a (1.06/2.45)	0.98 ^b (0.85/1.29)	1.11 ^{bc} (0.59/1.84)
	Ponies	0.78 (0.51/2.31)	0.80 (0.65/1.70)	0.38* (0.09/0.88)
Bacilli	Horses	0.39 ^a (0.23/0.66)	0.42* (0.27/0.61)	1.21 [#] (0.81/2.37)
	Ponies	0.37 ^a (0.29/0.49)	0.34 ^{ab} (0.30/0.43)	0.80 ^b (0.52/1.29)
Coriobacteriia	Horses	0.37 ^a (0.29/0.49)	0.34 ^{ab} (0.30/0.43)	0.80 ^b (0.52/1.29)
	Ponies	0.33 ^a (0.30/0.49)	0.39 ^a (0.33/0.59)	0.77 ^b (0.67/1.25)
Negativicutes	Horses	0.31 (0.12/0.38)	0.57 (0.41/0.70)	0.49 (0.39/0.57)
	Ponies	0.32 ^a (0.27/0.64)	0.81 ^b (0.41/1.24)	0.39 ^a (0.23/0.84)
Orders				
Fibrobacterales	Horses	1.90 (1.06/2.45)	0.98 (0.85/1.29)	1.11 [#] (0.59/1.84)
	Ponies	0.78 ^a (0.51/2.31)	0.80 ^b (0.65/1.70)	0.38 ^{##} (0.09/0.88)
Coriobacteriales	Horses	0.37 ^a (0.30/0.49)	0.34 ^{ab} (0.29/0.43)	0.80 ^b (0.52/1.29)
	Ponies	0.33 ^a (0.30/0.49)	0.39 ^a (0.33/0.60)	0.77 ^b (0.67/1.25)
Selenomonadales	Horses	0.31 (0.12/0.38)	0.57 (0.41/0.70)	0.49 (0.39/0.57)
	Ponies	0.32 ^a (0.27/0.64)	0.81 ^b (0.41/1.24)	0.39 ^a (0.23/0.84)
Families				
Ruminococcaceae	Horses	25.0 ^a (22.5/29.1)	24.2 ^a (22.7/31.9)	21.4 ^{bc} (19.0/22.6)
	Ponies	24.5 (23.9/32.2)	27.2 (24.1/33.9)	25.2 [#] (20.9/26.1)
Lachnospiraceae	Horses	23.9 ^a (20.5/25.6)	22.9 ^{ab} (20.9/26.4)	31.3 ^b (25.9/32.5)
	Ponies	22.7 (20.7/23.3)	22.7 (20.8/25.0)	26.8 (24.0/28.6)
Rikenellaceae	Horses	7.15 (5.33/7.65)	5.63 (4.19/6.39)	4.80 [#] (4.18/6.17)
	Ponies	7.40 ^{ab} (4.51/8.17)	5.58 ^a (4.77/5.93)	6.80 ^{bc} (5.56/9.50)
F082	Horses	2.66 ^{##} (1.81/2.84)	4.46 [#] (2.13/9.44)	1.50 ^{bc} (1.10/1.88)
	Ponies	6.34 [#] (4.09/9.94)	5.67 (3.29/7.00)	5.16 [#] (2.65/5.74)
Bacteroidales UCG-001	Horses	1.14 (0.94/1.84)	0.90 (0.62/1.39)	0.60 [#] (0.52/0.93)
	Ponies	1.22 (1.02/1.64)	0.90 (0.75/1.13)	1.21 [#] (1.03/1.42)
Fibrobacteraceae	Horses	1.90 ^a (1.06/2.45)	0.98 ^b (0.85/1.29)	1.11 ^{bc} (0.59/1.84)
	Ponies	0.78 (0.51/2.31)	0.80 (0.65/1.70)	0.38* (0.09/0.88)
Muribaculaceae	Horses	0.75 (0.61/1.17)	1.55 (1.10/1.74)	1.24 (0.84/2.81)
	Ponies	0.93 ^a (0.47/1.93)	1.62 ^b (1.13/2.64)	1.14 ^a (0.72/1.57)
Bacteroidales RF16 group	Horses	0.81 ^a (0.59/1.00)	0.45 ^{ab} (0.28/0.63)	0.29 ^b (0.13/0.50)
	Ponies	0.62 ^a (0.36/0.89)	0.40 ^{ab} (0.35/0.49)	0.17 ^b (0.14/0.28)
Veillonellaceae	Horses	0.31 (0.12/0.38)	0.57 (0.41/0.70)	0.49 (0.39/0.57)
	Ponies	0.32 ^a (0.27/0.64)	0.81 ^b (0.41/1.24)	0.39 ^a (0.23/0.84)

a, b medians with different superscript letters differ significantly within a row (p < 0.05)

*, # medians with different superscript symbols differ significantly within a column (p < 0.05)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230015.t003>

Faecal SCFA and lactate

The most abundant SCFA in the faeces were C2 followed by C3, C4, IC5, IC4 and C5. Higher concentrations in the faeces of horses than in the faeces of ponies were found for total SCFA at t3, C2 at t2, C3 at t3, IC5 at t3 and IC4 at t1 and t2 (Table 4). Between the different timepoints no significant changes were determined in the faecal concentration of SCFA in ponies and horses. At t2 the total lactate concentration was higher in the faeces of ponies than in the faeces of horses (Table 4). During the feeding programme a significant increase in lactate was analysed for horses and ponies between t1 and t2 followed by a significant decrease between t2 and t3 in horse faeces.

Discussion

Due to the fact that ponies are more prone to obesity [2] and related diseases like laminitis [34] we investigated differences in the microbiota of horses and ponies during a two year period of excessive energy intake. To the authors knowledge this is the first paper analysing the distinctions in the faecal microbiota of horses and ponies. At present only data of the human gut microbiota revealed differences between ethnic groups [50,51]. However, unlike our animal experiment the studied human populations consumed different diets and stayed in different environments. Therefore, the impact of genetic, dietetic and environmental influences on the gut microbiota still remains open [50,51].

To the authors knowledge, our study is the first one investigating changes in the equine microbiota during a period of long-term body weight gain. This study design leads to the strong advantage that each individual was used as its own control. Other studies investigating differences of the microbiota between lean and obese horses always compared groups of different individuals [9,26,28]. It has been shown that even similar housing and feeding conditions for a six week period were not able to eliminate individual microbiota differences [13]. The

Table 4. Total SCFA, C2, C3, IC4, IC5 and lactate concentrations (mmol/L) in the faeces of horses and ponies. Data are presented as medians and 25/ 75 percentiles in brackets.

Variable	Breed	t1	t2	t3
Total SCFA (mmol/L)	Ponies	19.1 (16.2/23.9)	15.9 (13.3/19.3)	16.3 [#] (11.9/21.4)
	Horses	20.7 (20.4/29.6)	18.7 (17.1/24.2)	24.9 [#] (17.2/26.9)
C2 (mmol/L)	Ponies	12.4 (11.7/16.3)	10.5 [#] (8.9/11.8)	10.9 (8.1/14.6)
	Horses	17.5 (14.0/19.9)	12.6 [#] (11.9/16.2)	16.5 (11.6/18.3)
C3 (mmol/L)	Ponies	4.29 (3.11/5.27)	3.78 (2.57/4.39)	3.8 [#] (2.57/4.46)
	Horses	4.76 (4.32/6.89)	4.12 (3.78/5.41)	5.68 [#] (4.60/6.35)
C4 (mmol/L)	Ponies	1.19 (1.08/1.36)	1.08 (0.91/1.25)	0.94 (0.68/1.53)
	Horses	1.25 (1.08/1.65)	1.25 (0.97/1.36)	1.53 (1.02/1.71)
IC4 (mmol/L)	Ponies	0.28 [#] (0.23/0.34)	0.23 [#] (0.23/0.23)	0.26 (0.23/0.34)
	Horses	0.43 [#] (0.34/0.51)	0.37 [#] (0.34/0.46)	0.34 (0.28/0.46)
C5 (mmol/L)	Ponies	0.20 (0.20/0.20)	0.17 (0.10/0.20)	0.17 (0.10/0.29)
	Horses	0.20 (0.15/0.29)	0.20 (0.20/0.25)	0.20 (0.15/0.20)
IC5 (mmol/L)	Ponies	0.39 (0.34/0.49)	0.29 [#] (0.20/0.29)	0.29 (0.20/0.54)
	Horses	0.54 (0.40/0.67)	0.44 [#] (0.39/0.54)	0.39 (0.39/0.49)
Lactate (mmol/L)	Ponies	1.06 [#] (0.81/1.19)	0.71 ^{b#} (0.56/0.81)	0.67 ^b (0.64/0.87)
	Horses	0.92 [#] (0.70/1.14)	0.50 ^{b#} (0.43/0.64)	0.77 ^a (0.69/0.91)

a, b medians with different superscript letters differ significantly within a row ($p < 0.05$)

*, # medians with different superscript symbols differ significantly within a column ($p < 0.05$)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230015.t004>

large individual differences restrict the interpretation of results obtained from different individuals. The present experimental design included a two-year controlled feeding period to exclude any influences on the microbiota from different feeding regimes or management conditions. Other studies that examined the equine microbiota at different body conditions either had no standardized feeding protocol [28] or established a controlled feeding scheme for only one month or two weeks prior to faecal sampling [9,26].

During our biannual study the animals consumed 180–200% of their maintenance energy requirement according to the Society of Nutrition Physiology (GEH 2014) [40]. The major weight gain took place between t1 and t2 while only a non-significant increase in BW was recorded between t2 and t3 despite the same hypercaloric intake. In contrast CNS and BCS increased significantly in the second year of the feeding period. One explanation might be related to a loss in muscle mass due to a low physical activity during periods of turnout and increased body fat mass. However, the reasons for these findings remain open as muscle metabolism was not evaluated in this study. The lack in knowledge about muscle metabolism in the state of increasing obesity should be addressed in future studies.

During the BW gain programme faecal richness decreased in ponies. These results are in contrast to findings of Biddle et al. (2018) who found a higher richness in the faecal microbiota of obese horses. However, no changes in the faecal diversity indices were found during weight gain unlike previous data reported in humans [15] and horses [9,28]. This discrepancy might be due to the fact that most authors studied groups of different individuals and various diets in humans [15] and horses [28]. Only Morrison et al. (2018) [9] established a controlled feeding scheme one month prior to faecal sampling where the horses received a hay based ration.

In agreement with results obtained in the faecal microbiota of obese humans [30], BW gain in ponies was correlated with a significant increase in the phylum Firmicutes. Similar results have been obtained by Biddle et al. (2018) in the faecal microbiota of equines consuming varying types of forages and concentrates and by Morrison et al. (2018) who studied Welsh ponies fed a standardised hay diet. In contrast to our results, Morrison et al. (2018) and Biddle et al. (2018) found also significant changes in the phylum Bacteroidetes. In accordance with our results, Shepherd et al. (2014) did not detect any changes in the phylum Bacteroidetes in hay fed horses with various body condition scores. But unlike to our study, Shepherd et al. (2014) detected no significant changes in the phylum Firmicutes.

We also demonstrated that BW gain was associated with an increase of the phylum Actinobacteria in both breeds and a decrease of Fibrobacteres in the horse's microbiota. These findings are in accordance with results obtained by Morrison et al. (2018) [9]. Between t1 and t2 the phylum Proteobacteria rose significantly in ponies and showed a significant drop between t2 and t3 while it remained unchanged in horses. From studies investigating the influence of a high fat ration (8.3% fat) on the faecal microbiota of horses, it is known that a high fat ration may lead to an increase of the phylum Proteobacteria [8]. Since we recorded a 22.2% increase in crude lipid intake between t1 and t2 a dietary influence on the phylum Proteobacteria cannot be excluded. From our data the reasons for the changes in the phylum Proteobacteria in ponies but not in horses are not fully understood. Since the small intestine is the main site of fat absorption [32], and the fat intake through the ration was moderate (4.4–4.7% of dry matter intake), significant effects on the hindgut microbiota are probably of minor importance. But we cannot exclude a lower precaecal fat absorption capacity in ponies than in horses.

It has been reported that a high fat intake of 14.8% dry matter reduced the digestibility of fibre probably through a reduction of the cellulolytic activity in the hindgut microbiota [52] whereas a low fat intake below 10% of dry matter did not influence fibre digestibility in horses [53]. In consequence, it seems unlikely that our feeding regime with a fat intake of only 4.4–

4.7% dry matter influenced fibre digestibility in the large intestine but nevertheless we cannot fully exclude an influence of the moderate changes in fat intake on the equine microbiota.

Regarding the microbial fermentation products, we could not detect any significant changes in the faecal SCFA concentrations in both breeds during weight gain. These results are in accordance with findings obtained by Shepherd et al. (2014) [26] and Morrison et al. (2018) [9] who did not find any significant differences in the faecal concentrations of SCFA in obese and lean horses.

One major difference between the microbiota of horses and ponies was a higher relative abundance of the phylum Fibrobacteres in horses at t3 that could be traced over all taxonomic categories down to the family Fibrobacteraceae. In general, a higher abundance of fibrolytic family is related to a high intake of fibre (e.g. crude fibre or neutral detergent fibre (aNDFom)), but this issue could be excluded in our study as the coefficient of variation in crude fibre and NDF intake was $\leq 10\%$ at all sampling points between horses and ponies. In horses, the increase in the family Fibrobacteraceae may result in a better fibre fermentation, as Fibrobacteraceae is one of the fibrolytic families in the equine hindgut which are necessary for the degradation of plant cell walls [54]. These findings of a higher fibrolytic capacity in horses are in accordance with a higher digestibility of organic matter in Standardbred horses compared to Icelandic ponies fed an early cut haylage [55]. Another significant difference between horses and ponies was the higher expressions of the phylum Proteobacteria in the pony microbiota at t2. These findings are in accordance with Steelman et al. (2012)[56] who found a higher abundance of the order Burkholderiales belonging to the phylum Proteobacteria in one pony compared to a population of horses under different housing and feeding conditions [56].

In our study horses had higher concentrations of total SCFA at t3, C2 at t2, C3 at t3, IC5 at t3 and IC4 at t1 and t2 in the faeces than ponies. These results are in accordance with Jensen et al. (2010) [57] who showed that Danish warmbloods have higher faecal C3 and IC4 concentrations than Icelandic ponies when both groups received a diet consisting of sugar beet pulp, oats and haylage.

A limiting factor of our study is related to the identification of the genera. Only 1.8% of the analysed species and 74.2% of the genera were identified. Therefore, we can only draw limited functional conclusions from the generated sequencing data since the higher taxonomic categories often combine different functional groups. This is a main limitation in sequencing studies in the equine microbiota [12,58].

The analysis of faecal samples rather than samples obtained from the different sections of the gastrointestinal tract is a limitation of our study. Due to feasibility and animal welfare guidelines in most equine studies faeces have been used as a tool to describe the gut microbiota [9,13,26,28]. A correlation between dietary changes in the caecal, colonic and faecal microbiota was demonstrated by Grimm et al. (2017) [59]. But nevertheless the faecal microbiota represents at least the hindgut distal to the pelvic flexure[60].

Another limitation of our study is the fact that we only analysed faecal samples at three timepoints during the two-year study period. However, we conducted a standardised management and feeding protocol over two years. Furthermore, horses and ponies were used as their own control. Other authors already described a high stability in the faecal microbiota of individuals under identical management and feeding conditions for at least three months [13].

Reasons for equivocal results in studies comparing the microbiota of lean and obese horses might be related to differences in body weight classification and diet related differences. Similar to our study, the faecal microbiota of different individuals was compared. Biddle et al. (2018) [28] compared three different weight groups of horses while Morrison et al. (2018) [9] and Shepard et al. (2014) [26] compared an obese group of horses with a nonobese group of

animals. In contrast to these study protocols, each individual horse and pony was used at its own control in our study.

In conclusion BW gain seemed to change the composition of the equine microbiota in similar ways as already described. Comparing horses and ponies we found a higher abundance of the phylum Fibrobacteria at t3 and a lower abundance of Proteobacteria at t2 in the faecal microbiota of horses. We also found higher concentrations of different SCFA in the faeces of horses at these timepoints. The changes in the fermentation profile may have functional consequences. In order to gain more knowledge about the functional consequences of the changes in the microbiota during weight gain further research has to be conducted.

Supporting information

S1 Table. Coefficient of variation for the nutrient intake in horses and ponies two months prior to sampling point t1, t2, t3 and in between the three sampling points (CP: crude protein, CL: crude lipid, CF: crude fibre, aNDFom: neutral detergent fibre). Data shown as %.
(DOCX)

S2 Table. Relative abundance of Phyla in the faeces of horses and ponies with an overall median relative abundance over 0.4% at the three sampling points presented as medians and 25/ 75 percentiles in brackets.
(DOCX)

S3 Table. Relative abundance of Classes in the faeces of horses and ponies with an overall median relative abundance over 0.4% at the three sampling points presented as median and 25/ 75 percentiles in brackets.
(DOCX)

S4 Table. Relative abundance of Orders in the faeces of horses and ponies with an overall median relative abundance over 0.4% at the three sampling points presented as median and 25/ 75 percentiles in brackets.
(DOCX)

S5 Table. Relative abundance of Families in the faeces of horses and ponies with an overall median relative abundance over 0.4% at the three sampling points presented as median and 25/ 75 percentiles in brackets.
(DOCX)

S1 Data.
(XLSX)

S2 Data.
(XLSX)

S3 Data.
(XLSX)

S4 Data.
(XLSX)

S5 Data.
(ODS)

S6 Data.
(XLSX)

S7 Data.

(XLSX)

S8 Data.

(ODS)

S9 Data.

(XLSX)

Acknowledgments

We would like to thank E. Jacotot, M. C. De vos Franzin and P. Grimm from AgroSup Dijon for their assistance with the laboratory and statistical analysis. We also acknowledge S. Kleemann and M. Wacker for their support during the experimental trial.

Author Contributions

Conceptualization: Ingrid Vervuert.

Data curation: Katharina Langner, Dominique Blaue, Carola Schedlbauer, Janine Starzonek.

Formal analysis: Katharina Langner.

Funding acquisition: Ingrid Vervuert.

Investigation: Dominique Blaue, Carola Schedlbauer, Janine Starzonek.

Methodology: Katharina Langner, Veronique Julliand.

Project administration: Ingrid Vervuert.

Resources: Veronique Julliand, Ingrid Vervuert.

Software: Ingrid Vervuert.

Supervision: Ingrid Vervuert.

Validation: Katharina Langner.

Visualization: Katharina Langner.

Writing – original draft: Katharina Langner.

Writing – review & editing: Katharina Langner, Dominique Blaue, Carola Schedlbauer, Janine Starzonek, Veronique Julliand, Ingrid Vervuert.

References

1. Thatcher CD, Pleasant RS, Geor RJ, Elvinger F. Prevalence of overconditioning in mature horses in southwest Virginia during the summer. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2012; 26: 1413–1418. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2012.00995.x> PMID: 22946995
2. Potter SJ, Bamford NJ, Harris PA, Bailey SR. Prevalence of obesity and owners' perceptions of body condition in pleasure horses and ponies in south-eastern Australia. *Aust Vet J*. 2016; 94: 427–432. <https://doi.org/10.1111/avj.12506> PMID: 27785793
3. Robin CA, Ireland JL, Wylie CE, Collins SN, Verheyen KLP, Newton JR. Prevalence of and risk factors for equine obesity in Great Britain based on owner-reported body condition scores. *Equine Veterinary Journal*. 2015; 47: 196–201. <https://doi.org/10.1111/evj.12275> PMID: 24735219
4. Durham AE, Frank N, McGowan CM, Menzies-Gow NJ, Roelfsema E, Vervuert I, et al. ECEIM consensus statement on equine metabolic syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. <https://doi.org/10.1111/jvim.15423> PMID: 30724412
5. Engelhardt Wv, Breves G, Diener M, Gäbel G, editors. *Physiologie der Haustiere*. 5th ed. Stuttgart: Enke Verlag; 2015.

6. Dougal K, La Fuente G de, Harris PA, Girdwood SE, Pinloche E, Newbold CJ. Identification of a Core Bacterial Community within the Large Intestine of the Horse. *PLOS ONE*. 2013; 8: e77660. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077660> PMID: 24204908
7. Fernandes KA, Kittelmann S, Rogers CW, Gee EK, Bolwell CF, Bermingham EN, et al. Faecal microbiota of forage-fed horses in New Zealand and the population dynamics of microbial communities following dietary change. *PLoS ONE*. 2014; 9: e112846. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112846> PMID: 25383707
8. Dougal K, La Fuente G de, Harris PA, Girdwood SE, Pinloche E, Geor RJ, et al. Characterisation of the faecal bacterial community in adult and elderly horses fed a high fibre, high oil or high starch diet using 454 pyrosequencing. *PLoS ONE*. 2014; 9: e87424. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087424> PMID: 24504261
9. Morrison PK, Newbold CJ, Jones E, Worgan HJ, Grove-White DH, Dugdale AH, et al. The Equine Gastrointestinal Microbiome: Impacts of Age and Obesity. *Front Microbiol*. 2018; 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03017> PMID: 30581426
10. Costa MC, Stämpfli HR, Allen-Vercoe E, Weese JS. Development of the faecal microbiota in foals. *Equine Veterinary Journal*. 2016; 48: 681–688. <https://doi.org/10.1111/evj.12532> PMID: 26518456
11. Costa MC, Silva G, Ramos RV, Staempfli HR, Arroyo LG, Kim P, et al. Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. *The Veterinary Journal*. 2015; 205: 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.03.018> PMID: 25975855
12. Costa MC, Arroyo LG, Allen-Vercoe E, Stämpfli HR, Kim PT, Sturgeon A, et al. Comparison of the faecal microbiota of healthy horses and horses with colitis by high throughput sequencing of the V3-V5 region of the 16S rRNA gene. *PLoS ONE*. 2012; 7: e41484. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041484> PMID: 22859989
13. Blackmore TM, Dugdale A, Argo CM, Curtis G, Pinloche E, Harris PA, et al. Strong stability and host specific bacterial community in faeces of ponies. *PLoS ONE*. 2013; 8: e75079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075079> PMID: 24040388
14. Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe*. 2008; 3: 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.02.015> PMID: 18407065
15. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009; 457: 480–484. <https://doi.org/10.1038/nature07540> PMID: 19043404
16. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102: 11070–11075. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504978102> PMID: 16033867
17. Ley Ruth E., Turnbaugh Peter J., Klein Samuel, Gordon Jeffrey I. Human gut microbes associated with obesity. *Brief communications. Nature*. 2006; 441: xi–xi. <https://doi.org/10.1038/7093xic>
18. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101: 15718–15723. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407076101> PMID: 15505215
19. Rabot S, Membrez M, Bruneau A, Gérard P, Harach T, Moser M, et al. Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. *FASEB J*. 2010; 24: 4948–4959. <https://doi.org/10.1096/fj.10-164921> PMID: 20724524
20. Schéle E, Grahnmemo L, Anesten F, Hallén A, Bäckhed F, Jansson J-O. The gut microbiota reduces leptin sensitivity and the expression of the obesity-suppressing neuropeptides proglucagon (Gcg) and brain-derived neurotrophic factor (Bdnf) in the central nervous system. *Endocrinology*. 2013; 154: 3643–3651. <https://doi.org/10.1210/en.2012-2151> PMID: 23892476
21. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006; 444: 1027–1031. <https://doi.org/10.1038/nature05414> PMID: 17183312
22. Duncan SH, Lohley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P, et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes (Lond)*. 2008; 32: 1720–1724. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.155> PMID: 18779823
23. Armougom F, Henry M, Vialettes B, Raccach D, Raoult D. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and *Methanogens* in anorexic patients. *PLoS ONE*. 2009; 4: e7125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007125> PMID: 19774074
24. Million M, Angelakis E, Maraninchi M, Henry M, Giorgi R, Valero R, et al. Correlation between body mass index and gut concentrations of *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis*, *Methanobrevibacter smithii* and *Escherichia coli*. *Int J Obes (Lond)*. 2013; 37: 1460–1466. <https://doi.org/10.1038/ijo.2013.20> PMID: 23459324

25. Fleissner CK, Huebel N, Abd El-Bary MM, Loh G, Klaus S, Blaut M. Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity. *Br J Nutr*. 2010; 104: 919–929. <https://doi.org/10.1017/S0007114510001303> PMID: 20441670
26. Shepherd ML, Ponder MA, Burk AO, Milton SC, Swecker WS. Fibre digestibility, abundance of faecal bacteria and plasma acetate concentrations in overweight adult mares. *J Nutr Sci*. 2014; 3: e10. <https://doi.org/10.1017/jns.2014.8> PMID: 25191602
27. Liu R, Hong J, Xu X, Feng Q, Zhang D, Gu Y, et al. Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. *Nat Med*. 2017; 23: 859–868. <https://doi.org/10.1038/nm.4358> PMID: 28628112
28. Biddle AS, Tomb J-F, Fan Z. Microbiome and Blood Analyte Differences Point to Community and Metabolic Signatures in Lean and Obese Horses. *Front Vet Sci*. 2018; 5. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00225> PMID: 30294603
29. Elzinga SE, Weese JS, Adams AA. Comparison of the fecal Microbiota in Horses with Equine Metabolic Syndrome and metabolically normal Controls fed a similar all-forage diet. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2016; 44: 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.05.010>
30. Koliada A, Syzenko G, Moseiko V, Budovska L, Puchkov K, Perederiy V, et al. Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. *BMC Microbiol*. 2017; 17: 120. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1027-1> PMID: 28532414
31. Angelakis E, Armougom F, Million M, Raoult D. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future Microbiol*. 2012; 7: 91–109. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.142> PMID: 22191449
32. Frape D. Equine nutrition and feeding. 1. The digestive system, the large intestine, products of fermentation. S.11. 4th ed. Chichester: Wiley-Blackwell; 2010.
33. Alford P, Geller S, Richardson B, Slater M, Honnas C, Foreman J, et al. A multicenter, matched case-control study of risk factors for equine laminitis. *Preventive Veterinary Medicine*. 2001; 49: 209–222. [https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(01\)00188-x](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(01)00188-x) PMID: 11311954
34. Luthersson N, Mannfalk M, Parkin TDH, Harris P. Laminitis: Risk Factors and Outcome in a Group of Danish Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2017; 53: 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.03.006>
35. Wylie CE, Collins SN, Verheyen KLP, Newton JR. Risk factors for equine laminitis: A case-control study conducted in veterinary-registered horses and ponies in Great Britain between 2009 and 2011. *The Veterinary Journal*. 2013; 198: 57–69. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.08.028> PMID: 24070987
36. Schedlbauer C, Blaue D, Gericke M, Blüher M, Starzonek J, Gittel C, et al. Impact of body weight gain on hepatic metabolism and hepatic inflammatory cytokines in comparison of Shetland pony geldings and Warmblood horse geldings. *PeerJ*. 2019; 7: e7069. <https://doi.org/10.7717/peerj.7069> PMID: 31211018
37. Blaue D, Schedlbauer C, Starzonek J, Gittel C, Brehm W, Einspanier A, et al. Effects of body weight gain on insulin and lipid metabolism in equines. *Domestic Animal Endocrinology*. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2019.01.003> PMID: 31035090
38. Eiler H, Frank N, Andrews FM, Oliver JW, Fecteau KA. Physiologic assessment of blood glucose homeostasis via combined intravenous glucose and insulin testing in horses. *American Journal of Veterinary Research*. 2005; 66: 1598–1604. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.1598> PMID: 16261835
39. Durham AE. Endocrine Disease in Aged Horses. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2016; 32: 301–315. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.04.007> PMID: 27449391
40. Flachowsky G, Kamphues J, Rodehutschord M, Schenkel H, Staudacher W, Südekum KH, et al. Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung von Pferden. 2014.
41. Verordnung (EG) Nr. 152/2009 der Kommission vom 27. Januar 2009 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln. VO 152/2009; 2009.
42. Carroll CL, Huntington PJ. Body condition scoring and weight estimation of horses. *Equine Veterinary Journal*; 20: 41–45. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1988.tb01451.x> PMID: 3366105
43. Carter RA, Geor RJ, Burton Stanier W, Cubitt TA, Harris PA. Apparent adiposity assessed by standardised scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies. *Vet J*. 2009; 179: 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.02.029> PMID: 18440844
44. Jouany J. Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juices, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. *Science des Aliments*. 1982; 2: 131–144.
45. Yu Z, Morrison M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. Short technical report. *BioTechnique*. 2004; 36.

46. Sadet-Bourgeteau S, Philippeau C, Dequiedt S, Julliard V. Comparison of the bacterial community structure within the equine hindgut and faeces using Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA). *Animal*. 2014; 8: 1928–1934. <https://doi.org/10.1017/S1751731114001943> PMID: 25075719
47. Read T, Fortun-Lamothe L, Pascal G, Le Boulch M, Cauquil L, Gabinaud B, et al. Diversity and Co-occurrence Pattern Analysis of Cecal Microbiota Establishment at the Onset of Solid Feeding in Young Rabbits. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 973. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00973> PMID: 31134019
48. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*. 2016; 4: e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584> PMID: 27781170
49. Mahé F, Rognes T, Quince C, Vargas C de, Dunthorn M. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ*. 2014; 2: e593. <https://doi.org/10.7717/peerj.593> PMID: 25276506
50. Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012; 486: 222–227. <https://doi.org/10.1038/nature11053> PMID: 22699611
51. Chen L, Zhang Y-H, Huang T, Cai Y-D. Gene expression profiling gut microbiota in different races of humans. *Sci Rep.* 2016; 6. <https://doi.org/10.1038/srep23075> PMID: 26975620
52. Jansen WL, Geelen SNJ, van der Kuilen J, Beynen AC. Dietary soyabean oil depresses the apparent digestibility of fibre in trotters when substituted for an iso-energetic amount of corn starch or glucose. *Equine Veterinary Journal*. 2002; 34: 302–305. <https://doi.org/10.2746/042516402776186074> PMID: 12108752
53. Bush JA, Freeman DE, Kline KH, Merchen NR, Fahey GC. Dietary fat supplementation effects on in vitro nutrient disappearance and in vivo nutrient intake and total tract digestibility by horses. *J Anim Sci.* 2001; 79: 232–239. <https://doi.org/10.2527/2001.791232x> PMID: 11204705
54. Neumann AP, Suen G. The Phylogenomic Diversity of Herbivore-Associated *Fibrobacter* spp. Is Correlated to Lignocellulose-Degrading Potential. *mSphere*. 2018; 3. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00593-18> PMID: 30541780
55. Ragnarrson S., Jansson A. Comparison of grass haylage digestibility and metabolic plasma profile in Icelandic and standard bred horses. *Journal of animal physiology and animal nutrition*. 2010.
56. Steelman SM, Chowdhary BP, Dowd S, Suchodolski J, Janečka JE. Pyrosequencing of 16S rRNA genes in fecal samples reveals high diversity of hindgut microflora in horses and potential links to chronic laminitis. *BMC Vet Res.* 2012; 8: 231. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-231> PMID: 23186268
57. Jensen RB, Broker C, Knudsen KEB, Tauson AH. A comparative study of the apparent total tract digestibility of carbohydrates in Icelandic and Danish warmblood horses fed two different haylages and a concentrate consisting of sugar beet pulp and black oats. *Arch Anim Nutr.* 2010; 64: 343–356. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2010.504606> PMID: 21114231
58. Shepherd ML, Swecker WS, Jensen RV, Ponder MA. Characterization of the fecal bacteria communities of forage-fed horses by pyrosequencing of 16S rRNA V4 gene amplicons. *FEMS Microbiol Lett.* 2012; 326: 62–68. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02434.x> PMID: 22092776
59. Grimm P, Philippeau C, Julliard V. Faecal parameters as biomarkers of the equine hindgut microbial ecosystem under dietary change. *Animal*. 2017; 11: 1136–1145. <https://doi.org/10.1017/S1751731116002779> PMID: 28065211
60. Julliard V, Grimm P. HORSE SPECIES SYMPOSIUM: The microbiome of the horse hindgut: History and current knowledge. *J Anim Sci.* 2016; 94: 2262–2274. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-0198> PMID: 27285903

Supporting information

S1 Table: Coefficient of variation for the nutrient intake in horses and ponies two months prior to sampling point t1, t2, t3 and in between the three sampling points (CP: crude protein, CL: crude lipid, CF: crude fibre, aNDFom: neutral detergent fibre). Data shown as %.

Time	Hay	Starch	CP	CL	CF	aNDFom	sugar
-t1	8.58	11.8	13.3	10.9	9.13	9.75	8.75
-t2	4.64	11.2	6.47	9.16	10.8	4.66	5.38
-t3	6.41	11.6	8.56	11.9	8.00	9.97	6.84
-t1-t3	10.1	18.5	14.0	22.0	10.7	12.0	12.4
-t1-t2	10.8	18.6	15.5	22.2	11.5	11.2	9.69
-t2-t3	6.37	12.9	10.9	12.3	10.7	10.8	9.37

S2 Table: Relative abundance of Phyla in the faeces of horses and ponies with an overall median relative abundance over 0.4 % at the three sampling points presented as medians and 25/ 75 percentiles in brackets.

Phylum	Breed	t1	t2	t3
Firmicutes	Horses	55.7 (52.3/59.8)	57.2 (55.5/62.2)	58.5 (55.5/62.9)
	Ponies	54.0 ^{ab} (51.9/62.9)	58.5 ^a (53.2/63.8)	62.8 ^b (57.7/65.7)
Bacteroidetes	Horses	39.0 (35.0/40.5)	37.2 (34.0/40.4)	35.0 (32.7/36.5)
	Ponies	40.9 (33.1/43.6)	36.6 (29.4/42.9)	32.1 (28.9/38.3)
Spirocheates	Horses	3.16 (1.87/3.96)	1.72 (1.65/2.59)	2.39 (1.73/3.16)
	Ponies	2.21	1.89	1.78

Publikationen

		(1.70/3.65)	(1.75/2.18)	(1.34/2.28)
Phylum	Breed	t1	t2	t3
Fibrobacteres	Horses	1.90 ^a (1.05/2.45)	0.98 ^b (0.85/1.29)	1.11 ^{b#} (0.59/1.84)
	Ponies	0.78 (0.51/2.31)	0.79 (0.65/1.70)	0.38 [*] (0.09/0.88)
Proteobacteria	Horses	0.34 (0.31/0.69)	0.61 [#] (0.52/0.92)	0.52 (0.43/0.99)
	Ponies	0.60 ^a (0.37/0.85)	1.14 ^{b*} (0.81/1.45)	0.43 ^a (0.27/0.70)
Actinobacteria	Horses	0.37 ^a (0.30/0.49)	0.34 ^{ab} (0.30/0.43)	0.88 ^b (0.54/1.31)
	Ponies	0.33 ^a (0.31/0.49)	0.39 ^a (0.33/0.59)	0.77 ^b (0.67/1.25)

a, b medians with different subscript letters differ significantly within a row ($p < 0.05$)

*, # medians with different subscript symbols differ significantly within a column ($p < 0.05$)

S3 Table: Relative abundance of Classes in the faeces of horses and ponies with an overall median relative abundance over 0.4 % at the three sampling points presented as median and 25/ 75 percentiles in brackets.

Class	Breed	t1	t2	t3
Clostridia	Horses	54.4 (51.9/59.7)	56.1 (54.2/59.5)	56.7 (53.6/60.7)
	Ponies	53.3 (51.0/62.0)	57.5 (51.9 /62.2)	60.2 (56.5/63.4)
Bacteroidia	Horses	39.0 (35.0/40.5)	37.2 (34.0/40.4)	35.0 (32.7/36.5)
	Ponies	40.9 (33.1/43.6)	36.6 (29.4/42.9)	32.1 (29.0/38.3)
Class	Breed	t1	t2	t3

Publikationen

Spirochaetia	Horses	3.15 (1.78/3.92)	1.70 (1.61/2.46)	2.39 (1.72/3.13)
	Ponies	1.90 (1.58/2.90)	1.80 (1.58/1.99)	1.70 (0.94/2.25)
Fibrobacteria	Horses	1.90 ^a (1.06/2.45)	0.98 ^b (0.85/1.29)	1.11 ^{b#} (0.59/1.84)
	Ponies	0.78 (0.51/2.31)	0.80 (0.65/1.70)	0.38* (0.09/0.88)
Bacilli	Horses	0.39 ^a (0.23/0.66)	0.42 ^a (0.27/0.61)	1.21 ^b (0.81/2.37)
Coriobacteriia	Horses	0.37 ^a (0.29/0.49)	0.34 ^{ab} (0.30/0.43)	0.80 ^b (0.52/1.29)
	Ponies	0.33 ^a (0.30/0.49)	0.39 ^a (0.33/0.59)	0.77 ^b (0.67/1.25)
Negativicutes	Horses	0.31 (0.12/0.38)	0.57 (0.41/0.70)	0.49 (0.39/0.57)
	Ponies	0.32 ^a (0.27/0.64)	0.81 ^b (0.41/1.24)	0.39 ^a (0.23/0.84)

a, b medians with different subscript letters differ significantly within a row ($p < 0.05$)

*, # medians with different subscript symbols differ significantly within a column ($p < 0.05$)

S4 Table: Relative abundance of Orders in the faeces of horses and ponies with an overall median relative abundance over 0.4 % at the three sampling points presented as median and 25/ 75 percentiles in brackets.

Order	Breed	t1	t2	t3
Clostridiales	Horses	54.4 (52.0/59.7)	56.1 (54.2/59.5)	56.7 (53.6/60.7)
	Ponies	53.3 (51.0/62.0)	57.5 (51.9/62.2)	60.2 (56.5/63.4)
Bacteroidales	Horses	39.0 (35.0/40.5)	37.2 (33.8/40.4)	35.0 (32.6/36.4)
	Ponies	40.9 (33.1/43.6)	36.6 (29.4/42.9)	32.1 (29.0/ 38.3)
Spirochaetales	Horses	3.15 (1.78/3.92)	1.70 (1.61/2.46)	2.39 (1.72/3.13)
	Ponies	1.90 (1.58/2.90)	1.79 (1.58/2.00)	1.70 (0.94/2.25)
Fibrobacterales	Horses	1.90 (1.06/2.45)	0.98 (0.85/1.29)	1.11 [#] (0.59/1.84)
	Ponies	0.78 ^a (0.51/2.31)	0.80 ^b (0.65/1.70)	0.38 ^{a*} (0.09/0.88)
Lactobacillales	Horses	0.39 (0.23/0.66)	0.42 (0.27/0.61)	1.23 (0.78/ 2.35)
Coriobacteriales	Horses	0.37 ^a (0.30/0.49)	0.34 ^{ab} (0.29/0.43)	0.80 ^b (0.52/1.29)
	Ponies	0.33 ^a (0.30/0.49)	0.39 ^a (0.33/0.60)	0.77 ^b (0.67/1.25)
Selenomonadales	Horses	0.31 (0.12/0.38)	0.57 (0.41/0.70)	0.49 (0.39/0.57)
	Ponies	0.32 ^a (0.27/0.64)	0.8 ^b (0.41/1.24)	0.39 ^a (0.23/0.84)

a, b medians with different subscript letters differ significantly within a row ($p < 0.05$)

*, # medians with different subscript symbols differ significantly within a column ($p < 0.05$)

S5 Table: Relative abundance of Families in the faeces of horses and ponies with an overall median relative abundance over 0.4 % at the three sampling points presented as median and 25/ 75 percentiles in brackets.

Family	Breed	t1	t2	t3
Ruminococcaceae	Horses	25.0 ^a (22.5/29.1)	24.2 ^a (22.7/31.9)	21.4 ^{b#} (19.0/22.6)
	Ponies	24.5 (23.9/32.2)	27.2 (24.1/33.9)	25.2* (20.9/26.1)
Lachnospiraceae	Horses	23.9 ^a (20.5/25.6)	22.9 ^{ab} (20.8/26.4)	31.3 ^b (25.9/32.5)
	Ponies	22.7 (20.7/23.3)	22.7 (20.8/25.0)	26.8 (24.0/28.6)
p-251-o5	Horses	14.1 (10.6/15.5)	12.4 (8.88/ 13.8)	11.5 (8.59/13.9)
	Ponies	12.9 (6.38/13.8)	9.96 (7.23/11.9)	8.55 (3.08/ 10.3)
Prevotellaceae	Horses	10.8 (8.12/11.9)	9.97 (7.55/11.7)	11.6 (10.1/ 13.0)
	Ponies	8.34 (6.46/9.94)	10.4 (6.83/13.2)	9.88 (5.34/12.3)
Rikenellaceae	Horses	7.15 (5.33/7.65)	5.63 (4.19/6.39)	4.80 [#] (4.18/6.17)
	Ponies	7.40 ^{ab} (4.51/8.17)	5.58 ^a (4.77/5.93)	6.80 ^{b*} (5.56/9.50)
F082	Horses	2.66 ^{a#} (1.81/2.84)	4.46 ^a (2.13/9.44)	1.50 ^{b#} (1.10/1.88)
	Ponies	6.34* (4.09/9.94)	5.67 (3.29/7.00)	5.16* (2.65/5.74)

Publikationen

Family	Breed	t1	t2	t3
Christensenellaceae	Horses	2.95 (2.55/3.25)	3.29 (2.99/3.68)	3.33 (2.99/3.96)
	Ponies	3.31 (2.96/3.71)	4.30 (3.33/4.85)	3.87 (3.08/6.95)
Spirochaetaceae	Horses	3.15 (1.78/3.92)	1.70 (1.62/2.46)	2.39 (1.72/3.13)
	Ponies	1.90 (1.58/2.90)	1.80 (1.58/2.00)	1.70 (0.94/2.25)
Family XIII	Horses	1.91 (1.67/2.27)	1.91 (1.85/2.42)	2.01 (1.64/2.86)
	Ponies	1.80 (1.64/1.97)	2.15 (1.90/2.46)	3.09 (1.48/4.26)
Bacteroidales UCG-001	Horses	1.14 (0.94/1.84)	0.90 (0.62/1.39)	0.60 [#] (0.52/0.93)
	Ponies	1.22 (1.02/1.64)	0.90 (0.75/1.13)	1.21 [*] (1.03/1.42)
Fibrobacteraceae	Horses	1.90 ^a (1.06/2.45)	0.98 ^b (0.85/1.29)	1.11 ^{b#} (0.59/1.84)
	Ponies	0.78 (0.51/2.31)	0.80 (0.65/1.70)	0.38 [*] (0.09/0.88)

Publikationen

Family	Breed	t1	t2	t3
Paludibacteraceae	Horses	0.68 (0.26/0.81)	0.35 (0.19/1.15)	0.26 (0.13/0.67)
	Ponies	0.44 (0.17/1.66)	0.57 (0.34/1.07)	0.12 (0.05/ 0.79)
Muribaculaceae	Horses	0.75 (0.61/1.17)	1.55 (1.10/1.74)	1.24 (0.84/2.81)
	Ponies	0.93 ^a (0.47/1.93)	1.62 ^b (1.13/2.64)	1.14 ^a (0.72/1.57)
Bacteroidales RF16 group	Horses	0.81 ^a (0.59/1.00)	0.45 ^{ab} (0.28/0.63)	0.29 ^b (0.13/0.50)
	Ponies	0.62 ^a (0.36/0.89)	0.40 ^{ab} (0.35/0.49)	0.17 ^b (0.14/0.28)
Veillonellaceae	Horses	0.31 (0.12/0.38)	0.57 (0.41/0.70)	0.49 (0.39/0.57)
	Ponies	0.32 ^a (0.27/0.64)	0.81 ^b (0.41/1.24)	0.39 ^a (0.23/0.84)

a, b medians with different subscript letters differ significantly within a row ($p < 0.05$)

*, # medians with different subscript symbols differ significantly within a column ($p < 0.05$)

3.2 Beeinflussung der equinen Mikrobiota durch Fütterung und Probiotika: aktueller Stand der Forschung und rechtliche Grundlagen

Katharina Langner, Ingrid Vervuert

Tierärztliche Praxis Großtiere/ Nutztiere 2019, 47: 35-48

DOI 10.1055/a-0824-5210

Eigenanteil bei der Erstellung des Übersichtsartikels

Die Autorin erstellte selbständig das vorliegende Manuskript. Dazu recherchierte die Autorin die einschlägigen Quellen und erstellte auf deren Grundlage die im Manuskript enthaltenen Literaturtabellen und Abbildungen. Idee zu dem Thema und Revision des Manuskripts durch I. Vervuert.

Persönliche PDF-Datei für Katharina Langner, Ingrid Vervuert

Mit den besten Grüßen vom Georg Thieme Verlag

www.thieme.de

Beeinflussung der equinen Mikrobiota durch Fütterung und Probiotika: aktueller Stand der Forschung und rechtliche Grundlagen

DOI <https://doi.org/10.1055/a-0824-5210>
Tierärztliche Praxis Großtiere/Nutztiere 2019; 47: 35–48

Dieser elektronische Sonderdruck ist nur für die Nutzung zu nicht-kommerziellen, persönlichen Zwecken bestimmt (z. B. im Rahmen des fachlichen Austauschs mit einzelnen Kollegen und zur Verwendung auf der privaten Homepage des Autors). Diese PDF-Datei ist nicht für die Einstellung in Repositorien vorgesehen, dies gilt auch für soziale und wissenschaftliche Netzwerke und Plattformen.

Verlag und Copyright:
© 2018 by
Georg Thieme Verlag KG
Rüdigerstraße 14
70469 Stuttgart
ISSN 1434-1220

Nachdruck nur
mit Genehmigung
des Verlags

H₂ produziert [19]. Einen großen Einfluss auf die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota und das Milieu im Dickdarm hat die Fütterung. So führt beispielsweise eine stärkereiche Fütterung zu einem Anstieg von Bakterien, die Stärke verwerten und Laktat produzieren [15][25][31][40], während die Anzahl der für die Faserverdauung zuständigen zellulolytischen Bakterien sinkt [15][31][40][43][45]. Dadurch kommt es zu einem Anstieg der Laktat- und SCFA-Konzentration sowie zum Abfall des pH-Werts im Dickdarmchymus [25][32]. Änderungen in der Zusammensetzung dieser komplexen Mikrobiota werden auch bei Erkrankungen wie Kolik [79], Hufrehe [72], Kolitis [9], Grass Sickness [47] und Durchfall [68] beobachtet. Nach jetzigem Forschungsstand ist jedoch unklar, ob diese Veränderungen die Ursache der auftretenden Erkrankung sind oder sich infolge von Schmerz, Stress und Veränderungen der Darmmotilität entwickeln, die mit den beschriebenen Erkrankungen einhergehen [12]. Dennoch wird immer wieder versucht, die equine Mikrobiota prophylaktisch oder therapeutisch durch Gabe von Probiotika zu beeinflussen.

Mikrobiota im Magen-Darm-Trakt

Adulte Pferde

Der Begriff Mikrobiota beschreibt alle mikroskopisch sichtbaren lebenden Organismen einer Region [5]. Im Dickdarm des Pferdes gehören dazu beispielsweise neben den Bakterien Protozoen, Viren, Pilze und Archaea [16][76]. Während eine bakterielle Besiedelung beim Pferd im gesamten MDT einschließlich des Magens beschrieben wurde [10][22], gibt es bis jetzt keine Studien zum Vorkommen weiterer Mikroorganismen der equinen Mikrobiota in den vorderen Abschnitten des MDT wie Magen oder Dünndarm [42]. Die Bakterien, die den überwiegenden Bestandteil der equinen Mikrobiota darstellen [4][76], werden taxonomisch zunächst in Stämme unterteilt, die wiederum in Klassen mit unterschiedlichen Ordnungen gegliedert sind. Eine Ordnung enthält mehrere Familien, die verschiedene Genera umfassen (Beispiel in ► **Tab. 1**).

Die Mikrobiota des equinen MDT kann mittels unterschiedlicher Kultivierungsmethoden untersucht werden. Da die meisten der im MDT angesiedelten Mikroorganismen nur unter anaeroben Bedingungen wachsen, ist eine solche Kultivierung jedoch sehr aufwendig und nicht in der Lage, alle im MDT vorkommenden Spezies nachzuweisen [42]. Zudem muss bei Kultivierungsverfahren die Lebens- bzw. Vermehrungsfähigkeit der Bakterien gegeben sein. Eine erfolgreiche Kultivierung setzt des Weiteren Kenntnisse zu den spezifischen Wachstumsfaktoren und -anforderungen der Bakterien voraus. Die kulturunabhängigen Methoden wie das Next Generation Sequencing sind deshalb besser geeignet, um die Mikrobiota des Pferdes in ihrer Gesamtheit, und auch unabhängig von der Lebens- bzw. Vermehrungsfähigkeit der Bakterien, zu untersuchen. Mittels Sequenzierung konnte die bakterielle Besiedelung im kompletten MDT des Pferdes aufgezeigt werden (► **Abb. 1**), wobei die Diversität der Mikrobiota vom Magen in Richtung Dickdarm zunimmt [10]. Ferner wurde festgestellt, dass das Vorkommen unterschiedlicher Bakterienstämme in den einzelnen Abschnitten des MDT stark differiert [10][22]. Im Magen und Duodenum dominiert der Stamm Firmicutes. Dies gilt ebenso für das Jejunum und Ileum, wobei hier auch der Stamm Proteobacteria sehr prominent ist. Hin-

► **Tab. 1** Beispielhafte Darstellung der taxonomischen Einteilung der Bakterien anhand des Genus *Lachnospira*

► **Table 1** Exemplary description of the taxonomic classification of the bacterial kingdom based on the Genus *Lachnospira*.

Taxonomische Einteilung	Beispiel Genus <i>Lachnospira</i>
Stamm (Phylum)	Firmicutes
Klasse	Clostridia
Ordnung	Clostridiales
Familie	Lachnospiraceae
Genus	Lachnospira

ter der Ileozäkalklappe ist der Stamm Proteobacteria im Zäkum deutlich seltener vertreten, während je nach Studienergebnis die Stämme Verrucomicrobia [10] bzw. Bacteroidetes [18][22] nach den Firmicutes die zweithäufigsten Bakterienstämme im Dickdarm darstellen. Auch wenn sich die bakterielle Mikrobiota im Dickdarm auf Ebene der Bakterienstämme relativ uniform darstellt, bestehen nach differenzierten Untersuchungen der verschiedenen Dickdarmabschnitte deutliche Unterschiede zwischen der bakteriellen Mikrobiota auf Ebene der Bakterienfamilien und -gattungen proximal und distal der Flexura pelvina [18][42]. Deshalb ermöglicht die Untersuchung von Kotproben lediglich zuverlässige Aussagen über die Mikrobiota der distalen Dickdarmabschnitte wie Colon dorsale und Colon descendens.

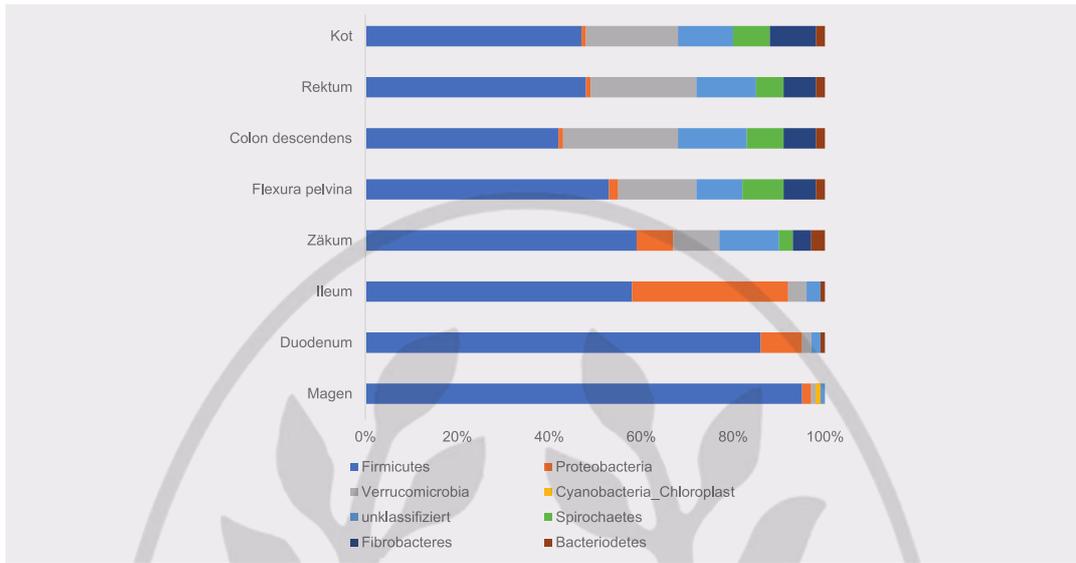
Innerhalb des Bakterienstamms Firmicutes, der den dominierenden Stamm im MDT des Pferdes darstellt, sind Bacilli die vorherrschende Bakterienklasse im Magen und Duodenum, während im Dickdarm die Klasse Clostridia stark vertreten ist [10].

Die oben genannten Befunde beziehen sich auf Pferde, die entweder aufgrund von Erkrankungen, die nicht mit dem MDT in Zusammenhang standen, eingeschläfert [10][22] oder gesund zur Fleischgewinnung geschlachtet wurden [18]. Da jedoch auch Stressfaktoren wie Transport [23][66], Nahrungsentzug [66], Anästhesie [66] oder extreme Arbeit [35] die Mikrobiota verändern können, ist es nahezu unmöglich, Versuchstiere zu finden, bei denen sich Veränderungen in der Mikrobiota durch Stressfaktoren ausschließen lassen. Sofern Angaben zur Fütterung gemacht wurden, bestanden die Rationen der Pferde entweder aus Gras und Heu [18] oder aus Heu und teilweise moderaten, nicht näher spezifizierten Kraftfuttermengen [10].

Anaerobe Pilze, Protozoen und Archaea, die nur einen sehr geringen Anteil an der intestinalen Mikrobiota des Pferdes ausmachen [76], wurden in allen Abschnitten des Dickdarms nachgewiesen [16]. Shepherd et al. [70] identifizierten 1% der im Kot ermittelten Sequenzen als Archaea. Während die anaeroben Pilze alle Dickdarmabschnitte gleichmäßig besiedeln, kommen Protozoen und Archaea vorwiegend im Colon dorsale dextrum vor [16].

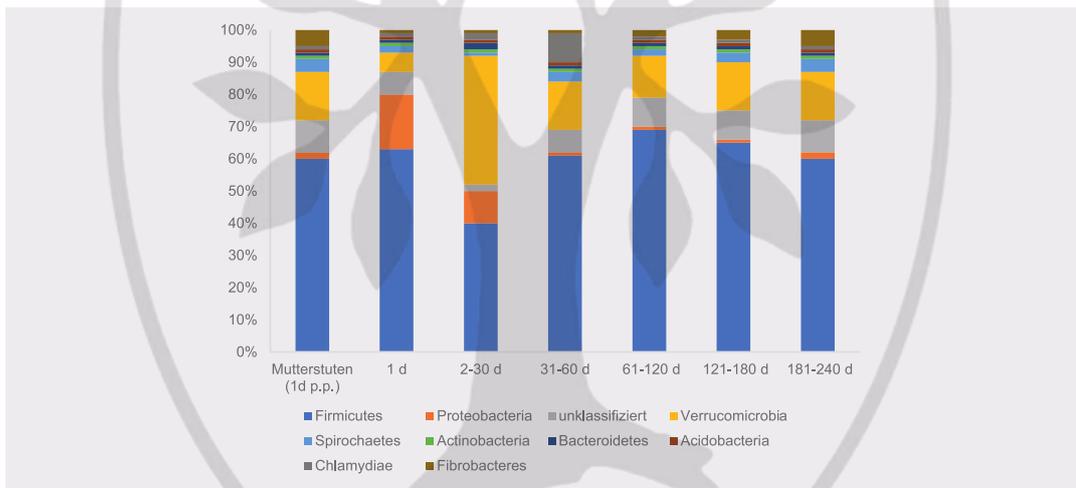
Fohlen

Nach neuesten Untersuchungen mittels Sequenzierung besitzen Fohlen bereits nach der Geburt eine sehr diverse fäkale bakterielle Mikrobiota, die durch den Stamm Firmicutes dominiert wird (► **Abb. 2**). Im Alter von 2–30 Tagen herrscht das Genus Akker-



► **Abb. 1** Bakterielle Mikrobiota in den verschiedenen Kompartimenten des equinen Magen-Darm-Trakts (nach Daten von Costa et al. [10]) (© K. Langner)

► **Fig. 1** Bacterial microbiota in the different compartments of the equine gastrointestinal tract (according to data from Costa et al. [10]) (© K. Langner).



► **Abb. 2** Entwicklung der fäkalen Mikrobiota beim Fohlen (nach Daten von Costa et al. [11]). p. p.: post partum (© K. Langner).

► **Fig. 2** Development of the faecal microbiota in foals (according to data from Costa et al. [11]). p. p.: post partum (© K. Langner).

mansia vor, ein Muzin abbauendes Bakterium, das zum Stamm der Verrucomicrobia gehört. Dadurch sind die Stämme Verrucomicrobia und Firmicutes zu diesem Zeitpunkt zu gleichen Teilen in der fäkalen bakteriellen Mikrobiota der Fohlen vertreten. Ab dem 31. Lebenstag dominiert dann wieder der Stamm Firmicutes. Im Lauf der Entwicklung der Fohlen wird ihre fäkale bakterielle Mikrobiota der

ihrer Mütter immer ähnlicher und die Diversität im Kot nimmt ab. Ab dem 60. Tag bleibt die fäkale Mikrobiota der Fohlen weitestgehend konstant und ähnelt der ihrer Mütter. Nach dem Absetzen der Fohlen am 180. Tag kommt es zu einem Anstieg des Stamms Fibrobacteres im Kot [11].

Veränderungen der equinen Mikrobiota bei Durchfall, Kolitis und Grass Sickness

Bei adulten Pferden und Fohlen mit Durchfallssymptomen war die Anzahl der unterschiedlichen Bakterienspezies im Kot erheblich geringer als bei gesunden Tieren [61][68]. Außerdem konnten die zur Bakterienklasse Clostridia gehörenden Familien Lachnospiraceae [9][68] und Ruminococcaceae [61][68] deutlich häufiger bei gesunden als bei an Durchfall erkrankten Tieren im Kot nachgewiesen werden.

Bei Pferden, die an einer Kolitis litten, zeigten sich im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren auf Ebene der Bakterienstämme deutliche Unterschiede im Kot [9]. So war bei Ersteren Bacteroidetes mit 40 % der am häufigsten vertretene Bakterienstamm, gefolgt von Firmicutes (30 %) und Proteobacteria (18 %), wobei der Nachweis im Kot erfolgte. Dagegen stellte bei den gesunden Tieren Firmicutes (68 %) den dominanten Bakterienstamm dar, gefolgt von Bacteroidetes (14 %) und Proteobacteria (10 %). Eine ähnliche Tendenz ermittelten Rodriguez et al. [61] bei Pferden mit Durchfall: Der Stamm Firmicutes (zu dem auch die Klasse der Clostridia gehört) lag im Kot reduziert vor, während beim Stamm Verrucomicrobia ein Anstieg zu verzeichnen war.

Die bei Pferden mit Grass Sickness (EGS) nachgewiesenen Dysbiosen ähnelten ebenfalls denen von Pferden mit Kolitis [9][47]. So stellten Leng et al. [47] bei der Untersuchung der fäkalen Mikrobiota von 19 an Grass Sickness erkrankten Pferden fest, dass im Vergleich zur Kontrollgruppe die Stämme Bacteroidetes und Proteobacteria vermehrt auftraten und die Stämme Firmicutes und Verrucomicrobia deutlich seltener vorkamen. Die Familie Clostridia, zu der auch das als möglicher Mitverursacher der EGS geltende Bakterium *Clostridium botulinum* gehört [60], war bei den an EGS

erkrankten Pferden seltener im Kot nachzuweisen als bei der Kontrollgruppe [47].

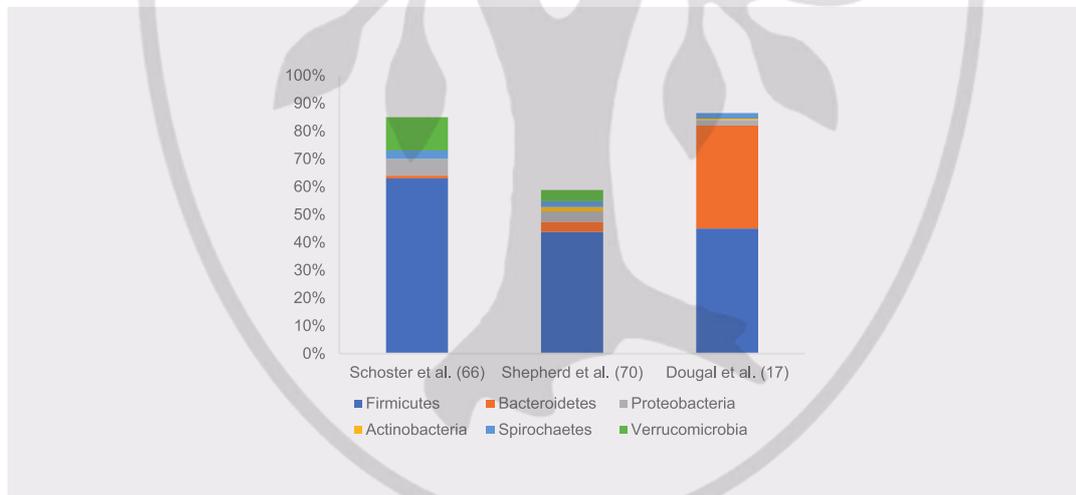
Einfluss der Fütterung auf die intestinale Mikrobiota

Fütterung von Heu

Studien, die mittels Sequenzierung die bakterielle Mikrobiota im Kot von ausschließlich mit Heu gefütterten Pferden untersuchten, ergaben, dass bei diesen der Stamm Firmicutes dominiert (► **Abb. 3**) [17][66][70]. Dieser grampositive Bakterienstamm wird bei Heufütterung vorwiegend durch die Klasse Clostridia repräsentiert [66]. Obwohl zu dieser Klasse auch einige Spezies gehören, die Erkrankungen auslösen können, hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass die Clostridien in der Mikrobiota des equinen MDT vermutlich eine wichtige Rolle spielen. So werden beispielsweise die Bakterienfamilien Lachnospiraceae und Ruminococcaceae all-gemein mit Darmgesundheit assoziiert [9][68]. Als zweithäufigst auftretender Bakterienstamm bei Heufütterung wurde in einigen Studien Verrucomicrobia [66][70] identifiziert, in einer anderen Untersuchung [17] der Stamm Bacteroidetes.

Trotz der vorliegenden Studien zur Zusammensetzung der bakteriellen Mikrobiota des Pferdes lassen sich keine klaren Aussagen zur physiologischen equinen Mikrobiota treffen. Zum einen schwankt die Zusammensetzung der Mikrobiota trotz identischer Fütterung tierindividuell erheblich [3]. Zum anderen gibt es Hinweise, dass die verwendeten Sequenzierungs- und DNA-Extraktionsmethoden die Ergebnisse erheblich beeinflussen [4][71], weshalb ein Vergleich von Studien, die unterschiedliche Methoden verwendet haben, nur bedingt möglich ist.

Elektronischer Sonderdruck zur persönlichen Verwendung



► **Abb. 3** Zusammensetzung der fäkalen bakteriellen Mikrobiota bei Heufütterung (nach Daten von Schoster et al. [66], Shepherd et al. [70] und Dougal et al. [17]) (© K. Langner)

► **Fig. 3** Composition of the faecal bacterial microbiota after feeding hay (according to data from Schoster et al. [66], Shepherd et al. [70] and Dougal et al. [17]) (© K. Langner).

Fütterung von Silage oder Heulage

Silage weist im Vergleich zu Heu aufgrund der Herstellung durch Milchsäuregärung einen deutlich niedrigeren pH-Wert und geringere Zuckergehalte sowie höhere Laktat- und SCFA-Gehalte auf (► Tab. 2). Die aus stark getrocknetem Material hergestellten Heulagen bieten schlechtere Bedingungen für die Milchsäuregärung [34] und haben verglichen mit Silagen höhere pH-Werte und höhere Zuckergehalte sowie geringere Laktat- und SCFA-Gehalte [55] [57]. Mehrere Untersuchungen überprüften mittels Kultivierungsmethoden an fistulierten Pferden die Auswirkungen konservierter Futtermittel auf die Mikrobiota und das Milieu im Kolon und Kot. Nennenswerte Veränderungen zeigten sich weder unmittelbar nach der Futterumstellung von Heu (Trockensubstanz[TS]-Gehalt 81 %) auf Silage (TS-Gehalt 36 %) oder Heulage (TS-Gehalt 55 %) [55] noch bei längerfristiger Fütterung von Heulage und Silage [57].

► **Tab. 3** zeigt die nach 21-tägiger Fütterung von Heu, Heulage und Silage kultivierten Bakteriengruppen und den pH-Wert für die verschiedenen Arten der Grünfütterkonservierung. Bei der Fütterung von Heulage konnten weniger Streptokokken kultiviert werden als bei der Fütterung von Heu oder Silage. Da aber die Fütterung die Gesamtzahl der laktatproduzierenden Bakterien, zu denen die Streptokokken gehören, und die Laktatkonzentration im Kolonchymus nicht signifikant beeinflusste, hat dieses Ergebnis vermutlich keine Relevanz. Entgegen der landläufigen Meinung fanden sich keine wissenschaftlich fundierten Hinweise für eine Azidierung

des Dickdarmchymus oder massive Verschiebungen in der bakteriellen Mikrobiota durch die Fütterung von Silage und Heulage. Aus wissenschaftlicher Sicht gibt es daher keinen Grund, auf Silage und Heulage als Raufutter pauschal zu verzichten, wobei vor allem Pferde mit Asthma von einer solchen Fütterung profitieren [75].

Fütterung von stärkereichem Kraftfutter

Im Vergleich zu anderen Tierarten weisen Pferde im Speichel keine und im Dünndarm eine deutlich geringere Aktivität des Enzyms Amylase auf, das für den Abbau von Polysacchariden wie z. B. Stärke notwendig ist. Dies beruht wahrscheinlich auf der evolutionären Anpassung des Pferdes an eine stärkearme Ration, die vorwiegend aus pflanzlichen Zellwandbestandteilen besteht [21]. Eine Fütterung von mehr als 200 g Stärke pro 100 Kilogramm Körpermasse und Mahlzeit überschreitet die präzäkale Verdauungskapazität des Pferdes und Stärke gelangt in den Dickdarm [41]. Verschiedene Autoren untersuchten die Auswirkungen der Anflutung von Stärke auf die bakterielle Mikrobiota und das Milieu des Dickdarms. Im Fokus standen die unterschiedlichen funktionellen Bakteriengruppen im Zäkum- und Kolonchymus bei Pferden mit Darmfisteln.

Durch die Anflutung von Stärke im Dickdarm steigt die Anzahl der stärkeverwertenden Bakterien, zu denen auch Laktobazillen und Streptokokken gehören [15][25][31][40]. Diese Bakterien fermentieren Stärke und produzieren neben Gasen und SCFAs wie Propionat hauptsächlich Laktat [40][43]. Als Konsequenz stärkereicher Mahlzeiten steigt die Laktatkonzentration im Dickdarmchymus [13][25][31][40][45]. Zudem erhöht sich die Gesamtzahl der anaeroben Bakterien [15][25][31][40], wodurch auch mehr SCFAs gebildet werden [25][31][32][40][45]. Laktat und SCFAs führen zu einer Azidierung des Dickdarmmilieus, sodass nach Überschreitung der vorhandenen Pufferkapazität der pH-Wert im Dickdarmchymus absinkt [32][40][45]. Durch den verringerten pH-Wert geht die Anzahl der für die Faserverdauung zuständigen zellulolytischen Bakterien, die säureintolerant sind, zurück [15][31][40][43][45], während sich säuretolerante Bakterien wie Laktobazillen und Streptokokken verstärkt vermehren [25]. Des Weiteren steigt die Zahl der laktatverwertenden Bakterien [15][31]. Da die zellulolytischen Bakterien vorwiegend Azetat und die laktatverwertenden Bakterien vermehrt Propionat produzieren [43], führt die veränderte Zusammensetzung der funktionellen Bakteriengruppen im Dickdarm

► **Tab. 2** Futtermittelkundliche Daten von Silage, Heulage und Heu (nach Daten von Müller et al. [57] und Muhonen et al. [55])

► **Table 2** Data concerning the feed characteristics of silage, haylage and hay (according to data from Müller et al. [57] and Muhonen et al. [55]).

Parameter	Silage	Heulage	Heu
Trockensubstanz (TS) (%)	36	55	81
Glukose (g/kg TS)	31	49	42
Laktat (g/kg TS)	43	1,3	0,3
pH-Wert	4,4	5,6	5,96

► **Tab. 3** Bakterienzahl (Angabe als logarithmierter Wert der koloniebildenden Einheiten pro Gramm) und pH-Wert nach 21-tägiger Fütterung von Silage, Heulage oder Heu als Mittelwert der beiden Probenentnahmeorte rechte ventrale Kolonlage und Kot (nach Daten von Müller et al. [57])

► **Table 3** Microbial counts (indicated in log colony forming units per gram) and pH after feeding silage, haylage or hay for 21 days as a mean of the two sampling locations of the right ventral colon and faeces (according to data from Müller et al. [57]).

Futtermittel	Zellulolytische Bakterien	Gesamtzahl Anaerobier	Laktatverwertende Bakterien	Laktatproduzierende Bakterien	Streptococci	pH-Wert
Silage	5,4	8,0	7,4	7,0	6,1 ^a	6,81
Heulage	5,5	8,3	7,3	6,4	5,7 ^b	6,64
Heu	5,4	8,0	7,6	6,8	6,7 ^a	6,75

^{a,b} Unterschiedliche Kleinbuchstaben weisen auf eine Differenz mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ hin.

auch zu einem veränderten Muster der SCFAs. Der Propionatanteil steigt, der Anteil an Azetat nimmt ab, sodass der Azetat/Propionat-Quotient sinkt [22][23][29][33].

Veränderungen in der Mikrobiota durch stärkereiche Rationen werden vielfach mit der Auslösung von Hufrehe in Verbindung gebracht. Bei Untersuchungen der Mikrobiota während der experimentellen Auslösung einer Hufrehe durch Überlastung des MDT mit Oligofruktose oder Stärke ließ sich unmittelbar vor Beginn der Hufrehesymptomatik ein Anstieg von Streptokokken und Laktobazillen im Zäkumchymus und Kot der Pferde nachweisen [51][53]. Die Zunahme dieser laktatproduzierenden Bakterien bewirkte einen Anstieg der Laktatkonzentration und einen Abfall des pH-Werts auf bis zu 4 im Zäkumchymus [51][52]. Dieser niedrige pH-Wert im Dickdarm und die hohe Laktatkonzentration führen zu einer erhöhten Permeabilität der Darmmukosa [2]. Dadurch können vermutlich bakterielle Endotoxine, die beim Zerfall von Bakterien im Darm freigesetzt werden, sowie von den Darmbakterien gebildete Exotoxine und Monoamine vermehrt in die Blutbahn der Pferde gelangen. Die genannten Toxine und Monoamine werden als Triggerfaktoren bei der Auslösung der Hufrehe diskutiert, wobei die Rolle der einzelnen Faktoren nicht abschließend geklärt ist [2].

Zur Frage, inwieweit die im Kolon- und Zäkumchymus beobachteten Veränderungen im Kot nachvollzogen werden können, gibt es heterogene Ergebnisse. Einige Untersucher wiesen bei stärkereicher Fütterung im Kot ähnliche Veränderungen der bakteriellen Mikrobiota wie in Zäkum und Kolon nach [31][33], während sich das in anderen Untersuchungen nicht bestätigen ließ [26].

Studien, in denen mittels Sequenzierung der Einfluss einer stärkereichen Fütterung im Chymus von Zäkum und Kolon untersucht wurde, ergaben, dass bei stärkereicher Fütterung die Diversität der bakteriellen Mikrobiota abnimmt [32][45]. Außerdem wurde ein Anstieg der laktatproduzierenden und stärkerwertenden *Bacillus-Lactobacillus-Streptokokkus*-Gruppe festgestellt, während das zellulolytische Genus *Fibrobacter* seltener vorkam [13].

Abschließend lässt sich feststellen, dass es auf dem Gebiet der Interaktion zwischen der intestinalen Mikrobiota des Pferdes und der Fütterung einen erheblichen Forschungsbedarf gibt. In Zukunft wäre es wünschenswert, dass einheitliche Protokolle für die DNA-Extraktion und die Sequenzierung verwendet werden, um eine bessere Vergleichbarkeit der Studien zu erreichen.

Probiotika

Probiotika sind laut Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sowie der Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation (FAO) „lebende Mikroorganismen, die bei Aufnahme in ausreichender Menge einen gesundheitlichen Nutzen für den Wirt haben“ [37]. Diese sind abzugrenzen von den Präbiotika, bei denen es sich laut FAO/WHO um „unverdaubare Nahrungsbestandteile handelt, die das Wachstum von schon vorhandenen nützlichen Bakterien fördern, um die Gesundheit des Wirtes zu verbessern“ [37].

Probiotika sind laut der Verordnung EG (1831/2003) „Futtermittelzusatzstoffe“ und bedürfen einer Zulassung durch die Europäische Kommission. Dazu muss nachgewiesen werden, dass der Futtermittelzusatzstoff keine schädlichen Auswirkungen auf Tier, Mensch und Umwelt hat, nicht in einer Weise angeboten wird, die den Anwender irreführt, tierische Erzeugnisse nicht nachteilig be-

einflusst und Verbraucher nicht bezüglich der Beschaffenheit eines tierischen Erzeugnisses täuscht. Des Weiteren muss für die Zulassung eines Futtermittelzusatzstoffes ein Nachweis über dessen Wirkung erbracht werden. Im Gegensatz zu den landwirtschaftlichen Nutztieren stehen beim Pferd dabei nicht leistungssteigernde, sondern gesundheitsfördernde Wirkungen im Vordergrund [46]. Diese können durch eine Verbesserung der Verdaulichkeit von Futtermitteln oder eine positive Wirkung auf die Magen-Darm-Flora erreicht werden. Eine Zulassung als Futtermittelzusatzstoff erfolgt für 10 Jahre, jeweils für eine definierte Tierart und einen bestimmten Anwendungsbereich. Alle zugelassenen Zusatzstoffe lassen sich in einem Gemeinschaftsregister der Europäischen Union (EU) einsehen. Aktuell (Stand Dezember 2018) sind in der EU für Pferde lediglich vier Stämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als Futtermittelzusatzstoff zugelassen. Drei in der Kategorie der „Verdaulichkeitsförderer“ (CBS 493.94, CNCM I-1077, NCYC Sc 47) und einer in der Kategorie der „Darmflorastabilisatoren“ (MUCL 39885). Bis vor 3 Jahren war auch ein *E.-coli*-Stamm zur Verbesserung der Kotkonsistenz beim Pferd zugelassen.

Folgende Mechanismen werden für mögliche gesundheitsfördernde Effekte von Probiotika diskutiert: eine Modulation des Immunsystems, die Produktion antimikrobieller Substanzen, eine kompetitive Verdrängung von pathogenen Bakterien sowie eine Inaktivierung bakterieller Toxine [69]. Neben diesen gesundheitsfördernden Effekten müssen probiotische Mikroorganismen jedoch auch in der Lage sein, in einer von Säure und Gallensäuren dominierten Umgebung wie dem Magen und dem Dünndarm zu überleben, um zu ihrem Wirkungsort im Dickdarm gelangen zu können (siehe Übersicht S. 42). Außerdem ist es wünschenswert, dass sich die probiotischen Mikroorganismen im Dickdarm ansiedeln. Dies führt zum einen zu einer höheren Konzentration der Probiotika im Dickdarm, zum anderen zu einer längeren Wirkung, auch über die Applikation des Probiotikums hinaus. Ob die Verwendung von Mikroorganismen, die aus der Mikrobiota der Zielspezies isoliert wurden, Vorteile für das Erreichen einer solchen Kolonisation im Dickdarm bringt, konnte bis jetzt nicht abschließend geklärt werden [69]. Als Probiotikum eignen sich außerdem sauerstofftolerante Mikroorganismen, da diese problemlos den Herstellungsprozess und die Lagerung überleben [78].

Einsatz von *Saccharomyces cerevisiae*

Die meisten Studien beim Pferd wurden zum Einsatz der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (SC) publiziert (► Tab. 4), deren probiotische Stämme aktuell als einzige für das Pferd zugelassen sind (Stand Dezember 2018). Postuliert wird, dass der Einsatz von SC durch Förderung des Wachstums zellulolytischer Bakterien die Verdaulichkeit verbessert, vor allem die der Faserfraktionen. Außerdem soll SC das Milieu im Dickdarm durch Vermehrung laktatverwertender Bakterien verbessern, sodass der Laktatgehalt sinkt und der pH-Wert steigt. Diese Wirkungen wurden bei anderen Tierarten wie beispielsweise dem Rind nachgewiesen [7].

Im Zäkum und Kolon von Pferden, denen SC nicht als Probiotikum verabreicht wurde, konnte SC nicht nachgewiesen werden [39][50]. Somit ist davon auszugehen, dass diese Hefe keinen Bestandteil der physiologischen equinen Mikrobiota darstellt.

In-vivo-Studien beim Pferd mit unterschiedlichen SC-Stämmen ergaben hinsichtlich der Wirkungen widersprüchliche Ergebnisse.

► **Tab. 4** Übersicht über die wissenschaftlich untersuchten Stämme von *Saccharomyces cerevisiae* (SC) und deren Effekte in vivo

► **Table 4** Overview of the scientifically investigated strains of *Saccharomyces cerevisiae* (SC) and their effects in vivo.

Quelle	SC-Stamm	Stichprobe	Parameter	Ration	Effekt von SC
[58]	Yea Sacc® (CBS 493.94)	n = 4	qPCR Kot: saccharolytische und fibrolytische Bakterien	HF: 100 % Heu, HS: 50 % Heu, 50 % KF (1,8 g Stärke/kg KM)	<i>Fibrobacter succinogenes</i> ↓ bei HS
[30]	Yea Sacc® (CBS 493.94)	n = 6, Fisteln im Zäkum und Kolon	Kolon- und Zäkuminhalt: SCFA, pH, qPCR Bacteroidetes und Firmicutes, Kultivierung: Anaerobier und fibrolytische Bakterien, VQ	80 % Heu, 20 % KF, Vergleich: früh und spät geschnittenes Heu	keine
[63]	Procreatin 7®, Biocell F53®, Biosaf SC 47® (NCYC Sc47)	n = 4	Futteraufnahme, Blutchemie, VQ, Kot: Anzahl coliformer Bakterien, In-vitro-Kotfermentation	50 % KF, 50 % Weizenkleie und Stroh	Biocell: Futteraufnahme ↑, Biosaf: Blut TP ↓, Biocell und Procreatin: Methanproduktion bei Kotfermentation ↑, Biocell, Biosaf und Procreatin: VQ ↑
[74]	Synergie® (Y-904)	n = 2	Kot: pH, qPCR: Laktobazillen und fibrolytische Bakterien, VQ	HS: 70 % KF, 30 % Heu (2,05 g Stärke pro kg KM/Mahlzeit), HF: 30 % KF, 70 % Heu	<i>Fibrobacter succinogenes</i> ↓ bei HS, RP VQ ↑ bei hoher SC-Gabe
[23]	Levucell®SC (CNCL I-1077)	n = 4	Kot: SCFA, pH, Laktat, Kultivierung: funktionelle Bakteriengruppen, molekulare Analyse mittels TTGE, Blut: Glukose, TP, Leukozyten	60 % Heu, 40 % Gerste und KF, maximal 1,8 g Stärke/kg KM/Mahlzeit	Kultivierung: laktatverwertende Bakterien ↑; molekulare Analyse: isolierte Spezies ↑; pH ↓ vor Transport; nach Transport: pH → (Kontrollgruppe: ↓), TTGE-Profil vor und nach Transport ähnlicher als bei der Kontrollgruppe
[48]	Levucell®SC (CNCL I-1077)	n = 12	Kot: SCFA, pH, Laktat, VQ, SC-Konzentration	1,2 kg Heu/100 kg KM und 2,3 kg Mais (2 g Stärke/kg KM/Mahlzeit)	keine
[1]	Biosprint® (MUCL 39885)	n = 6	Futteraufnahme, Körpergewicht, VQ	70 % Heu/Gras, 30 % KF	Rohfaser-VQ ↑
[39]	Yea Sacc® (CBS 493.94)	n = 4, Fisteln im Zäkum und Kolon	Kolon- und Zäkuminhalt: Aktivität der Polysaccharidase und Glykosidhydrolase, Kultivierung: funktionelle Bakteriengruppen, SC-Konzentration	HF: 1,2 g Stärke/kg KM/Mahlzeit, HS: 3,2 g Stärke/kg KM/Mahlzeit	Zäkum: laktatverwertende Bakterien ↑ und Laktobazillen ↑ bei HS, Polysaccharidase ↑, Glykosidhydrolase ↑
[38]	Yea Sacc® (CBS 493.94)	n = 8, 4 mit Fistel im Zäkum und 4 mit Fisteln im Zäkum und Kolon	Futteraufnahme, Mean Retention Time, VQ, IVAD	HF: 1,2 g Stärke/kg KM/Mahlzeit, HS: 3,2 g Stärke/kg KM/Mahlzeit	Rohfaser VQ ↑, Futteraufnahme ↑, IVAD ↑
[54]	Diamond V XP Yeast Culture	n = 16	Futteraufnahme, VQ	Heu zwei Qualitäten, 56 g Getreide pro Pferd/Tag	Rohfaser-VQ ↑ bei Heu schlechter Qualität
[50]	Yea Sacc® (CBS 493.94)	n = 8, 4 mit Fistel im Zäkum und 4 mit Fisteln im Zäkum und Kolon	Kolon- und Zäkuminhalt: Kultivierung funktioneller Bakteriengruppen, SC-Konzentration, SCFA, pH, Laktat, NH ₃	HF: 1,24 g Stärke/kg KM/Mahlzeit, HS: 3,22 g Stärke/kg KM/Mahlzeit	Kolon: HF: anaerobe Bakterien ↓, Streptokokken ↓, (Azetat + Butyrat)/Propionat-Koeffizient ↑; HS: Laktat ↓, Zäkum: HF: Laktobazillen ↑, HS: pH-Wert ↑, Laktat und NH ₃ ↓
[28]	Yea Sacc® (CBS 493.94)	n = 4 trächtige/laktierende Stuten	Milchproduktion, Zusammensetzung der Milch, Gewichtszunahme Fohlen	50 % Heu, 9 % Hafer, 17,5 % Gerste, 17,5 % Mais, 2,5 % Melasse, 2,5 % Sojamehl, 1 % Ca	Milchproduktion ↑, Energie, Zucker-, Fett- und Aminosäuregehalte Milch ↑, Gewichtszunahme Fohlen ↑
[27]	Yea Sacc® (CBS 493.94)	n = 5 trächtige/laktierende Stuten	VQ	50 % Heu, 9 % Hafer, 17,5 % Gerste, 17,5 % Mais, 2,5 % Melasse + 2,5 % Sojamehl, 1 % Ca	Rohfaser, Ca, P: VQ ↑ in Trächtigkeit und Laktation

n: Stichprobe, qPCR: quantitative Polymerase-Kettenreaktion, SCFA: kurzkettige Fettsäuren, TP: Totalprotein, VQ: Verdaulichkeit, RP: Rohprotein, TTGE: Temperaturgradientengelelektrophorese, HF: rohfaserreiche Ration, HS: stärkereiche Ration, KF: Kraftfutter, KM: Körpermasse, IVAD: In-vivo-Abbaurate der Zellwandfraktionen, ↑ signifikanter Anstieg, ↓ signifikanter Abfall, → gleichbleibend
Die Nummer der Quellen entspricht der Nummer im Literaturverzeichnis.

ÜBERSICHT

Anforderungen an Probiotika (nach Daten von Schoster et al. [69] und Weese et al. [78])**Requirements of probiotics (according to data from Schoster et al. [69] and Weese et al. [78]).**

- Überleben in Salz- und Gallensäure dominiertem Milieu von Magen und Dünndarm
- Aerotoleranz zum Überleben des Herstellungsprozesses
- Gesundheitsfördernde Effekte
- Kolonisation im Dickdarm
- Keine adversen Effekte wie transferierbare Antibiotikaresistenzgene

Die von einigen Untersuchern mit SC erzielte höhere Faserverdaulichkeit [1][28][38][54][63] ließ sich das in anderen Studien nicht bestätigen [29][30][48][74]. Ursachen für diese Diskrepanz können sowohl der Einsatz unterschiedlicher Hefestämme in verschiedenen Konzentrationen als auch differierende Rationstypen sein. So wurde die Wirkung von SC bei Fütterung von Heu unterschiedlicher Qualitäten untersucht [30][54] oder aber bei Fütterung von stärke- oder rohfaserreichen Rationen [38][39][50][58][74]. Dabei verwendeten einige Untersucher sehr stärkereiche Rationen, deren Stärkeanteil mit 320 g Stärke pro 100 kg Körpermasse (KM) und Mahlzeit den maximal empfohlenen Wert von 100 g/100 kg KM pro Mahlzeit deutlich überschritt [38][39][50]. Solche Rationen, die zu einer Anflutung größerer Stärkemengen im Dickdarm führen, gelten als Risikofaktoren für Dysfunktionen im Dickdarm und sollten deshalb in der allgemeinen Fütterungspraxis nicht verwendet werden [41]. Außerdem fanden in den einzelnen Studien verschiedene Methoden zur Bestimmung der Verdaulichkeit Anwendung. Zwei Arbeitsgruppen [1][63], die eine höhere Verdaulichkeit bei Einsatz unterschiedlicher Hefestämme nachweisen konnten, verwendeten die Indikatormethode mit in Salzsäure unlöslicher Asche als Marker. Andere Autoren [28][29][30][38][48][54][74] nutzten die Kollektionsmethode, d. h. die vollständige und verlustfreie Sammlung des Kots über mehrere Tage, die als Goldstandard für Verdaulichkeitsstudien beim Pferd gilt.

Auch hinsichtlich der Beeinflussung des Dickdarmmilieus und der Mikrobiota differierten die Studienresultate. Medina et al. [50] bestimmten bei Supplementierung mit SC nach Fütterung einer sehr stärkereichen Ration im Zäkumchymus geringere Laktatkonzentrationen und höhere pH-Werte. Dies deckt sich mit den Ergebnissen weiterer Autoren zur SC-Supplementierung [23][39], die höhere Konzentrationen an Laktatverwertenden Bakterien im Zäkumchymus oder Kot bei Pferden nachwiesen, deren Rationen moderate bzw. sehr hohe Stärkegehalte hatten. Andere Untersucher [30][48] stellten hingegen bei einer Ration mit moderatem Stärkegehalt keinen Einfluss einer SC-Supplementierung auf pH-Wert und Laktatkonzentration im Kolon- und Zäkumchymus sowie im Kot fest.

Trotz Hinweisen auf eine verbesserte Fermentation des pelletierten, rohfaserreichen Futters [39][50] konnte bei Supplementierung von SC sowohl bei stärkereichen als auch bei rohfaserreichen Rationen (Heu und ein stärkereiches Ergänzungsfutter bzw. nur Heu) weder im Kolon- und Zäkumchymus noch im Kot eine höhe-

re Konzentration an fibrolytischen oder zellulolytischen Bakterien festgestellt werden [30][58][74]. Stattdessen kam es im Kot sowohl bei stärkereichen als auch bei den genannten rohfaserreichen Rationen zu einer Reduktion von *Fibrobacter succinogenes* [58][74].

Mehrere Autoren [39][48][50] bestimmten die Konzentration von SC im Zäkum, Kolon und im Kot. Dabei ergab sich eine Abnahme der SC-Konzentration vom Zäkum ($4,4 \times 10^6$ KBE/ml) zum Kolon ($5,6 \times 10^4$ KBE/ml) um zwei Zehnerpotenzen [39]. Im Kot ließen sich bei Gabe von SC lediglich 220 ± 283 KBE/g isolieren statt der erwarteten $1,1 \times 10^6 \pm 1,7 \times 10^5$ KBE/g unter der Bedingung, dass SC weder verdaut noch kolonisiert wird [48].

Diese Daten deuten darauf hin, dass SC vermutlich das saure Magenmilieu überlebt und an seinen Wirkungsort im Dickdarm gelangen kann. Dort findet jedoch wahrscheinlich keine Ansiedlung dieser Hefen statt, sondern ihre Konzentration nimmt aufgrund von Fermentationsprozessen durch die wirtseigene Mikrobiota im Verlauf des Dickdarms sukzessive ab [48].

Einsatz anderer Probiotika beim adulten Pferd

Zwei Studien beschäftigten sich mit dem Einsatz der Hefe *Saccharomyces boulardii* (SB) zur Behandlung der akuten Enterokolitis (Durchfalldauer <72 Stunden). Desrochers et al. [14] inkludierten alle Pferde, die dreimal ungeformten Kot abgesetzt hatten, Boyle et al. [6] lediglich Pferde mit Durchfall nach antibiotischer Therapie. Beide Arbeitsgruppen konnten SB nach oraler Applikation im Kot der Tiere nachweisen, während die Ergebnisse zum Verlauf der Enterokolitis differierten. Desrochers et al. [14] erzielten durch SB-Gabe eine Verkürzung der Durchfalldauer um 2 Tage, Boyle et al. [6] wiesen keine Unterschiede zwischen der mit SB behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe nach.

Zur Frage, inwieweit die Gabe von Probiotika beim Pferd die Salmonellenausscheidung nach einem chirurgischen abdominalen Eingriff reduzieren kann, liegen zwei Studien vor. Die verwendeten Multistrain-Probiotika enthielten unterschiedliche Bakterienspezies der Gattungen *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* und *Enterococcus* sowie Hefen. Für kein Probiotikum war eine Wirkung auf die Salmonellenausscheidung nachweisbar [44][59].

Des Weiteren gibt es Untersuchungen zu den probiotischen Stämmen *Lactobacillus rhamnosus* und *Enterococcus faecium* beim Pferd [62]. In vivo wurden die Effekte einer Supplementierung dieser probiotischen Stämme auf die fäkale Mikrobiota einer Jungpferde-Gruppe untersucht und in vitro ihre Überlebensfähigkeit in einem aus Magen, Jejunum und Zäkum gewonnenen Sterilfiltrat überprüft. In vitro überlebten die probiotischen Bakterien lediglich im sauren Magenmilieu länger, nicht jedoch im basischen Milieu des Jejunums und Zäkums. Dies bestätigten die fäkalen Zellzahlen in vivo, die bei den Jungpferden im Versuchszeitraum nicht anstiegen. Auch die Untersuchung des fäkalen Milieus und der fäkalen Mikrobiota in vivo zeigte, dass durch die Supplementierung von *Lactobacillus rhamnosus* und *Enterococcus faecium* beim Pferd keine Veränderung klinischer Parameter zu erwarten ist [62].

Ein weiteres kommerziell erhältliches Produkt sind die sogenannten effektiven Mikroorganismen (EM). Hierbei handelt es sich um eine Mischung aus Photosynthesebakterien, Laktobazillen, Hefen und fermentaktiven Pilzen wie *Aspergillus* und *Penicillium*, ursprünglich dazu entwickelt, die Bodenqualität im ökologischen Landbau zu verbessern [8]. EM können als sogenannte Stammlö-

► **Tab. 5** Übersicht der beim Fohlen angewendeten Probiotika und deren Effekte

► **Table 5** Overview of the probiotics used in foals and their effects.

Quelle	Stichprobe	Art der Studie	Probiotikum	Parameter	Effekte des Probiotikums
[65]	n = 21 Plazebo, n = 17 Probiotikum	plazebo-kontrollierte Feldstudie	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LHR 19 und SP1, <i>L. plantarum</i> LPAL und BG112, <i>Bifidobacterium animalis lactis</i>	Zusammensetzung des fäkalen Mikrobioms mittels Sequenzierung	keine
[36]	n = 8 Plazebo, n = 7 geringe Dosis, n = 10 hohe Dosis	plazebo-kontrollierte Feldstudie	<i>Bacillus cereus var. toyoi</i>	Blutbild, Serum-IgG, IKT, Körpergewicht, Kotkonsistenz, Kot: TS, bakterielle Mikrobiota mittels Kultivierung	keine
[67]	n = 36 Plazebo und Probiotikum	plazebo-kontrollierte Feldstudie	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LHR 19 und SP1, <i>L. plantarum</i> LPAL und BG112, <i>Bifidobacterium animalis lactis</i>	Kot: Konsistenz, Vorkommen von <i>Clostridium difficile</i> und <i>C. perfringens</i> mittels Kultivierung	Durchfall ↑, tierärztliche Behandlungen ↑
[73]	n = 29 Kontrollgruppe, n = 101 Probiotikum	Feldstudie	<i>Lactobacillus ruminis</i> KK14, <i>L. equi</i> KK15, <i>L. reuteri</i> KK18, <i>L. johnsonii</i> KK21, <i>Bifidobacterium boum</i> HU	klinische Überwachung der Fohlen, Kot: Nachweis des Probiotikums mittels DEEG	Durchfall ↓
[80]	n = 83 Kontrollgruppe, n = 70 Probiotikum	plazebo-kontrollierte Feldstudie	<i>Lactobacillus pentosus</i> WE7	klinische Überwachung der Fohlen	Anorexie ↑, Koliksymptome ↑, Durchfall ↑, tierärztliche Behandlungen ↑

DEEG: Denaturierungsgradientengelelektrophorese, IKT: innere Körpertemperatur, TS: Trockensubstanz
Die Nummer der Quellen entspricht der Nummer im Literaturverzeichnis.

sung über verschiedene Anbieter bezogen werden. Unter Zusatz von Zuckerrohmelasse und Wasser werden diese vor Gebrauch für mehrere Tage bei 35 °C inkubiert [20]. Die unter dem Begriff EM geführten Bakterien- und Pilzstämme sind in der EU nicht als probiotische Stämme zugelassen, sodass eine Vermarktung solcher Produkte einen Rechtsverstoß darstellt. Aktuell gibt es jedoch einige kommerzielle Produkte für Pferde, die statt lebender Mikroorganismen Kräutermischungen enthalten, die zuvor mit EM fermentiert wurden. Die sogenannten Fermentkräuter stellen einen Graubereich dar, da für die Silierung ebenfalls nur zugelassene Stämme (EG 1831/2003 „Futtermittelzusatzstoffe“) als Silierzusatzstoffe eingesetzt werden dürfen. Wissenschaftliche Studien zur Überlebensfähigkeit der EM im MDT oder zu klinischen Effekten bei adulten Pferden sind den Autoren derzeit nicht bekannt, allerdings wurde eine Studie zur Fütterung von Fermentkräutern auf die Prävention von Magenschleimhautveränderungen beim Absetzfohlen publiziert [24] (siehe unten).

Einsatz von Probiotika beim Fohlen

Weese et al. [77] zeigten, dass sich Probiotika bei Fohlen, vermutlich aufgrund der noch nicht ausgereiften bakteriellen Mikrobiota, besser im Darm ansiedeln als bei adulten Pferden. Verschiedene Studien beim Fohlen untersuchten die Reduktion der Durchfallhäufigkeit durch Gabe von probiotischen Stämmen (► **Tab. 5**). Lediglich Tanabe et al. [73] erzielten durch Einsatz eines Probiotikums mit verschiedenen Laktobazillen- und Bifidobakterien-Spezies eine geringere Prävalenz von Durchfällen bei Fohlen. In weiteren Studien hatte die Probiotikagabe entweder keinen Einfluss auf die Durchfallprävalenz [36] oder bei den behandelten Tieren traten häufiger Durchfälle auf [67][80]. Außerdem erfolgte bei den mit Probio-

tika behandelten Fohlen häufiger eine tierärztliche Intervention aufgrund des Schweregrads des Durchfalls [67][80], begleitet von Anorexie und Koliken [67]. Diese negativen Effekte der Probiotika beruhen wahrscheinlich auf der noch unausgereiften Mikrobiota der Fohlen, die vermutlich von den probiotischen Mikroorganismen überwuchert wird [64]. Deshalb sollten gerade beim Fohlen die Vor- und Nachteile einer Anwendung der allgemein als sicher geltenden Probiotika abgewogen werden. Der Einsatz von Fermentkräutern zur Prävention stressbedingter Magenschleimhautläsionen beim Absetzen von Fohlen zeigte keine protektiven Effekte auf die Magenschleimhaut im Vergleich zur Kontrollgruppe [24].

Kottransplantation

Alle bis jetzt untersuchten Probiotika enthalten Mikroorganismen, die weniger als 1 % der Mikrobiota gesunder Equiden repräsentieren [64]. Dies ist vermutlich ein wesentlicher Grund dafür, dass in plazebokontrollierten Versuchen beim Pferd eine Probiotikagabe vielfach keine Effekte hatte. Deshalb gibt es Ansätze, die Mikrobiota durch Verabreichung von Kotsuspensionen gesunder Spenderpferde, die die gesamte Bandbreite der equinen Mikrobiota enthalten, zu stabilisieren. Hinsichtlich der Wirksamkeit einer solchen Kottransplantation beim Pferd liegen nur vereinzelte Berichte vor [49] [56]. Mullen et al. [56] stellten in einer Fallstudie bei drei von vier an Kolitis erkrankten Pferden nach Kottransplantation eine Verbesserung der Kotkonsistenz fest. Sie entwickelten außerdem ein Protokoll für die Durchführung von Kottransplantationen beim Pferd. Dem Empfängertier sollten vor der Kottransplantation Protonenpumpenhemmer verabreicht werden, um den pH-Wert im Magen anzuheben, damit die transplantierten säureempfindlichen Mikro-

organismen die Magenpassage vermehrungsfähig überleben können. Des Weiteren muss gegebenenfalls eine antimikrobielle Behandlung eingestellt werden, um das Empfängertier auf die Kottransplantation vorzubereiten. Als Spendertier sollte ein gesundes, in den letzten 6 Monaten nicht antibiotisch behandeltes Pferd dienen, das eine raufutterbasierte Ration erhält und aus derselben Herde oder demselben Stall stammt wie das Empfängertier. Das Spendertier sollte auf gängige Infektionen und Darmparasiten untersucht werden und bei auffälligen Befunden nicht herangezogen werden. Verwendung findet rektal gewonnener Kot oder, falls das Spenderpferd euthanasiert wurde, auch frischer Zäkuminhalt. Das Material wird mit warmem Wasser oder isotonischer Kochsalzlösung gemischt und vorsichtig püriert, damit auch die zellulolytischen Bakterien, die sich häufig an längeren Halmen befinden, transplantiert werden können. Von der anschließend gesiebten Suspension können einem adulten Pferd 2–3 l per Nasenschlundsonde verabreicht werden. Die täglich frisch angerührte Kotsuspension sollte 3 Tage lang appliziert werden [56].

Fazit

Die Analyse von Kotproben ermöglicht nur Aussagen über den distalen Abschnitt des Dickdarms beim Pferd [18][42]. Untersuchungen zufolge kommen Vertreter der Bakterienklasse Clostridia, die die größte Bakterienklasse im Dickdarm darstellt, häufiger bei gesunden als bei kranken Pferden vor [9][68]. Hier könnte Potenzial für die Nutzung bestimmter Clostridien-Stämme als Probiotikum liegen. Problematisch ist bei den Clostridienarten jedoch, dass sie als obligat anaerobe Keime nicht sauerstofftolerant sind und deshalb besondere Herausforderungen an den Herstellungsprozess stellen [78].

Die aktuell zugelassenen Stämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Stand Dezember 2018) gehören nicht zur physiologischen equinen Mikrobiota, was ihre Wirksamkeit stark infrage stellt [39][50]. Bei Fohlen führte darüber hinaus die Gabe von Probiotika teilweise zu vermehrtem Auftreten von Durchfall, Anorexie und Koliksymptomen, sodass die mit dem Probiotikum behandelte Gruppe häufiger tierärztlich behandelt werden musste [67][80].

Hervorzuheben ist, dass eine adäquate und leistungsangepasste Rationsgestaltung, d. h. raufutterreich, mindestens täglich 1,5 kg Trockensubstanz/100 kg KM (Gras, Heu oder Heulage), eine Restriktion der Stärkeaufnahme auf maximal 100 g/100 kg KM pro Mahlzeit sowie eine einwandfreie Futtermittelhygiene die wesentlichen Voraussetzungen für eine erwünschte Mikrobiota beim Pferd darstellen.

Interessenkonflikt

Die Autoren bestätigen, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

- [1] Agazzi A, Ferroni M, Fanelli A, Marocco S, Invernizzi G, Dell'Orto V, Savoini G. Evaluation of the Effects of Live Yeast Supplementation on

- Apparent Digestibility of High-Fibre Diet in Mature Horses Using the Acid Insoluble Ash Marker Modified Method. *J Equine Vet Sci* 2011; 31 (1): 13–18.
- [2] Bailey SR, Marr CM, Elliott J. Current research and theories on the pathogenesis of acute laminitis in the horse. *Vet J* 2004; 167 (2): 129–142.
- [3] Blackmore TM, Dugdale A, Argo CM, Curtis G, Pinloche E, Harris PA, Worgan HJ, Girdwood SE, Dougal K, Newbold CJ, McEwan NR. Strong stability and host specific bacterial community in faeces of ponies. *PLoS one* 2013; 8 (9): e75079.
- [4] Blikslager AT, Moore JN, White NA, Mair TS, eds. *The Equine Acute Abdomen*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons 2017.
- [5] Blood D, Studdert V, Gay C. *Saunders Comprehensive Veterinary Dictionary*, 3rd edn. Philadelphia: Saunders 2007.
- [6] Boyle AG, Magdesian KG, Gallop R, Sigdel S, Durando MM. *Saccharomyces boulardii* viability and efficacy in horses with antimicrobial-induced diarrhoea. *Vet Rec* 2013; 172 (5): 128.
- [7] Callaway ES, Martin SA. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *J Dairy Sci* 1997; 80 (9): 2035–2044.
- [8] Córdor-Golec AF, Pérez PG, Lokare C. Effective microorganisms: myth or reality? *The Peruvian Journal of Biology* 2007; 14 (2): 315–319.
- [9] Costa MC, Arroyo LG, Allen-Vercoe E, Stämpfli HR, Kim PT, Sturgeon A, Weese JS. Comparison of the faecal microbiota of healthy horses and horses with colitis by high throughput sequencing of the V3-V5 region of the 16S rRNA gene. *PLoS one* 2012; 7 (7): e41484.
- [10] Costa MC, Silva G, Ramos RV, Staempfli HR, Arroyo LG, Kim P, Weese JS. Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. *Vet J* 2015; 205 (1): 74–80.
- [11] Costa MC, Stämpfli HR, Allen-Vercoe E, Weese JS. Development of the faecal microbiota in foals. *Equine Vet J* 2016; 48 (6): 681–688.
- [12] Costa MC, Weese JS. Understanding the intestinal microbiome in health and disease. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2018; 34 (1): 1–12.
- [13] Daly K, Proudman CJ, Duncan SH, Flint HJ, Dyer J, Shirazi-Beechey SP. Alterations in microbiota and fermentation products in equine large intestine in response to dietary variation and intestinal disease. *Br J Nutr* 2012; 107 (7): 989–995.
- [14] Desrochers AM, Dolente BA, Roy M-F, Boston R, Carlisle S. Efficacy of *Saccharomyces boulardii* for treatment of horses with acute enterocolitis. *J Am Vet Med Assoc* 2005; 227 (6): 954–959.
- [15] Destrez A, Grimm P, Cézyly F, Julliard V. Changes of the hindgut microbiota due to high-starch diet can be associated with behavioral stress response in horses. *Physiol Behav* 2015; 149: 159–164.
- [16] Dougal K, Harris PA, Edwards A, Pachebat JA, Blackmore TM, Worgan HJ, Newbold CJ. A comparison of the microbiome and the metabolome of different regions of the equine hindgut. *FEMS Microbiol Ecol* 2012; 82 (3): 642–652.
- [17] Dougal K, La Fuente G de, Harris PA, Girdwood SE, Pinloche E, Geor RJ, Nielsen BD, Schott HC, Elzinga S, Newbold CJ. Characterisation of the faecal bacterial community in adult and elderly horses fed a high fibre, high oil or high starch diet using 454 pyrosequencing. *PLoS one* 2014; 9 (2): e87424.
- [18] Dougal K, La Fuente G de, Harris PA, Girdwood SE, Pinloche E, Newbold CJ. Identification of a core bacterial community within the large intestine of the horse. *PLOS ONE* 2013; 8 (10): e77660.
- [19] Durham AE. The role of nutrition in colic. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2009; 25 (1): 67–78.
- [20] EMIKO Firmengruppe. EMA – Herstellung und Wissenswertes. <https://www.emiko.de/ema-herstellung-wissenswertes/>; abgerufen am 10. Oktober 2018.

- [21] Engelhardt Wv, Breves G, Diener M, Gäbel G, Hrsg. Physiologie der Haustiere, 5. Aufl. Stuttgart: Enke 2015.
- [22] Ericsson AC, Johnson PJ, Lopes MA, Perry SC, Lanter HR. A Microbiological map of the healthy equine gastrointestinal tract. *PLoS one* 2016; 11 (11): 1–17.
- [23] Faubladiet C, Chaucheyras-Durand F, da Veiga L, Julliard V. Effect of transportation on fecal bacterial communities and fermentative activities in horses: impact of *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077 supplementation. *J Anim Sci* 2013; 91 (4): 1736–1744.
- [24] Fedtke A, Fiedler A, Venner M, Vervuert I. Effects of different nutraceutical supplements on the gastric mucosa of weanling foals. *Pferdeheilk* 2015; 31 (4): 363–370.
- [25] Fombelle A de, Julliard V, Drogoul C, Jacotot E. Feeding and microbial disorders in horses: 1-effects of an abrupt incorporation of two levels of barley in a hay diet on microbial profile and activities. *J Equine Vet Sci* 2001; 21 (9): 439–445.
- [26] Fombelle A de, Varloud M, Goachet AG, Jacotot E, Philippeau C, Drogoul C, Julliard V. Characterization of the microbial and biochemical profile of the different segments of the digestive tract in horses given two distinct diets. *Anim Sci* 2003; 77: 293–304.
- [27] Glade MJ. Dietary yeast culture supplementation of mares during late gestation and early lactation. *J Equine Vet Sci* 1991; 11 (3): 167–175.
- [28] Glade MJ. Effects of dietary yeast culture supplementation of lactating mares on the digestibility and retention of the nutrients delivered to nursing foals via milk. *J Equine Vet Sci* 1991; 11 (6): 323–329.
- [29] Glade MJ, Biesik LM. Enhanced nitrogen retention in yearling horses supplemented with yeast culture. *J Anim Sci* 1986; 62 (6): 1635–1640.
- [30] Grimm P, Julliard V, Philippeau C, Sadet-Bourgeteau S. Effect of yeast supplementation on hindgut microbiota and digestibility of horses subjected to an abrupt change of hays. *Livestock Science* 2016; 186: 34–40.
- [31] Grimm P, Philippeau C, Julliard V. Faecal parameters as biomarkers of the equine hindgut microbial ecosystem under dietary change. *Animal* 2017; 11 (7): 1136–1145.
- [32] Hansen NCK, Avershina E, Myrdland LT, Næsset JA, Austbø D, Moen B, Måge I, Rudi K. High nutrient availability reduces the diversity and stability of the equine caecal microbiota. *Microb Ecol Health Dis* 2015; 26: 27216.
- [33] Harlow BE, Lawrence LM, Hayes SH, Crum A, Flythe MD. Effect of dietary starch source and concentration on equine fecal microbiota. *PLoS one* 2016; 11 (4): e0154037.
- [34] Harris PA, Ellis AD, Fradinho MJ, Jansson A, Julliard V, Luthersson N, Santos AS, Vervuert I. Review: Feeding conserved forage to horses: recent advances and recommendations. *Animal* 2017; 11 (6): 958–967.
- [35] Janabi AHD, Biddle AS, Klein D, McKeever KH. Exercise training-induced changes in the gut microbiota of Standardbred racehorses. *Comparative Exercise Physiology* 2016; 12 (3): 119–130.
- [36] John J, Roediger K, Schroedel W, Aldaher N, Vervuert I. Development of intestinal microflora and occurrence of diarrhoea in sucking foals: effects of *Bacillus cereus* var. *toyoi* supplementation. *BMC Veterinary Research* 2015; 11: 34.
- [37] Joint FAO/WHO Expert Consultation on Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>; abgerufen am 21. März 2018.
- [38] Jouany J-P, Gobert J, Medina B, Bertin G, Julliard V. Effect of live yeast culture supplementation on apparent digestibility and rate of passage in horses fed a high-fiber or high-starch diet. *J Anim Sci* 2008; 86 (2): 339–347.
- [39] Jouany J-P, Medina B, Bertin G, Julliard V. Effect of live yeast culture supplementation on hindgut microbial communities and their polysaccharidase and glycoside hydrolase activities in horses fed a high-fiber or high-starch diet. *J Anim Sci* 2009; 87 (9): 2844–2852.
- [40] Julliard V, Fombelle A de, Drogoul C, Jacotot E. Feeding and microbial disorders in horses: Part 3 – Effects of three hay:grain ratios on microbial profile and activities. *J Equine Vet Sci* 2001; 21 (11): 543–546.
- [41] Julliard V, Fombelle A de, Varloud M. Starch digestion in horses: The impact of feed processing. *Livestock Science* 2006; 100 (1): 44–52.
- [42] Julliard V, Grimm P. Horse species symposium: The microbiome of the horse hindgut: History and current knowledge. *J Anim Sci* 2016; 94 (6): 2262–2274.
- [43] Julliard V, Grimm P. The impact of diet on the hindgut microbiome. *J Equine Vet Sci* 2017; 52: 23–28.
- [44] Kim LM, Morley PS, Traub-Dargatzis JL, Salman MD, Gentry-Weeks C. Factors associated with *Salmonella* shedding among equine colic patients at a veterinary teaching hospital. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218 (5): 740–748.
- [45] Kristoffersen C, Jensen RB, Avershina E, Austbø D, Tauson A-H, Rudi K. Diet-dependent modular dynamic interactions of the equine cecal microbiota. *Microbes Environ* 2016; 31 (4): 378–386.
- [46] Lahrssen M, Zentek J. Wirksamkeit von probiotischen Mikroorganismen als Futterzusatzstoff: Leitlinien zur Prüfung der Wirksamkeit von probiotischen Mikroorganismen als Futterzusatzstoff: Leitlinien zur Prüfung der Wirksamkeit von Mikroorganismen bei den Tierarten Hund, Katze und Pferd. *Deut Tierärztl Wochenschr* 2002 (109): 22–25.
- [47] Leng J, Proudman C, Darby A, Blow F, Townsend N, Miller A, Swann J. Exploration of the fecal microbiota and biomarker discovery in equine grass sickness. *J Proteome Res* 2018; 17 (3): 1120–1128.
- [48] Mackenthun E, Coenen M, Vervuert I. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on apparent total tract digestibility of nutrients and fermentation profile in healthy horses. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2013; 97 Suppl 1: 115–120.
- [49] McGovern K. Approach to the adult horse with chronic diarrhoea. *Livestock* 2013; 18 (5): 189–194.
- [50] Medina B, Girard ID, Jacotot E, and Julliard V. Effect of a preparation of *Saccharomyces cerevisiae* on microbial profiles and fermentation patterns in the large intestine of horses fed a high fiber or a high starch diet. *J Anim Sci* 2002; 80: 2600–2609.
- [51] Milinovich GJ, Burrell PC, Pollitt CC, Klieve AV, Blackall LL, Ouwkerker D, Woodland E, Trott DJ. Microbial ecology of the equine hindgut during oligofructose-induced laminitis. *ISME J* 2008; 2 (11): 1089–1100.
- [52] Milinovich GJ, Trott DJ, Burrell PC, van Eps AW, Thoenner MB, Blackall LL, Al Jassim RAM, Morton JM, Pollitt CC. Changes in equine hindgut bacterial populations during oligofructose-induced laminitis. *Environment Microbiol* 2006; 8 (5): 885–898.
- [53] Moreau MM, Eades SC, Reinemeyer CR, Fugaro MN, Onishi JC. Illumina sequencing of the V4 hypervariable region 16S rRNA gene reveals extensive changes in bacterial communities in the cecum following carbohydrate oral infusion and development of early-stage acute laminitis in the horse. *Vet Microbiol* 2014; 168 (2–4): 436–441.
- [54] Morgan LM, Coverdale JA, Froetschel MA, Yoon I. Effect of yeast culture supplementation on digestibility of varying forage quality in mature horses. *J Equine Vet Sci* 2007; 27 (6): 260–265.
- [55] Muhonen S, Julliard V, Lindberg JE, Bertilsson J, Jansson A. Effects on the equine colon ecosystem of grass silage and haylage diets after an abrupt change from hay. *J Anim Sci* 2009; 87 (7): 2291–2298.
- [56] Mullen KR, Yasuda K, Divers TJ, Weese JS. Equine faecal microbiota transplant: Current knowledge, proposed guidelines and future directions. *Equine Vet Educ* 2018; 30 (3): 151–160.
- [57] Müller CE, Rosen D von, Udén P. Effect of forage conservation method on microbial flora and fermentation pattern in forage and in equine colon and faeces. *Livestock Science* 2008; 119 (1–3): 116–128.
- [58] Murray JAMD, Brown S, O’Shaughnessy P, Monteiro A, Warren H, Hastie PM. Effect of live yeast culture supplementation on fibrolytic and saccharolytic bacterial populations in the faeces of horses fed a high-fibre or high-starch diet. *J Equine Vet Sci* 2017; 51: 41–45.

- [59] Parraga ME, Spier SJ, Thurmond M, Hirsh D. A clinical trial of probiotic administration for prevention of *Salmonella* shedding in the postoperative period in horses with colic. *J Vet Intern Med* 1997; 11 (1): 36–41.
- [60] Pirie RS, Jago RC, Hudson NPH. Equine grass sickness. *Equine Vet J* 2014; 46 (5): 545–553.
- [61] Rodriguez C, Taminiau B, Brévers B, Avesani V, van Broeck J, Leroux A, Gallot M, Bruwier A, Amory H, Delmée M, Daube G. Faecal microbiota characterisation of horses using 16 rDNA barcoded pyrosequencing, and carriage rate of *Clostridium difficile* at hospital admission. *BMC Microbiology* 2015; 15 (181).
- [62] Saalschmidt FL. Untersuchungen über verdauungsphysiologische Effekte eines Probiotikums aus *Enterococcus faecium* und *Lactobacillus rhamnosus* bei Pferden. Dissertation, Freie Universität Berlin 2017.
- [63] Salem AZM, Elghandour MMY, Kholif AE, Barbabosa A, Camacho LM, Odongo NE. Influence of feeding horses a high fiber diet with or without live yeast cultures supplementation on feed intake, nutrient digestion, blood chemistry, fecal coliform count, and in vitro fecal fermentation. *J Equine Vet Sci* 2016; 39: 12–19.
- [64] Schoster A. Probiotic use in equine gastrointestinal disease. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2018; 34 (1): 13–24.
- [65] Schoster A, Guardabassi L, Staempfli HR, Abrahams M, Jalali M, Weese JS. The longitudinal effect of a multi-strain probiotic on the intestinal bacterial microbiota of neonatal foals. *Equine Vet J* 2016; 48 (6): 689–696.
- [66] Schoster A, Mosing M, Jalali M, Staempfli HR, Weese JS. Effects of transport, fasting and anaesthesia on the faecal microbiota of healthy adult horses. *Equine Vet J* 2016; 48 (5): 595–602.
- [67] Schoster A, Staempfli HR, Abrahams M, Jalali M, Weese JS, Guardabassi L. Effect of a probiotic on prevention of diarrhea and *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* shedding in foals. *J Vet Intern Med* 2015; 29 (3): 925–931.
- [68] Schoster A, Staempfli HR, Guardabassi LG, Jalali M, Weese JS. Comparison of the fecal bacterial microbiota of healthy and diarrheic foals at two and four weeks of life. *BMC Veterinary Research* 2017; 13 (144).
- [69] Schoster A, Weese JS, Guardabassi L. Probiotic use in horses – what is the evidence for their clinical efficacy? *J Vet Intern Med* 2014; 28 (6): 1640–1652.
- [70] Shepherd ML, Swecker WS, Jensen RV, Ponder MA. Characterization of the fecal bacteria communities of forage-fed horses by pyrosequencing of 16S rRNA V4 gene amplicons. *FEMS Microbiol Lett* 2012; 326 (1): 62–68.
- [71] Shepherd ML, Swecker WS, Ponder MA. Effect of two different commercial DNA extraction kits on the bacterial 16S ribosomal RNA gene denaturing gradient gel electrophoresis profile of Arabian gelding feces. *J Equine Vet Sci* 2015; 35 (2): 165–169.
- [72] Steelman SM, Chowdhary BP, Dowd S, Suchodolski J, Janečka JE. Pyrosequencing of 16S rRNA genes in fecal samples reveals high diversity of hindgut microflora in horses and potential links to chronic laminitis. *BMC Veterinary Research* 2012; 8: 231.
- [73] Tanabe S, Suzuki T, Wasano Y, Nakajima F, Kawasaki H, Tsuda T, Nagamine N, Tsurumachi T, Sugaya K, Akita H, Takagi M, Takagi K, Inoue Y, Asai Y, Morita H. Anti-inflammatory and intestinal barrier-protective activities of commensal lactobacilli and bifidobacteria in thoroughbreds: Role of probiotics in diarrhea prevention in neonatal Thoroughbreds. *J Equine Vet Sci* 2014; 25 (2): 37–43.
- [74] Taran FMP, Gobesso AAO, Gonzaga IVF, Francoso R, Centini TN, Moreira CG, Silva LFP. Effects of different amounts of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on apparent digestibility and faecal parameters in horses fed high-roughage and high-concentrate diets. *Livestock Science* 2016; 186: 29–33.
- [75] Vervuert I. Heulage und Co: Was kann die Fütterung für die Lunge tun? *Pferdespiegel* 2018; 21 (3): 107–114.
- [76] Weese JS. The equine intestinal microbiota. In: *The Equine Acute Abdomen*. Blikslager AT, Moore JN, White NA, Mair TS, eds. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons 2017; 58–65.
- [77] Weese JS, Anderson MEC, Lowe A, Monteith GJ. Preliminary investigation of the probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in horses: fecal recovery following oral administration and safety. *Can Vet J* 2003; 44 (4): 299–302.
- [78] Weese JS, Anderson MEC, Lowe A, Penno R, da Costa TM, Button L, Goth KC. Screening of the equine intestinal microflora for potential probiotic organisms. *Equine Vet J* 2004; 36 (4): 351–355.
- [79] Weese JS, Holcombe SJ, Emberton RM, Kurtz KA, Roessner HA, Jalali M, Wismer SE. Changes in the faecal microbiota of mares precede the development of post partum colic. *Equine Vet J* 2015; 47 (6): 641–649.
- [80] Weese JS, Rousseau J. Evaluation of *Lactobacillus pentosus* WE7 for prevention of diarrhea in neonatal foals. *J Am Vet Med Assoc* 2005; 226 (12): 2031–2034.

4 Diskussion

Ziel dieser Studie war die Untersuchung der fäkalen Mikrobiota von Ponys und Pferden während einer zweijährigen hochkalorischen Fütterung. Nach Kenntnisstand der Autorin ist dies die erste Untersuchung zu Unterschieden in der fäkalen Mikrobiota von Pferden und Ponys in einer kontrollierten Haltung und Fütterung. Zur Zeit liegen für Pferde nur Studien vor, die domestizierte Pferde und Przewalski Pferde vergleichen (METCALF et al. 2017), die zwar in benachbarten Gebieten grasen, aber ansonsten unterschiedlich gefüttert wurden und Studien zur fäkalen Mikrobiota von unterschiedlichen Distanz- und Sportpferderassen (PLANCADE et al. 2019, MASSACCI et al. 2019).

Nach Kenntnisstand der Autorin ist dies außerdem die erste Studie, die Veränderungen in der equinen Mikrobiota während einer Gewichtszunahme untersucht. Das Studiendesign wurde so gewählt, dass jedes Individuum als seine eigene Kontrolle genutzt werden kann. Alle anderen Studien, die nach aktuellem Kenntnisstand zur Mikrobiota von normal und übergewichtigen Pferden publiziert wurden, haben Gruppen unterschiedlicher Individuen miteinander verglichen (BIDDLE et al. 2018, MORRISON et al. 2018, SHEPHERD et al. 2014, COLEMAN et al. 2019, MSHELIA et al. 2018). Bei allen anderen Studien, die die equine Mikrobiota unterschiedlicher Gewichtsklassen verglichen, wurde hingegen entweder kein standardisiertes Fütterungsregime verwendet (MSHELIA et al. 2018, BIDDLE et al. 2018, COLEMAN et al. 2019) oder lediglich für einen Monat (MORRISON et al. 2018) oder zwei Wochen (SHEPHERD et al. 2014) vor der Entnahme der Kotproben ein standardisiertes Fütterungsregime etabliert.

Während unserer zweijährigen Studie konsumierten die Pferde und Ponys 180-200% ihres Bedarfs an umsetzbarer Energie nach den Empfehlungen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie der Haustiere (GfE 2014). Die wesentliche Gewichtszunahme fand zwischen der ersten Probennahme (t1), nach einer fünfmonatigen Adaptationsperiode, und der zweiten Probennahme (t2), zwölf Monate nach dem Beginn der hochkalorischen Fütterung, statt. Zwischen t2 und dem dritten Probennahme Zeitpunkt (t3), nach 24-monatiger hochkalorischer Fütterung, zeigte sich lediglich ein nicht signifikanter Anstieg der Körpermasse (KM). Im Gegensatz zur KM stieg der Cresty Neck Score (CNS) auch im zweiten Jahr unter hochkalorischer Fütterung an. Dies könnte durch einen Verlust an Muskelmasse aufgrund der geringeren physischen Aktivität während der Fütterungsperiode bedingt sein. Da der Muskelmetabolismus jedoch nicht Teil unserer Studie war können wir keine abschließende Aussage dazu treffen. Bei weiteren Studien zu Veränderungen im Laufe einer Gewichtszunahme, wäre es von Interesse auch den Muskelmetabolismus während der fortschreitenden Gewichtszunahme zu betrachten.

4.1 Veränderungen in der fäkalen equinen Mikrobiota

Während der größten Gewichtszunahme zwischen t1 und t2 zeigte sich ein Abfall in der Artenvielfalt in der fäkalen Mikrobiota der Ponys. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von BIDDLE et al.

(2018), die eine höhere Artenvielfalt in der fäkalen Mikrobiota übergewichtiger Pferde gefunden haben. Diese Unterschiede könnten dadurch begründet sein, dass die Autoren die Mikrobiota unterschiedlicher Individuen, die unterschiedlich gefüttert und gehalten wurden, untersuchten (BIDDLE et al. 2018). Andere Autoren konnten die Ergebnisse von BIDDLE et al. (2018) ebenfalls nicht bestätigen (MORRISON et al. 2018, COLEMAN et al. 2019). Sowohl MORRISON et al. (2018), die die Mikrobiota von Pferden unterschiedlicher Gewichtsklassen untersuchten, die einen Monat vor der Probenentnahme ausschließlich Heu aus einer Charge erhielten, als auch COLEMAN et al. (2019), die die Mikrobiota von Pferden unterschiedlicher Gewichtgruppen, aber aus demselben Stall verglichen, konnten keine Unterscheid in der Artenvielfalt der fäkalen Mikrobiota nachweisen. In Bezug auf die Diversität der fäkalen Mikrobiota konnten wir bei Pferden und bei Ponys keine Veränderungen während der Gewichtszunahme nachweisen. Dies entspricht den Ergebnissen von COLEMAN et al. (2019), die ebenfalls keinen Unterschied in der Diversität der equinen fäkalen Mikrobiota unterschiedlicher Gewichtgruppen nachweisen konnten.

Die KM Zunahme beim Pony führte zu einem Anstieg des Phylums Firmicutes. Dies entspricht den Ergebnissen von BIDDLE et al. (2018) und MORRISON et al. (2018). Dass sich das Phylum Firmicutes und die Artenvielfalt nur bei den Ponys im Verlaufe der Gewichtszunahme signifikant veränderten und nicht bei den Pferden, könnte dadurch bedingt sein, dass die prozentuale KM Zunahme während der Studie bei den Ponys mit 26,4 % deutlich höher lag als bei den Pferden mit 13,7 %. Deshalb wäre es im Rahmen weiterer Studien von Interesse, ob sich in der fäkalen Mikrobiota der Pferde bei einer prozentualen Gewichtszunahme, die der der Pony entspricht, dieselben Veränderungen in Bezug auf das Artenreichtum und das Phylum Firmicutes zeigen würden.

Im Gegensatz zu unserer Studie konnten MORRISON et al. (2018) und BIDDLE et al. (2018) auch signifikante Veränderungen im Phylum Bacteroidetes nachweisen, die in unserer Studie weder bei Pferden noch bei Ponys auftraten. Ähnlich wie bei den Pferden in unserer Studie konnten SHEPHERD et al. (2014) und COLEMAN et al. (2019) keine signifikanten Unterschiede in den Phyla Bacteroidetes und Firmicutes in der fäkalen Mikrobiota unterschiedlicher Gewichtgruppen nachweisen.

In unserer Studie konnten wir außerdem zeigen, dass die KM Zunahme bei beiden Rasse mit einem Anstieg des Phylums Actinobacteria in der fäkalen Mikrobiota assoziiert war. Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen von MORRISON et al. (2018). Bei Pferden konnte außerdem während der größten Gewichtszunahme zwischen t1 und t2 ein Abfall des Phylums Fibrobacteres beobachtet werden, während sich dieser Abfall bei den Ponys lediglich als Trend äußerte. Dies entspricht ebenfalls den Ergebnissen von MORRISON et al. (2018), die einen Abfall des Phylums Fibrobacteres bei übergewichtigen Pferden nachweisen konnten. Zwischen den Zeitpunkten t1 und t2 stieg das Phylum Proteobacteria in der Mikrobiota der Ponys signifikant an und sank dann zwischen t2 und t3 wieder signifikant ab. Bei den Pferden zeigten sich im selben Zeitraum hingegen keine signifikanten Veränderungen im Phylum

Proteobacteria. Von Autoren, die den Einfluss einer fettreichen Fütterung auf die fäkale equine Mikrobiota untersucht haben, ist bekannt, dass eine fettreiche Ration (8,3 % Fett) zu einem Anstieg des Phylums Proteobacteria führen kann. Da zwischen t1 und t2, aufgrund von Problemen beim Hersteller, das Ergänzungsfutter gewechselt werden musste, kam es zu einem Anstieg der Fettaufnahme um 22,2 %. Warum sich diese Veränderungen nur in der fäkalen Mikrobiota der Ponys zeigte, kann nicht beantwortet werden. Da die Fettabsorption vor allem in Dünndarm stattfindet und der Rohfettgehalt unserer Ration auch nach der Futterumstellung mit 4,4-4,7 % der Trockensubstanz (TS) moderat war, ist der Effekt der Futterumstellung auf die Mikrobiota wahrscheinlich vernachlässigbar. Trotzdem können wir nicht ausschließen, dass Ponys eine geringere präcaecale Fettabsorptionskapazität besitzen als Pferde und deshalb bei ihnen mehr Fett in den Dickdarm gelangte als bei den Pferden.

Ein wesentlicher Unterschied in der fäkalen Mikrobiota von Pferden und Ponys liegt in einem prozentual höheren Auftreten des Phylums Fibrobacteres zum Zeitpunkt t3, dass über alle taxonomischen Kategorien bis zur Familie Fibrobacteraceae verfolgt werden kann. Bei Pferden könnte das vermehrte Vorkommen der fibrolytischen Familie Fibrobacteraceae, die einen wichtigen Beitrag zum Abbau von Pflanzenzellwänden leistet (NEUMANN und SUEN 2018), zu einer erhöhten Faserfermentation führen. Dies legen auch Ergebnisse von RAGNARRSON und JASSON (2010) nahe, die bei einer Heulage aus einem frühen Schnitt bei Pferden, verglichen mit Islandpferden, eine höhere Verdaulichkeit der organischen Substanz nachweisen konnten (RAGNARRSON und JANSSON 2010). Ein anderer signifikanter Unterschied zwischen Pferden und Ponys zeigte sich zum Zeitpunkt t2 beim Phylum Proteobacteria. Dieses trat zum Zeitpunkt t2 vermehrt in der fäkalen Mikrobiota der Ponys auf. Dies ähnelt den Ergebnissen von STEELMAN et al. (2012), die bei einer Untersuchung zur fäkalen Mikrobiota bei chronischen Hufrehepatienten ein Pony beprobten im dessen Kotprobe, verglichen mit den Pferden, die Ordnung Burkholderiales, die zum Phylum Proteobacteria gehört, vermehrt auftrat (STEELMAN et al. 2012).

Betrachtet man die relative Verteilung der Bakterienfamilien in der fäkalen Mikrobiota der Pferde und Ponys, dann finden sich am letzten Probennahme Zeitpunkt t3 vier Familien (F082, Bacteroidales UCG- 001, Rikenellaceae und Ruminococcaceae), die häufiger in der fäkalen Mikrobiota der Ponys vorkommen und eine Familie (Fibrobacteraceae), die vermehrt in der Mikrobiota der Pferde auftritt. Zum Zeitpunkt t1 kommt lediglich die Familie F082, die sich als einzige an zwei Probennahme Zeitpunkten signifikant bei Pony und Pferd unterscheidet, vermehrt in der fäkalen Mikrobiota der Ponys vor. Zum Zeitpunkt t2 gibt es keine signifikanten Unterschiede im Auftreten der Bakterienfamilien. Dies deutet darauf hin, dass die Unterschiede in der Mikrobiota von Pferden und Ponys bei Übergewicht stärker ausgeprägt sind als bei Normalgewicht.

4.2 Veränderungen in der fäkalen SCFA Konzentration

Obwohl verschiedene Verschiebungen in den Phyla der fäkalen Mikrobiota zwischen den einzelnen Probenahmezeitpunkten beobachtet werden konnten, zeigten beiden Rassen keine Veränderungen in den SCFA. Dies entspricht auch den Ergebnissen von SHEPERD et al. (2014) und MORRISON et al. (2018) die keine Veränderungen in der fäkalen Konzentration der SCFA zwischen dünnen und übergewichtigen Pferden messen konnten. Die These, dass die Mikrobiota übergewichtiger Individuen durch eine vermehrte SCFA Produktion mehr Energie für das Individuum bereitstellt und so die Entstehung der Adipositas fördert (BLAUT 2015), konnte in unserer Untersuchung beim Pferd und Pony nicht bestätigt werden. Hier wäre es in weiteren Studien von Interesse über eine fäkale Metabolom Analyse weitere Stoffwechselwege der Mikrobiota zu untersuchen, die einen Einfluss auf den Energiestoffwechsel der Pferde und Ponys haben. Mittels der Analyse des fäkalen Metaboloms konnte bereits bei Untersuchungen übergewichtiger Pferde, ein vermehrtes Auftreten von Metaboliten des Citratzyklus, wie Isocitrat, Malat, Citrat und Aconitat, gefunden werden (COLEMAN et al. 2019). Dies könnte ein Hinweis für eine vermehrte Energieausbeute der Mikrobiota der übergewichtigen Pferde sein. Deshalb wäre es von Interesse, ob diese Veränderungen auch während einer Gewichtszunahme bei Pferden und Ponys auftreten.

In unserer Studie konnten wir bei Pferden zum Zeitpunkt t1 höhere Konzentrationen von Isobutyrat, zum Zeitpunkt t2 höhere Azetat und Isobutyrat Konzentrationen sowie zum Zeitpunkt t3 höhere gesamt SCFA, Propionat und Isovalerat Konzentrationen nachweisen. Dies deckt sich mit Ergebnissen von JENSEN et al (2010), die bei der Untersuchung von dänischen Warmblutpferden und Islandpferden, die eine Ration aus Zuckerrübenschnitzeln, Heulage und Hafer erhielten, höhere fäkale Konzentrationen von Propionat und Isobutyrat bei den Warmblutpferden nachwiesen. Da wir lediglich den SCFA Gehalt in Kotproben analysiert haben, ist es fraglich, ob die höheren SCFA Gehalte im Kot der Pferde ein Zeichen für eine verminderte SCFA Absorption im Dickdarm oder eine vermehrte SCFA Produktion der Mikrobiota sind. Dies sollte in weiteren Untersuchungen über Blutproben, wobei die Verstoffwechslung der SCFAs über die Leber berücksichtigt werden muss, oder über eine Beprobung des Dickdarmchymus abgeklärt werden.

4.3 Veränderungen in der fäkalen Laktatkonzentration

Während der signifikanten Zunahme der KM zwischen t1 und t2 zeigte sich ein Anstieg der Laktat Konzentration in der fäkalen Mikrobiota der Pferde und Ponys, der bei den Pferden anschließend von einem Abfall zwischen t2 und t3 begleitet wurde. Ein Anstieg der Laktat Konzentration wird in der Literatur vor allem nach Fütterung eines stärkereichen Kraftfutters im Chymus des Colons beschrieben (DALY et al. 2012, JULLIAND et al. 2001). Während unserer Studie kam es aufgrund des herstellerbedingten Kraftfutterwechsels zwischen t1 und t2 zu einer Varianz der Stärkeaufnahme um 18,6 % bei Pferden und Ponys. Daher können wir nicht ausschließen, dass die erhöhte Laktatkonzentration im Kot durch die erhöhte Stärkeaufnahme zustande kam. Warum es dann anschließend zwischen t2 und t3 zu einem Abfall

der fäkalen Laktatkonzentration bei den Pferden kommt, während die Laktatkonzentration im Kot der Ponys konstant bleibt, kann nicht abschließend geklärt werden. Die Variation der Stärkeaufnahme zwischen Ponys und Pferden liegt sowohl zum Probennahme Zeitpunkt t2 als auch zum Probennahme Zeitpunkt t3 bei 11 %, sodass die Stärkeaufnahme diesen Unterschied zwischen Pferden und Ponys vermutlich nicht ausschließlich verursacht. Auch die Verschiebungen in der fäkalen Mikrobiota, die zum Zeitpunkt t3 zwischen Pferden und Ponys beobachtet wurden, bieten keinen Erklärungsansatz für die erhöhte Laktatkonzentration im Kot der Ponys. Eventuell befinden sich jedoch innerhalb der unbekanntenen Genera Laktat verstoffwechselnde Genera, die vermehrt beim Pferd vorkommen. Um dies in weiteren Untersuchungen abklären zu können wäre entweder eine Kultivierung der laktatverwertenden Bakterien oder eine Metabolom Analyse sinnvoll.

4.4 Restriktionen der Studie

Ein limitierender Faktor unserer Studie ist die Tatsache, dass nur 1,8 % der gefundenen Spezies und 74,2 % der Genera identifiziert werden konnten. Dadurch können wir lediglich begrenzte Rückschlüsse über die funktionellen Auswirkungen der beobachteten Verschiebungen in der bakteriellen Mikrobiota ziehen. Denn die oberen taxonomischen Kategorien fassen meist Bakterien mit unterschiedlichen Funktionen zusammen. Dies ist jedoch eine Limitation, die derzeit bei allen Sequenzierungsstudien zur equinen Mikrobiota gegeben ist (COSTA et al. 2012, SHEPHERD et al. 2012, GRIMM et al. 2020).

Eine andere Restriktion unserer Untersuchung liegt in der Tatsache, dass wir über einen Studienzeitraum von zwei Jahren lediglich an drei Zeitpunkten Kotproben analysiert haben. Bis jetzt liegen, nach Kenntnisstand der Autorin, lediglich Untersuchungen vor, die eine hohe Stabilität der equinen Mikrobiota bei standardisierter Haltung und Fütterung über drei Monate nachweisen (BLACKMORE et al. 2013). Da wir jedoch über zwei Jahre ein standardisiertes Haltungs- und Fütterungsprotokoll etablierten und jedes Tier bei der Betrachtung der Gewichtsentwicklung im Zeitverlauf seine eigene Kontrolle darstellte, kann spekuliert werden, dass die Ergebnisse aussagekräftige Rückschlüsse zulassen.

4.5 Schlussfolgerung

Entgegen der ersten Hypothese konnte, anders als bei übergewichtigen Mäusen, Menschen und zum Teil auch bei Pferden beschrieben, während der Gewichtszunahme bei Pferden und Ponys kein Abfall des Phylums Bacteroidetes nachgewiesen werden. Der in der Literatur beschriebene Anstieg des Phylums Firmicutes, lies sich in unserer Studie lediglich bei den Ponys nicht jedoch bei den Pferden nachvollziehen. Auch der zwischen t1 und t2 beobachtete Abfall der Artenvielfalt, konnte lediglich in der fäkalen Mikrobiota der Ponys beobachtet werden, wobei zu diesem Zeitabschnitt die Ponys prozentual höhere KM-Zunahmen entwickelten als die Pferde. Die Veränderungen der Phyla Actinobacteria bei beiden Rassen und Fibrobacteres bei den Pferden ähneln hingegen den von anderen Autoren beschriebenen Veränderungen bei adipösen Pferden. Die verminderte Artenvielfalt in der fäkalen Mikrobiota der übergewichtigen Ponys,

könnte zu einer schlechteren Anpassungsfähigkeit der Ponys an Veränderungen in der Fütterung führen, da weniger Arten in der fäkalen Mikrobiota vorhanden sind, die sofern ihre Eigenschaften für die Verdauung benötigt werden, proliferieren könnten. Der Abfall des fibrolytischen Phylums Fibrobacteres im Rahmen der Gewichtszunahme bei den Pferden, könnte zu einer verminderten Faserverdaulichkeit führen.

Unsere zweite Hypothese, dass Ponys eine andere Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota besitzen als Pferde, konnte vor allem zum Zeitpunkt t2 und t3, nach elf bzw. dreiundzwanzig monatiger energiereicher Fütterung bestätigt werden. Dabei zeigte sich bei den Ponys zum Zeitpunkt t2 eine Erhöhung des Phylums Proteobacteria. In den Fäzes der Pferde, konnte hingegen ein vermehrtes Auftreten des fibrolytischen Phylums Fibrobacteres und verschiedener SCFA zum Zeitpunkt t3 beobachtet werden. Dies könnte auf eine verbesserte Faserfermentation der Pferde hinweisen. Um weitere Erkenntnisse über die funktionellen Konsequenzen dieser Verschiebungen in der Mikrobiota für die Pferde und Ponys während einer Gewichtszunahme zu erlangen, wäre in weiteren Untersuchungen die Analyse des fäkalen Metaboloms von Interesse.

5 Zusammenfassung

Katharina Langner

Veränderungen in der fäkalen Mikrobiota im Verlauf einer zweijährigen energiereichen Fütterung bei Pferden und Ponys

Institut für Tierernährung, Ernährungsschäden und Diätetik, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im April 2021

69 Seiten, 1 Abbildung, 3 Tabellen, 123 Literaturangaben, Anhang

Schlüsselwörter: fäkale Mikrobiota, 16S rRNA, kurzkettige Fettsäuren, Laktat, Adipositas

Einleitung Adipositas und die damit verbundenen Erkrankungen wie Hyperlipidämie, Insulindysregulation und Hufrehe stellen ein großes gesundheitliches Problem domestizierter Pferde und Ponys dar. Besonders Ponys, die als „leichtfuttrig“ gelten, sind öfter von Adipositas und den damit verbundenen Erkrankungen betroffen. Aktuelle Untersuchungen der intestinalen Mikrobiota bei Mäusen, Menschen und Pferden deuten darauf hin, dass es einen Zusammenhang zwischen der Mikrobiota und der Gewichtsentwicklung gibt und bei adipösen Individuen eine andere Zusammensetzung der Mikrobiota als bei normalgewichtigen Individuen vorliegt. Untersuchungen zu den Veränderungen der fäkalen equinen Mikrobiota während einer mehrmonatigen Gewichtszunahme bei Pferden und Ponys fehlen.

Ziele der Untersuchungen Zweck der vorliegenden Studie war die Überprüfung der Effekte einer zweijährigen energiereichen Fütterung auf die fäkale Mikrobiota bei Pferden und Ponys. Dabei sollten folgende Hypothesen geprüft werden: (1) Die equine fäkale Mikrobiota verändert sich im Laufe der Gewichtszunahme hin zu einer Zusammensetzung wie sie für adipöse Individuen beschrieben ist. (2) Ponys besitzen eine andere Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota als Pferde.

Tiere, Material und Methoden Zehn Shetlandponys (Alter 6 ± 3 Jahre) und zehn Warmblutpferde (Alter 10 ± 3 Jahre) erhielten zwei Jahre 200 % ihres Erhaltungsbedarfs an umsetzbarer Energie. Monatlich wurde der Energiebedarf an die aktuelle Körpermasse (KM) angepasst. Die Ration bestand zu 60 % aus Heu und zu 40 % aus einem Ergänzungsfutter (Rohprotein 13,4 %, Rohfett 14,4 %, Rohfaser 9,8 %, stickstofffreie Extraktstoffe 54,3 %). Morphometrische Daten (Body Condition Score (BCS), Cresty neck score (CNS) und KM) wurden wöchentlich erfasst. Kotproben wurden 5 (t1), 11 (t2) und 23 (t3) Monate nach Beginn der energiereichen Fütterung bei den Pferden und Ponys gewonnen. Aus den Kotproben wurde die DNA extrahiert und die V3-V4 Region auf der 16S rRNA wurde mittels PCR vervielfältigt. Die PCR Produkte wurden mit Illumina MiSeq sequenziert. Die Sequenzierungsdaten wurden mit FROGS ausgewertet und zur Beurteilung der Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota wurden die Diversität mittels Shannon und

Simpson Index sowie das beobachtete Artenreichtum kalkuliert. Die Konzentrationen der gesamten kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) sowie von Azetat, Propionat, Butyrat, Isobutytrat, Valerat und Isovalerat wurden mittels flüssig Gaschromatographie bestimmt. Der Laktatgehalt im Kot wurde mittels enzymatisch kolorimetrischer Messung ermittelt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software Statistica ©. Der Zeiteffekt wurde mit einer Friedmanns ANOVA und anschließend Wilcoxon Rangsummentest mit Bonferroni Korrektur ermittelt. Für die Rasseneffekte wurde ein Mann-Whitney-U Test verwendet. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$.

Ergebnisse KM, BCS und CNS stiegen signifikant während der zweijährigen hochkalorischen Fütterung an. Beim Pony kam es zu einem Anstieg des Phylums Firmicutes ($p = 0,025$) zwischen t2 und t3 und bei beiden Rassen wurde ein signifikanter Anstieg des Phylums Actinobacteria in der fäkalen Mikrobiota zwischen t1 und t3 beobachtet. Bei Pferden konnte während der größten Gewichtszunahme zwischen t1 und t2 ein Abfall des Phylums Fibrobacteres ($p = 0,028$) beobachtet werden. In der fäkalen Mikrobiota der Ponys zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Phylums Proteobacteria zwischen t1 und t2, gefolgt von einem Abfall zwischen t2 und t3. Der einzige signifikante Unterschied zwischen der fäkalen Mikrobiota der Pferde und der Ponys zum Zeitpunkt t1 war ein vermehrtes Vorkommen der Familie F082 in der fäkalen Mikrobiota der Ponys. Zum Zeitpunkt t2 wurde das Phylum Proteobacteria seltener in der Mikrobiota der Ponys beobachtet ($p = 0,01$). Die größten Unterschiede in der fäkalen Mikrobiota von Pferden und Ponys konnten zum Zeitpunkt t3 beobachtet werden. Dort kam das Phylum Fibrobacteres ($p = 0,026$) häufiger in der fäkalen Mikrobiota der Pferde vor und 5 Bakterienfamilien unterschieden sich signifikant in ihrem Vorkommen bei Pferden und Ponys. Während der größten Gewichtszunahme zwischen t1 und t2 zeigte sich ein signifikanter Abfall in der Artenvielfalt in der fäkalen Mikrobiota der Ponys. Im Kot der Pferde konnten, verglichen mit dem der Ponys, signifikant höhere SCFA Konzentrationen gemessen werden: t1: Isobutytrat, t2: Isobutytrat und Azetat und t3: gesamt SCFA, Propionat und Isovalerat. Zwischen t1 und t2 zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Laktat Konzentration in den Fäzes der Pferde und Ponys, der bei den Pferden anschließend von einem Abfall zwischen t2 und t3 begleitet wurde.

Schlussfolgerungen Während der energiereichen Fütterung konnte ein Abfall der Artenvielfalt sowie Änderungen in den Phyla Firmicutes, Actinobacteria und Fibrobacteres beobachtet werden. Unterschiede in der Mikrobiota von Pferden und Ponys konnten vor allem gegen Ende der 23-monatigen hochkalorischen Fütterung beobachtet werden. Während beim Pony die Bakterienfamilien F082, Bacteroidales UCG-001, Rikenellaceae und Ruminococcaceae vermehrt in der fäkalen Mikrobiota auftraten, kam beim Pferd das fibrolytischen Phylum Fibrobacteres und die fibrolytische Familie Fibrobacteraceae sowie verschiedene SCFAs häufiger vor. Dies könnte ein Hinweis auf eine verbesserte Faserfermentation der Pferde sein. Die funktionellen Konsequenzen dieser Mikrobiota Verschiebungen sollten zukünftig über Metabolomanalysen weiter abgeklärt werden.

6 Summary

Katharina Langner

Changes in the faecal microbiota of horses and ponies during a two -year body weight gain programme

Institute of Animal Nutrition, Nutrition Diseases and Dietetics, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University

Submitted in April 2021

69 pages, 1 figure, 3 tables, 123 references

Keywords: faecal microbiota, 16S rRNA, diversity, short chain fatty acids, lactate, obesity

Introduction Obesity is a major health concern in many domesticated equids since it is related to metabolic abnormalities such as insulin dysregulation, hyperlipidaemia, or laminitis. Ponies are known as “easy keepers” and are often affected by obesity and its related metabolic disorders. Research in the last decade indicated that the intestinal microbiota may play an important role in the development of obesity. The microbiota of obese humans, horses and mice also has a different composition compared to the microbiota of normal weight individuals. Studies of changes in the equine faecal microbiota during a weight gain programme are missing so far.

Aim of the study The present study was conducted to evaluate the impact of two years of excessive energy intake on the faecal microbiota of horses and ponies. With our study we wanted to verify the following hypothesis: (1) the composition of the equine faecal microbiota changes during weight gain into a composition similar to the one described by other authors for obese individuals. (2) the microbiota of ponies has another structure than the microbiota of horses.

Animals, materials, and methods Ten Shetland ponies (age 6 ± 3 years) and ten Warmblood horses (age 10 ± 3 years) were housed individually and fed a diet containing 200 % of their maintenance metabolizable energy requirement supplied by 60 % hay and 40 % complementary feed (crude protein 13.4 %, crude fat 14.4 %, crude fibre 9.8 %, nitrogen free extract 54.3 %). Monthly the energy requirement was adapted to the current body weight (BW). BW, Body condition score (BCS) and cresty neck score (CNS) were recorded weekly. Faecal samples were taken 5 (t1), 11 (t2) and 23 (t3) months after the start of the controlled feeding period. Faecal sampling was performed by manual grapping in horses and by bag sampling in ponies. Total DNA was extracted from the faecal samples, and a PCR was performed to amplify the V3-V4 region of the 16S rRNA gene. PCR products were sequenced using Illumina MiSeq. Sequencing data was processed with FROGS pipeline. Community structure was analysed by calculation of observed richness, Simpson and Shannon diversity index. Concentrations of total short chain fatty acids (SCFAs), acetate,

propionate, isobutyrate, butyrate, isovalerate and valerate were analysed by gas liquid chromatography. The lactate concentration was measured through enzymatic colorimetric analysis. The statistical analysis was performed with the commercial software Statistica ©. Friedman's ANOVA and Wilcoxon signed rank test with Bonferroni correction were performed factoring the effects of time. For breed related differences Mann-Whitney-U test was used. Significant levels were set at $p < 0.05$.

Results BW, BCS and CNS increased significantly during the two-years of excessive energy intake. In ponies an increase of the phylum Firmicutes ($p = 0.025$) was seen between t2 and t3 and in both breeds a significant increase of the phyla Actinobacteria was recorded between t1 and t3. During the highest weight gain between t1 and t2 a drop of the phylum Fibrobacteres ($p = 0.028$) was recorded in the faecal microbiota of horses. Between t1 and t2 the phylum Proteobacteria rose significantly in the faecal microbiota of ponies and showed a significant drop between t2 and t3. At t1 the only difference in the faecal microbiota of horses and ponies was the higher abundance of the family F082 in the microbiota of ponies. At t2 a lower abundance of the phyla Proteobacteria was recorded for the microbiota of ponies ($p = 0.01$). The highest differences in the faecal microbiota of horses and ponies were seen at t3. At this timepoint the phylum Fibrobacteres ($p = 0.026$) had a higher abundance in the microbiota of horses and 4 bacterial families differed significantly between the microbiota of horses and ponies. During the highest weight gain between t1 and t2 a significant decrease in richness was recorded in the faecal microbiota of ponies. Compared to ponies, horses had significantly higher faecal concentrations of the following SCFA: isobutyrate at t1, acetate and isobutyrate at t2 and total SCFA, isovalerate and propionate at t3. During t1 and t2 a significant increase of the faecal lactate concentration was recorded for horses and ponies. In horses' faecal lactate decreased significantly between t2 and t3.

Conclusion During the excessive energy intake the richness of the faecal microbiota decreased in ponies and changes in the phyla Firmicutes, Actinobacteria and Fibrobacteres were recorded. Differences in the microbiota of horses and ponies were primarily seen at the end of the study after 23 months on the hypercaloric diet at t3. At this timepoint an increase of the families F082, Bacteroidales UCG- 001, Rikenellaceae und Ruminococcaceae was recorded in the faecal microbiota of ponies. In the faecal microbiota of horses, a significant increase of the fibrolytic phylum Fibrobacteres, the fibrolytic family Fibrobacteraceae and higher levels of different SCFAs were seen. If these changes in the faecal microbiota of horses at t3 lead to a better fibre digestibility, has to be addressed in further studies. To determine the functional impact of changes in the microbiota a metabolome analysis should be performed in future studies.

7 Literaturverzeichnis

Argenzio RA, Southworth M, Stevens CE. Sites of organic acid production and absorption in the equine gastrointestinal tract. *Am J Physiol.* 1974;226(5):1043–50.

Armougom F, Henry M, Vialettes B, Raccach D, Raoult D. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and *Methanogens* in anorexic patients. *PLoS one.* 2009;4(9):7125.

Arroyo LG, Rossi L, Santos BP, Gomez DE, Surette MG, Costa MC. Luminal and Mucosal Microbiota of the Cecum and Large Colon of Healthy and Diarrheic Horses. *Animals.* 2020;10(8):1403.

Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(44):15718–23.

Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ free mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(3):979–84.

Bailey SR, Marr CM, Elliott J. Current research and theories on the pathogenesis of acute laminitis in the horse. *Vet J.* 2004;167(2):129–42.

Biddle AS, Tomb J-F, Fan Z. Microbiome and Blood Analyte Differences Point to Community and Metabolic Signatures in Lean and Obese Horses. *Front Vet Sci.* 2018;5: 10.3389/fvets.2018.00225.

Blackmore TM, Dugdale A, Argo CM, Curtis G, Pinloche E, Harris PA, et al. Strong stability and host specific bacterial community in faeces of ponies. *PLoS one.* 2013;8(9):75079.

Blaut M. Gut microbiota and energy balance: role in obesity. *Proc Nutr Soc.* 2015;74(3):227–34.

Breves G. Funktionen des Dickdarms- Mikrobieller Kohlenhydratstoffwechsel. In: Engelhardt Wv, Breves G Diener M, Gäbel G. *Physiologie der Haustiere.* 5. Aufl. Stuttgart: Enke Verlag; 2015. p.435-36

Bulmer LS, Murray J-A, Burns NM, Garber A, Wemelsfelder F, McEwan NR, et al. High-starch diets alter equine faecal microbiota and increase behavioural reactivity. *Sci Rep.* 2019;9(1): 10.1371/journal.pone.0075079.

Campisciano G, Palmisano S, Cason C, Giuricin M, Silvestri M, Guerra M, et al. Gut microbiota characterisation in obese patients before and after bariatric surgery. *Benef microbes.* 2018;9(3):367–73.

Coenen M. Verdauungssekrete und -Enzyme sowie mikrobielle Darmflora. In: Coenen M., Vervuert I. *Pferdefütterung.* 6. Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2020. p.38-41.

Coleman MC, Whitfield-Cargile CM, Madrigal RG, Cohen ND. Comparison of the microbiome, metabolome, and lipidome of obese and non-obese horses. *PLoS one.* 2019;14(4):0215918.

Costa MC, Arroyo LG, Allen-Vercoe E, Stämpfli HR, Kim PT, Sturgeon A, et al. Comparison of the faecal microbiota of healthy horses and horses with colitis by high throughput sequencing of the V3-V5 region of the 16S rRNA gene. *PLoS one.* 2012;7(7):41484.

Costa MC, Silva G, Ramos RV, Staempfli HR, Arroyo LG, Kim P, et al. Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. *Vet J.* 2015;205(1):74–80.

- Costa MC, Weese JS. Understanding the Intestinal Microbiome in Health and Disease. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2018;34 (1):1-12.
- Daly K, Proudman CJ, Duncan SH, Flint HJ, Dyer J, Shirazi-Beechey SP. Alterations in microbiota and fermentation products in equine large intestine in response to dietary variation and intestinal disease. *The Br J Nutr.* 2012;107(7):989–95.
- David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature.* 2014;505(7484):559–63.
- den Besten G, Lange K, Havinga R, van Dijk TH, Gerding A, van Eunen K, et al. Gut-derived short-chain fatty acids are vividly assimilated into host carbohydrates and lipids. *Am J Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 2013;305(12):G900-10.
- Destrez A, Grimm P, Cézilly F, Julliand V. Changes of the hindgut microbiota due to high-starch diet can be associated with behavioral stress response in horses. *Physiol Behav.* 2015;149:159–64.
- Destrez A, Grimm P, Julliand V. Dietary-induced modulation of the hindgut microbiota is related to behavioral responses during stressful events in horses. *Physiol Behav.* 2019;202:94–100.
- Dougal K, Harris PA, Edwards A, Pachebat JA, Blackmore TM, Worgan HJ, et al. A comparison of the microbiome and the metabolome of different regions of the equine hindgut. *FEMS Microbiol Ecol.* 2012;82(3):642–52.
- Dougal K, La Fuente G, Harris PA, Girdwood SE, Pinloche E, Geor RJ, et al. Characterisation of the faecal bacterial community in adult and elderly horses fed a high fibre, high oil or high starch diet using 454 pyrosequencing. *PloS one.* 2014;9(2):87424.
- Dougal K, La Fuente G, Harris PA, Girdwood SE, Pinloche E, Newbold CJ. Identification of a Core Bacterial Community within the Large Intestine of the Horse. *PloS one.* 2013;8(10):77660.
- Duca FA, Swartz TD, Sakar Y, Covasa M. Increased oral detection, but decreased intestinal signaling for fats in mice lacking gut microbiota. *PloS one.* 2012;7(6):39748.
- Duncan SH, Lobley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P, et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes (2005).* 2008;32(11):1720–4.
- Elzinga SE, Weese JS, Adams AA. Comparison of the fecal Microbiota in Horses with Equine Metabolic Syndrome and metabolically normal Controls fed a similar all-forage diet. *J Equine Vet Sci.* 2016;44:9–16.
- Ericsson AC, Johnson PJ, Lopes MA, Perry SC, Lanter HR. A Microbiological Map of the Healthy Equine Gastrointestinal Tract. *PloS one.* 2016;11(11): 0166523.
- Fernandes J, Su W, Rahat-Rozenbloom S, Wolever TMS, Comelli EM. Adiposity, gut microbiota and faecal short chain fatty acids are linked in adult humans. *Nutr Diabetes.* 2014;4:121.
- Fleissner CK, Huebel N, Abd El-Bary MM, Loh G, Klaus S, Blaut M. Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity. *Br J Nutr.* 2010;104(6):919–29.
- Fombelle A de, Julliand V, Drogoul C, Jacotot E. Feeding and microbial disorders in horses: 1-effects of an abrupt incorporation of two levels of barley in a hay diet on microbial profile and activities. *J Equine Vet Sci.* 2001;21(9):439–45.

- Frape D. The digestive system. In: Frape D, Equine nutrition and feeding. 4. Aufl. Chichester: Wiley-Blackwell; 2010.p. 1-20.
- Furet J-P, Kong L-C, Tap J, Poitou C, Basdevant A, Bouillot J-L, et al. Differential Adaptation of Human Gut Microbiota to Bariatric Surgery–Induced Weight Loss. *Diabetes*. 2010;59(12):3049–57.
- Gesellschaft für Ernährungsphysiologie. Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung von Pferden. Frankfurt am Main: DLG- Verlag; 2014.
- Glatter M, Borewicz K, van den Bogert B, Wensch-Dorendorf M, Bochnia M, Greef JM, et al. Modification of the equine gastrointestinal microbiota by Jerusalem artichoke meal supplementation. *PloS one*. 2019;14(8):0220553.
- Graham C, Mullen A, Whelan K. Obesity and the gastrointestinal microbiota: a review of associations and mechanisms. *Nutr Rev*. 2015;73(6):376–85.
- Grimm P, Combes S, Pascal G, Cauquil L, Julliand V. Dietary composition and yeast/microalgae combination supplementation modulate the microbial ecosystem in the caecum, colon and faeces of horses. *Br J Nutr*. 2020;123(4):372–82.
- Grimm P, Philippeau C, Julliand V. Faecal parameters as biomarkers of the equine hindgut microbial ecosystem under dietary change. *Animal*. 2017;11(7):1136–45.
- Hansen NCK, Avershina E, Mydland LT, Næsset JA, Austbø D, Moen B, et al. High nutrient availability reduces the diversity and stability of the equine caecal microbiota. *Microb ecol health dis*. 2015;26:27216.
- Harlow BE, Lawrence LM, Hayes SH, Crum A, Flythe MD. Effect of Dietary Starch Source and Concentration on Equine Fecal Microbiota. *PloS one*. 2016;11(4):0154037.
- Harris PA, Ellis AD, Fradinho MJ, Jansson A, Julliand V, Luthersson N, et al. Review: Feeding conserved forage to horses: recent advances and recommendations. *Animal*. 2017;11(6):958–67.
- Hildebrandt MA, Hoffman C, Sherrill-Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen Y-Y, et al. High Fat Diet Determines the Composition of the Murine Gut Microbiome Independently of Obesity. *Gastroenterology*. 2009;137(5):1716-24.
- Jensen RB, Brokner C, Knudsen KEB, Tauson A-H. A comparative study of the apparent total tract digestibility of carbohydrates in Icelandic and Danish warmblood horses fed two different haylages and a concentrate consisting of sugar beet pulp. *Arch Anim Nutr* 2010;64(5):343-56.
- Julliand V, de Fombelle A, Drogoul C, Jacotot E. Feeding and microbial disorders in horses: Part 3—Effects of three hay:grain ratios on microbial profile and activities. *J Equine Vet Sci*. 2001;21(11):543–6.
- Julliand V, de Fombelle A, Varloud M. Starch digestion in horses: The impact of feed processing. *Livest Sci*. 2006;100(1):44–52.
- Julliand V, Grimm P. HORSE SPECIES SYMPOSIUM: The microbiome of the horse hindgut: History and current knowledge. *J Anim Sci*. 2016;94(6):2262–74.
- Julliand V, Grimm P. The Impact of Diet on the Hindgut Microbiome. *J Equine Vet Sci*. 2017;52:23–8.
- Kadereit JW. Methoden der Systematik. In: Strasburger E, Bresinsky A, Körner C, Kadereit JW, Neuhaus G, Sonnwald U. *Lehrbuch der Botanik*. 36. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.; 2008. p. 610-617.

- Kaiser-Thom S, Hilty M, Gerber V. Effects of hypersensitivity disorders and environmental factors on the equine intestinal microbiota. *Vet Q.* 2020;40(1):97–107.
- Kasai C, Sugimoto K, Moritani I, Tanaka J, Oya Y, Inoue H, et al. Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. *BMC Gastroenterol.* 2015;15.
- König B. Einfluss biogeographischer Faktoren auf die Diversität von Lebensgemeinschaften. In: Campbell NA, Reece JB, Held A, Markl J. *Biologie.* 6. Aufl., München: Pearson Studium; 2008. p. 1422-1429.
- Koliada A, Syzenko G, Moseiko V, Budovska L, Puchkov K, Perederiy V, et al. Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. *BMC Microbiol.* 2017;17(1):120.
- Kong L-C, Tap J, Aron-Wisnewsky J, Pelloux V, Basdevant A, Bouillot J-L, et al. Gut microbiota after gastric bypass in human obesity: increased richness and associations of bacterial genera with adipose tissue genes. *Am J Clin Nutr.* 2013;98(1):16–24.
- Kristoffersen C, Jensen RB, Avershina E, Austbø D, Tauson A-H, Rudi K. Diet-Dependent Modular Dynamic Interactions of the Equine Cecal Microbiota. *Microbes and environments.* 2016;31(4):378–86.
- Leclere M, Costa MC. Fecal microbiota in horses with asthma. *J Vet Intern Med.* 2020;34(2):996–1006.
- Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(31):11070–5.
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Human gut microbes associated with obesity [Brief communications]. *Nature.* 2006;441(7093):1022-23.
- Liggenstoffer AS, Youssef NH, Couger MB, Elshahed MS. Phylogenetic diversity and community structure of anaerobic gut fungi (phylum Neocallimastigomycota) in ruminant and non-ruminant herbivores. *ISME J.* 2010;4(10):1225–35.
- Liou AP, Paziuk M, Luevano J-M, Machineni S, Turnbaugh PJ, Kaplan LM. Conserved shifts in the gut microbiota due to gastric bypass reduce host weight and adiposity. *Sci Transl Med.* 2013;5(178):178ra41.
- Luthersson N, Mannfalk M, Parkin TDH, Harris P. Laminitis: Risk Factors and Outcome in a Group of Danish Horses. *J Equine Vet Sci.* 2017;53:68–73.
- Massacci FR, Clark A, Ruet A, Lansade L, Costa M, Mach N. Inter-breed diversity and temporal dynamics of the faecal microbiota in healthy horses. *J Anim Breed Genet.* 2020;137:103-20.
- McKinney CA, Oliveira BCM, Bedenice D, Paradis M-R, Mazan M, Sage S, Sanchez A, Widmer G. The fecal microbiota of healthy donor horses and geriatric recipients undergoing fecal microbial transplantation for the treatment of diarrhea. *PloS one.* 2020;15(3):0230148.
- Menni C, Jackson MA, Pallister T, Steves CJ, Spector TD, Valdes AM. Gut microbiome diversity and high-fibre intake are related to lower long-term weight gain. *Int J Obes (2005).* 2017;41(7):1099–105.
- Metcalf JL, Song SJ, Morton JT, Weiss S, Seguin-Orlando A, Joly F, et al. Evaluating the impact of domestication and captivity on the horse gut microbiome. *Sci Rep.* 2017;7(1):15497.
- Milinovich GJ, Burrell PC, Pollitt CC, Klieve AV, Blackall LL, Ouwerkerk D, et al. Microbial ecology of the equine hindgut during oligofructose-induced laminitis. *ISME J.* 2008;2(11):1089–100.

- Milnovich GJ, Trott DJ, Burrell PC, Croser EL, Al Jassim RAM, Morton JM, et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of hindgut bacteria associated with the development of equine laminitis. *Environ microbiol.* 2007;9(8):2090–100.
- Milnovich GJ, Trott DJ, Burrell PC, van Eps AW, Thoefner MB, Blackall LL, et al. Changes in equine hindgut bacterial populations during oligofructose-induced laminitis. *Environ microbiol.* 2006;8(5):885–98.
- Million M, Angelakis E, Maraninchi M, Henry M, Giorgi R, Valero R, et al. Correlation between body mass index and gut concentrations of *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis*, *Methanobrevibacter smithii* and *Escherichia coli*. *Int J Obes (2005).* 2013;37(11):1460–6.
- Million M, Maraninchi M, Henry M, Armougom F, Richet H, Carrieri P, et al. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *Int J Obes (2005).* 2012;36(6):817–25.
- Moreau MM, Eades SC, Reinemeyer CR, Fugaro MN, Onishi JC. Illumina sequencing of the V4 hypervariable region 16S rRNA gene reveals extensive changes in bacterial communities in the cecum following carbohydrate oral infusion and development of early-stage acute laminitis in the horse. *Vet microbiol.* 2014;168(2-4):436–41.
- Morrison PK, Newbold CJ, Jones E, Worgan HJ, Grove-White DH, Dugdale AH, et al. The Equine Gastrointestinal Microbiome: Impacts of Age and Obesity. *Front microbiol.* 2018;9.
- Morrison PK, Newbold CJ, Jones E, Worgan HJ, Grove-White DH, Dugdale AH, et al. Effect of age and the individual on the gastrointestinal bacteriome of ponies fed a high-starch diet. *PLoS one.* 2020a;15(5):0232689.
- Morrison PK, Newbold CJ, Jones E, Worgan HJ, Grove-White DH, Dugdale AH, et al. The equine gastrointestinal microbiome: impacts of weight-loss. *BMC Vet Res.* 2020b;16(78):10.1186/s12917-020-02295-6.
- Mshelia ES, Adamu L, Wakil Y, Turaki UA, Gulani IA, Musa J. The association between gut microbiome, sex, age and body condition scores of horses in Maiduguri and its environs. *Microb pathog.* 2018;118:81–6.
- Muhonen S, Julliand V, Lindberg JE, Bertilsson J, Jansson A. Effects on the equine colon ecosystem of grass silage and haylage diets after an abrupt change from hay. *J Anim Sci.* 2009;87(7):2291–8.
- Müller CE, von Rosen D, Udén P. Effect of forage conservation method on microbial flora and fermentation pattern in forage and in equine colon and faeces. *Livest Sci.* 2008;119(1-3):116–28.
- Mura E, Edwards J, Kittelmann S, Kaerger K, Voigt K, Mrazek J, et al. Anaerobic fungal communities differ along the horse digestive tract. *Fungal Biol.* 2019;123(3):240–6.
- Murphy R, Tsai P, Jüllig M, Liu A, Plank L, Booth M. Differential Changes in Gut Microbiota After Gastric Bypass and Sleeve Gastrectomy Bariatric Surgery Vary According to Diabetes Remission. *Obes Surg.* 2016;27(4):917–25.
- Neumann AP, Suen G. The Phylogenomic Diversity of Herbivore-Associated *Fibrobacter* spp. Is Correlated to Lignocellulose-Degrading Potential. *mSphere.* 2018;3(6): 00593-18.
- Park J, Kim EB. Differences in microbiome and virome between cattle and horses in the same farm. *Asian-australas J Anim Sci.* 2020;33(6):10.5713/ajas.19.0267.

- Patterson-Kane JC, Karikoski NP, McGowan CM. Paradigm shifts in understanding equine laminitis. *Vet J*. 2018;231:33-40.
- Philippeau C, Sadet-Bourgeteau S, Varloud M, Julliand V. Impact of barley form on equine total tract fibre digestibility and colonic microbiota. *Animal*. 2015;9(12):1943–8.
- Placade S, Clark A, Philippe C, Helbling JC, Moisan MP, Esquerré D, Le ML, et al. Unraveling the effects of the gut microbiota composition and function on horse endurance physiology. *Sci Rep*. 2019;9(1):10.1038/s41598-019-46118-7.
- Potter SJ, Bamford NJ, Harris PA, Bailey SR. Prevalence of obesity and owners' perceptions of body condition in pleasure horses and ponies in south-eastern Australia. *Aust Vet J*. 2016;94(11):427–32.
- Pyles MB, Fowler AL, Bill VT, Crum AD, Hayes SH, Harlow BE, et al. Effect of Starch Source in Pelleted Concentrates on Fecal Bacteria in Prepartum and Postpartum Mares. *J Equine Vet Sci*. 2019;72:31–6.
- Rabot S, Membrez M, Bruneau A, Gérard P, Harach T, Moser M, et al. Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. *FASEB J*. 2010;24(12):4948–59.
- Ragnarrson S, Jansson A. Comparison of gras haylage digestibility and metabolic plasma profile in Icelandic and standard bred horses. *J Anim Physiol Anim Nutr*. 2011;95:273-9.
- Ravussin Y, Koren O, Spor A, LeDuc C, Gutman R, Stombaugh J, et al. Responses of gut microbiota to diet composition and weight loss in lean and obese mice. *Obesity*. 2012;20(4):738–47.
- Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*. 2013;341(6150):1241214.
- Riva A, Borgo F, Lassandro C, Verduci E, Morace G, Borghi E, et al. Pediatric obesity is associated with an altered gut microbiota and discordant shifts in Firmicutes populations. *Environ microbiol*. 2016;19(1):95–105.
- Robin CA, Ireland JL, Wylie CE, Collins SN, Verheyen KLP, Newton JR. Prevalence of and risk factors for equine obesity in Great Britain based on owner-reported body condition scores. *Equine Vet J*. 2015;47(2):196–201.
- Rodriguez C, Taminiau B, Brévers B, Avesani V, van Broeck J, Leroux A, et al. Faecal microbiota characterisation of horses using 16 rDNA barcoded pyrosequencing, and carriage rate of *Clostridium difficile* at hospital admission. *BMC Microbiol*. 2015;15(181): 10.1186/s12866-015-0514-5.
- Rosenfeld I, Austbø D. Digestion of cereals in the equine gastrointestinal tract measured by the mobile bag technique on caecally cannulated horses. *Anim Feed Sci Technol*. 2009;150(3-4):249–58.
- Salem SE, Maddox TW, Antczak P, Ketley JM, Williams NJ, Archer DC. Acute changes in the colonic microbiota are associated with large intestinal forms of surgical colic. *BMC Vet Res*. 2019;15(1):468.
- Samuel BS, Shaito A, Motoike T, Rey FE, Backhed F, Manchester JK, et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(43):16767–72.
- Schéle E, Grahne L, Anesten F, Hallén A, Bäckhed F, Jansson J-O. The gut microbiota reduces leptin sensitivity and the expression of the obesity-suppressing neuropeptides proglucagon (Gcg) and brain-derived neurotrophic factor (Bdnf) in the central nervous system. *Endocrinology*. 2013;154(10):3643–51.

- Schoster A, Mosing M, Jalali M, Staempfli HR, Weese JS. Effects of transport, fasting and anaesthesia on the faecal microbiota of healthy adult horses. *Equine Vet J*. 2016;48(5):595–602.
- Schoster A, Staempfli HR, Guardabassi LG, Jalali M, Weese JS. Comparison of the fecal bacterial microbiota of healthy and diarrheic foals at two and four weeks of life. *BMC Vet Res*. 2017;13:144
- Shepherd ML, Ponder MA, Burk AO, Milton SC, Swecker WS. Fibre digestibility, abundance of faecal bacteria and plasma acetate concentrations in overweight adult mares. *J Nutr Sci*. 2014;3(10): 10.1017/jns.2014.8.
- Shepherd ML, Swecker WS, Jensen RV, Ponder MA. Characterization of the fecal bacteria communities of forage-fed horses by pyrosequencing of 16S rRNA V4 gene amplicons. *FEMS Microbiol Lett*. 2012;326(1):62–8.
- Shirazi-Beechey SP. Molecular insights into dietary induced colic in the horse. *Equine Vet J*. 2008;40(4):414–21.
- Simmons HA, Ford E. Gluconeogenesis from Propionat produced in the colon of the horse. *Br vet J*. 1991;147(04):340–5.
- Steelman SM, Chowdhary BP, Dowd S, Suchodolski J, Janečka JE. Pyrosequencing of 16S rRNA genes in fecal samples reveals high diversity of hindgut microflora in horses and potential links to chronic laminitis. *BMC Vet Res*. 2012;8:231.
- Stevens CE. Physiological implications of microbial digestion in the large intestine of mammals: relation to dietary factors. *Am J Clin Nutr*. 1978;31(10):161-68.
- Stewart HL, Pitta D, Indugu N, Vecchiarelli B, Hennessy ML, Engiles JB, et al. Changes in the faecal bacterial microbiota during hospitalisation of horses with colic and the effect of different causes of colic. *Equine Veterinary Journal*. 2020.
- Stewart HL, Southwood LL, Indugu N, Vecchiarelli B, Engiles JB, Pitta D. Differences in the equine faecal microbiota between horses presenting to a tertiary referral hospital for colic compared to an elective surgical procedure. *Equine Veterinary Journal*. 2018. 10.1111/evj.13389.
- Studdert VP, Gay CC, Blood DC. *Saunders comprehensive veterinary dictionary*. 4. Aufl. Philadelphia: Saunders; 2012.
- Thatcher CD, Pleasant RS, Geor RJ, Elvinger F. Prevalence of overconditioning in mature horses in southwest Virginia during the summer. *J Vet Intern Med*. 2012;26(6):1413–8.
- Tims S, Derom C, Jonkers DM, Vlietinck R, Saris WH, Kleerebezem M, et al. Microbiota conservation and BMI signatures in adult monozygotic twins. *ISME J*. 2013;7(4):707–17.
- Tremaroli V, Karlsson F, Werling M, Ståhlman M, Kovatcheva-Datchary P, Olbers T, et al. Roux-en-Y Gastric Bypass and Vertical Banded Gastroplasty Induce Long-Term Changes on the Human Gut Microbiome Contributing to Fat Mass Regulation. *Cell Metab*. 2015;22(2):228–38.
- Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe*. 2008;3(4):213–23.
- Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009;457(7228):480–4.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444(7122):1027–31.

Venable EB, Kerley MS, Raub R. Assessment of equine fecal microbial profiles during and after a colic episode using pyrosequencing. *J Equine Vet Sci*. 2013;33(5):347–8.

Walters WA, Xu Z, Knight R. Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. *FEBS Lett*. 2014;588(22):4223–33.

Warzecha CM, Coverdale JA, Janecka JE, Leatherwood JL, Pinchak WE, Wickersham TA, et al. Influence of short-term dietary starch inclusion on the equine cecal microbiome. *J Anim Sci*. 2017;95(11):5077–90.

Weems LN. Identifying differences in the Gut Microbiome of Easy and Hard Keeper Horses [Bachelorarbeit]. Delaware: University of Delaware; 2018.

Weese JS. The equine intestinal Microbiota. In: Blikslager AT, Moore JN, White NA, Mair TS, Hrsg. *The equine acute abdomen*. 3. Aufl. Hoboken: John Wiley & Sons Inc; 2017. p. 58–65.

Weese JS, Holcombe SJ, Embertson RM, Kurtz KA, Roessner HA, Jalali M et al. Changes in the faecal microbiota of mares precede the development of post partum colic. *Equine Vet J*. 2015;47(6):641–9.

Wylie CE, Collins SN, Verheyen KLP, Newton JR. Risk factors for equine laminitis: A case-control study conducted in veterinary-registered horses and ponies in Great Britain between 2009 and 2011. *Vet J*. 2013;198(1):57–69.

Xiao L, Sonne SB, Feng Q, Chen N, Xia Z, Li X, et al. High-fat feeding rather than obesity drives taxonomical and functional changes in the gut microbiota in mice. *Microbiome*. 2017;5(1):43. 10.1186/s40168-017-0258-6.

Xu P, Li M, Zhang J, Zhang T. Correlation of intestinal microbiota with overweight and obesity in Kazakh school children. *BMC Microbiol*. 2012;12:283. 10.1186/s40168-017-0258-6.

8 Danksagung

Die Durchführung eines so umfangreichen Projektes ist natürlich nicht die Arbeit eines einzelnen und so möchte ich hier die Gelegenheit nutzen meinen Mitstreitern zu danken, durch die meine Doktorarbeit überhaupt erst möglich wurde.

Als erstes möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Prof. Dr. Ingrid Vervuert dafür bedanken, dass sie mir die Bearbeitung dieses Themas zugetraut hat und mich in den letzten Jahren bestens betreute. Sie hatte immer ein offenes Ohr für verschiedenste Fragen und Probleme, die schnell und unkompliziert gelöst wurden. Dabei arbeitete sie auch noch an Wochenenden und Feiertagen, um auch eine schnelle Korrektur unserer Arbeiten zu ermöglichen. Vielen Dank für die umfassende Unterstützung.

Außerdem gilt mein Dank meinen ehemaligen Mitdoktoranden Dr. Dominique Blau und Dr. Carola Schedlbauer, die mit den Probennahmen für dieses Projekt schon begannen, als ich noch nicht ahnte, dass ich jemals ein Teil davon werden würde. Vielen Dank, dass ich einige der von euch gesammelten Daten und Proben mit für meine Arbeit verwenden durfte. Ohne euren großen Einsatz für diesen Versuch hätte es auch mein Projekt nie gegeben.

Des Weiteren haben mich Frau Prof. Veronique Julliard und ihr Team an der AgroSup in Dijon, vor allem Emmanuel Jacotot, Marie-Claire De Vos Franzin und Dr. Pauline Grimm, unterstützt. Vielen Dank für eure Ratschläge und eure große Hilfe bei der Analyse meiner Proben und der Auswertung der gewonnenen Daten.

Vielen Dank auch an unsere vierbeinigen Probanden, die auch mich als nicht ganz so pferdeaffinen Menschen tapfer ertragen haben und fleißig Kot für meinen Versuch spendeten. Da so viele Pferde und Ponys auch viel Arbeit machen möchte ich auch unseren Tierpflegern Sabine Klemann und Michael Wacker, meiner Kollegin Dr. Janine Starzonek und zahlreichen studentischen Hilfskräften und Praktikanten für ihre Unterstützung bei der Versorgung der Tiere danken.

Des Weiteren gilt mein Dank der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die unser Projekt finanziert hat, und dem Albrecht-Daniel-Thaer-Institut e.V., über das zu Beginn meiner Arbeit meine Anstellung lief. Außerdem möchte ich mich bei der Akademie für Tiergesundheit bedanken, die es mir durch ein Stipendium ermöglicht hat, die Ergebnisse meiner Arbeit auf der ESVCN 2019 in Turin vorzustellen.

Ferner gilt mein Dank meinen lieben derzeitigen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Tierernährung, die mir jederzeit mit Ratschlägen zu technischen Problemen, Formularen und fachlichen Inhalten zur Seite standen.

Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Ehemann bedanken, die mir durch ihre Hilfe bei der Kinderbetreuung den Rücken freigehalten haben, damit ich diese Arbeit finalisieren konnte. Vielen Dank, dass ihr immer für mich da wart und mich motiviert und unterstützt habt.

