

**Effect van rantsoen en  
antibioticagebruik op het  
microbioom in de mest (feces)  
van biologische en gangbare  
melkveebedrijven**

Maaïke van Agtmaal, Martine Bruinenberg,  
Nick van Eekeren

© 2024 Louis Bolk Instituut

Effect van rantsoen en antibioticagebruik op het microbioom in de mest (feces) van biologische en gangbare melkveebedrijven

Maike van Agtmaal, Martine Bruinenberg, Nick van Eekeren

37 pagina's

Publicatienummer: 2024-6175-LbD

Deze publicatie is beschikbaar via  
[www.louisbolk.nl/publicaties](http://www.louisbolk.nl/publicaties)

[www.louisbolk.nl](http://www.louisbolk.nl)

[info@louisbolk.nl](mailto:info@louisbolk.nl)

T 0343 523 860

Kosterijland 3-5

3981 AJ Bunnik

✕ @LouisBolk

## Voorwoord

In de biologische melkveehouderij wijkt het gevoerde rantsoen, de hoeveelheid weidegang, de huisvesting, het gebruik van antibiotica en het aantal koeien per hectare veelal af van de gangbare bedrijfsvoering. De samenstelling van het microleven, de bacteriën en de schimmels, die in de koe leven wordt beïnvloed door verschillende factoren zoals omgeving, gebruik van medicatie en voeding. De centrale vraag in dit onderzoek was of het verschil in bedrijfsvoering tussen biologisch en gangbaar ook reflecteert in de samenstelling van het microbioom in de mest (feces) van de koe. Om hier inzicht in te krijgen zijn er verschillende aspecten onderzocht:

Allereerst is onderzocht of er een effect te zien is van het type bedrijfsvoering (gangbaar versus biologisch) op het microbioom van de mest. Daarnaast zijn ook de mogelijk onderliggende factoren onder de loep genomen om verder te kunnen uitdiepen wat verschillen in het microbioom zou kunnen veroorzaken. Hierin stonden de volgende vragen centraal:

- Is er een effect van rantsoen op het microbioom van gangbaar en biologisch gehouden koeien?
- is er een effect van antibioticagebruik op het microbioom van gangbaar en biologisch gehouden koeien?

In dit rapport worden de resultaten uit dit onderzoek beschreven en vergeleken met wat er bekend is uit de literatuur. Veel dank aan alle veehouders die hebben meegewerkt aan dit onderzoek en aan Ruth Schmidt voor de ondersteuning bij de bioinformatica en analyse van de resultaten. Het onderzoek is gefinancierd door de IONA-stichting.



## Samenvatting

In de Nederlandse melkveesector wordt slechts een klein aandeel van de koeien biologisch gehouden. De bedrijfsvoering verschilt op verschillende aspecten van de gangbare veehouderij en is extensiever. De externe omgeving van de koe verschilt door verschil in huisvesting en verplichte weidegang. In de teelt van ruw- en krachtvoer worden geen chemische gewasbeschermingsmiddelen en kunstmest gebruikt. Naast externe omgevingsfactoren is er ook een verschil tussen biologische en gangbare melkveehouderij in wat de koe binnenkrijgt: zo verschilt het rantsoen tussen beide bedrijfssystemen en wordt in de biologische veehouderij niet preventief, maar enkel curatief antibiotica gebruikt. Alle genoemde verschillen in bedrijfsvoering kunnen leiden tot verschillen in het microbioom van de koe.

Het microbioom van de koe kan dus zowel door wat de koe binnenkrijgt als door zijn leefomgeving worden beïnvloed. De eerste vraag in dit onderzoek is of het verschil in bedrijfssysteem meetbaar is in het darmmicrobiom van de koe. De vervolgvraag is welke factoren de mogelijke verschillen in microbiële samenstelling in de mest (feces), als proxy voor darmmicrobiom, van koeien tussen biologisch en gangbare bedrijfssystemen kunnen verklaren.

Een mogelijke verklaring voor verschillen in het microbiom is het verschil in antibioticagebruik. Uit onderzoek blijkt dat het effect van een antibioticabehandeling tot ruim een maand in het microbiom meetbaar is. Ook het rantsoen heeft een belangrijke invloed op het microbiom in de koe, dit betekent dat rantsoenverschillen mogelijk meetbaar zijn in de darmmicrobiota.

Om te onderzoeken of het microbiom van biologisch en gangbare koeien van elkaar verschilt en of rantsoen en antibioticagebruik hier verklarende factoren voor zijn is er een onderzoek opgezet waarin mest van 16 verschillende bedrijven werd verzameld. De helft van deze bedrijven was biologisch, de andere helft gangbaar. Tevens werd op de helft van de bedrijven, verdeeld over biologisch en gangbaar, een hoog aandeel mais in het rantsoen gevoerd en werd bij de andere helft een hoog aandeel gras gevoerd. Op elk bedrijf werd de mest van 4 koeien bemonsterd die geen antibiotica hadden gekregen en 0-4 koeien die wel recentelijk een behandeling hadden gehad.

Uit de mest van al deze koeien werd een profiel gemaakt van de gevonden micro-organismen en geanalyseerd welke factoren invloed hadden op de structuur van de populatie. Ondanks grote variatie was er een duidelijk meetbaar verschil tussen biologisch en gangbaar gehouden koeien in het mestmicrobiom. Dit verschil is eerder gevonden, o.a. in het onderzoek van Gomes en co-auteurs (2020). Desondanks is het bijzonder, het betekent dat hoewel het microbiom van stal tot stal en zelfs van dier tot dier sterk kan verschillen, er toch een duidelijk effect van het bedrijfssysteem meetbaar was in het microbiom. Er was één bacteriefamilie, de Succinivibrionaceae, die zowel in de hier gepresenteerde studie en in het onderzoek van Gomes en co-auteurs naar voren kwam als significant verschillend tussen beide bedrijfssystemen, deze

bacteriefamilie was significant minder aanwezig in mest van biologisch gehouden koeien. In de schimmelpopulatie van het hier gepresenteerde onderzoek was het schimmelgenus *Hypopichia* totaal afwezig in gangbare mestmonsters, in biologische mestmonsters was juist het schimmelgenus *Cyberindnara* afwezig.

Naast bedrijfssysteem is ook gekeken wat het effect is van rantsoen en antibioticagebruik op het microbiom. We vonden inderdaad dat het rantsoen een duidelijk effect heeft op het microbiom. Ook het gebruik van antibiotica, en dan met name oxytetracycline had een sterk effect op het microbiom, vooral op de *Clostridium*bacteriën.

De hier gepresenteerde studie heeft geprobeerd een volgende stap te zetten en het verschil tussen de twee soorten veehouderij te linken aan een tweetal factoren die verschillen tussen biologisch en gangbaar gehouden koeien, namelijk rantsoen en antibioticagebruik. Door te kijken naar het interactie-effect is er bepaald of het microbiom van het ene bedrijfssysteem (bio vs gangbaar) anders reageert op de factoren rantsoen of antibiotica. Dit was inderdaad zo, het bacteriemicrobiom van biologisch gehouden koeien reageerde anders op mais in het rantsoen dan gangbaar gehouden koeien. Bij antibioticagebruik was er naast een overall-effect ook een effect afhankelijk van het bedrijfssysteem. We konden echter de gemeten verschillen in het microbiom niet alleen verklaren vanuit bedrijfssysteem, rantsoen of antibioticagebruik. Dit betekent dat er andere factoren (ook) een rol spelen die het verschil in microbiom bepalen.

Op basis van het hier gepresenteerde onderzoek is het moeilijk de resultaten volledig te duiden en aanbevelingen te doen omtrent een gezonder en diverser microbiom. Maar de ontwikkelingen in het onderzoek naar het microbiom gaan snel. Het is veelbelovend dat de focus in het microbiom onderzoek langzaam verschuift van identificatie van de aanwezige microben naar een bredere kijk: niet alleen het kijken naar wie er aanwezig is, maar ook naar activiteit, functie en mogelijke mechanismen en interacties met het organisme waarin ze leven. Deze ontwikkelingen zullen het in de toekomst mogelijk maken de rol van microben op gezondheid en welzijn van melkvee en het productieproces beter te begrijpen en te duiden.

# Inhoud

<b>1</b>	<b>Introductie</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b> Materiaal en methoden</b>	<b>9</b>
2.1	Selectie van bedrijven	9
2.2	Verzamelen van de mestmonsters	9
2.3	DNA extractie, library preparation en sequencing	9
2.4	Bioinformatica, kwaliteitsanalyse en filteren van ruis	10
2.5	Data-analyse/statistiek	11
<b>3</b>	<b> Resultaten</b>	<b>12</b>
3.1	Bacteriën	12
3.1.1	<i>Effect van bedrijfssysteem: biologisch versus gangbaar</i>	12
3.1.2	<i>Effect van rantsoen: met en zonder mais</i>	15
3.1.3	<i>Effect van antibiotica</i>	16
3.1.4	<i>Interactie-effecten</i>	17
3.2	Eukaryoten, schimmels en protisten	18
3.2.1	<i>Effect bedrijfssysteem: biologisch versus gangbaar</i>	18
3.2.2	<i>Effect van rantsoen: met en zonder mais</i>	20
3.2.3	<i>Effect van antibiotica: met en zonder antibiotica</i>	21
3.2.4	<i>Interactie-effecten</i>	22
<b>4</b>	<b> Conclusie en Discussie</b>	<b>23</b>
4.1	Algemeen	23
4.2	Onderzoeksopzet	24
4.3	Bacteriën	24
4.3.1	<i>Effecten van bedrijfstype</i>	24
4.3.2	<i>Effecten van het rantsoen</i>	25
4.3.3	<i>Effect van antibiotica</i>	26
4.4	Eukaryoten, schimmels en protozoa	26
4.4.1	<i>Effecten van bedrijfstype</i>	27
4.4.2	<i>Effecten van het rantsoen</i>	28
4.4.3	<i>Effecten van antibiotica</i>	28
4.5	Synthese	28
	<b>Referenties</b>	<b>30</b>
	<b>Supplement</b>	<b>32</b>

# 1 Introductie

Minder dan 3% van de Nederlandse koeien wordt biologisch gehouden. De biologische bedrijfsvoering verschilt op verschillende manieren van de gangbare veehouderij. Zo gebruiken ze geen kunstmest en chemische gewasbeschermingsmiddelen, zijn er verschillen in huisvestingseisen en het gebruik van antibiotica, is weidegang verplicht, wordt er gemiddeld genomen minder mais en krachtvoer gevoerd, en zijn de biologische bedrijven extensiever (gebruiken ze meer land per koe).

De verschillen in bedrijfsvoering kunnen leiden tot verschillen in het microbiële leven (= microbiom) aanwezig op een bedrijf. In verschillende studies is ook aan het licht gekomen dat dit microbiom tussen biologische en gangbare bedrijven verschilt. Zo werden door Pershina et al. (2018) verschillen gevonden in de bodemmicrobiota van bouwland tussen gangbaar en biologisch landgebruik in een langjarige studie. Ook in melk werden verschillen gevonden tussen gangbaar en biologisch; in de studie van Coorevits et al. (2008) verschilde het totaal aantal bacteriën in de melk nauwelijks, maar waren er wel duidelijke verschillen in welke microben er aanwezig waren in de melk tussen de beide systemen.

In een voorgaande studie van Gomes et al. (2020) werd daarom de hele kringloop op een melkveebedrijf onder de loep genomen. De hoofdvraag van die studie was of het bedrijfssysteem het microbiom van de hele kringloop beïnvloedt en of er een microbiële transfer is van het ene deel van de cyclus in de volgende. Van 10 biologische bedrijven, gepaard met 10 gangbare buurtbedrijven, werden van de vier onderdelen van de kringloop de microbiële samenstelling onderzocht: de bodem, de graskuil, de mest en de melk. In de resultaten van die studie waren geen duidelijke effecten van een microbiële transfer zichtbaar, wel was er een duidelijk significant effect van het bedrijfssysteem (biologisch versus gangbaar) op de gevonden microbiota in de mest en in de melk.

De resultaten van het onderzoek van Gomes et al. (2020) zijn de aanleiding voor dit onderzoek. De vraag voor onderliggende onderzoek was dan ook: wat kan nu het verschil in microbiële samenstelling in de mest (feces) van koeien op biologische en gangbare bedrijven verklaren? Een mogelijke verklaring is het verschil in gebruik van antibiotica. In de studie van Holman et al. (2019) werden er tot 34 dagen na antibioticagebruik nog effecten van gemeten op het microbiom. Als mogelijke andere verklaring werd het verschil in rantsoen (o.a. aandeel mais en krachtvoer) tussen gangbaar en biologisch aangedragen. Eerdere studies hebben al effecten van rantsoen op de samenstelling van de mestmicrobiota aangetoond (Hagey et al., 2019). Indirect, via het voer, zou het gebruik van kunstmest en gewasbeschermingsmiddelen de samenstelling van het microbiële leven kunnen hebben beïnvloed, dit wordt echter in deze studie niet meegenomen.

Om te bevestigen dat er duidelijke verschillen zijn in het microbioom van de mest van biologisch en gangbaar gehouden koeien en om verder te kunnen inzoomen op de mogelijk verklarende factoren van deze verschillen werd er een vervolgonderzoek opgestart. Doel van dit onderzoek was om te kijken of:

- er verschil is tussen het microbioom in de mest van gangbaar en biologisch gehouden koeien;
- verschillen in rantsoen een verschil geven in het microbioom in de mest;
- er een verschil is in het microbioom van de mest tussen koeien die wel en geen antibiotica hebben gekregen;
- er interacties zijn tussen deze verschillende factoren.



## **2 Materiaal en methoden**

### **2.1 Selectie van bedrijven**

Om de effecten van bedrijfssysteem, rantsoen en antibiotica op het microbioom in de mest te onderzoeken werden er 16 melkveebedrijven geselecteerd, waarbij met name geselecteerd werd op bedrijfssysteem (biologisch of gangbaar) en op rantsoen (wel of geen snijmais in het rantsoen). Acht bedrijven waren biologisch en acht bedrijven waren gangbaar. Binnen beide groepen maakte dan weer de helft gebruik van snijmaiskuil in het rantsoen, en de andere helft gebruikte met name graskuil als ruwvoer. Omdat de monsters in de winter genomen waren, had geen van de veehouders vers gras in het rantsoen.

Om het effect van het behandelen met antibiotica op het microbioom van de koe te testen, werden op elk deelnemend bedrijf vier koeien geselecteerd die in de voorgaande maanden geen antibiotica hadden gekregen en, afhankelijk van het antibioticagebruik per bedrijf, 0-4 koeien die wel antibiotica hadden gekregen. Twee bedrijven waren antibioticavrij, en gebruiken dan ook nooit antibiotica. Op deze bedrijven zijn alleen vier antibioticavrije monsters genomen. Enkele bedrijven hadden geen vier koeien die antibiotica hadden gehad, ondanks het vrij laten van het moment van antibioticatoediening. Op deze bedrijven werden minder monsters genomen.

### **2.2 Verzamelen van de mestmonsters**

Mestmonsters van de geselecteerde koeien werden verzameld tijdens de defecatie in een gesteriliseerde emmer. Er werden direct monsters van 50 ml van de mest genomen, welke in steriele 50 ml buisjes (greiner) werd gedeponereerd en koud werd bewaard (maximaal 8°C) tijdens het transport gedurende maximaal 8 uur. De monsters werden direct bij aankomst in het laboratorium verwerkt. Per mestmonster werden twee submonsters van 2,5 gram genomen en meteen gemixt met 2,5 ml DNA/RNA shield buffer (Zymo Research, Irvine, CA) om het DNA te preserven. Vervolgens werden de buisjes ingevroren op -20°C, nog op de dag van de monsternamen.

### **2.3 DNA extractie, library preparation en sequencing**

De extractie van het DNA werd uitbesteed aan Eurofins Genomics (Eurofins Genomics Europe Sequencing, Constance, Duitsland) volgens de volgende procedure: het totaal aan genetisch materiaal uit de microbiële cellen werd geëxtraheerd uit de mest met de DNeasy PowerSoil Pro kit (Qiagen artikel nummer 47016) volgens het protocol van de fabrikant. De monsters werden na DNA-extractie opgewerkt om gesequencet te kunnen worden. Hierin werden de standaard protocollen (PCR, clean-up, library preparation) van Eurofins Genomics (Eurofins Genomics Europe Sequencing, Constance, Duitsland) gevolgd. Tijdens de library preparation werden er ook unieke barcodes per sample toegevoegd. De gekozen targetregio voor bacterie sequencing was

de V3-V4-regio van het rRNA-gen, voor schimmels was de targetregio het ITS2-gen. Dit zijn stukken DNA met een zeer conservatief stuk waar de primer kan binden en die voor alle schimmel- of bacteriesoorten identiek is, maar wat ook een zeer variabel stuk heeft die voor alle soorten anders is. Deze eigenschappen kunnen gebruik worden voor de identificatie. De sequencing werd uitgevoerd met een Technology Illumina MiSeq Personal Sequencer.

## **2.4 Bioinformatica, kwaliteitsanalyse en filteren van ruis**

Nadat de output van ruwe data van het sequencen beschikbaar is gekomen zijn er een aantal stappen gezet. Hieronder een samenvatting van de stappen.

### 1) Sequenties aan elkaar plakken

De gebruikte methode was pair-end sequencing. Dit houdt in dat de hele genetische code in twee delen wordt afgelezen in plaats van in één keer. Het voordeel hiervan was dat er heel veel genetische codes kunnen worden afgelezen, maar het nadeel was dat de genetische codes met computerberekeningen gecompleteerd moeten worden. Van het gekozen stuk ribosomaal DNA werd zowel van het begin van de streng (voorwaarts) de genetische code afgelezen tot iets voorbij de helft en daarnaast werd er ook vanaf het einde van het gewenste stuk (achterwaarts) tot aan iets voorbij de helft afgelezen. Doordat beide codes tot voorbij de helft gelezen werden was er een overlap. Om de gelezen sequenties per microbesoort compleet te maken werden deze overlappende delen met computerberekeningen aan elkaar gekoppeld.

### 2) Sequenties koppelen aan microbe soorten

De volgende stap, die ook met behulp van computerberekeningen werd gedaan, was het koppelen van de gelezen sequenties aan bacterie- en schimmelsoorten. De afgelezen sequenties werden vervolgens vergeleken met een grote database waarin alle bekende bacterie en schimmelsoorten staan en zo op naam gebracht. Vervolgens werd geteld hoe vaak deze soort / dit genus / deze familie voorkwam. Van niet alle bacteriën en schimmels was er veel informatie beschikbaar, daarom konden niet alle sequenties volledig op naam gebracht worden maar bijvoorbeeld wel op familieniveau ingedeeld worden.

### 3) Filteren ruis

Om de foutieve signalen uit de dataset te filteren werden er verschillende stappen ondernomen. Zo werden alle sequenties die maar een keer voorkwamen, de zogenaamde singletons, uit de dataset verwijderd omdat de kans groot is dat deze vals positief zijn. Ook alle sequenties die niet aan een bacterie- of schimmelfylum verbonden konden worden werden verwijderd uit de dataset.

## 2.5 Data-analyse/statistiek

Alle statische analyses en figuren zijn gemaakt in RStudio versie 2022.02.3 door R-versie 4.1.2 te runnen. Bacterie- (16S) en schimmeldata (ITS) werden geanalyseerd met phyloseq package versie 1.38.0 (McMurdie and Holmes 2013) en microbiome package versie 1.14.0 (Lahti, Shetty, and Blake 2017). De Shannon diversity index en de Inverse Simpson index matrices (maten voor diversiteit en de verdeling van de gevonden sequenties) werden berekend met de *estimate\_richness* function van phyloseq package versie 1.38.0.

De top 20 van de bacterie- en schimmelfyla, -families en -genera werd uit de complete dataset geëxtraheerd met de *taxa\_sums* functie van phyloseq package versie 1.38.0. Drieweg repeated measures ANOVA-analyses werden uitgevoerd voor deze top 20 fyla, families en genera met als factoren bedrijfssysteem, rantsoen en antibioticagebruik met de functie *aov* van het stats package versie 4.1.2.

### 3 Resultaten

De resultaten worden apart besproken voor bacteriën en eukaryoten (schimmels en protisten). Per groep wordt ingegaan op algemene resultaten, effect bedrijfssysteem, effect rantsoen, effect antibioticagebruik en interactie tussen de verschillende factoren. Er wordt gekeken naar effecten op fyllum, familie en genera.

#### 3.1 Bacteriën

In totaal werden gemiddeld 11.524 sequenties gevonden per monster, die toe te schrijven zijn aan 2163 verschillende OTU's (OTU staat voor Operational Taxonomic Unit, een proxy voor soort). Binnen deze dataset was er veel variatie, doordat het microbioom in de mest van veel (112) verschillende koeien is bekeken, van 16 verschillende bedrijven. Door de variatie laat de PCA-analyse (zie Supplement S1) ook geen duidelijk onderscheid zien tussen biologische en gangbare bedrijven in het patroon van de totale bacteriële gemeenschap.

##### 3.1.1 Effect van bedrijfssysteem: biologisch versus gangbaar

Een vergelijking van de OTU's in het bacteriemicrobiom in de verschillende mestmonsters liet op verschillende taxonomische niveaus verschillen zien tussen gangbaar en biologisch gehouden koeien. Op het hoogst taxonomische niveau, fyllum, werden in de monsters zeven verschillende stammen/fyla gevonden, waarvan de Firmicuten het meest aanwezig waren, gevolgd door de Bacteroidetes (Tabel 1; Supplement Figuur S2). Op fylumniveau verschilde het microbiom tussen gangbaar en biologisch gehouden koeien significant van elkaar (Tabel 1): het aandeel Actinobacteria, Bacteroidetes en Spirochaetes waren significant hoger in mest van biologisch gehouden koeien, de Fibrobacteres waren hoger in de mest van gangbaar gehouden koeien.

Tabel 1: ANOVA-resultaten van de bacteriegemeenschap op fylumniveau. Significante resultaten zijn dik gedrukt.

Fyllum	bedrijfs-systeem	rantsoen	antibiotica	bedrijfssysteem: rantsoen	bedrijfssysteem: antibiotica	rantsoen: antibiotica
Actinobacteria	<b>0.01</b>	0.07	0.53	<b>0.01</b>	0.81	0.56
Bacteroidetes	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>	<b>0.03</b>	<b>0</b>	0.77	0.72
Fibrobacteres	<b>0.01</b>	0.84	0.57	<b>0</b>	0.65	0.81
Firmicutes	0.06	0.61	<b>0</b>	<b>0.02</b>	0.68	0.79
Proteobacteria	0.44	<b>0</b>	<b>0</b>	0.39	0.5	0.82
Spirochaetes	<b>0.01</b>	<b>0.02</b>	<b>0.04</b>	<b>0.04</b>	0.97	0.87
Tenericutes	0.63	1	0.06	0.67	0.43	0.31

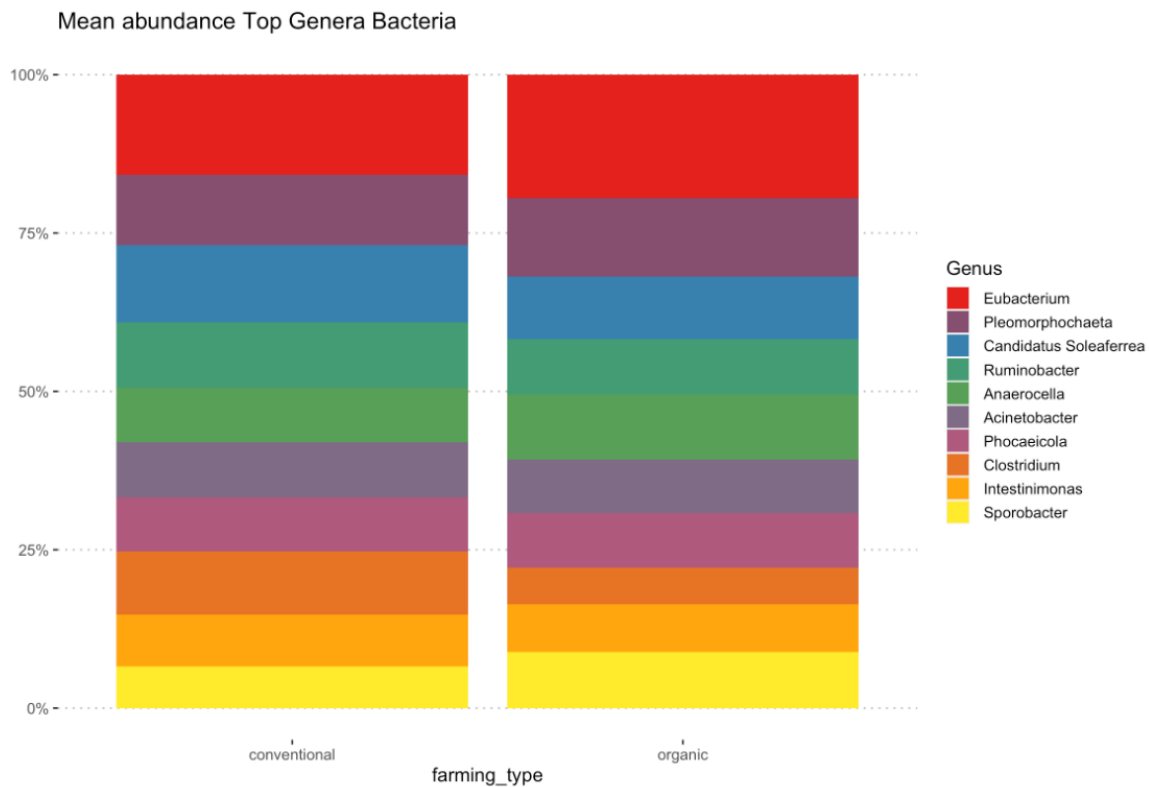
Om te achterhalen welke microben nu de grootse verschuivingen gaven, werd in de volgende stap van de analyse ingezoomd en op familieniveau naar het microbiom gekeken. Van de 20 meest voorkomende bacteriefamilies in de mest van koeien (representatief voor meer dan 20% van het totaal microbiom) waren Atopobiaceae, Oscillospiraceae en Rikenellaceae significant

meer aanwezig in mest van biologisch gehouden koeien (Tabel 2), Bacteroidaceae, Erysipelotrichaceae, Hungateiclostridiaceae en Succinivibrionaceae waren juist significant lager in de mest van biologisch gehouden koeien.

Als laatste stap werd er nog verder ingezoomd en gekeken op genusniveau. Uit de top 20 van meest voorkomende genera waren Bacteroides, Phocaeicola en Ruminobacter, significant lager in de mest van biologisch gehouden koeien (Tabel 3), Alistipes, Oscillibacter en Pseudoflavonifractor waren significant meer aanwezig in mest van biologisch gehouden koeien.

Tabel 2: ANOVA-resultaten van de bacteriegemeenschap op familieniveau. Significante resultaten zijn dik gedrukt.

Familie	bedrijfssysteem	rantsoen	antibiotica	bedrijfssysteem: rantsoen	bedrijfssysteem: antibiotica	rantsoen: antibiotica
Atopobiaceae	<b>0.01</b>	<b>0.04</b>	0.15	0.13	0.77	0.37
Bacteroidaceae	<b>0.01</b>	0.79	<b>0.01</b>	0.91	0.33	0.86
Christensenellaceae	0.39	0.17	<b>0</b>	0.14	0.4	0.29
Clostridiaceae	0.31	0.57	<b>0.01</b>	0.19	0.5	0.86
Desulfovibrionaceae	0.52	<b>0.03</b>	<b>0</b>	0.98	0.23	<b>0</b>
Erysipelotrichaceae	<b>0.05</b>	0.27	0.34	0.8	0.57	0.82
Eubacteriaceae	0.33	<b>0</b>	0.73	<b>0</b>	0.92	0.05
Hungateiclostridiaceae	<b>0</b>	0.14	0.13	0.61	0.08	<b>0.02</b>
Lachnospiraceae	0.55	0.68	0.22	0.14	0.47	0.72
Moraxellaceae	0.22	<b>0</b>	0.55	<b>0.01</b>	0.96	0.8
Muribaculaceae	0.45	<b>0.03</b>	<b>0.02</b>	0.93	0.36	0.61
Oscillospiraceae	<b>0.05</b>	0.52	0.54	0.59	<b>0.02</b>	0.6
Paludibacteraceae	0.59	0.6	0.45	0.36	0.16	0.89
Peptococcaceae	0.12	0.82	<b>0.02</b>	0.48	0.16	0.99
Peptostreptococcaceae	0.21	0.16	0.35	0.48	0.63	0.19
Prevotellaceae	0.56	<b>0</b>	0.32	0.38	0.07	0.68
Rikenellaceae	<b>0</b>	0.1	<b>0.02</b>	0.05	0.94	0.32
Ruminococcaceae	<b>0.01</b>	0.79	0.53	<b>0</b>	0.92	0.42
Spirochaetaceae	0.11	0.1	<b>0</b>	0.61	0.24	0.57
Succinivibrionaceae	<b>0.01</b>	0.41	<b>0.02</b>	0.09	0.52	0.24



Figuur 1: Het gemiddelde bacteriemicrobioom op genusniveau gesplitst naar bedrijfssysteem.

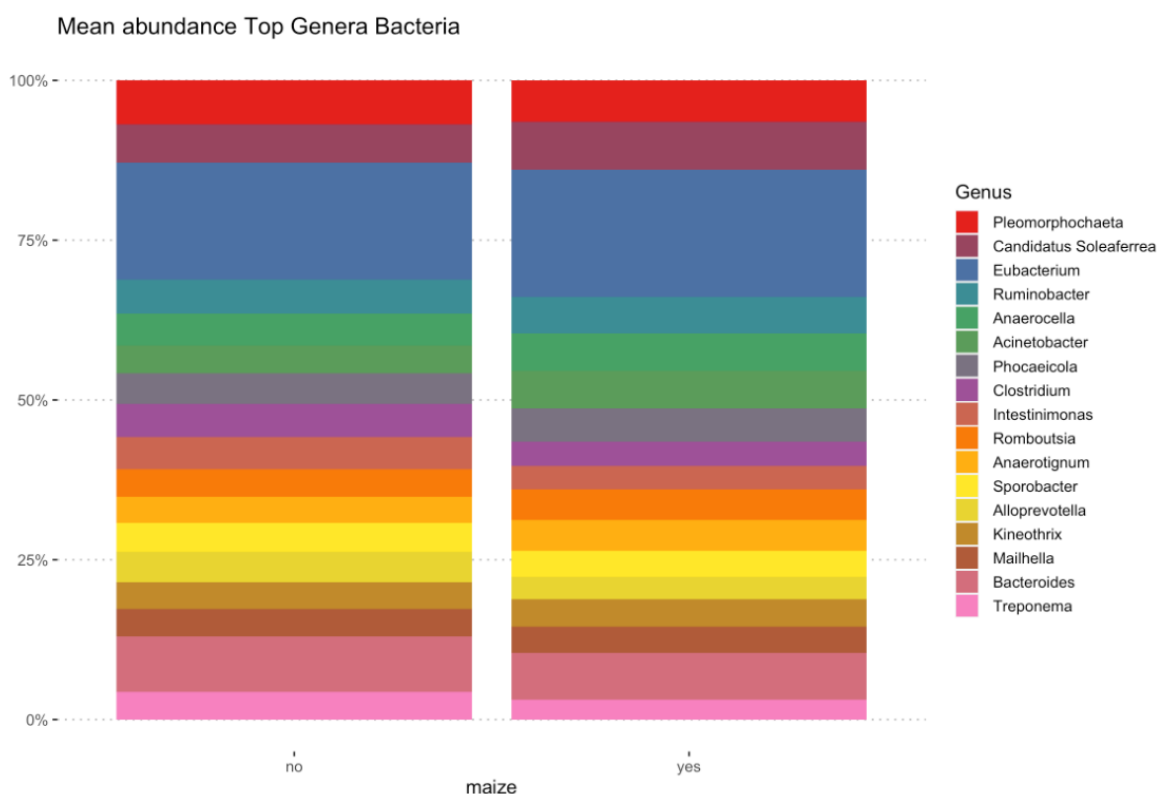
Tabel 3: ANOVA-resultaten van de bacteriegemeenschap op genusniveau. Significante resultaten zijn dik gedrukt.

Genus	bedrijfssysteem rantsoen		antibiotica		bedrijfssysteem: rantsoen	bedrijfssysteem: antibiotica	rantsoen: antibiotica
Acinetobacter	0.22	<b>0</b>	0.55	<b>0.01</b>	0.96	0.8	
Alistipes	<b>0</b>	<b>0.03</b>	<b>0.02</b>	0.17	0.66	0.62	
Alloprevotella	0.76	<b>0</b>	0.35	0.91	0.23	0.64	
Anaerocella	0.31	0.89	0.41	0.08	0.6	0.23	
Bacteroides	<b>0.01</b>	0.79	<b>0.01</b>	0.91	0.33	0.86	
Candidatus Soleaferrea	0.63	0.65	0.43	0.28	0.05	0.75	
Clostridium	0.31	0.57	<b>0.01</b>	0.19	0.5	0.86	
Eubacterium	0.84	<b>0</b>	0.87	<b>0</b>	0.5	0.07	
Intestinimonas	0.37	0.36	0.32	0.44	<b>0.01</b>	0.68	
Kineothrix	0.07	0.41	0.28	0.08	0.52	0.8	
Mailhella	0.52	<b>0.03</b>	<b>0</b>	0.98	0.23	<b>0</b>	
Negativibacillus	0.1	<b>0.04</b>	0.2	0.93	0.97	0.23	
Oscillibacter	<b>0.05</b>	0.52	0.54	0.59	<b>0.02</b>	0.6	
Paludibacter	0.59	0.6	0.45	0.36	0.16	0.89	
Phocaeicola	<b>0.02</b>	0.26	0.35	0.68	0.95	0.84	
Pleomorphochaeta	0.33	0.51	0.29	0.44	0.56	0.41	
Pseudoflavonifractor	<b>0</b>	<b>0</b>	0.11	<b>0</b>	0.16	0.95	
Ruminobacter	<b>0</b>	0.19	<b>0.01</b>	<b>0.03</b>	0.18	0.29	
Sporobacter	0.86	0.83	0.59	0.05	0.51	0.71	
Treponema	0.17	0.13	<b>0</b>	0.82	0.12	0.79	

### 3.1.2 Effect van rantsoen: met en zonder mais

Om naar het effect van het rantsoen te kijken werd op elk deelnemend bedrijf het rantsoen opgevraagd. Vervolgens werden de bedrijven in twee categorieën onderverdeeld: een rantsoen zonder of met weinig mais in het ruwvoer (maximaal 1,5 kg droge stof) en een rantsoen met veel mais in het ruwvoer (meer dan 4 kg droge stof). Het wel of geen mais voeren had op het hoogste taxonomische niveau op drie fyla een significant effect: Bacteroidetes, Proteobacteria, en Spirochaetes (Tabel 1, Figuur S3). De Proteobacteria waren juist meer aanwezig wanneer er mais werd gevoerd, de andere twee waren meer aanwezig in mest van koeien die geen mais in het ruwvoerrantsoen kregen.

Op (bacterie)familieniveau waren er een aantal families die significant relateerden aan het gegeven rantsoen: Atopobiaceae, Desulfovibrionaceae, Eubacteriaceae, Moraxellaceae, Muribaculaceae en Prevotellaceae. Deze laatste was hoger in een rantsoen zonder mais dan in het rantsoen met mais in het ruwvoer. De aanwezigheid van Eubacteriaceae, Moraxellaceae was lager in de rantsoenen zonder mais. Atopobiaceae, Desulfovibrionaceae en Muribaculaceae waren juist meer aanwezig in de rantsoenen zonder mais.



Figuur 2: Het gemiddelde microbioom op genusniveau gesplitst op rantsoen.

Op genusniveau bleken een aantal genera significant te verschillen tussen de verschillende rantsoenen: Alistipes, Mailhella, Eubacterium, Acinetobacter, Alloprevotella, Negativibacillus en

Pseudoflavonifractor, Mailhella, Pseudoflavonifractor, Alloprevotella en Alistipes waren hierbij hoger in een rantsoen zonder mais vergeleken met het rantsoen met mais in het ruwvoer, terwijl Eubacterium, Negativibacillus en Acinetobacter juist lager waren in de rantsoenen zonder mais. (Figuur 2, Tabel 2)

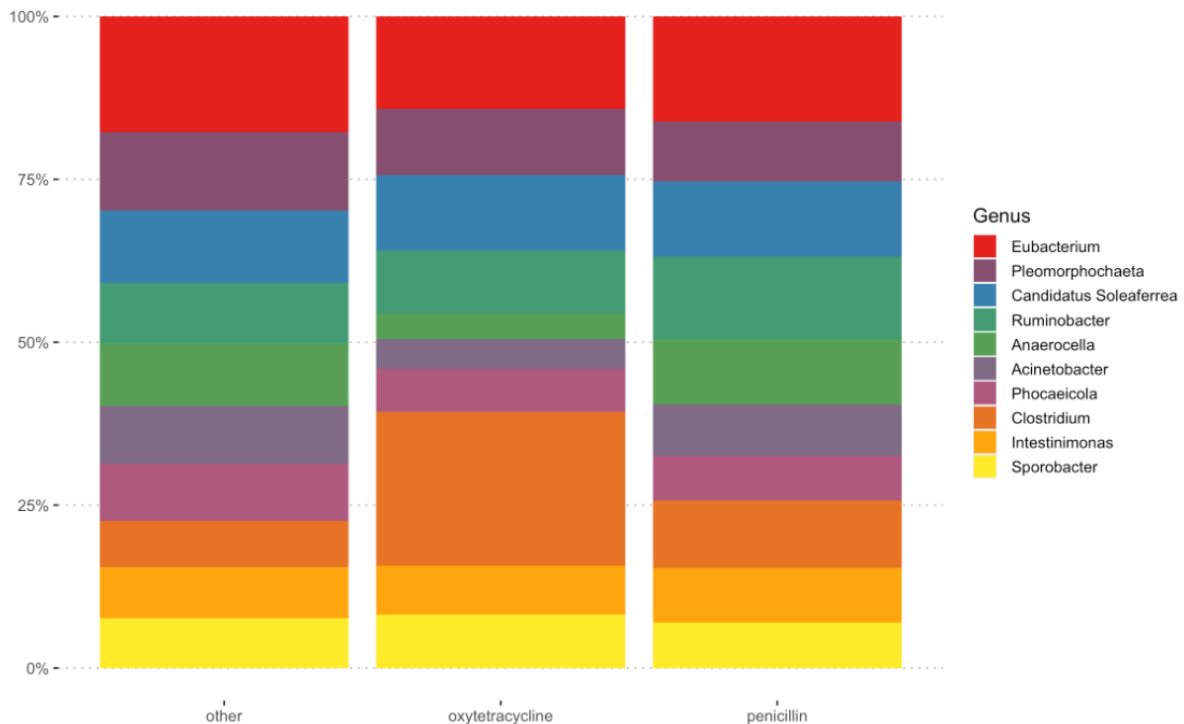
### 3.1.3 Effect van antibiotica

In de eerste analyse van de mest van dieren met en zonder antibiotica was er geen enkel effect van antibiotica zichtbaar. Hierbij werden echter alle mestmonsters van koeien die antibiotica kregen als vergelijkbaar in de dataset ingevoerd ongeacht het type antibioticum dat was toegediend en hoeveel tijd er verstreken was sinds de behandeling. Om het effect van antibiotica beter inzichtelijk te krijgen is een subselectie gemaakt van koeien die recentelijk, maximaal 30 dagen geleden, een antibioticabehandeling kregen. Deze selectie is onderbouwd met de bevindingen van Holman et al. (2019). In deze studie was het effect van antibioticabehandeling op het microbiom tot 34 dagen na de behandeling zichtbaar in het microbiom. Bovendien is er bij de subselectie specifiek gekeken naar de werkzame stoffen van de antibiotica. Daarin zijn twee groepen geselecteerd: oxytetracycline werkzaam tegen grampositieve bacteriën en antibiotica uit de penicillinefamilie werkzaam tegen gramnegatieve bacteriën.

Op de verschillende taxonomische niveaus waren er duidelijke verschillen te zien in de aanwezigheid van bacteriën tussen de onbehandelde en behandelde koeien alsook tussen de verschillende typen antibiotica. Met name de oxytetracycline liet een duidelijk ander microbiomprofiel zien vergeleken met onbehandelde koeien of met koeien die penicilline kregen. Op fylumniveau waren er vier fyta die significant verschilden bij de verschillende behandelingen (Tabel 1) Firmicutes, Proteobacteria en Spirochaetes waren significant meer aanwezig bij toediening van oxytetracycline in de maand voor monsternamen vergeleken met penicilline of geen antibiotica. Bacteroidetes daarentegen was minder aanwezig.

Op familieniveau bleken een aantal bacteriefamilies meer of minder aanwezig te zijn na een oxytetracyclinebehandeling. Met name het aantal Clostridiaceae en Muribaculaceae waren meer aanwezig na de behandeling met oxytetracycline, terwijl Desulfovibrionaceae en Rikenellaceae minder aanwezig waren. Ook de behandeling met penicilline was terug te zien in het microbiële profiel: het aantal Bacteroidaceae was lager en het aandeel Succinovibrionaceae hoger vergeleken met koeien die oxytetracycline of geen antibiotica kregen. De aanwezigheid van Christensenellaceae en Peptococcaceae was het hoogste in de oxytetracyclinebehandeling, gevolgd door de penicillinebehandeling en was het minste aanwezig in de onbehandelde koeien. Het aantal Spirochaetaceae was het hoogst in de oxytetracyclinebehandeling, hoger dan in de mest van de onbehandelde koeien. Het aantal Spirochaetaceae was het laagst in de mestmonsters van koeien die penicilline kregen.





Figuur 3: Het gemiddelde bacteriemicrobioom uitgesplitst op geen antibioticagebruik en gebruik van de antibioticafamilies oxytetracycline en penicilline.

Op genusniveau waren *Bacteroides* en *Clostridium* beide meer dominant in de behandeling met oxytetracycline. *Clostridium* had zelfs een zeer groot effect (zie Figuur 3 en Tabel 3). *Alistipes* en *Mailhella* waren minder aanwezig bij een recente behandeling (< 1 maand) met oxytetracycline. Penicilline bleek op genusniveau ook een effect te hebben op *Ruminobacter*. Deze was meer aanwezig na een penicillinebehandeling. Het genus *Treponema* was het hoogste in de oxytetracyclinebehandeling, gevolgd door de koeien zonder antibiotica en was het minste aanwezig in de penicillinebehandelde koeien.

### 3.1.4 Interactie-effecten

Naast de hoofdeffecten van de drie factoren bedrijfssysteem, rantsoen en antibioticagebruik waren er ook interactie-effecten. Het effect van het rantsoen op het microbiom van de gemeten koeien, was verschillend per bedrijfssysteem. Het bacteriemicrobioom van biologisch gehouden koeien reageerde dus anders op mais in het rantsoen dan gangbaar gehouden koeien. Met name de aanwezigheid van Actinobacteria, Bacteroidetes, Fibriobacters, Firmicutes, Proteobacteria en Spirochaetes verschilden significant in abundantie afhankelijk van het bedrijfssysteem. Op familieniveau waren er drie bacteriefamilies met een interactie-effect: Moraxellaceae, Eubacteriaceae en Ruminococcaceae. Op genusniveau verschilden *Acinetobacter*, *Eubacterium*, *Pseudoflavonifractor* en *Ruminobacter* significant in abundantie afhankelijk van het bedrijfssysteem.

Naast rantsoen-bedrijfssysteeminteracties, gaf ook het gebruik van antibiotica een effect dat afhankelijk bleek van het bedrijfssysteem. Dit gold bijvoorbeeld voor de familie Oscillospiraceae en de genera *Intestinimonas* en *Oscillibacter* (Tabel 1, Tabel 2, Tabel 3).

### 3.2 Eukaryoten, schimmels en protisten

In totaal werden er tussen de 240 en 11.667 sequenties gevonden per monster, met een gemiddelde van 2534. Er is binnen deze dataset heel veel variatie, doordat het microbioom in de mest van 112 verschillende koeien is bekeken op 16 bedrijven.

#### 3.2.1 Effect bedrijfssysteem: biologisch versus gangbaar

Van alle schimmelfyla waren de Ascomyceten het meest aanwezig. Ook de eencellige ciliaten waren veel aanwezig. Ondanks de duidelijke verschuiving van het gemiddelde eukaryotenprofiel op fylumniveau (meer Basidiomyceten en Ciliophora en minder Ascomyceten) was het verschil tussen biologisch en gangbaar niet significant. Dit komt door de zeer grote variatie tussen de monsters (Figuur S5, Tabel 4).

Tabel 4: ANOVA-resultaten van de schimmel gemeenschap op fylumniveau.

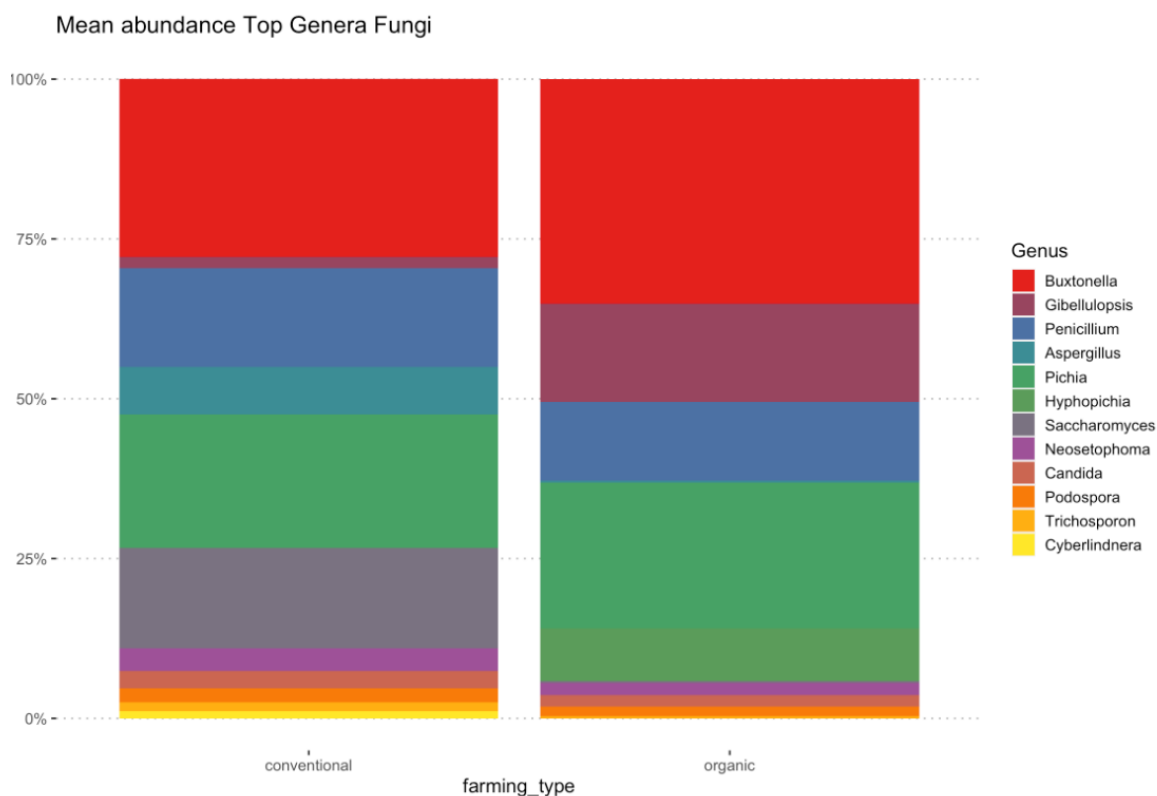
fylum	bedrijfssysteem rantsoen	antibiotica	bedrijfssysteem: dieet	bedrijfssysteem: antibiotica	dieet: antibiotica
Ascomycota	0.7	0.68	0.12	0.6	0.37
Basidiomycota	0.23	<b>0.03</b>	0.37	0.82	0.95
Chytridiomycota	0.2	0.33	0.38	0.15	0.63
Ciliophora	0.19	<b>0.01</b>	0.22	0.21	0.31
Discosea	0.26	0.18	0.93	0.16	0.84
Mucoromycota	0.26	0.18	0.93	0.16	0.84

Op familieniveau zijn er wel significante verschillen aangetroffen tussen biologisch en gangbaar gehouden koeien. De Aspergillaceae, Bulleribasidiaceae, Saccheromycetaceae en Trichosporanaceae waren significant meer aanwezig in mestmonsters van gangbaar gehouden koeien, terwijl de Thelebolaceae iets meer aanwezig bleken te zijn in mest van biologische koeien. De Plectosphaerellaceae waren in een veel grotere mate aanwezig in mest van biologische koeien en de Pseudorotiaceae waren aanwezig in de mest van biologische koeien, maar totaal afwezig in mest van gangbaar gehouden koeien (Tabel 5).

Bij het volgende taxonomische niveau, het genuslevel, worden de verschillen tussen de bedrijfssystemen zeer duidelijk (Figuur 4, Tabel 6). In gangbare mest zijn veel meer *Aspergilles*, *Candida*, *Saccheromyces*, *Trichosporon* en *Vishniacozyma* aanwezig. In deze mest was ook het schimmelgenus *Hypopichia* totaal afwezig. In biologische mestmonsters was juist het schimmelgenus *Cyberlindnera* afwezig en waren meer *Gibellulopsis* aanwezig.

Tabel 5: ANOVA-resultaten van de schimmelmicrobiom op familieniveau. Significante resultaten zijn dik gedrukt.

familie	bedrijfssysteem	rantsoen	antibiotica	bedrijfssysteem: dieet	bedrijfssysteem: antibiotica	dieet: antibiotica
Aspergillaceae	<b>0.01</b>	0.71	0.38	<b>0.05</b>	0.6	0.05
Bulleribasidiaceae	<b>0</b>	0.35	0.56	0.28	0.79	0.81
Chaetomiaceae	0.14	0.27	<b>0</b>	0.22	0.74	0.78
Cladosporiaceae	0.17	0.11	0.9	0.1	0.81	0.68
Coniothyriaceae	0.48	0.22	<b>0</b>	0.46	0.93	0.75
Cystofilobasidiaceae	0.26	0.18	0.93	0.16	0.84	0.73
Debaryomycetaceae	0.16	0.39	0.86	<b>0.01</b>	<b>0.05</b>	0.86
Dipodascaceae	0.18	0.37	<b>0.01</b>	0.36	0.69	0.91
Neocallimastigaceae	0.12	0.24	<b>0</b>	0.2	0.55	0.75
Phaeosphaeriaceae	0.36	0.2	0.53	0.31	0.61	0.73
Phaffomycetaceae	0.14	0.34	0.82	0.31	0.59	0.79
Pichiaceae	0.06	0.1	0.49	<b>0</b>	0.41	0.21
Plectosphaerellaceae	<b>0</b>	<b>0</b>	0.18	<b>0</b>	0.56	0.19
Pleosporaceae	0.37	0.51	<b>0.03</b>	0.47	0.74	0.86
Pseudeurotiaceae	<b>0.02</b>	<b>0.02</b>	0.71	<b>0.02</b>	0.62	0.56
Pycnotrichidae	0.54	0.23	0.09	<b>0</b>	<b>0.01</b>	<b>0.04</b>
Saccharomycetaceae	<b>0</b>	<b>0.04</b>	0.59	0.09	0.15	0.4
Sporormiaceae	0.83	0.88	0.94	0.05	0.23	0.99
Thelebolaceae	<b>0.01</b>	<b>0.05</b>	0.5	0.14	0.57	0.62
Trichosporonaceae	<b>0.01</b>	<b>0.02</b>	0.27	0.06	0.5	0.82



Figuur 4: Het gemiddelde schimmelmicrobiom op genusniveau gesplitst naar bedrijfssysteem.

Tabel 6: ANOVA-resultaten van de schimmelgemeenschap op genusniveau. Significante resultaten zijn dik gedrukt.

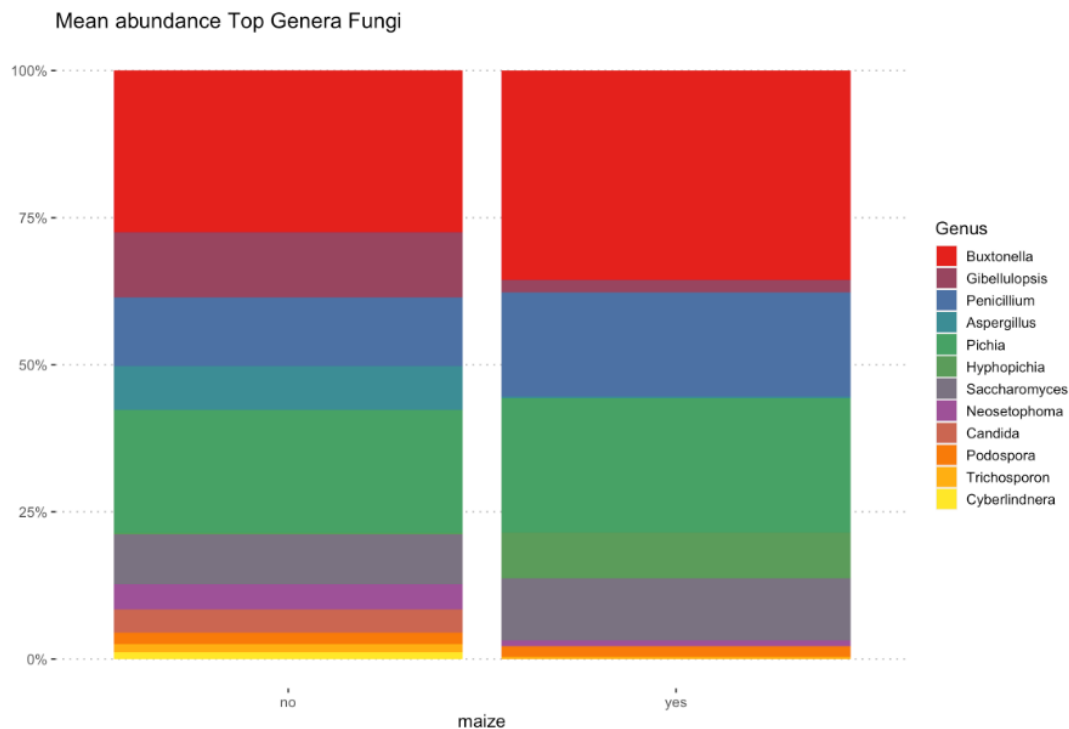
Genus	bedrijfssysteem	rantsoen	antibiotica	bedrijfssysteem: dieet	bedrijfssysteem: antibiotica	dieet: antibiotica
Aspergillus	<b>0.01</b>	0.08	0.79	0.08	0.72	0.72
Buxtonella	0.54	0.23	0.09	<b>0</b>	<b>0.01</b>	<b>0.04</b>
Caecomyces	0.12	0.24	<b>0</b>	0.2	0.55	0.75
Candida	<b>0.05</b>	0.2	0.69	0.16	0.46	0.55
Cladosporium	0.17	0.11	0.9	0.1	0.81	0.68
Coniothyrium	0.48	0.22	<b>0</b>	0.46	0.93	0.75
Cyberlindnera	0.14	0.34	0.82	0.31	0.59	0.79
Geotrichum	0.15	0.33	<b>0.01</b>	0.34	0.71	0.95
Gibellulopsis	<b>0</b>	<b>0</b>	0.16	<b>0</b>	0.6	0.18
Hyphopichia	<b>0</b>	<b>0.02</b>	0.24	<b>0.02</b>	<b>0.03</b>	0.57
Nakaseomyces	0.41	0.35	0.06	0.13	0.38	0.16
Neosetophoma	0.5	0.16	0.54	0.54	0.63	0.7
Parastagonospora	0.21	0.45	0.65	0.11	0.65	0.84
Penicillium	0.14	0.22	0.44	0.12	0.71	<b>0.05</b>
Pichia	0.06	0.1	0.49	<b>0</b>	0.41	0.21
Podospora	0.14	0.27	<b>0</b>	0.22	0.74	0.78
Saccharomyces	<b>0</b>	<b>0.05</b>	0.31	0.05	0.31	0.62
Thelebolus	<b>0.01</b>	<b>0.05</b>	0.5	0.14	0.57	0.62
Trichosporon	<b>0.03</b>	0.16	0.13	<b>0.04</b>	0.41	0.7
Vishniacozyma	<b>0</b>	0.35	0.56	0.28	0.79	0.81

### 3.2.2 Effect van rantsoen: met en zonder mais

Op het hoogste taxonomische niveau, het fyllum, bleek Ciliophora veel minder aanwezig in de mest van koeien die geen mais in het rantsoen hebben. Opvallend was dat ook de hoeveelheid Basidiomyceten significant groter was in een ruwvoerrantsoen zonder mais (Tabel 4).

Op familieniveau waren er vijf schimmelfamilies die significant verschilden tussen de rantsoenen. Bij vier families, Plectosphaerellaceae, Pseudeurotiaceae, Thelebolaceae en Trichosporonaceae was de aanwezigheid van de schimmels in het rantsoen zonder mais in het ruwvoer significant hoger. Bij Saccharomycetaceae daarentegen was de aanwezigheid van deze schimmelfamilie in het rantsoen met mais juist hoger (Tabel 5).

Om verder te kijken welke groepen schimmels nu de grootste verschillen geven tussen de rantsoenen is er gekeken naar de verschillen op genusniveau. Bij vier schimmelgenera was er een significant effect van rantsoen. Zowel Gibellulopsis als Thelebolus waren meer aanwezig bij een rantsoen zonder mais, Saccharomyces was meer aanwezig in een rantsoen met mais en Hyphopichia was enkel aanwezig in een rantsoen met mais (Tabel 6).



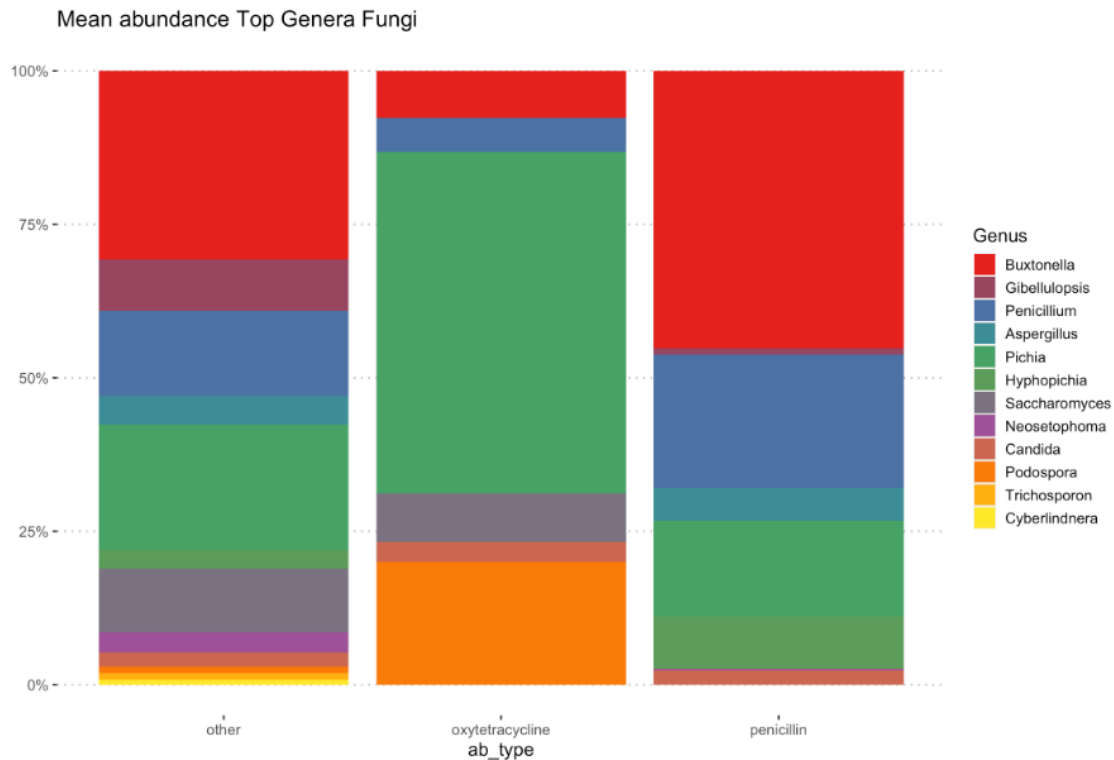
Figuur 5: Het gemiddelde schimmelmicrobioom op genusniveau gesplitst naar rantsoen.

### 3.2.3 Effect van antibiotica: met en zonder antibiotica

Het effect van antibioticabehandelingen was ook op het schimmelprofiel in de bemonsterde koeien duidelijk terug te zien in het gemiddelde profiel per behandeling. Hierin was ook duidelijk onderscheid te zien tussen de gebruikte antibiotica. Echter, bij een gezamenlijke analyse van alle mestmonsters bleek de variatie tussen de monsters zo groot dat behandeling met antibiotica geen significant verschil gaf op het hoogste taxonomische niveau, het fylumniveau.

Er zijn wel verschillen aangetoond op schimmelfamilieniveau: de families Coniothyriaceae en Chaetomiaceae waren alleen aanwezig bij onbehandelde mestmonsters. De familie Dipodascaceae was volledig afwezig bij penicillinebehandeling en was hoger bij oxytetracyclinebehandeling vergeleken met de onbehandelde mestmonsters. De familie Neocallimastigaceae was ook afwezig bij penicillinebehandelde koeien. Echter, hier was de aanwezigheid na oxytetracyclinebehandeling lager dan bij de onbehandelde groep. Pleosporaceae waren wel significant verschillend. Deze waren echter maar in een paar monsters aanwezig.

Op genusniveau was er bijvoorbeeld bij het Geotrichum een verschuiving te zien. Ten opzichte van onbehandelde koeien waren de mestmonsters van koeien die behandeld werden met een antibioticum uit de oxytetracyclinefamilie verrijkt met Geotrichum schimmels. De schimmel genera Caecomyces en Coniothyrium waren volledig afwezig na penicilliumbehandeling. Het genus Podospora was volledig afwezig na oxytetracyclinebehandeling.



Figuur 6: Het gemiddelde schimmelmicrobioom op genusniveau gesplitst naar antibioticagebruik.

### 3.2.4 Interactie-effecten

Naast de hoofdeffecten van de drie factoren bedrijfssysteem, rantsoen en antibioticagebruik waren er ook interactie-effecten. Het effect van het rantsoen op het schimmelmicrobioom van de gemeten koeien, was verschillend tussen gangbare en biologische bedrijven.

De schimmelsamenstelling van biologisch gehouden koeien reageerde dus anders op mais in het rantsoen dan gangbaar gehouden koeien. Met name de aanwezigheid van Aspergillaceae, Debaryomecetaceae, Pichiaceae, Plectosphaerellaceae, Pseudorotiaceae en Pycnotrichidae, verschilden significant in voorkomen, afhankelijk van het bedrijfssysteem. Op genusniveau waren er vier genera met een interactie-effect: Buxtonella, Gibellulopsis, Hyphopichia en Pichia, . Bij deze genera bleek het voorkomen in de mest van afhankelijk van het bedrijfssysteem (gangbaar of biologisch).

Behalve interactie-effecten van rantsoen en bedrijfssysteem, bleek ook het effect van gebruik van antibiotica afhankelijk van het bedrijfssysteem. Het voorkomen van de families Debaryomecetaceae en Pycnotrichidae en de genera Buxtonella en Hyphopichia bleek afhankelijk van het bedrijfssysteem (Tabel 4 - Tabel 6).

Tenslotte waren er ook interactie-effecten tussen rantsoen en antibioticagebruik. De schimmelsamenstelling in de mest van koeien met mais in het rantsoen reageerde anders op antibiotica dan van de koeien zonder mais in het rantsoen. Dit gold voor de schimmelfamilie Pycnotrichidae en de genera Buxtonella en Penicillium.

## 4 Conclusie en Discussie

### 4.1 Algemeen

Bij het onderzoek zijn in totaal 112 individuele koeien van 16 verschillende bedrijven bemonsterd. Dit levert een grote variatie in microbiom op. Desondanks zijn er wel significante verschillen gevonden, zowel qua aanwezigheid van bacteriën als qua aanwezigheid van schimmels. Hieronder worden de onderzoeksvragen kort beantwoord en vervolgens wordt dit onderzoek en de gevonden resultaten verder uitgelicht en vergeleken met eerdere onderzoeken.

- Is er verschil in het mestmicrobiom tussen gangbaar en biologisch gehouden koeien?

Op alle geanalyseerde taxonomische niveaus is er een significant verschil in het microbiologische profiel tussen mestmonsters.

- Geven verschillen in rantsoen een verschil in het microbiom in de mest?

Zowel op fyllumniveau als op familie- en generaniveau waren er verschillen zichtbaar in het bacterie- en schimmelprofiel tussen dieren met een hoog en dieren met een laag aandeel snijmais in het rantsoen.

- Is er een verschil in het microbiom van de mest tussen koeien die wel en geen antibiotica hebben gekregen?

Het effect van een antibioticagift is duidelijk zichtbaar in het microbiom. Het effect verschilt wel per soort antibioticum.

- Zijn er interacties tussen de verschillende factoren?

#### **Bacteriën:**

Het effect van het rantsoen op het microbiom van de gemeten koeien, was verschillend per bedrijfssysteem.

Ook het gebruik van antibiotica gaf een effect dat afhankelijk bleek van het bedrijfssysteem.

#### **Schimmels:**

De schimmelsamenstelling van biologisch gehouden koeien reageerde anders op mais in het rantsoen dan gangbaar gehouden koeien.

Het effect van antibioticagebruik is afhankelijk van het bedrijfssysteem.

De schimmelsamenstelling in de mest van koeien met mais in het rantsoen reageerde anders op antibiotica dan van de koeien zonder mais in het rantsoen.

## 4.2 Onderzoeksopzet

Er is getracht een goede balans te creëren met acht gangbare en acht biologische bedrijven, en uit elke groep vier bedrijven met een hoog en vier bedrijven met een laag snijmaisgebruik in het rantsoen. Op ieder bedrijf werden vervolgens vier koeien met antibiotica en vier koeien zonder antibiotica bemonsterd. Met name wat betreft de splitsing wel/geen antibiotica is het scheef gegaan, omdat sommige bedrijven antibioticavrij waren, terwijl ook op andere bedrijven onvoldoende dieren waren met een recente antibioticatoediening. Hierdoor zijn er 64 dieren zonder en 48 dieren mét antibiotica bemonsterd, waarbij het moment van antibioticagebruik soms meer dan drie maanden geleden was. Bij een eventuele volgende keer is het aan te raden een uiterlijke termijn aan het antibioticagebruik te koppelen. Desalniettemin zijn er wel significante verschillen aangetroffen tussen wel en geen antibiotica, mede door de verder selectie van koeien die uiterlijk 30 dagen voor bemonstering antibiotica hadden gehad, en door de splitsing in de verschillende type antibiotica.

## 4.3 Bacteriën

Bacteroides, Phocaeicola en Ruminobacter, waren significant lager in de mest van biologisch gehouden koeien en Alistipes, Oscillibacter en Pseudoflavinofractor waren juist significant hoger in de mest van biologische gehouden koeien. Hieronder een lijst met kenmerken van de verschillende bacteriegroepen die significant verschilden:

- Bacteroides, een anaerobe bacteriesoort wordt veel aangetroffen in de darm. Bacteroides spelen een rol in de omzetting van polysacchariden en oligosacchariden. Bacteroides zijn over het algemeen mutualistische bacteriën maar kunnen ook pathogeen zijn, met name buiten het darmstelsel.
- Phocaeicola: veel aangetroffen in de darm, helpt mee met afbraak van complexe heterosacchariden en synthese van vitaminen en dergelijke.
- Ruminobacter uit de familie Succinivibrionaceae is belangrijk in het verteringsproces van herkauwers omdat ze onder anaerobe omstandigheden zetmeel vergisten. Dit type is gevoelig voor verandering van het rantsoen en omstandigheden.
- Alistipes wordt veel in de darm aangetroffen.
- Oscillibacter is in proeven veel meer aanwezig bij rantsoenen met veel krachtvoer versus rantsoenen met alleen ruwvoer in vleeskoeien (Kim, 2014).
- Van Pseudoflavinofractor is bekend dat deze verschillen in aanwezigheid tussen kalveren en koeien en ook beïnvloed worden door het gebruik van antibiotica in deze laatste groep. Van de functie van dit genus is verder weinig bekend (Weese en Jellinski 2016).

### 4.3.1 Effecten van bedrijfstype

Uit het onderzoek van Gomes et al. (2020) bleek dat er een aantal mestbacteriefamilies waren die significant verschilden tussen gangbaar en biologisch gehouden koeien, namelijk Aeromodales, Prevotellaceae en Succinivibrionaceae. Ook in ons onderzoek verschillen Succinivibrionaceae



significant tussen gangbaar en biologisch. In beide gevallen waren er significant minder Succinivibrionaceae in biologische mest en mogelijk is deze familie een indicatorfamilie. Succinivibrionaceae zijn anaerobe mest- en pensbacteriën die glucose fermenteren. Het is bekend dat als deze bacterie meer in de pens voorkomt dit mogelijk een hoger eiwitgehalte in de melk geeft (Xue et al., 2020) en een lagere methaanemissie (Wallace et al., 2015, en 2017). Of dit ook het geval is bij een hogere aanwezigheid van Succinivibrionaceae in de mest is niet bekend.

#### **4.3.2 Effecten van het rantsoen**

Zowel op fyllumniveau als op familie- en generaniveau waren er verschillen zichtbaar tussen dieren met een hoog en dieren met een laag aandeel snijmais in het rantsoen. De fyyla Bacteroidetes en Spirochaetes waren significant meer aanwezig bij dieren met een laag aandeel snijmais in het rantsoen, terwijl de Proteobacteria significant meer aanwezig waren wanneer er een hoger aandeel snijmais in het rantsoen werd gevoerd. Van de families waren Atopobiaceae, Desulfovibrionaceae en Muribaculaceae hoger in de rantsoenen zonder mais en Eubacteriaceae en Moraxellaceae hoger in de rantsoenen met mais. Van de genera waren Alistipes, Alloprevotella Mailhella en Pseudoflavonifractor hoger in een rantsoen zonder mais en Acinetobacter en Negativibacillus hoger in de rantsoenen met mais.

Een verschuiving in microbiom in pens en darm is geheel volgens verwachting, omdat de verschillende bacteriën ieder hun eigen niche hebben (Loo et al., 2016). In de literatuur is dit dan ook inmiddels veelvuldig beschreven, hoewel er meer literatuur beschikbaar is over het pens- dan het darmmicrobiom. In onderzoek van Liu et al. (2016) bleek in de pens rond de 50% uit het fyllum Firmicutes te bestaan, terwijl dit in de darm meer dan 80% was (Liu et al., 2016). De Bacteroidetes waren intussen van 30% in de pens naar 10% in de darm gedaald. De resultaten van Liu et al. (2016) zijn afwijkend van de hier gevonden resultaten: wij vonden circa 50% Firmicutes in de mest en tegen de 40% Bacteroidetes. Echter, onderzoek van Hagey et al. (2019) was meer vergelijkbaar met de hier gevonden resultaten: zij vonden ongeveer 60% Firmicutes, 32% Bacteroidetes, 3% Spirochaetes en 2% Proteobacteria in de darm. Andere fyyla waren in hoeveelheden onder de 1% aanwezig

Ondanks eventuele verschillen tussen microbiom in de pens en de darm, zal de ecologische niche vergelijkbaar zijn. Onderzoek van De Menezes et al. (2011) betrof alleen onderzoek van het pensmicrobiom, maar ook hier zagen ze een dominantie van Firmicutes en Bacteroidetes. In het onderzoek zagen ze dat met name Bacteroidetes, Fibrobacteres, Firmicutes, en Proteobacteria verantwoordelijk waren voor verschillen tussen een weiderantsoen en een TMR-rantsoen (De Menezes et al., 2011). Voor Bacteroidetes en Proteobacteria kwam dit overeen met de resultaten in dit onderzoek: Proteobacteria gingen omhoog bij een TMR-rantsoen en Bacteroidetes waren hoger bij een weiderantsoen. In tegenstelling tot in ons onderzoek, vonden De Menezes et al. (2011) geen verschillen in de hoeveelheid Spirochaetes tussen rantsoenen.

Een belangrijke functie van bacteriën in de pens is de afbraak van vezels en cellulose (Fibrobacter spp, Ruminococcus spp), afbraak van snel afbreekbare koolhydraten zoals zetmeel (Prevotella spp, Ruminobacter spp) en de metabolisatie van vetzuren (Megasphaera, Succinivibrio en Treponema) (Stewart et al., 1997). Juist van dit soort bacteriën zouden verschuivingen verwacht worden als gevolg van verschillen tussen rantsoenen. Op fylaniveau vonden we echter geen effect op de Fibrobacter, mogelijk omdat beide rantsoenen niet of nauwelijks verschillen in de aanwezigheid van celwanden. Er was wel een significant interactie-effect tussen rantsoen en bedrijfsstelsel voor Fibrobacter, mogelijk omdat de biologische bedrijven een structuurrijker rantsoen voeren en daarmee Fibrobacter stimuleren. Op familieniveau zagen we een significant effect van Prevotellaceae en op genusniveau zagen we een significant effect van Altoprevotella: deze was hoger in een rantsoen zonder mais, terwijl Prevotella juist belangrijk is voor de afbraak van zetmeel. Echter, bij rantsoenen waar geen mais gevoerd wordt, wordt dit in het krachtvoer en de bijproducten vaak gecompenseerd. Deze compensatie verklaart ook waardoor er ook voor Ruminobacter spp. (op genusniveau) geen effecten van het rantsoen aangetroffen zijn. Treponoma was hoger in rantsoenen zonder mais: in deze rantsoenen zullen meer vetzuren uit het gras zitten, waardoor Treponoma actiever zal worden.

#### **4.3.3 Effect van antibiotica**

Het effect van een antibioticagift is duidelijk zichtbaar in het microbiom. Antibiotica uit de penicillinefamilie, zoals Orbenin en Peniyet, werken met name tegen grampositieve bacteriën, ook oxytetracycline werkt met name tegen grampositieve soorten. Net als in de hier gepresenteerde data is in het paper van Holman et al. (2019) te zien dat het toedienen van oxytetracycline een verschuiving in het mestmicrobiom geeft en dat dit effect ook nog in het laatste tijdstip, 34 dagen na toediening zichtbaar is in het microbiom. Verschillende bacteriën nemen op fyllum, familie of genusniveau toe. Opvallend hier is de toename van Clostridium na oxytetracycline. Omdat Clostridium een grampositieve bacteriesoort is zou je verwachten dat deze gevoelig zou zijn voor de oxytetracyclinebehandeling, echter Clostridium neemt sterk toe in de mestmonsters van koeien die dit antibioticum hadden gekregen. Een mogelijke verklaring hiervoor is resistentie tegen het antibioticum. Van Clostridium is bekend dat ze via plasmiden resistentiegenen kunnen opnemen.

#### **4.4 Eukaryoten, schimmels en protozoa**

In totaal werden er tussen de 240 en 11.667 sequenties gevonden per monster, met een gemiddelde van 2534, dat is veel minder dan de hoeveelheid gevonden bacteriesequenties, waarbij het gemiddelde lag op 11.524 sequenties per monster. Het is bekend dat het aantal schimmels van het totale microbiom in de pens van de koe vrij laag is, zo'n 8% van het microbiom zijn schimmels. Net als bij bacteriën is het microbiom van schimmels in de darm anders dan in de pens. Omdat microben hun eigen niche hebben, verschuift de samenstelling in

elk deel van het verteringsstelsel. Breton et al. (1994) toonden aan dat de schimmelsamenstelling in de dikke darm van schapen een andere structuur heeft dan de samenstelling in de pens.

In de studie van Gomes et al. (2020) waren de dominante schimmelgroepen de Ascosphaeraceae, de Aspergillaceae, en de Saccheromycetaceae uit het fyllum van de Ascomyceten. In de hier gepresenteerde studie waren ook de schimmels uit de stam van Ascomyceten het meest dominant en ook de protozoasoort Ciliophora veel aanwezig. Deze laatste was sterk gekoppeld aan het aandeel mais dat gevoerd werd: de protozoa waren veel minder aanwezig in de mest van koeien die geen mais in het rantsoen hebben. Dit is bekend uit eerdere studies: rantsoen bepaalt in hoge mate de populatiedichtheid van protozoa in de pens (Warner et al., 1962).

#### **4.4.1 Effecten van bedrijfstype**

Verschillen in de schimmelpopulatie tussen bedrijfssystemen komen in de hier gepresenteerde studie duidelijk naar voren. In de studie van Gomes et al. (2020) was dit een interactie tussen rantsoen en bedrijfssysteem (biologisch of gangbaar) en antibioticagebruik. Uit onze gegevens blijkt dat het verschil tussen biologisch en gangbaar ook op zichzelf te zien was. Er zijn bijvoorbeeld in gangbare mest veel meer Aspergilles, Candida, Saccheromyces, Trichosporon en Vishniacozyma aanwezig dan in biologische mestmonsters en het schimmelgenus Hypopichia was totaal afwezig in gangbare mestmonsters. In biologische mestmonsters was juist het schimmelgenus Cyberlindnera afwezig en waren meer Gibellulopsis aanwezig.

##### Gangbaar (+)

- Saccheromyces: gist, belangrijk voor de koolhydratenfermentatie
- Candida: gist, vaak meekomend met rantsoen
- Trichosporon: gist, mogelijk onderdrukken van methaanproductie
- Vishniacozyma: gist, rantsoengevoelig (silageschimmel)
- Aspergilles: cellulose-afbraak, produceert essentiële enzymen

##### Gangbaar (-)

- Hypopichia: weinig van bekend. Biomarker voor ruraal- versus stadsmicrobioom bij mensen (Kabwe et al 2020) en aanwezig in verschillende voedergewassen.

##### Biologisch (+)

- Gibellulopsis: silageschimmel

##### Biologisch (-)

- Cyberlindnera: gist, bestanddeel van krachtvoer (gisteiwit) – dit gist wordt weleens aan het (gangbaar) krachtvoer toegevoegd om de benutting van het voer in de pens te verbeteren.

#### **4.4.2 Effecten van het rantsoen**

De meeste hierboven genoemde schimmels zijn gisten, eencellige schimmels die betrokken zijn bij fermentatie. Een deel van de schimmels dat meer aanwezig is bij gangbaar gehouden koeien lijkt mee te komen met het rantsoen, zowel uit de silage als uit het krachtvoer. Het is uit verschillende bronnen bekend (o.a. Kumar et al., 2015) dat met name de samenstelling van de anaerobe schimmels in de pens wordt gedreven door het gegeven rantsoen. Dit kan op verschillende manieren. Dit proces kan direct plaatsvinden doordat het gegeven voer (krachtvoer en silage) schimmels bevat die de maag kunnen passeren en in het verteringsstelsel van de koe terecht kunnen komen. Dit proces kan daarnaast ook indirect plaatsvinden door de samenstelling van het rantsoen. Het aandeel van vezels en lignocellose in het voer kan een verschuiving van aanwezige schimmels veroorzaken. In de studie van Kostyukovsky et al. (1991) bleek dat er meer schimmels aanwezig waren in koeien die een hoger aandeel hooi in het rantsoen kregen.

#### **4.4.3 Effecten van antibiotica**

In onze monsters waren er verschillen tussen de samenstelling van het schimmelmicrobioom tussen behandelde en onbehandelde koeien. De families Coniothyriaceae en Chaetomiaceae waren alleen aanwezig in mestmonsters van onbehandelde koeien. Ook specifieke antibiotica gaven verschillen. De familie Dipodascaceae was volledig afwezig bij penicillinebehandeling en was hoger bij oxytetracyclinebehandeling vergeleken met de mestmonsters van onbehandelde koeien. De familie Neocallimastigaceae was ook afwezig bij penicillinebehandelde koeien. Echter, hier was de aanwezigheid na oxytetracyclinebehandeling lager dan bij de onbehandelde groep.

Omdat antibiotica met name werken tegen bacteriën is het effect dat ze op de schimmelpopulatie hebben veelal secundair: door verschuivingen van het microbiom na antibioticagift is er vaak een verstoorde balans waardoor specifieke soorten dominanter worden. In sommige gevallen kan dit zelf leiden tot schimmelinfecties (Casadeval, 2007).

### **4.5 Synthese**

Onderzoek naar het microbiom van gangbaar en biologisch gehouden koeien toont herhaaldelijk aan (Gomes en co-auteurs, 2020, deze studie) dat er een verschil in microbiom meetbaar is tussen bedrijfssystemen. Dat is bijzonder, het betekent dat ondanks dat het microbiom van stal tot stal en zelfs van dier tot dier sterk kan verschillen, er toch een duidelijk effect van het bedrijfssysteem meetbaar was in het microbiom. De hier gepresenteerde studie heeft geprobeerd een volgende stap te zetten en het verschil tussen deze twee soorten veehouderij te linken aan een tweetal factoren die verschillen tussen biologisch en gangbaar gehouden koeien, namelijk rantsoen en antibioticagebruik. Ondanks de verschillen die we hebben gemeten tussen de verschillende factoren (bedrijfssysteem, rantsoen en antibioticagebruik) kunnen we niet alle variatie in het microbiom volledig aan deze factoren

verbinden. Dit betekent dat er andere factoren (ook) een rol spelen die het verschil in microbiom bepalen.

Op basis van het hier gepresenteerde onderzoek is het moeilijk de resultaten te duiden en aanbevelingen te doen omtrent een gezonder en diverser microbiom. Maar de ontwikkelingen in het onderzoek naar het microbiom gaan snel. Het is veelbelovend dat de focus in het microbiom onderzoek langzaam verschuift van identificatie van de aanwezige microben naar een bredere kijk: niet alleen het kijken naar wie er aanwezig is, maar ook naar activiteit, functie en mogelijke mechanismen en interacties met het organisme waarin ze leven. Deze ontwikkelingen zullen het in de toekomst mogelijk maken de rol van microben op de gezondheid en welzijn van melkvee en het productieproces beter te begrijpen en te duiden.

## Referenties

- Breton, A., Confesson, I., Dusser, M. & Gaillard-Martinie, B. (1994). [Comparison of the fungal populations in the rumen, duodenum and faeces of sheep.] *Annales de Zootechnie* 43, 262.
- Casadevall A. (2007). Determinants of virulence in the pathogenic fungi. *Fungal Biol Rev* 21(4):130–132.
- Coorevits, A.N., De Jonghe, V., Vandroemme, J., Reekmans, R., Heyrman, J., Messens, W., ... & Heyndrickx, M. (2008). Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. *Systematic and Applied Microbiology*, 31(2), 126-140.
- De Menezes, A.B., E. Lewis, M. O'Donovan, B.F. O'Neill, N. Clipson & E.M. Doyle, 2011. Microbiome analyses of dairy cows fed pasture or total mixed ration diets. *FEMS Microbiol Ecol* 78, 256.
- Dixon, Philip. 2003. "VEGAN, a Package of R Functions for Community Ecology." *Journal of Vegetation Science*. <https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2003.tb02228.x>.
- Gomes, S. I., van Bodegom, P.M., van Agtmaal, M., Soudzilovskaia, N.A., Bestman, M., Duijm, E., ... & van Eekeren, N. (2020). Microbiota in dung and milk differ between organic and conventional dairy farms. *Frontiers in microbiology*, 11, 1746.
- Gordon G.L., M.W. Phillips. The role of anaerobic gut fungi in ruminants. *Nutr Res Rev*. 1998 Jun;11(1):133-68.
- Hagey, J.V., S. Bhatnagar, J.M., Heguy, B.M. Karle, P.L. Price, D. Meyer and E.A. Maga, 2019. Fecal microbial communities in a large representative cohort of California dairy cows. *Frontiers in microbiology* 10, 1093.
- Holman, D.B., W. Yang & T.W. Alexander, 2019. Antibiotic treatment in feedlot cattle: a longitudinal study of the effect of oxytetracycline and tulathromycin on the fecal and nasopharyngeal microbiota. *Microbiome* 7: 86.
- Kabwe, M.H., Vikram, S., Mulaudzi, K. et al. The gut mycobiota of rural and urban individuals is shaped by geography. *BMC Microbiol* 20, 257 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01907-3>
- Kostyukovsky, V.A., Okunev, O.N., and Tarakanov, B.V., Description of two anaerobic fungal strains from the bovine rumen and influence of diet on the fungal population in vivo. *J. Gen. Microbiol.*, 137, 1759-1764 (1991).
- Kumar S., Indugu N., Vecchiarelli B., Pitta D.W. (2015b) Associative patterns among anaerobic fungi, methanogenic archaea, and bacterial communities in response to changes in diet and age in the rumen of dairy cows. *Front Microbiol* 6:781.
- Lahti, Leo, S. Shetty, and T. Blake. 2017. "Tools for Microbiome Analysis in R." *Microbiome Package Version 0.99*.
- Loor, J.J., A.A. Elolimy & J.C. McCann, 2016. Dietary impacts on rumen microbiota in beef and dairy production. *Animal Frontier* 6, 3, 22.
- McMurdie, Paul J., and Susan Holmes. 2013. "Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data." *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.
- Pershina, E.V., Ivanova, E.A., Korvigo, I.O., Chirak, E.L., Sergaliev, N.H., Abakumov, E.V., & Andronov, E.E. (2018). Investigation of the core microbiome in main soil types from the East European plain. *Science of the Total Environment*, 631, 1421-1430.
- R.J. Wallace, J.A. Rooke, N. McKain, C.A. Duthie, J.J. Hyslop, D.W. Ross, et al. The rumen microbial metagenome associated with high methane production in cattle, *BMC Genom*, 16 (1) (2015), p. 839
- R.J. Wallace, T.J. Snelling, C.A. McCartney, I. Tapio, F. Strozzi, Application of meta-omics techniques to understand greenhouse gas emissions originating from ruminal metabolism, *Genet Sel Evol*, 49 (1) (2017), p. 9

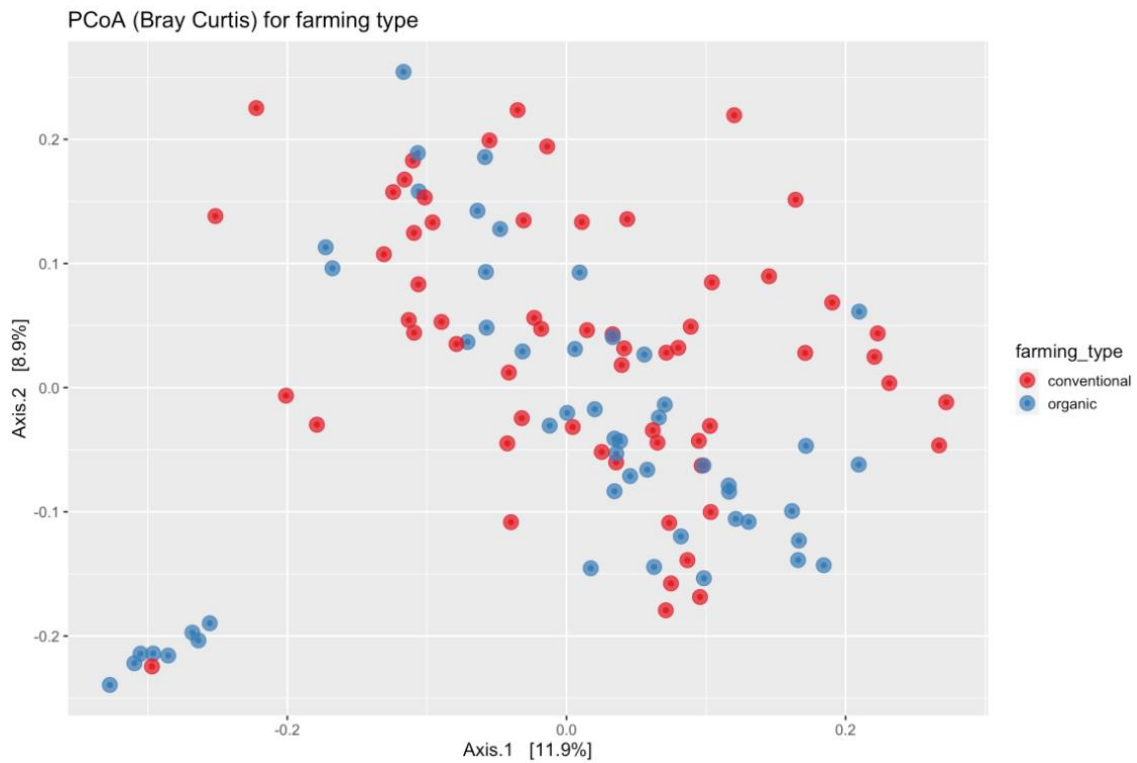
Stewart, C.S., H.J. Flint & M.P. Bryant, 1997. The rumen bacteria. The rumen microbial ecosystem (Hobson PN & Stewart CS, eds), pp10-72, Chapman & Hall, London.

Warner, A.C.I. (1962). Some factors influencing the rumen microbial population. *Journal of General Microbiology* 28, 129–46.

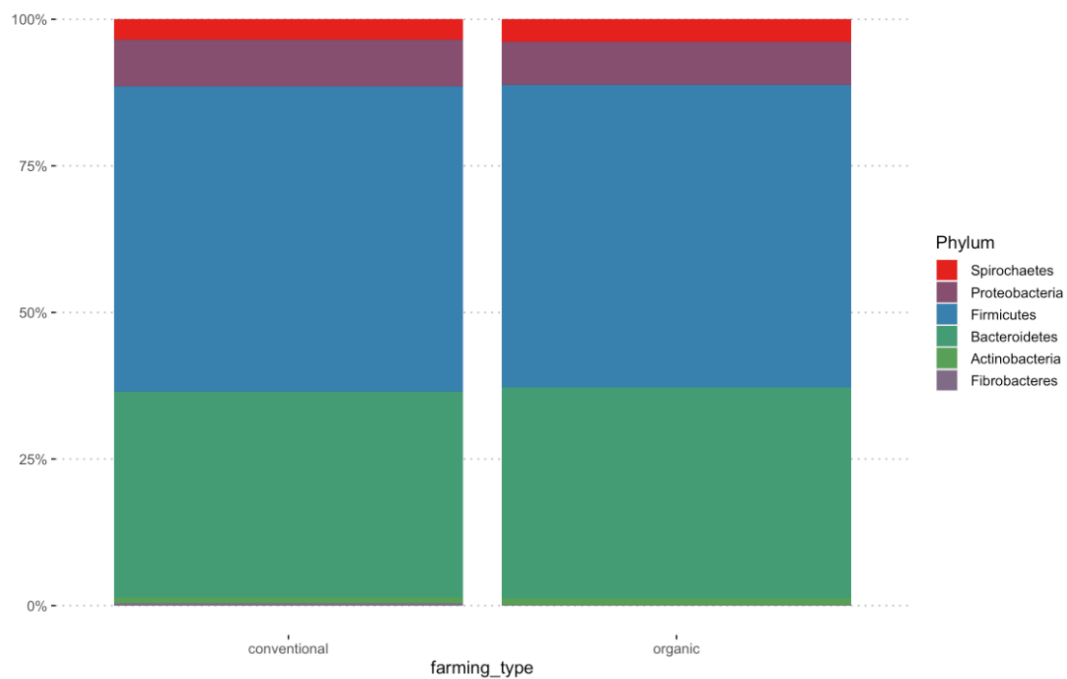
Weese, J.S., and M. Jelinski. "Assessment of the fecal microbiota in beef calves." *Journal of veterinary internal medicine* 31.1 (2017): 176-185.

M.Y. Xue, J.J. Wu, Y.Y. Xie, S.L. Zhu, Y.F. Zhong, J.X. Liu, et al. Investigation of fiber utilization in the rumen of dairy cows based on metagenome-assembled genomes and single-cell RNA sequencing. *Microbiome*, 10 (2022), p. 11

## Supplement

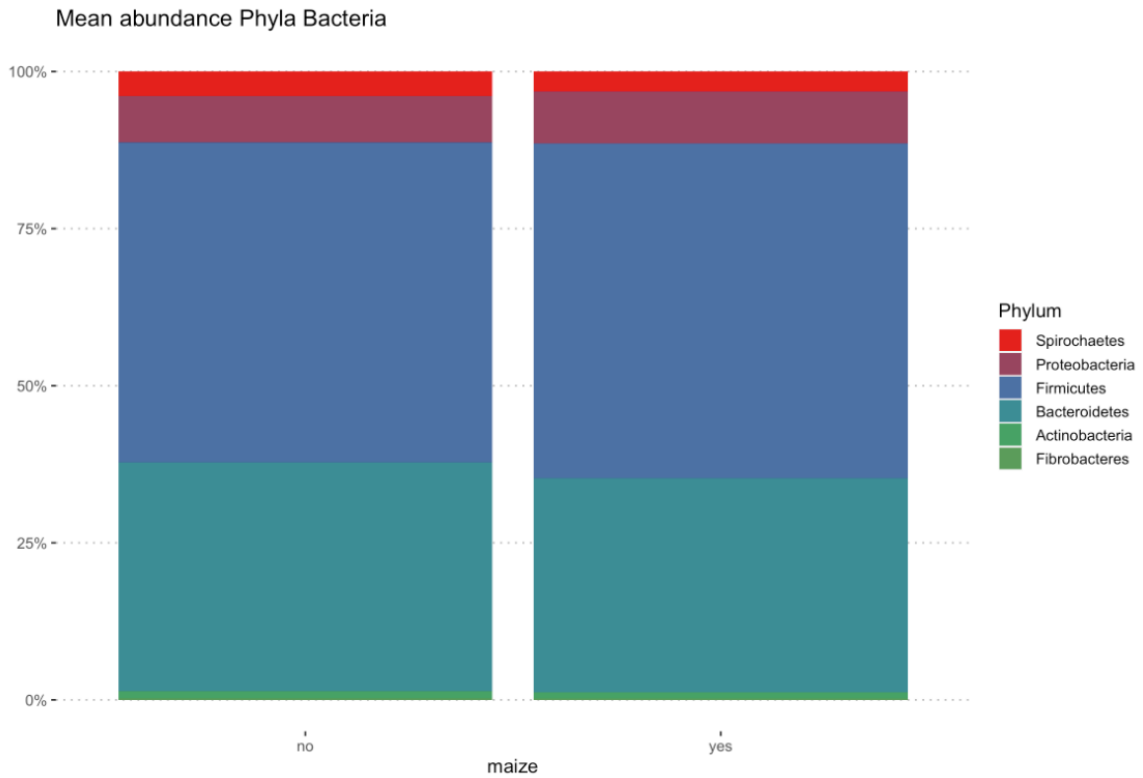


Figuur S1 PCA-analyse van de spreiding van de variatie van het bacteriemicrobioom van individuele koeien. Rode stippen zijn gangbaar gehouden koeien, blauwe stippen zijn biologisch gehouden koeien.

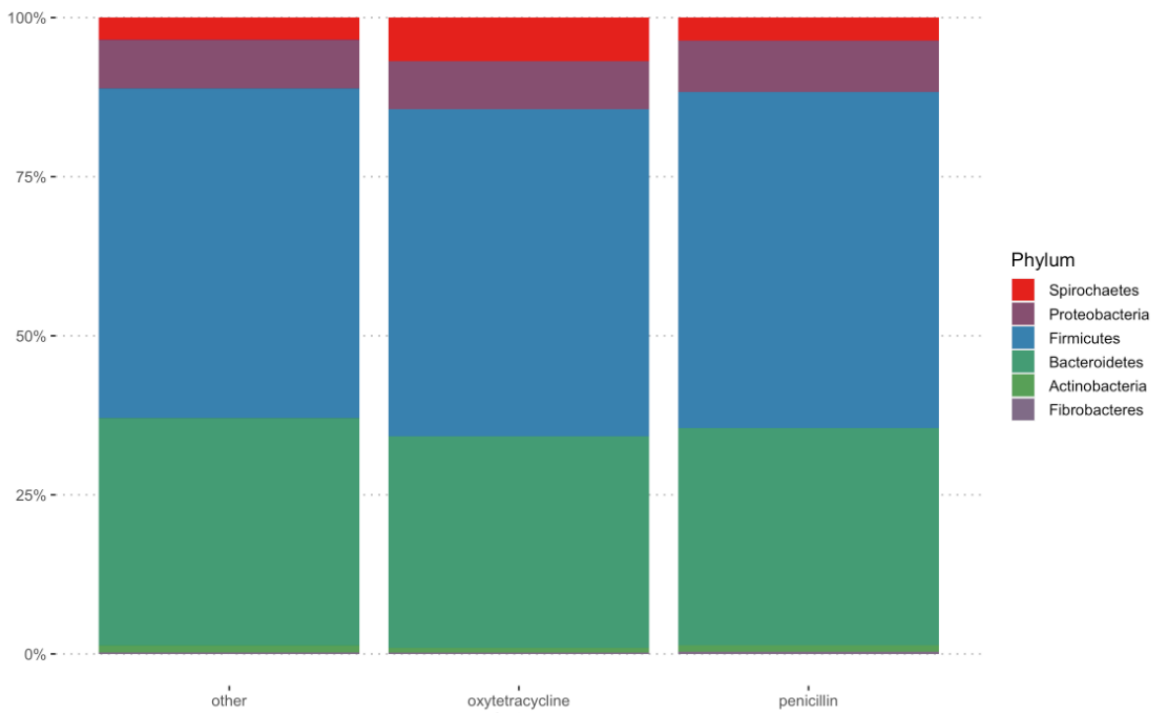


Figuur S2 Gemiddelde bacteriemicrobioom op fyllumniveau gesplitst op bedrijfssysteem.

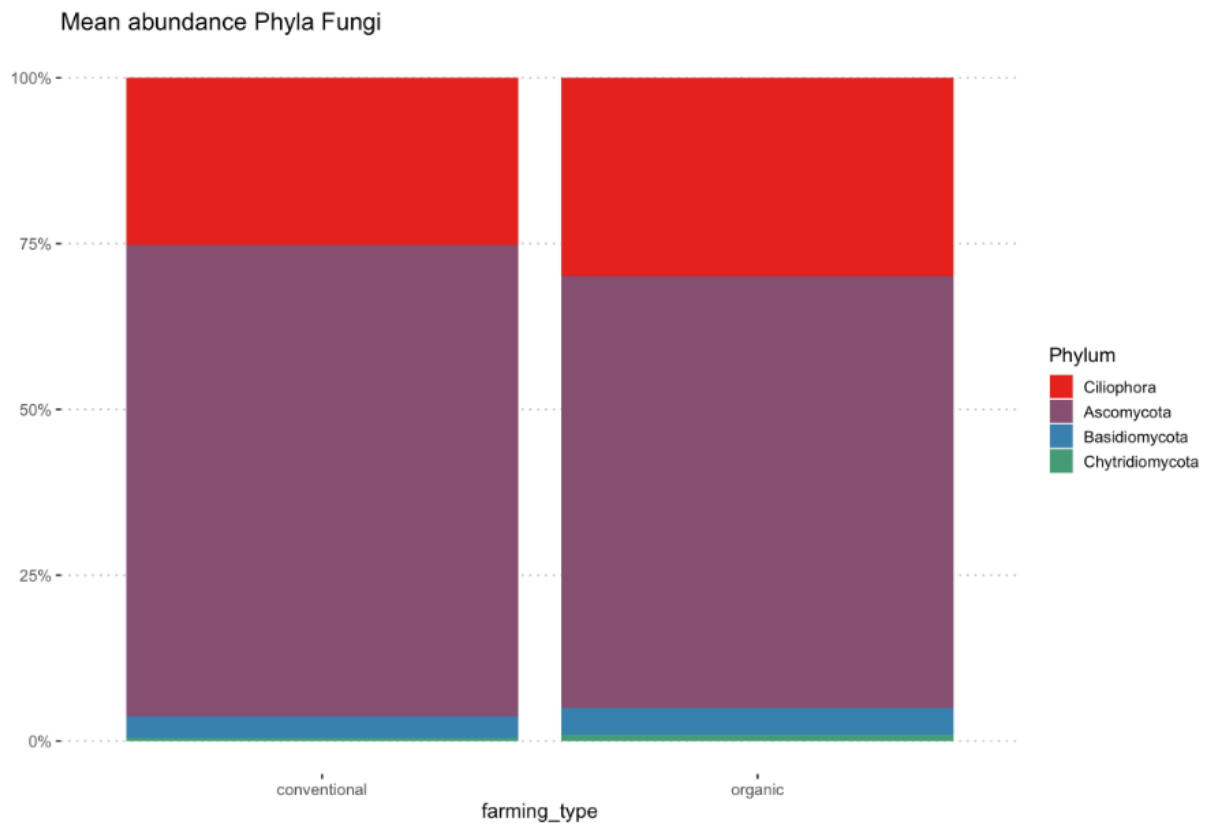




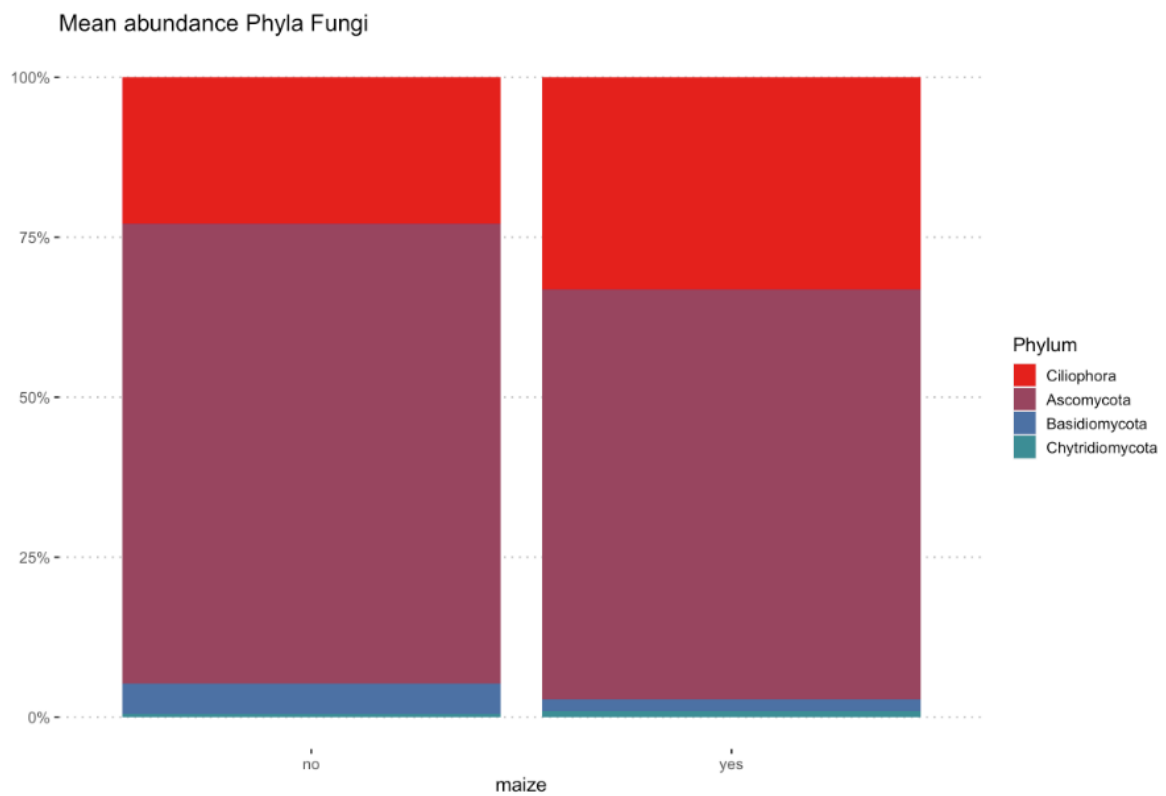
Figuur S3: Gemiddelde bacteriemicrobioom op fylumniveau gesplitst op rantsoen.



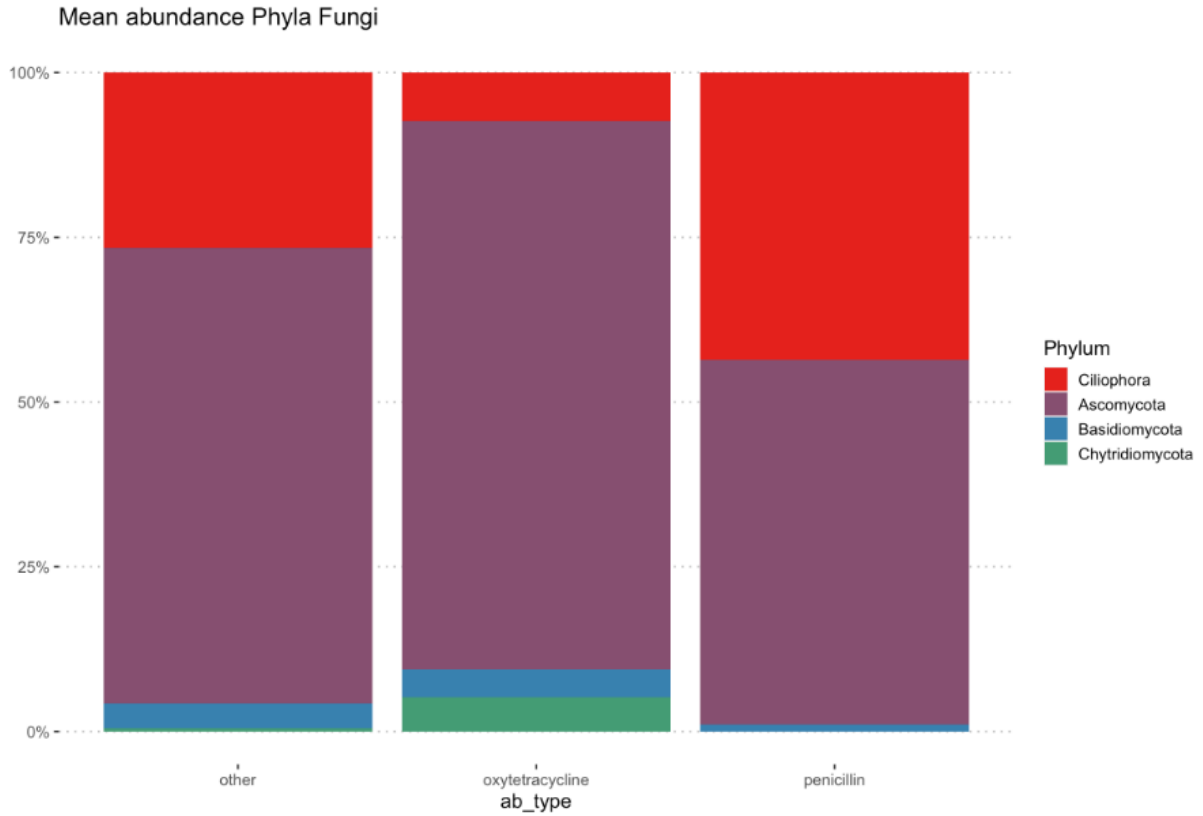
Figuur S4: Gemiddelde bacteriemicrobioom op fylumniveau gesplitst op geen antibiotica en twee antibioticafamilies.



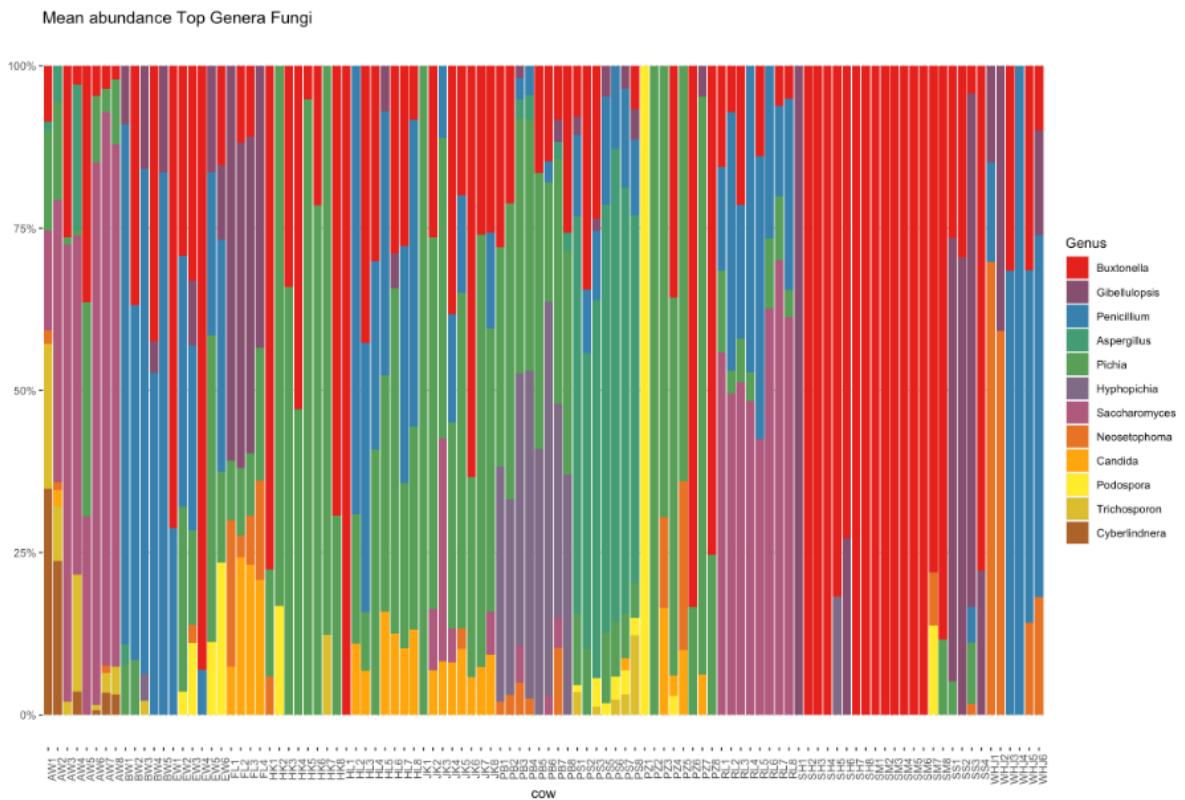
Figuur S5: Gemiddelde schimmelmicrobiom op fylumniveau gesplitst op bedrijfssysteem.



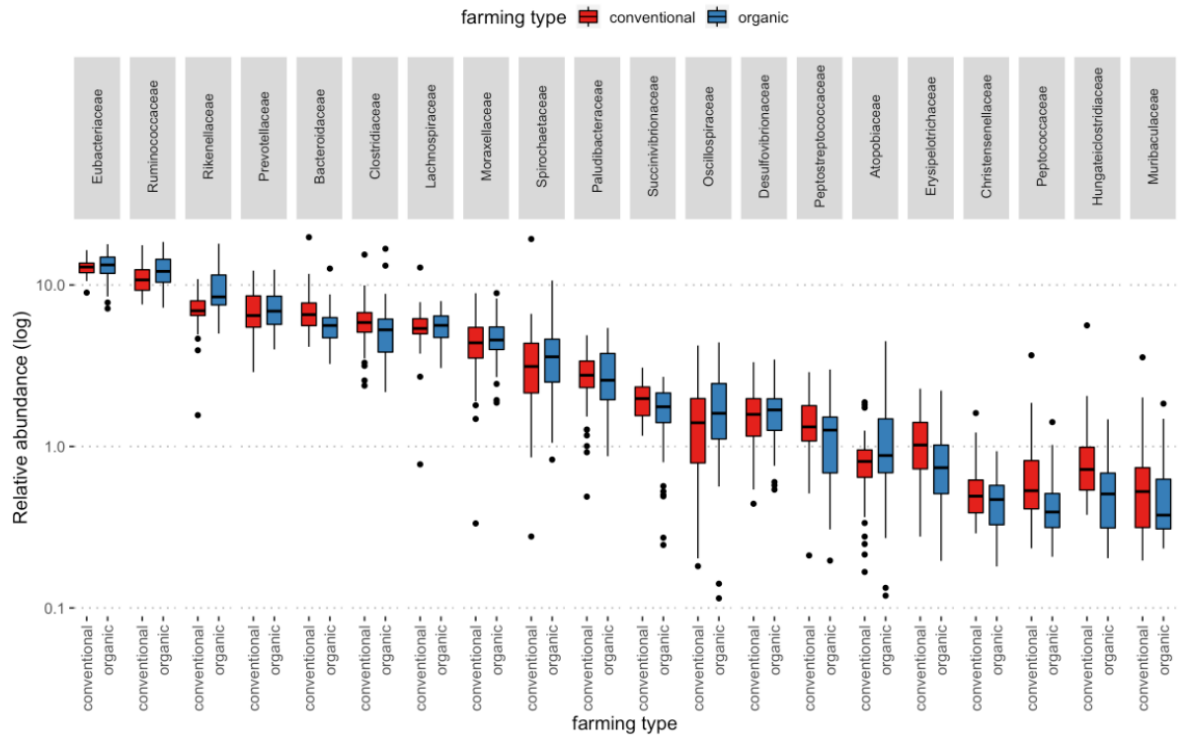
Figuur S6: Gemiddelde schimmelmicrobiom op fylumniveau gesplitst op rantsoen.



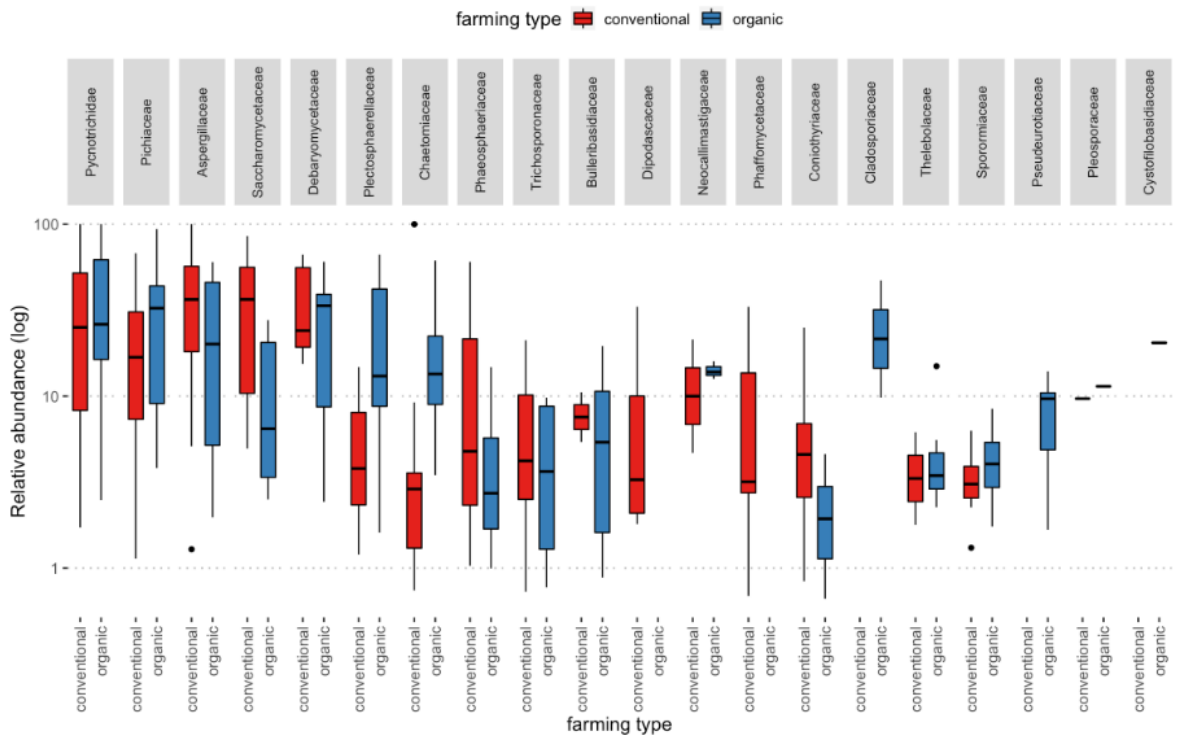
Figuur S7: Gemiddelde schimmelmicrobioom op fylumniveau gesplitst op geen antibiotica en twee antibioticafamilies.



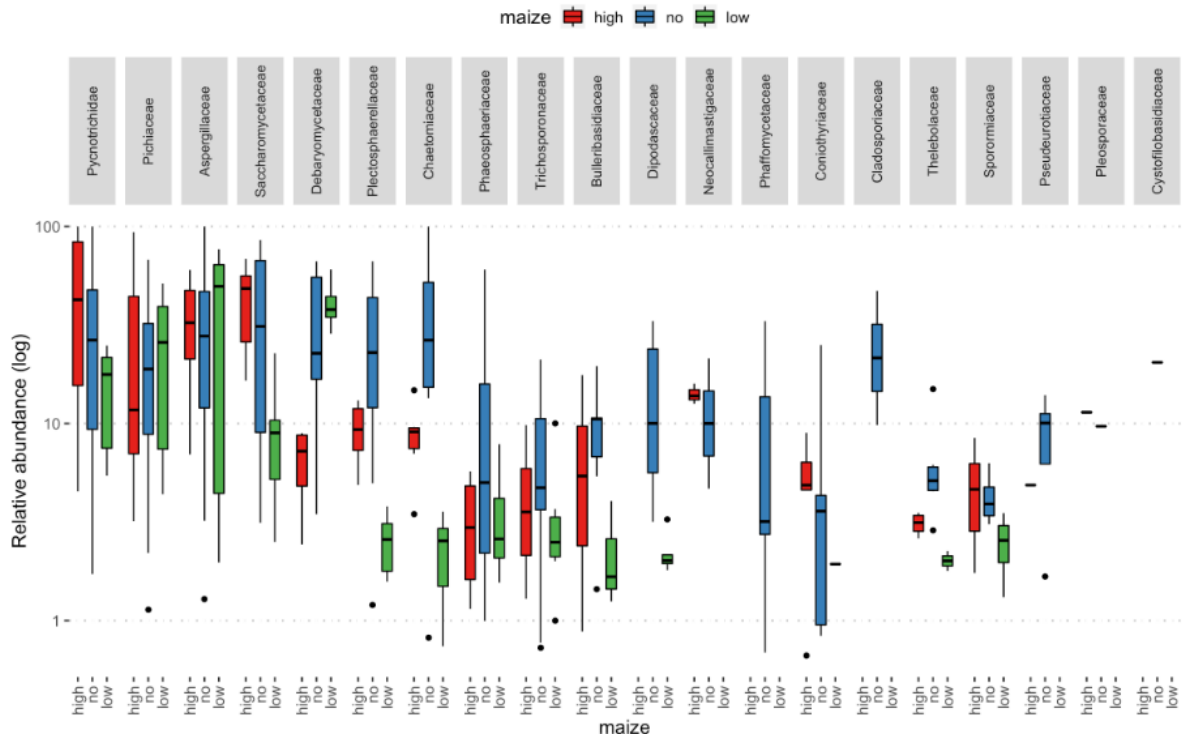
### Top families per farming type



### Top families per farming type



### Top families per diet



### Top families per antibiotic treatment

