

Gemeinsame Weidehaltung von Schweinen und Hühnern unter  
besonderer Berücksichtigung der Übertragung von Zoonoseerregern

von Emma Charlotte Kaeder

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

Gemeinsame Weidehaltung von Schweinen und Hühnern unter besonderer Berücksichtigung  
der Übertragung von Zoonoseerregern

von Emma Charlotte Kaeder  
aus Dortmund

München 2024



Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit und -analytik

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Karin Schwaiger  
Mitbetreuung durch: Dr. Samart Dorn-In



Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.  
Berichterstatterin: Univ.-Prof. Dr. Karin Schwaiger  
Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. Susanne Zöls

Tag der Promotion: 10. Februar 2024



*Meinem Mann und meinem Sohn*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Begriffe und Definitionen .....</b>	<b>11</b>
2.1.1	Tierwohl .....	11
2.1.2	Artgemäße Tierhaltung .....	11
2.1.3	Nachhaltige Landwirtschaft .....	12
2.1.4	Tierschutzgesetz.....	12
2.1.5	Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung.....	13
<b>2.2</b>	<b>Haltungssysteme für Schweine und Geflügel .....</b>	<b>14</b>
2.2.1	Konventionelle Tierhaltung bzw. intensive Tierhaltung.....	14
2.2.2	(Konventionelle) Freilandhaltung.....	16
2.2.3	Ökologische Tierhaltung.....	17
2.2.4	Gemeinsame (symbiotische) Weidehaltung .....	19
<b>2.3</b>	<b>Potenzielle Erregerübertragung bei gemeinsamer Haltung von Schweinen und Hühnern.....</b>	<b>20</b>
2.3.1	Potenzielle Krankheitsübertragung.....	20
2.3.2	Ausgewählte Bakterien zur Überprüfung eines Erregeraustauschs.....	21
2.3.2.1	<i>Escherichia (E.) coli</i> .....	21
2.3.2.2	<i>Campylobacter</i> spp.....	21
2.3.2.3	<i>Salmonella (S.)</i> spp.....	22
<b>2.4</b>	<b>Nachweismöglichkeiten des Erregeraustausches zwischen verschiedenen Tierarten .....</b>	<b>24</b>
2.4.1	Kultureller Nachweis .....	24
2.4.2	Massenspektrometrie .....	24
2.4.3	Infrarotspektrometrie .....	25
2.4.4	Genanalyse.....	27
<b>3</b>	<b>Publikation .....</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>47</b>

---

<b>4.1</b>	<b>Überprüfung eines Erregeraustauschs zwischen Schwein und Huhn ..</b>	<b>47</b>
4.1.1	<i>Escherichia coli</i> .....	47
4.1.2	<i>Campylobacter</i> spp.....	49
4.1.3	<i>Salmonella</i> spp. ....	51
<b>4.2</b>	<b>Tierwohl, artgemäße und nachhaltige Nutztierhaltung .....</b>	<b>51</b>
<b>4.3</b>	<b>Konsequenzen für die gemeinsame Weidehaltung.....</b>	<b>54</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>Summary.....</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>60</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>71</b>

## Abkürzungsverzeichnis

BBodSchG	Bundes-Bodenschutzgesetz
<i>C. spp.</i>	<i>Campylobacter spp.</i>
EAEC	enteroaggregative <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	enterohämorrhagische <i>E.coli</i>
EIEC	enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
etc.	et cetera
ETEC	enterotoxigene <i>E. coli</i>
EU	Europäische Union
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
GVO	gentechnisch veränderte Organismen
H-Antigen	Geißel-Antigen
ha	Hektar
LC	Liquid-Chromatographie
MALDI-TOF	Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung mit Flugzeitanalyse
Mio	Millionen
MS	Massenspektrometer
O-Antigen	Oberflächen-Antigen
o.Ä.	oder Ähnliche
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFGE	Pulsfeld-Gel- Elektrophorese

---

sp.	Spezies (Einzahl)
spp.	Spezies (Mehrzahl)
ssp.	Subspezies
TierSchG	Tierschutzgesetz
TierSchNutztV	Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung
µm	Mikrometer
u.a.	unter anderem

## 1 Einleitung

Die Fleischwirtschaft gewinnt in den vergangenen Jahren immer mehr das Interesse der Gesellschaft. Ausgelöst unter anderem durch Skandale mit Schlagwörtern wie Schweinepest, „Gammelfleisch“ oder BSE setzen sich die Verbraucher vermehrt kritisch mit der Primärproduktion sowie mit den nachgelagerten Stufen auseinander. Neben der Produktqualität und Warensicherheit geht es hierbei vor allem auch um soziale und ethische Aspekte der Tierhaltung (Becker und Oppermann, 1994; Christoph-Schulz, 2018; Jochemsen, 2013). In dieser anhaltenden Debatte in modernen Industriegesellschaften geht es vor allem um die Art und Weise, wie Tiere in der Landwirtschaft behandelt werden (Brumfiel, 2008).

Durch das gesteigerte gesellschaftliche und auch mediale Interesse der westlichen Industrieländer an der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung wird diese mehr und mehr kritisch hinterfragt (Busch und Kunzmann, 2004; Fraser et al., 1997; Keeling et al., 2013). Das Thema Tierwohl ist damit auch zu einem politisch kontrovers diskutierten Thema geworden, welches verschiedene Konfliktlinien berührt (Jansen und Vellema, 2004).

Nicht nur ein Großteil der Verbraucher steht der jetzigen Form der Tierhaltung kritisch gegenüber, sondern auch der agrarpolitische Beirat des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft hält einen Hauptteil der konventionellen Haltungsformen auf lange Sicht für nicht zukunftsfähig. Das im Jahre 2015 veröffentlichte Gutachten, „Wege einer gesellschaftlich akzeptierten Nutztierhaltung“, ist bis heute ein Bezugspunkt der geführten Tierwohl-Debatten. Neben den erheblichen Defiziten im Bereich Tierschutz werden auch Defizite im Bereich des Umweltschutzes dargelegt und „tiefgreifende Änderungen“ gefordert (Wissenschaftlicher Beirat Agrarpolitik beim BMEL, 2015). Eine Umfrage des BMEL zeigte, dass insbesondere die Erwartung an eine artgerechte Tierhaltung mit 70 % sehr hoch ist. Dafür sei eine Mehrheit der Befragten auch bereit, mehr zu zahlen (90 % der Frauen und 85 % der Männer) (BMEL, 2021).

Die Nutztierhaltung in Deutschland bietet in weiten Teilen ein hohes Verbesserungspotential im Bereich des Tierschutzes. Dieses Wissen und eine veränderte Mensch-Tier-Beziehung haben zu einem kritischen Umdenken geführt. Eine breite Zustimmung in der Bevölkerung findet vor allem die Forderung nach einem sorgsamem und respektvollen Umgang mit Tieren und die Möglichkeit zur Ausübung eines artgerechten Verhaltens (European Commission,

2007; Wissenschaftlicher Beirat Agrarpolitik beim BMEL, 2015). Hinzu kommt, dass die Fleischproduktion einen großen Anteil der deutschen Wirtschaft einnimmt. Im Rekordjahr 2016 wurden insgesamt 8,3 Millionen Tonnen Fleisch in gewerblichen Schlachthöfen produziert. Der Fleischkonsum in Deutschland ist im Jahr 2022 zwar zurückgegangen (Statistisches Bundesamt, 2023a); dennoch bleibt Deutschland weiterhin einer der größten Fleischproduzenten und -exporteure weltweit (BLE, 2020a). Aber auch hier zeigt sich insgesamt ein Abwärtstrend, in den letzten fünf Jahren reduzierte sich die Menge an exportiertem Fleisch um 19,3 % (Statistisches Bundesamt, 2023b).

Dieses Zusammenspiel zwischen dem Anspruch an den Tierschutz, dem wirtschaftlichen Stellenwert und die Frage nach mehr Nachhaltigkeit (Niggli, 2018) hat dazu geführt, dass eine Mehrheit von 87 % der Deutschen eine Überprüfung und Verbesserung der Standards im Bereich des Tierwohls für erforderlich hält (BMEL, 2017). Aufgrund dieser Entwicklung ist es wichtig, auf die Veränderung in der Wahrnehmung der Gesellschaft zu reagieren und neue Möglichkeiten in der Tierhaltung zu schaffen (BLE, 2020b).

Durch die gemeinsame Haltung von verschiedenen Tierarten, z.B. von Schweinen und Hühnern auf einer Weide, könnten tierschutzrelevante Symbioseeffekte genutzt und die Nachhaltigkeit in der Tierhaltung erhöht werden. Jedoch kommt gleichzeitig die Frage auf, ob diese Haltungsform zu einem erhöhten Austausch von Krankheitserregern führt. Sollte ein erhöhtes Risiko bestehen, könnte dies in der Folge das gewonnene Lebensmittel negativ beeinflussen und somit im Falle zoonotischer Erreger eine erhöhte Gefahr für den Verbraucher darstellen. Ziel des Projekts war es deshalb, herauszufinden, inwieweit die gemeinsame Haltung von Schweinen und Hühnern einen Einfluss auf die Übertragung von Mikroorganismen hat. Die Erkenntnisse sollten dazu dienen, den gesetzlich garantierten Verbraucheranspruch „Lebensmittelsicherheit“ zu gewährleisten.

## 2 Literatur

### 2.1 Begriffe und Definitionen

#### 2.1.1 Tierwohl

Der Begriff „Tierwohl“ wird in verschiedenen Diskussionen nicht einheitlich verwendet. Im Wesentlichen bezieht sich der Ausdruck "Tierwohl" auf den Zustand eines Tieres in Bezug auf sein Wohlbefinden und die Erfüllung seiner individuellen Bedürfnisse. Das erklärte Ziel des Tierschutzes ist es, dieses Tierwohl zu erreichen (Fraser, 2018; Reymann, 2016). Der Begriff ist vergleichbar mit Schlagwörtern wie „Wohlergehen“ und „Wohlbefinden“ (Broom und Fraser, 2015). Für die Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft (DLG) beinhaltet Tierwohl als Ziel das arttypische Verhalten, Tiergesundheit und das Wohlbefinden der Tiere. Der Begriff lässt sich dementsprechend vom englischen Begriff „animal welfare“ ableiten (Brown und Winnicker, 2015; HOY, 2016).

In den 1980er-Jahren entwickelte der britische Farm Animal Welfare Council (FAWC) das Konzept der "Fünf Freiheiten", welches als Grundlage für verschiedene Mess- und Bewertungssysteme zur Beurteilung des Tierwohls in der Tierhaltung dient. Dieses Konzept bietet einen Ansatz zur praktischen Erfassung und Bewertung des Wohlbefindens von Tieren in der Tierhaltung und umfasst folgende fünf Freiheiten (FAWC, 2009)

1. Freiheit von Hunger und Durst
2. Freiheit von haltungsbedingten Beschwerden
3. Freiheit von Schmerz, Verletzungen und Krankheiten
4. Freiheit von Angst und Stress
5. Freiheit zum Ausleben normaler Verhaltensmuster

#### 2.1.2 Artgemäße Tierhaltung

Der Begriff „artgemäß“ wird verwendet, um zu beschreiben, dass Tiere in Übereinstimmung mit ihren natürlichen Bedürfnissen und Verhaltensweisen gehalten werden können. Ein artgemäßes Haltungssystem ist eine Umgebung, die dem biologischen Typus der jeweiligen Tierart entspricht und es den Tieren ermöglicht, ihr normales Verhalten in verschiedenen Bereichen wie Nahrungsaufnahme, Komfort, Ruhe und sozialem Verhalten auszuleben,

während sie gesund und unverletzt bleiben. Unter diesen Bedingungen wird angenommen, dass sich die Tiere wohlfühlen, was die Grundlage für eine nachhaltig hohe Leistungsfähigkeit bildet (Laister, 2003).

### **2.1.3 Nachhaltige Landwirtschaft**

Nach der allgemeinen Definition im Duden bedeutet Nachhaltigkeit, dass etwas auf die Zeit bezogen eine länger andauernde Wirkung hat. Konkretisiert auf die Ökologie wird es mit der Definition, dass nicht mehr verbraucht werden darf, als jeweils nachwächst, sich regenerieren oder künftig wieder bereitgestellt werden kann (Duden, 2023). Ziel sollte sein, dass die Bedürfnisse der Gegenwart so befriedigt werden, dass die zukünftigen Generationen in ihren Möglichkeiten nicht eingeschränkt werden (BMZ, 2023). Der Begriff der Nachhaltigkeit besteht seit über 300 Jahren und wurde erstmals in der Forstwirtschaft verwendet und praktisch verknüpft. Bei einer nachhaltigen Waldnutzung darf demzufolge nur so viel abgeholzt werden, wie auch neu gepflanzt wird. Als Leitbild wird die Nachhaltigkeit seit der UN-Umweltkonferenz 1992 in Rio weltweit anerkannt. Für eine nachhaltige Entwicklung müssen die drei Säulen - die ökologische Verträglichkeit, die soziale Gerechtigkeit und die wirtschaftliche Leistungsfähigkeit - in Einklang gebracht werden (BLE, 2023c).

Das Ziel einer nachhaltigen Landwirtschaft ist es, die Ernährung der Bevölkerung zu decken, ohne die eigenen Produktionsgrundlagen zu zerstören (BLE, 2023c). Der Boden spielt hierbei eine wichtige Rolle, da er eine Vielzahl wichtiger Funktionen im Bereich der Landwirtschaft erfüllt. So stellt er u.a. den Lebensraum für die gehaltenen Tiere; er ist Teil des Wasser- und Nährstoffkreislaufes und stellt ein Abbaumedium da. Rechtlich ist die Nutzung von Böden in Deutschland allgemein im Bundes-Bodenschutzgesetz (BBodSchG) geregelt. Es wird u.a. dort geregelt, dass es ein generelles Gebot zur Vorsorge vor schädlichen bodenverändernden Tätigkeiten gibt (§ 7). Bei landwirtschaftlicher Nutzung müssen hinreichende Kenntnisse der Bodenfunktion und Bodeneigenschaften vorliegen (Ehrnsberger, 2000).

### **2.1.4 Tierschutzgesetz**

Erstmalig formuliert wurde das Tierschutzgesetz in der Bundesrepublik Deutschland 1972 als Vorläufer des aktuell geltenden Gesetzes. Mit der Aufnahme des Tierschutzes als Staatsziel ins Grundgesetz (Art. 20 a GG) war das TierSchG nicht mehr nur ein einfaches Gesetz, sondern

eine Verfassungsnorm mit rechtlich bindender Wirkung. Die Erfüllung dieser Staatsziele schreiben bestimmte inhaltliche Gestaltungskonzepte mit Absichten und Zielen für die Gesellschaft vor, die in der Regel als Verfassungsauftrag formuliert sind. Allerdings sind sie, anders als Grundrechte, nicht rechtlich einklagbar (Schubert, 2020). Am 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313) ist das aktuell geltende TierSchG in Kraft getreten (zuletzt geändert am 20. Dezember 2022 (BGBl. I S. 2752)) (Herzog, 2018). Der Zweck des Gesetzes besteht laut § 1 darin, das Leben und Wohlbefinden der Tiere, welche als Mitgeschöpfe definiert sind, zu schützen. Demnach dürfen keinem Tier ohne vernünftigen Grund Schmerzen, Leiden oder Schäden zufügt werden. Dabei ist das Rechtsgut im ethischen Sinne die Beziehung zwischen Mensch und Tier, allerdings lassen sich aus der einleitenden Bestimmung keine konkreten Verhaltenspflichten ableiten. Sollte das Gesetz verschiedene Interpretationen zulassen, soll nach Satz 1 immer die tierfreundlichere Auslegung getroffen werden (Erbs et al., 2022a). Der § 2 des TierSchG befasst sich mit den Menschen, welche Tiere halten, betreuen oder zu betreuen haben; diese Begriffe lassen sich unter dem Oberbegriff der „Obhut“ zusammenfassen. Hierbei ist es gleichgültig, ob diese Betreuung nur kurzfristig vorgesehen oder vorgeschrieben ist. Jeder Mensch, der ein Tier in Obhut hat, muss sich an die Pflichten des Tierschutzrechtes halten (Erbs et al., 2022b). Den Tieren gegenüber haben alle entsprechenden Personen die Pflicht, sie ihrer Art und ihren Bedürfnissen entsprechend zu pflegen, zu ernähren und verhaltensgerecht unterzubringen. Sie dürfen die Tiere in ihrer artgemäßen Bewegung auch nicht so einschränken, dass ihnen Schmerzen, vermeidbare Schäden oder Leiden zugefügt werden. In den weiteren 20 Paragraphen des Gesetzes sind u.a. die Tötung von Tieren, die Tierhaltung, Eingriffe und Versuche an Tieren sowie Regelungen zur Zucht und zum Handel mit Tieren geregelt (Lorz und Metzger, 2019).

### **2.1.5 Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung**

Die Haltung von Nutztieren wird konkretisiert in der „Verordnung zum Schutz landwirtschaftlicher Nutztiere und anderer zur Erzeugung tierischer Produkte gehaltener Tiere bei ihrer Haltung“ (kurz: TierSchNutzV). Sie dient der Umsetzung verschiedener europäischer Rechtsakte:

1. Richtlinie 98/58/EG des Rates vom 20. Juli 1998 über den Schutz landwirtschaftlicher Nutztiere

2. Richtlinie 91/629/EWG des Rates vom 19. November 1991 über Mindestanforderungen für den Schutz von Kälbern
3. Richtlinie 1999/74/EG des Rates vom 19. Juli 1999 zur Festlegung von Mindestanforderungen zum Schutz von Legehennen
4. Richtlinie 91/630/EWG des Rates vom 19. November 1991 über Mindestanforderungen für den Schutz von Schweinen
5. Richtlinie 2007/43/EG des Rates vom 28. Juni 2007 mit Mindestvorschriften zum Schutz von Masthühnern

Nutztiere sind im Sinne der Verordnung landwirtschaftlich gehaltene Tiere, welche der Erzeugung von Nahrungsmitteln, Wolle, Häuten oder Fellen oder anderen landwirtschaftlichen Zwecken dienen. Eingeschlossen sind außerdem diejenigen Tiere, dessen Nachzucht zu diesem Zwecke gehalten wird (Erbs et al., 2022c).

## 2.2 Haltungssysteme für Schweine und Geflügel

### 2.2.1 Konventionelle Tierhaltung bzw. intensive Tierhaltung

Mit dem Begriff der „konventionellen Tierhaltung“ ist im Folgenden die Art der Tierhaltung gemeint, welche sich an den Mindestanforderungen der TierSchNutztV orientiert. Die konventionelle Landwirtschaft ist im Gegensatz zur ökologischen Landwirtschaft kosten- und zeitsparender, was zur Folge hat, dass die Produkte günstiger an den Verbraucher abgegeben werden können. Durch weniger bis keinen Zugang zum Freien ist das Risiko eines Befalls mit Parasiten oder anderen von Wildtieren übertragbaren Krankheiten, deutlich geringer. Durch den Zukauf von Futter ohne Regulierungen der Regionalität sind keine saisonalen und wetterbedingten Qualitätsunterschiede zu erwarten. Außerdem kann durch eine strikte Stallhaltung jedes Einzeltier deutlich einfacher überwacht werden (Haas, 2003; Niggli und Fließbach, 2009).

#### a) Schweine

Die gesetzliche Grundlage zur Haltung von Mastschweinen ist in der Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung verankert. In Bezug auf die Mindestanforderungen für den Schutz der Schweine setzt sie die EU-Richtlinie 91/630/EWG um. Bei Mastschweinen handelt es sich um Tiere der Art *Sus scrofa f. domestica*, welche zur Schlachtung bestimmt sind und älter als 10 Wochen sind (Erbs et al., 2022c).

In Abschnitt 5 der Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung werden detailliert die Vorgaben der Schweinehaltung im Allgemeinen angegeben (Schweine, Saugferkel, Jungsauen und Sauen). Im Hinblick explizit auf Schweine werden im § 22 die allgemeinen Anforderungen an die Haltungseinrichtungen definiert. So müssen Schweine Sichtkontakt mit Artgenossen haben, gleichzeitig ungehindert liegen und eine natürliche Körperhaltung einnehmen können. Sie dürfen nicht mehr als unbedingt nötig mit Exkrementen in Kontakt kommen; ihnen muss ein trockener Liegebereich zur Verfügung stehen und es muss die Möglichkeit geben, dass bei hohen Temperaturen die Wärmebelastung der Tiere verringert wird.

Bei Mastschweinen ist zudem eine Gruppenhaltung vorgeschrieben, bei dem jedem Schwein eine definierte nutzbare Bodenfläche zur Verfügung steht, welche abhängig von dem jeweiligen Körpergewicht des Tieres ist (BMJV, 30.6.2017). Der § 26 gibt zusätzlich die allgemeinen Anforderungen an das Halten der Schweine an. Demnach muss jedem Schwein u.a. jederzeit Zugang zu gesundheitlich unbedenklichen und in ausreichender Menge vorhandenem Beschäftigungsmaterial gegeben werden. Dieses muss vom Schwein untersucht werden können und veränderbar sein. Den Schweinen muss jederzeit Zugang zu Wasser in ausreichender Menge und Qualität zur Verfügung stehen (bei Gruppenhaltung getrennt zur Futterstelle). Die Grenzwerte für die Luftqualität und den Geräuschpegel sind außerdem in diesem Paragraphen geregelt.

### **b) Geflügel**

Wie bei den Mastschweinen wird auch die Haltung von Masthühnern über die Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung geregelt, welche die EU-Richtlinie 2007/43/EG umsetzt. Diese gilt für Masthühnerhaltungen ab einer Bestandsgröße von 500 Tieren. Ausgenommen hiervon sind Hühner, welche in extensiver Bodenhaltung (VO (EG) Nr. 843/2008) oder in ökologischer Haltung nach VO (EG) Nr. 834/2007 gehalten werden. Masthühner sind im Sinne des Gesetzes Tiere der Art *Gallus gallus*, welche zum Zwecke der Fleischerzeugung gehalten werden (Erbs et al., 2022c).

Laut der Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung ist eine maximale Besatzdichte von 35 Kilogramm Lebendgewicht pro Quadratmeter zulässig; meist erfolgt diese Form der Haltung in geschlossenen Ställen mit Belüftungsanlagen (BMJV, 30.6.2017). Die RL 2007/43/EG (EU-Masthühnerrichtlinie) sieht in Art. 3 Abs. 2 eine Besatzdichte von max. 33 kg Lebendgewicht pro Quadratmeter vor, allerdings darf bei festgelegten Mindestkriterien

eine Erhöhung der Besatzdichte auf 39 kg/qm<sup>2</sup> vorgenommen werden (Art. 3 Abs. 4 RL 2007/43/EG). Von den ungefähr 60 Mio. gleichzeitig lebenden Masthühnern werden in Deutschland mehr als zwei Drittel in Ställen mit einer Besatzdichte von über 50.000 Tieren gehalten, knapp die Hälfte in Besatzgrößen von über 200.000 Tieren. Bei der sogenannten Kurzmast leben in der Endphase der Mast 22 - 24 Tiere auf einem Quadratmeter Stallfläche. Der Boden wird ausgelegt mit gehäckseltem Stroh, Strohpellets, Hobelspänen oder Sägemehl, allerdings wird während der Mast in der Regel nicht nachgestreut. Neben den Tränkelinien und Futterbahnen müssen den Hühnern keine weiteren Strukturelemente angeboten werden (wie Strohbällen, Sitzstangen o.Ä.). Man geht in der EU von jährlich ungefähr 5,3 Milliarden geschlachteten Masthühnern aus der konventionellen Haltung aus (Hirt, 2023).

### **2.2.2 (Konventionelle) Freilandhaltung**

Grundlegend unterscheidet sich die ökologische von der konventionellen Haltung in den Regeln bezüglich des Futters, des Zukaufs von Tieren, der Säugezeit und der medizinischen Behandlung. Abgesehen von den Regeln der EG-Öko-Verordnung lässt sich die Freilandhaltung bei ausreichendem Flächenangebot schnell und kostengünstig umsetzen. Es muss allerdings beachtet werden, dass mit dem Mehr an Fläche auch mit einem höheren Arbeitsaufwand zu rechnen ist (Klöble, 2010). Die Tiere sind allen Witterungsbedingungen ausgesetzt, und es besteht eine erhöhte Gefahr von Parasitenbefall (Hörning et al., 2011).

#### **a) Schweine**

Bei Schweinen ist es wichtig, die Tiere so einzuzäunen, dass eine Übertragung von Krankheiten über Wildtiere verhindert wird. So muss laut der Schweinehygiene-VO jede Freilandhaltung von einem doppelten Zaun umgeben sein. Zwischen den beiden Zäunen muss ein Mindestabstand von drei bis fünf Metern eingehalten werden. Die Höhe und die Art des Einbaus des Zauns wird jeweils auf Länderebene geregelt. Bezüglich des Futters muss gerade im Winter der Wärmeverlust mit einberechnet werden, welcher etwa 200 bis 300 kg Futter je Tier im Jahr entspricht (Hörning et al., 2011). Den Schweinen sollte eine Weidemöglichkeit geschaffen werden, um für eine bessere Beschäftigung zu sorgen und eine bessere Nährstoffversorgung zu ermöglichen. Allerdings darf bei Schweinen die Besatzdichte nicht zu hoch sein, und es muss ein regelmäßiger Flächenwechsel

vorgenommen werden, da der Bewuchs sonst zerstört wird. Bezüglich der Einzeltierbehandlung ist es wichtig, dass die Tiere an den Umgang mit Menschen gewöhnt sind und es eine Möglichkeit des Lockens beispielsweise mit Futter in Behandlungsstände oder Transportwagen gibt, da sich Schweine nur eingeschränkt treiben lassen (Martin und Edwards, 1994).

#### **b) Geflügel**

Die Geflügelhaltung in mobilen Ställen ist eine Möglichkeit, den Hühnern den Zugang zum Freilauf zu ermöglichen. Der große Vorteil hierbei liegt in der Möglichkeit, den Standort flexibel zu verändern, um den Tieren einen immer grünen Auslauf zu ermöglichen und den Keim- und Parasitendruck möglichst gering zu halten. Aber auch hier ist zu erwähnen, dass diese Art der Haltung vermehrt bei Legehennen angewendet und verknüpft mit der ökologischen Haltung wird (Pfeifer und Ossowski, 2021).

### **2.2.3 Ökologische Tierhaltung**

Die ökologische Tierhaltung ist Teil des ökologischen Landbaus und damit gekoppelt an den Pflanzenbau und die Bodenfruchtbarkeit. Durch diese Verknüpfung soll die Bodenfruchtbarkeit erhalten bzw. weiter erhöht werden. Die Voraussetzung für eine ökologische Tierhaltung ist, dass die jeweiligen Bauern auch landwirtschaftliche Flächen bewirtschaften. Die Zahl der Tiere ist mit 170 kg Stickstoff pro Jahr und Hektar immer flächengebunden. Des Weiteren dürfen die Tiere ausschließlich mit ökologisch erzeugtem Futter und nicht mit gentechnisch veränderten Organismen oder Stoffen, die aus GVO produziert wurden, gefüttert werden (BZL, 2023). Die ökologische Tierhaltung bietet viele verschiedene Vorteile. Das erhöhte Platzangebot und die Beschäftigungsmöglichkeiten sorgen für mehr Tierwohl. Es werden Nahrungsmittel produziert, bei denen auf Gentechnik verzichtet und die Gabe von Antibiotika deutlich eingeschränkt wird. Die ökologische Landwirtschaft engagiert sich für den Schutz von Böden und Gewässern sowie die Bewahrung der Artenvielfalt. Langfristig trägt sie dazu bei, die negativen Auswirkungen auf das Klima zu reduzieren (Haas, 2003; Niggli und Fließbach, 2009).

**a) Schweine**

Die ökologische Schweinehaltung wird über die EG-Öko-Basisverordnung (EG) Nr. 834/2007 und die Durchführungsvorschrift VO (EG) Nr. 889/2008 geregelt.

Für Tiere aus ökologischer Schweinehaltung gilt laut der EG-Öko-Basisverordnung inkl. Durchführungsbestimmungen (VO (EG) 2018/848), dass die Tiere über Liegeflächen verfügen müssen, welche bequem, sauber, trocken und mit natürlicher Einstreu ausgelegt sind. Wie auch in der konventionellen Haltung muss für ausreichend Tageslicht und eine natürliche Belüftung gesorgt sein, und die Tiere müssen ungehinderten Zugang zum Fressplatz und zu den Tränken haben. Des Weiteren ist vorgeschrieben, dass die Tiere Weide- oder Freigeländezugang haben und über Bewegungsflächen zum Misten und Wühlen verfügen (BLE, 2020b). Mastschweinebetriebe müssen Ihre Tiere aus ökologischen Sauen-Betrieben kaufen, und es werden vorwiegend robuste, stresstolerante Rassen eingesetzt (BLE, 2023a).

**b) Geflügel**

Bei der ökologischen Geflügelmast müssen laut der Verordnung (EG) Nr. 2018/848 die Tiere bis zu einem gewissen Mindestalter aufgezogen werden oder es muss sich um langsam wachsende Rassen handeln. Bei der Haltung müssen folgende Mindestanforderungen erfüllt sein: Die Tiere müssen über ein Drittel der Lebensdauer uneingeschränkten Zugang zu einem Freigelände haben (Ausnahme: unionsrechtliche Beschränkungen). Der Geflügelstall muss mindestens zu einem Drittel der Bodenfläche über einen festen Boden verfügen. Der Stall muss über Sitzstangen oder erhöhte Sitzebenen, über eine Grünauslauffläche und einen Kaltscharrraum verfügen. Zusätzlich gilt, dass der Stall mit Streumaterial in Form von Stroh, Holzspänen, Sand oder Torf ausgelegt sein muss (BLE, 2020b). Ein Stallabteil darf höchstens mit einer Besatzdichte von 4.800 Masthühnern belegt werden. Außerdem gilt eine Besatzobergrenze von 21 kg Lebendgewicht pro nutzbarem Quadratmeter Stallfläche. Das Futter darf ausschließlich aus ökologischer Erzeugung stammen, von dem mindestens 30 % aus eigener Erzeugung stammen müssen (sollte dies nicht verfügbar sein, muss es aus einem Betrieb der gleichen Region bezogen werden) (BLE, 2023b).

**Tabelle 1: Schweine- und Geflügelbestände 2020 in konventioneller und ökologischer Haltung (Statistisches Bundesamt, 2021)**

Jahr 2020	Anzahl [n] der gehaltenen Tiere (ökologisch und konventionell)	Anzahl [n] der Betriebe (ökologisch und konventionell)	Anteil [%] der ökologisch gehaltenen Tiere
Schweine	26 299 994	31 852	0,8 %
Hühner	159 118 147	49 388	5,2 %

#### 2.2.4 Gemeinsame (symbiotische) Weidehaltung

Bei dieser Symbiose handelt es sich um eine Allianz, also eine lockere „Partnerschaft“, bei der die beiden Arten zwar den Vorteil der gemeinsamen Haltung haben, aber nicht lebensnotwendigerweise auf ihren Kooperationspartner angewiesen sind (Kompaktlexikon der Biologie, 2001).

Zu den Vorteilen der symbiotischen Haltung von Hühnern und Schweinen zählt beispielsweise, dass durch das Aufwühlen des Bodens durch die Schweine den Hühnern ein besserer Zugang zu Regenwürmern und anderem Futter ermöglicht wird. Die Hühner ihrerseits können den Schweinen Schutz vor Ektoparasiten bieten. Außerdem können die Hühner geschützt werden, da die Schweine ihnen Schutz vor Raubtieren wie Füchsen und Mardern sowie vor Raubvögeln wie dem Habicht bieten (Herrmannsdorfer Landwerkstätten Glonn GmbH & Co. KG, 2020).

Neben all diesen Vorteilen gibt es allerdings auch mögliche negative Effekte bezüglich des Verbraucherschutzes. Einen wichtigen Aspekt stellt hier im Hinblick auf die Lebensmittelsicherheit die Übertragung von Zoonoseerregern dar (Abebe et al., 2020).

Sollte es nun durch das Zusammenleben von Hühnern und Schweinen zu einem vermehrten Austausch der Pathogene kommen, rückt zeitgleich die Frage in den Vordergrund, ob dies auch zu einer Potenzierung des Risikos einer Erregerübertragung führen kann. Am Beispiel der Campylobacteriose lässt sich die Problematik verdeutlichen: Hierbei handelt es sich um die häufigste bakterielle, meldepflichtige Krankheit in Deutschland. Die Infektion beim Menschen ist hauptsächlich lebensmittelbedingt. Die häufigste Ursache für einen Ausbruch einer Campylobacter-Enteritis stellt die Infektion mit *Campylobacter (C.) jejuni*, gefolgt von *C. coli* dar (RKI, 2019). Obwohl die beiden o. g. Spezies nicht obligat an einen Wirt gebunden sind, werden *C. coli* häufiger bei Schweinen und *C. jejuni* vermehrt bei Hühnern nachgewiesen

(Rosner, 2017). Infolgedessen wäre das Übertragungsrisiko auf Lebensmittel erhöht und würde so zu einer erhöhten Gefahr für den Verbraucher führen - gerade auch im Hinblick auf die Tatsache, dass hierzu noch kaum wissenschaftliche Studien verfügbar sind (Boes et al., 2005).

## **2.3 Potenzielle Erregerübertragung bei gemeinsamer Haltung von Schweinen und Hühnern**

### **2.3.1 Potenzielle Krankheitsübertragung**

Wie im Kapitel der gemeinsamen Weidehaltung (Kapitel 2.2.4) angeschnitten, kann eine gemeinsame Haltung von verschiedenen Tierarten (hier Schweine und Hühner) potenziell zu einer Übertragung von verschiedenen Erregern führen. Weiterführend haben einige Mikroorganismen zoonotischen Charakter, was bedeutet, dass sie von Tieren auf den Menschen übertragen werden können. Dieser Aspekt gewinnt besondere Bedeutung, vor allem wenn diese Mikroorganismen über Kontaminationen in Lebensmittel gelangen und somit die Lebensmittelsicherheit gefährden.

Die häufigsten Zoonosen, die durch Lebensmittel übertragen werden, sind auf Erreger wie *Campylobacter*, *Salmonella*, *Yersinia*, *E. coli* und *Listeria* zurückzuführen. Lebensmittelbedingte Zoonosen stellen eine erhebliche und weit verbreitete Gefahr für die öffentliche Gesundheit auf globaler Ebene dar. In der Europäischen Union werden jährlich über 350.000 Fälle beim Menschen gemeldet, doch es wird angenommen, dass die tatsächliche Zahl noch höher liegt (EFSA, 2022, 2023).

Desweiteren können aber auch weitere Mikroorganismen sowohl bei Schweinen als auch bei Hühnern auftreten, wie *Erysipelothrix rhusiopathiae* und Bakterien des *Mycobacterium avium intracellulare*-Komplexes (BfR, 2009; LGL, 2012; Opriessnig et al., 2020; RKI, 2000, 2009, 2019). Bei der Freilandhaltung ist zusätzlich zu beachten, dass es durch Wildvögel zu einem Erkrankungsausbruch durch Influenzaviren kommen kann. Auf der einen Seite können hochpathogene Influenzaviren zu einer hohen Sterblichkeitsrate in Geflügelbeständen führen und somit eine enorme wirtschaftliche Gefahr für Landwirte darstellen. Auf der anderen Seite können Schweine sich mit Vogel-, Menschen- und Schweine-Influenzaviren anstecken, diese

auch gleichzeitig in sich tragen und so neue Virenvarianten hervorbringen. Menschen können sich sowohl mit den aviären als auch mit den porcinen Influenzaviren infizieren (RKI, 2023).

## **2.3.2 Ausgewählte Bakterien zur Überprüfung eines Erregeraustauschs**

### **2.3.2.1 *Escherichia (E.) coli***

*Escherichia (E.) coli* sind ubiquitär vorkommende, gramnegative, fakultativ pathogene, begeißelte Stäbchenbakterien. Aufgrund ihrer optimalen Wachstumstemperatur von 37 °C kommen *E. coli* vor allem im menschlichen sowie im tierischen Darm vor (Kayser et al., 2005), können jedoch an das Überleben in Böden wenig angepasst werden (Xing et al., 2019). *E. coli* können eingeteilt werden in nicht-pathogene, kommensale, intestinal-pathogene und extraintestinale-pathogene Stämme. Auch wenn kommensale *E. coli* bei gesunden Menschen nicht pathogen sind, können sie bei Menschen mit geschwächtem Immunsystem Krankheiten verursachen (Amara et al., 1995; Mercer et al., 1971). Es gibt eine große, teilweise nicht einheitlich benannte Anzahl an pathogenen *E. coli*. Einige der bekanntesten pathogenen *E. coli*-Stämme umfassen EHEC (enterohämorrhagische *E. coli*) (Martins et al., 2022), EPEC (enteropathogene *E. coli*) (Cleary et al., 2004), ETEC (enterotoxigene *E. coli*) (Huang et al., 2006), EIEC (enteroinvasive *E. coli*) und EAEC (enteroaggregative *E. coli*) (Hebbelstrup Jensen et al., 2014). Jeder dieser Stämme kann verschiedene Krankheiten verursachen und unterschiedliche Symptome hervorrufen. Durch ein sehr flexibles Genom, welches genetische Informationen auch horizontal erwirbt, ergibt sich eine schnelle Evolution von Varianten (Dobrindt, 2005). Innerhalb der genetischen Spezies *E. coli* zeigt sich eine große Heterogenität in der Größe des jeweiligen Genoms (von 4,66 Millionen Basenpaare bis 5,3 Millionen Basenpaare) (Bergthorsson und Ochman, 1995; Bischoff, 2009). Durch die Entstehung einer großen Anzahl an unterschiedlichen Geno- und Phänotypen eignet sich *E. coli* für wissenschaftliche Untersuchungen mit epidemiologischen Fragestellungen (Cameron und Redfield, 2006; Schwaiger et al., 2009; Thomas und Nielsen, 2005).

### **2.3.2.2 *Campylobacter* spp.**

Bei *Campylobacter (C.)* spp. handelt es sich um gramnegative, spiral- oder S-förmige Stäbchen. Die Gattung besteht aus mehr als 30 Spezies, wobei nicht alle humanpathogen sind. Allerdings können viele Spezies potenziell sowohl Einfluss auf die Tiergesundheit nehmen als auch die

menschliche Gesundheit gefährden. Es handelt sich somit um Zoonoseerreger, welche zu schwerwiegenden Infektionskrankheiten führen können (RKI, 2019; Tschäpe, 2000).

Die *Campylobacter*-Enteritis ist mit 60.000 – 70.000 Fällen pro Jahr die am häufigsten gemeldete bakterielle Durchfallerkrankung bei Menschen in Deutschland (RKI, 2021). Auch EU-weit ist sie die am häufigsten gemeldete lebensmittelassoziierte Durchfallerkrankung mit 127.840 gemeldeten Fällen alleine 2021 (EFSA, 2022). Speziell die beiden Subspezies *C. jejuni* und *C. coli* spielen als Durchfallerreger beim Menschen eine wichtige Rolle (Thorns, 2000).

Das Krankheitsbild lässt sich einteilen in die asymptomatische und die symptomatische Form, wobei sich letztere in der Regel als akute Enteritis mit Diarrhö, Bauchschmerzen/-krämpfen, Fieber und Mattigkeit zeigt. Die Übertragung von Mensch zu Mensch ist in Ausnahmefällen möglich, allerdings findet die Übertragung hauptsächlich durch kontaminierte Lebensmittel statt. Die höchste Gefahr stellt hierbei nicht durchgegartes Hühnchen, aber auch Rind, Schwein und andere rohe Lebensmittel (Milch, Milchprodukte und kontaminiertes Trinkwasser) dar. Die Kontamination bleibt oft unerkant, da betroffene Tiere nur selten klinische Symptome zeigen (EFSA, 2022; Friedman et al., 2004; Hyllestad et al., 2020; RKI, 2019).

Obwohl die beiden oben genannten Arten nicht obligat wirtsgebunden sind, werden *C. coli* häufiger bei Schweinen und *C. jejuni* öfter bei Hühnern nachgewiesen (Alter et al., 2005; Boes et al., 2005; Møller Nielsen et al., 1997; Rosner, 2017).

### **2.3.2.3 *Salmonella (S.) spp.***

Bei Salmonellen handelt es sich um gramnegative, bewegliche, stäbchenförmige Bakterien. Aufgrund ihrer verschiedenen Oberflächenstrukturen (O)- und Geißel-(H)-Antigene werden sie mithilfe des White-Kauffmann-Le-Minor-Schemas in verschiedene Serovare eingeteilt, von denen derzeit mehr als 2.600 bekannt sind (Banerji et al., 2020).

Grundsätzlich unterscheidet man dabei 2 Spezies (*Salmonella enterica* und *Salmonella bongori*), wobei *S. enterica* noch in sechs weitere Subspezies unterteilt wird (Popoff et al., 2004). Für die Serovare von *S. enterica* ssp. *enterica* werden eigene Namen verwendet, wie *S. Typhi*, *S. Paratyphi*, *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* (Rolle und Mayr, 2007).

Klassischerweise werden die Serovare *S. Typhi* und *S. Paratyphi* von den anderen Serovaren abgegrenzt, weil sie sich deutlich im Krankheitsbild unterscheiden und ausschließlich

humanpathogen sind. Klinisch und epidemiologisch relevant im Bereich der Enteritiden sind in Deutschland neben *S. Typhimurium* das Serovar *S. Enteritidis* (Bäumler et al., 2000). Trotz der Vielzahl an unterscheidbaren Serovaren weisen Salmonellen ein sehr ähnliches klinisches Bild auf (Tschäpe und Kühn, 1993). Das Krankheitsbild wird dominiert von Durchfall, außerdem können die Betroffenen an Bauchschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Abgeschlagenheit und Fieber leiden (Sander, 1993).

Mit 8.743 übermittelten Fällen 2020 ist die Salmonellose in Deutschland die zweithäufigste meldepflichtige bakterielle Magen-Darm-Erkrankung beim Menschen (RKI, 2021); EU-weit ist die Salmonellose nach der *Campylobacteriose* ebenfalls die zweithäufigste übermittelte Zoonose mit 60.050 übermittelten menschlichen Fällen (EFSA, 2022). Die häufigste Infektionsquelle dabei ist der Verzehr von tierischen Lebensmitteln. Wie bei *Campylobacter* ist ein Grund für die unerkannte Kontamination der Lebensmittel, dass landwirtschaftliche Nutztiere (Geflügel, Schweine und Rinder) das Hauptreservoir darstellen, aber nur selten klinische Symptome zeigen (RKI, 2009). Sehr viel seltener erfolgt eine Übertragung auf den Menschen durch direkten Kontakt mit infizierten und ausscheidenden Tieren. Eine Ausnahme stellt hier die Übertragung von Heimtieren auf Risikogruppen wie Säuglinge oder Kleinkinder dar (Bertrand et al., 2008; Mermin et al., 2004).

Innerhalb der Nutztierbestände gibt es für die Übertragung von Salmonellen verschiedene Möglichkeiten. Je nach Serovar geschieht die Einbringung über latent infizierte Tiere, kontaminierte Futtermittel oder andere Vektoren (bspw. Schädlinge, kontaminierte Gegenstände, Vögel). Bei freilaufenden Tieren besteht ein hohes Risiko der Exposition gegenüber diesen Vektoren (Blaha, 1993).

Ähnlich wie bei *Campylobacter* spp. sind nicht alle Serovare obligat wirtsgebunden. Es zeigt sich dennoch eine artenabhängige Häufung einiger Serovare: beim Menschen *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis*, bei Schweinen *S. Typhimurium* und bei Hühnern *S. Enteritidis*, *Infantis* und *Typhimurium* (Duijkeren et al., 2002).

## 2.4 Nachweismöglichkeiten des Erregeraustausches zwischen verschiedenen Tierarten

### 2.4.1 Kultureller Nachweis

Um zu evaluieren, ob der Erregeraustausch bei der gemeinsamen Haltung von verschiedenen Tierarten im Vergleich zur alleinigen Haltung einer Art erhöht ist, kann die Prävalenz bestimmter Bakterienspezies durch kulturellen Nachweis ermittelt werden. Dafür wird nach individueller Aufarbeitung das Untersuchungsmaterial in selektivem oder unselektivem Nährmedium angezchtet. So lassen sich schnell und einfach viele Mikroorganismen wie Salmonellen, Yersinien, Listerien, *Campylobacter* oder auch *E. coli* nachweisen (Schneider, 2017). Der kulturelle Nachweis dient der Gewinnung von Einzelisolaten, welche in den folgenden Schritten weitergehend auf ihre Charakteristika, Ähnlichkeiten und Veränderungen untersucht werden können (Boes et al., 2005; Flieger et al., 2013).

### 2.4.2 Massenspektrometrie

Zur Massenspektrometrie werden verschiedene Verfahren gezählt, mit denen die Massen von Atomen und Molekülen bestimmt werden können. Allen gemein ist der Ansatz, dass die Atome und Moleküle entsprechend ihres Masse-/Ladungs-Verhältnisses getrennt werden und das detektierte Massenspektrum aufgezeichnet wird. Die Darstellung erfolgt, indem auf der x-Achse die Masse und auf der y-Achse die Intensität der Ionen pro Zeiteinheit angegeben werden (McLafferty und Tureček, 1995). Diese generierten Spektren können dann mit bekannten Spektren aus bestehenden Datenbanken abgeglichen werden (Perkins et al., 1999).

Es gibt verschiedene Arten der Massenspektrometrie (z.B. LC-MS, GC-MS, etc.). In dieser Studie wurde MALDI-TOF MS für die Änderung der Charakteristik von *E. coli* und *C. spp.* verwendet. Bei der Messung mittels MALDI-TOF MS werden die Analyten in den gasförmigen Aggregatzustand gebracht und anschließend ionisiert. In einem elektrischen Feld werden die so erzeugten Ionen beschleunigt und einem Analysator zugeführt, der diese anhand ihres Masse-Ladungsverhältnisses ( $m/z$ ) aufgliedert (McLafferty und Tureček, 1995).

Dieses Masse-Ladungsverhältnis kann dann graphisch in Bezug zur Intensität der Ionen gesetzt und als Massenspektrum dargestellt werden (Budzikiewicz und Schäfer, 2012). Bei diesem

speziellen Verfahren der Massenspektrometrie werden die Matrix-assistierte Laser-Desorptions- und Ionisations-Technologie (MALDI) mit einer Analyse der Flugzeit (time of flight, TOF) verbunden (Schubert und Wieser, 2011). Für die Identifizierung von Mikroorganismen hat sich diese Methode bewährt, da diese durch ribosomale Proteine in Massenbereichen von 2 - 20 kDa unterschieden und identifiziert werden können (Clark et al., 2013).

Die zu untersuchenden Bakterien werden direkt von der Agarplatte auf eine Messplatte (Target) aufgetragen und mit einer niedermolekularen, organischen Lösung (Matrix, z.B. 2,5 Dihydroxybenzoesäure) beschichtet. Beim Trocknen erfolgt eine Co-Kristallisation, bei der der Analyt in die Matrixkristalle eingebunden wird. Somit kann die durch den Laserstrahl auf die Matrix übertragene Ladung auf den Analyten übertragen werden (Schubert und Wieser, 2011). Die so generierten Spektren können untereinander verglichen werden, um die Änderung der Charakteristik einzelner Isolate zu prüfen (Bruker Daltonik GmbH, 2017).

### **2.4.3 Infrarotspektrometrie**

Durch die Infrarotspektrometrie (IR) ist die Identifizierung von Substanzen aller Aggregatzustände möglich. Es handelt sich um eine Methode, um Mikroorganismen anhand des Infrarotspektrums zu identifizieren, differenzieren und klassifizieren (Naumann, 2001). Diese Art der Messung beruht auf der Grundlage, dass die meisten Moleküle Licht in dem hier verwendeten Infrarotspektrum absorbieren. Diese Absorption ist charakteristisch für die jeweiligen chemischen Bindungsverhältnisse im Analyten (Bruker Daltonik GmbH, 2022).

Dabei werden die Substrate mit Infrarotstrahlung [typischerweise  $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$  (Wellenzahl)] durchleuchtet und die dabei entstehende Transmission gemessen. Die Transmission entspricht dem Verhältnis zwischen eingedrungener und durchgelassener Strahlung. Dieses physikalische Analyseverfahren basiert somit auf der energetischen Anregung von Molekülen (Bruker Daltonik GmbH, 2022; Günzler und Gremlich, 2012).

Der Frequenzbereich von  $1250$  bis  $600 \text{ cm}^{-1}$ , der bei organischen Materialien anzutreffen ist, ist charakteristisch und wird oft als sogenanntes "Fingerprint-Gebiet" zur Identifizierung herangezogen (Arndt, 2019).

Im Infrarotbereich können bestimmte Molekülgruppen Licht absorbieren, und diese Absorption wird in Abhängigkeit von der einfallenden Infrarotstrahlung aufgezeichnet. Die genaue Position der Infrarot-Absorptionsbänder hängt von der Lage und der Art der in den untersuchten Substraten vorhandenen Strukturgruppen ab, zu denen unter anderem Carbonyl-, Hydroxy- und Aminogruppen gehören (Günzler und Gremlich, 2012). Die individuelle Lage und Intensität dieser Absorptionsbänder sind äußerst spezifisch für bestimmte Stoffe.

Vergleicht man nun das Proben-IR-Spektrum mit den IR-Spektren der Spektrenbibliothek, lässt sich die Identität des Analyten bestimmen (Arndt, 2019).

Solange keine Beeinträchtigungen der Messungen durch Aggregations-Effekte oder Lösungsmittel vorliegen, können Messungen auch quantitativ vorgenommen werden, da der Transmissionsgrad bei einer bestimmten Wellenlänge für jeden Analyten spezifisch ist (Günzler und Gremlich, 2012).

Auch in der Infrarotspektrometrie gibt es verschiedene Verfahren, wie z.B. die Nahinfrarotspektroskopie oder die Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR). Der Vorteil des Fourier-Transformations-Infrarot-Spektrometers ist, dass alle IR-Wellenlängen mit einer Messung analysiert werden können und die Probe nicht sequentiell mit einer isolierten Wellenlänge bestrahlt werden muss (Bruker Daltonik GmbH, 2022).

Im Falle des FT-IR wird das Infrarotlicht von einer Strahlenquelle auf einen Strahlenteiler gerichtet. Dieser Strahlenteiler lässt bei einer korrekt durchgeführten Messung die Hälfte des Lichtes durch, reflektiert die andere Hälfte und erzeugt so zwei Einzelstrahlen.

Der reflektierte Teil der Strahlung wird auf einen festen Spiegel umgeleitet und von dort wieder auf den Strahlenteiler reflektiert (Herres und Gronholz, 1984). Der durchgelassene Teil der Strahlung wird auf einen beweglichen Spiegel geleitet. Die beiden Strahlenhälften werden nun jeweils so durch den Strahlenteiler geleitet, dass sie wieder kombiniert und aus dem Interferometer des FT-IR durch die Probe auf den Detektor geleitet werden. Die von dem Detektor gemessene Größe ist die Intensität der kombinierten IR-Strahlen als Funktion der beweglichen Spiegelverschiebung, welche einer bestimmten Wellenlänge zugeordnet wird. So erhält man das sogenannte Interferogramm. Dieses Interferogramm wird von dem Detektor an die angeschlossene Software übertragen, welche die Intensität der Wellenzahlen über

Fourier-Transformation bestimmt. (Günzler und Gremlich, 2012; Herres und Gronholz, 1984). Durch die Fourier-Transformation wird das Interferogramm in ein IR-Spektrum umgewandelt, wobei das Signal Fourier-transformiert wird, um die übliche IR-Darstellung zu erhalten (Bruker Daltonik GmbH, 2022).

Dabei wird im ersten Schritt ein Einkanalspektrum erzeugt, welches durch das Verhältnis zu einer Referenz zu dem endgültigen Spektrum umgewandelt wird. Die Referenz ist dabei der sogenannte „Background“, die Messung der Platte ohne Probenmaterial (Günzler und Gremlich, 2012; Herres und Gronholz, 1984). Wie schon die generierten Spektren des MALDI-TOF MS können die FT-IR Spektren untereinander verglichen werden, um eine Änderung der Charakteristik der untersuchten Isolate zu erkennen (Bruker Daltonik GmbH, 2022; Ekruth et al., 2020).

#### **2.4.4 Genanalyse**

Gerade phänotypisch abweichende oder seltener isolierte Stämme können auf Grundlage der 16S rRNA identifiziert werden (Clarridge, 2004). Bakterielle 16S rRNA-Gene enthalten eine hohe Sequenzvielfalt zwischen verschiedenen Bakterien und können so auf ihre Unterschiede hin untersucht werden, da sie sich wie molekulare Chronometer verhalten (Woese, 1987). Man geht davon aus, dass die Stabilität in der 16S rRNA-Gen-Sequenz auf der Tatsache beruht, dass es kaum zu einem horizontalen Gentransfer kommt und Mutationen selten vorkommen. Man kann mit ihrer Hilfe den Verwandtschaftsgrad aller Organismen rekonstruieren (Harmsen, 2004; Thorne et al., 1998). Ein Vergleich der Gensequenz ermöglicht die Differenzierung zwischen allen wichtigen Bakterienstämmen auf Gattungsebene sowie die Klassifizierung auf der Ebene der Spezies und Subspezies (Sacchi et al., 2002).

Analog zu den MALDI-TOF MS und den FT-IR Spektren lassen sich mit den Sequenzen Dendrogramme erstellen, mit denen überprüft werden kann, ob sich Cluster aufgeteilt nach Bakterien, Spezies oder auch Tierart bilden (Chakravorty et al., 2007).

Bei der Pulsfeld-Gel-Elektrophorese (PFGE) handelt es sich um eine standardisierte, genetische Fingerprintmethode, mit deren Hilfe Infektionsquellen und Infektionswege nachgewiesen werden können. Diese Methode ist für fast alle Mikroorganismenspezies anwendbar und eignet sich so für die epidemiologische Überwachung; hierdurch lassen sich

beispielsweise die mikrobiologischen Ursachen regionaler Häufungen von Krankheitsausbrüchen und internationaler Ausbrüche aufklären (Prager und Tschäpe, 2003).

Eine weitere Methode stellt die Vollgenomanalyse dar. Bei dieser Analyse wird das komplette Erbgut eines Organismus sequenziert und dient der Erregercharakterisierung und -typisierung. Sie ist laut dem Bundesinstitut für Risikobewertung eine der wichtigsten Nachweismethoden von Bakterien bei lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen. Für leicht kultivierbare Erreger lassen sich genetische Verwandtschaften erkennen und durch den Vergleich der Vollgenomanalyse können Mikroorganismen verschiedener Tiere miteinander verglichen werden (BfR, 2020).

### 3 Publikation



Article

---

## Symbiotic Husbandry of Chickens and Pigs Does Not Increase Pathogen Transmission Risk

---

Emma Kaeder, Samart Dorn-In, Manfred Gareis and Karin Schwaiger

Special Issue

Foodborne Pathogens Management: From Farm and Pond to Fork

Edited by  
Prof. Dr. Frans J.M. Smulders



<https://doi.org/10.3390/foods11193126>



Article

# Symbiotic Husbandry of Chickens and Pigs Does Not Increase Pathogen Transmission Risk

Emma Kaeder <sup>1,\*</sup>, Samart Dorn-In <sup>2</sup> , Manfred Gareis <sup>1</sup> and Karin Schwaiger <sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Chair of Food Safety and Analytics, Faculty of Veterinary Medicine, LMU Munich, Schoenleutnerstr. 8, 85764 Oberschleissheim, Germany

<sup>2</sup> Unit of Food Hygiene and Technology, Institute of Food Safety, Food Technology and Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine, Veterinärplatz 1, 1210 Vienna, Austria

\* Correspondence: emma.kaeder@ls.vetmed.uni-muenchen.de

**Abstract:** A symbiotic or mixed animal husbandry (e.g., pigs and chickens) is considered to have a positive effect for animal welfare and sustainable agriculture. On the other hand, a risk of infection and transmission of microorganisms, especially of zoonotic pathogens, between animal species may potentially occur and thus might increase the risk of foodborne illnesses for consumers. To prove these assumptions, two groups of animals and their environmental (soil) samples were investigated in this study. Animals were kept in a free-range system. In the first group, pigs and chickens were reared together (pasture 1), while the other group contained only pigs (pasture 2). During a one-year study, fecal swab samples of 240 pigs and 120 chickens, as well as 120 ground samples, were investigated for the presence of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. and *E. coli*. Altogether, 438 *E. coli* and 201 *Campylobacter* spp. strains were isolated and identified by MALDI-TOF MS. *Salmonella* spp. was not isolated from any of the sample types. The prevalences of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* in pigs were 26.7% and 3.3% in pasture 1 and 30.0% and 6.7% in pasture 2, while the prevalences of *C. coli* and *C. jejuni* in chickens from pasture 1 were 9.2% and 78.3%, respectively. No correlation between the rearing type (mixed vs. pigs alone) and the prevalence of *Campylobacter* spp. was observed. All swab samples were positive for *E. coli*, while the average prevalences in soil samples were 78.3% and 51.7% in pasture 1 and 2, respectively. Results of similarity analysis of the MALDI-TOF MS spectra (for *C. coli*, *C. jejuni* and *E. coli*) and FT-IR spectra (for *E. coli*) of the same bacterial species showed no recognizable correlations, no matter if strains were isolated from chickens, pig or soil samples or isolated at different sampling periods. The results of the study indicate that the symbiotic husbandry of pigs and chickens neither results in an increased risk of a transmission of *Campylobacter* spp. or *E. coli*, nor in a risk of bacterial alteration, as shown by MALDI-TOF MS and FT-IR spectra. In conclusion, the benefits of keeping pigs and chickens together are not diminished by the possible transmission of pathogens.

**Keywords:** *Campylobacter* spp.; *E. coli*; free-range rearing system; MALDI-TOF MS; FT-IR; animal welfare



**Citation:** Kaeder, E.; Dorn-In, S.; Gareis, M.; Schwaiger, K. Symbiotic Husbandry of Chickens and Pigs Does Not Increase Pathogen Transmission Risk. *Foods* **2022**, *11*, 3126. <https://doi.org/10.3390/foods11193126>

Academic Editors: Frans J.M. Smulders and Arun K. Bhunia

Received: 16 July 2022

Accepted: 30 September 2022

Published: 8 October 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

In recent years, the meat industry has increasingly gained the interest of society. Partially triggered by scandals led by buzzwords such as zoonotic diseases (e.g., *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and enterohemorrhagic *E. coli*), consumers are increasingly taking a critical look at primary production and the downstream stages. In addition to product quality and product safety, the social and ethical aspects of animal husbandry are a major concern [1–3].

In many ways, animal husbandry offers a high potential for improvement in animal welfare and sustainability, both ecologically and economically [4]. In many countries, a large part of conventional husbandry types is considered as unsustainable in the long run,

such as that declared by the Federal Ministry of Food and Agriculture (Germany) [5]. This knowledge and a changed human-animal relationship have led to a critical rethinking [6]. Additionally, there is a broad support among the population demanding that animals are treated with care and respect and that they are given the opportunity to practice species-appropriate behavior [5].

Meat production takes up a large share in the food sector. This discrepancy between the demand for animal welfare and maximum economic value has led to an urgently needed review of animal welfare standards [7,8]. It is important to respond to this change in the society's perception by creating new opportunities in animal husbandry [9,10].

By keeping pigs and chickens together on the pasture, animal welfare-relevant symbiotic effects and the sustainability of animal husbandry systems can be optimally exploited. The benefits of keeping chickens and pigs together could include, for example, giving the chickens better access to earthworms and other food by having the pigs stir up the soil. For their part, the chickens could provide the pigs with protection from ectoparasites. Another benefit to the chickens could be that the pigs offer them protection from birds of prey such as the goshawk. However, at the same time, it raises the question as to whether this kind of animal husbandry leads to an increased exchange of pathogens and thus to a potentiation of the risk of disease transmission. Since *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. and *E. coli* are considered to be important pathogens in both pigs and chickens and are among the most common foodborne zoonoses in Europe [11], they were chosen as model microorganisms for the tracking investigations in this study.

*Campylobacter* spp. are gram-negative, microaerophilic bacteria. Campylobacteriosis caused by *Campylobacter* (*C.*) *jejuni* and *C. coli* is the most common bacterial diarrheal disease in humans [12]. They are considered as common zoonotic agents, with contaminated food being the main route of transmission, posing a high risk [13–15]. Although the two species mentioned above are not obligately host bound, *C. coli* are more frequently detected in pigs and *C. jejuni* in chickens [16,17].

After campylobacteriosis, the second most frequent, notifiable bacterial gastrointestinal disease in humans is salmonellosis [18]. Like *Campylobacter* spp., not all *Salmonella* serovars are obligately bound to the host. Nevertheless, there is a species-specific clustering of some serovars, e.g., *S. Typhimurium* in humans, pigs and chickens, *S. Enteritidis* in humans and chickens, *S. Infantis* and *S. Gallinarum* in chickens [19,20]. There are various possibilities for the transmission of *Salmonella* spp. within livestock. Depending on the serovar, it can be spread via latently infected animals, contaminated feed or other vectors, e.g., rodents, contaminated objects and birds [21,22]. The most common cause of human infection is the consumption of contaminated animal products [23].

The third investigated bacterial species in this study is *Escherichia coli*. They are gram-negative, facultatively pathogenic, flagellated rod-shaped bacteria that are commonly found in human and animal intestines [24,25]. Due to their ability to rapidly absorb and transfer genetic information, *E. coli* are considered as indicator and reservoir germs. Thus, they are particularly of interest for scientific studies dealing with epidemiological questions [26].

The aim of the study was to find out whether animal husbandry types (pigs and chickens vs. pigs alone) have an influence on the risk of shedding, and transmission of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. and *E. coli*. Additionally, the isolated bacterial strains were investigated using MALDI TOF MS and FT-IR to see if the spectra are converging over time, which could indicate increased exchange between the animal species.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Design (Sampling)

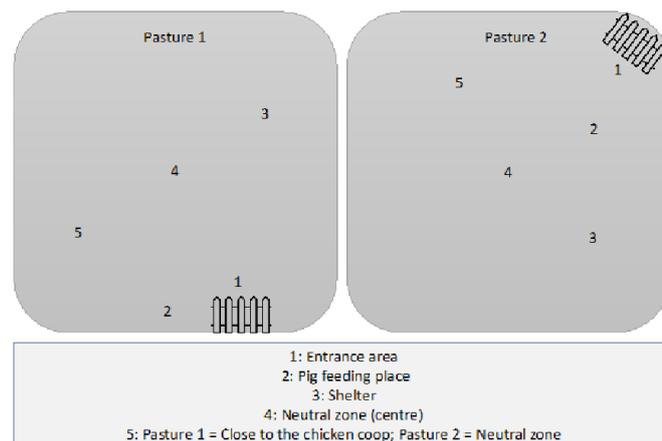
#### 2.1.1. Pre Sampling

A pre-sampling was performed to obtain the prevalence of investigated bacteria in animal and soil samples. Before starting the main experiment, rectal swabs were taken once from pigs ( $n = 10$ ) and cloacal swabs were taken once from chickens ( $n = 10$ ). At this point, the animals were each in their parent stocks and had no contact with each other. In

addition, soil samples ( $n = 10$ ) were taken once before the animals went out to pasture. The method of sample collection corresponds to the later applied study procedure (see sample collection, Section 2.2).

### 2.1.2. Forms of Husbandry

The animals were separated into two different groups, living on different pastures. Both pastures were not previously used for any agricultural purpose for the past ten years. For the study, pasture 1 was used for pigs (35) and poultry (about 250) as mixed husbandry and pasture 2 for pigs only (35; comparison group). Each pasture had an area of 2.5 ha. The distance between both pastures was two meters on each side separated by a double fence. Thus, direct contact between animals from both pastures can be ruled out. All investigated animals received feed from the same producer and the same source of water. Figure 1 shows the structure of each pasture. Pigs (3–5 months old) and chickens (4 weeks old) were obtained from the respective breeding stations of the same farm. They were kept in the pastures until reaching age of slaughtering, namely 12 months for pigs and 5 months for chickens. Then, new animals were continually introduced in the two pastures. Altogether, two pig and three chicken groups were introduced to the corresponding pastures. The whole study was localized in Upper Bavaria, Germany.



**Figure 1.** Schematic layout of the pastures and the soil sampling (1 to 5). Pasture 1: pigs and chickens; pasture 2: pigs alone.

## 2.2. Sample Collection

### 2.2.1. Animals

Rectal and cloacal swabs of 240 pigs and 120 chickens (from 12 monthly sampling runs with the exception of May and June 2020 due to the pandemic situation) were investigated between September 2019 and October 2020. For each sampling run, 10 rectal and 10 cloacal swabs were obtained from pigs and chickens from each pasture.

Two persons performed the swab sampling of animals. Sterile single-use swabs with Amies transport medium (Sarstedt, Germany) were inserted into the recta of pigs and the cloacae of chickens. The swabs were immediately put into the transport medium, individually labeled, packed in three different disposable bags (pasture 1—pig, pasture 1—chickens, pasture 2—pig), placed in a cooling box and transported to the laboratory within three hours. The animals were randomly selected. To assure that none of the animals was sampled twice, the pigs were marked using a marker pen immediately after the sampling was performed. As for chickens, the poultry coops were closed, and each chicken was released after the sampling procedure.

### 2.2.2. Soil

A total of 60 soil samples per pasture obtained from 12 sampling runs were investigated at the same time as the animal swab samples. The locations of five sampling sites from each pasture are shown in Figure 1. The soil sampling method was adopted from a procedure developed by the State Office for Nature, Environment and Consumer Protection in North Rhine-Westphalia, Germany [27]. The near-surface soil samples with a sampling depth of 2–4 cm were cut with a hole saw (Wolfcraft® GmbH, Kempenich, Germany), recorded with a diameter of 100 mm. For sampling, the metal cylinder was driven into the ground with a plastic hammer. After the excavation, the soil column in the cylinder (approximately 100 g) was transferred to a 200 mL sterile screw-type beaker (Sarstedt, Germany). Between the individual samples, the hole saw was freed from leftover soil with a knife and then disinfected with 70% alcohol. Samples were placed in a cooling box and transported to the laboratory within three hours.

### 2.3. Sample Preparation

The bacteriological analysis was started within 3 h after sample collection.

#### 2.3.1. Animal Samples

The 20 rectal and 10 cloacal swabs from each sampling run were processed as individual samples under sterile conditions. In a first step, the swabs were streaked directly on a RAPID'E. coli agar (Bio-Rad, Feldkirchen, Germany). This agar is recommended for the enumeration of *E. coli* in water and food [28,29]. The protective cap of the swab was then removed using a sterile scissor, while the swab was put into a sterile disposable tube (Greiner Bio-One, Germany) that was previously filled with 5 mL of buffered peptone water. All 30 tubes containing swabs were closed and shaken for 25 min at 250 rounds/min (FL-3005 varioshake, GFL, Lauda, Lauda-Königshofen, Germany) at room temperature. The "peptone water sample suspension" (PSS) was used as the starting material for the subsequent culturing of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp.

#### 2.3.2. Soil Samples

Each of the ten screw cups (Sarstedt, Germany) containing soil samples was opened under a sterile laminar flow workbench. Soil was transferred into a sterile flask and weighed to 10 g, then mixed with 90 mL of peptone water by shaking at 250 rounds/min for 25 min at room temperature. This PSS of soil served as the starting material for the subsequent culturing of all target bacteria.

### 2.4. Bacteriological Investigation

#### 2.4.1. Isolation of *Escherichia coli*

*E. coli* were isolated using the RAPID'E. coli 2 agar (Bio-Rad, Germany). While animal swabs were directly streaked on the selective agar, approximately 10 µg of the PSS of soil was transferred onto an agar plate and spread out using a sterile inoculation loop. The plates were aerobically incubated at 37 °C for 24 h. After that, one colony from each positive RAPID'E. coli 2 agar was subcultured on agar technical (Oxoid, Wesel, Germany) and incubated under the same conditions. The grown colonies proceeded to species identification/confirmation using MALDI-TOF MS (Bruker Daltoniks, Bremen, Germany) and to spectra analysis using FT-IR (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany).

#### 2.4.2. Isolation of *Salmonella* spp.

A pre-enrichment procedure was applied in order to revive the potentially sublethally damaged cells of *Salmonella* spp. For this step, 1 mL of the PSS suspension was transferred to 5 mL of buffered peptone water (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) and aerobically incubated at 37 °C for 16–20 h. From this pre-enrichment, 0.1 mL was dropped in triplicate onto the Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) medium (Oxoid, Germany) and incubated non-inverted at 42 °C for 24 h. Growth of *Salmonella* spp. on MRSV is indicated

when a clear opaque halo has formed around the droplet. For further confirmation steps, material from the rim of the opaque halo was subcultured onto Xylose-Lysine-Tergitol 4 (XLT4) agar (Oxoid, Germany) and Brilliant-green Phenol-red Lactose Sucrose (BPLS) agar (Oxoid, Germany). The agar plates were aerobically incubated at 37 °C for 24 h.

#### 2.4.3. Isolation of *Campylobacter* spp.

Enrichment of the thermophilic *Campylobacter* spp. was primarily performed, starting with transferring 1 mL of the PSS into 9 mL of a Preston selective broth (Carl Roth, Karlsruhe, Germany), followed by incubation under microaerobic conditions (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, Anaerocult™ C 2.5 l (Merck, Darmstadt, Germany)) at 42 °C for 48 h. The selective enrichment procedure was used in order to enhance the growth of *Campylobacter* spp. and at the same time to reduce or inhibit the growth of the accompanying microorganisms, which may be present in a high number in fecal swab and soil samples. After incubation, the suspension was filtered through a sterile membrane filter with a pore size of 0.65 µm (VWR, Hannover, Germany). Approximately 10 µL of the flow-through suspension was transferred to a Columbia blood agar containing sheep blood (CBA, Oxoid, Germany) with a disposable loop and was streaked using a 3-loop smear technique. The CBA plates were incubated under microaerobic conditions at 42 °C for 48 h. The grown colonies proceeded to species identification using MALDI-TOF MS.

#### 2.4.4. Species Identification by MALDI-TOF MS

The colonies of bacterial cultures were identified to species level using Matrix Assisted Laser Desorption Ionization—Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). Colonies of pure cultures were extracted using the direct transfer method as described in the Bruker Daltonik User's manual [30]. An appropriate colony mass on the agar plate was taken using a toothpick and smeared on a ground steel BC target plate. Then, 1 µL of a low-molecular organic matrix solution (saturated solution of a cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile) was added. During the drying process at room temperature, a co-crystallization took place in which the analyte was incorporated into the matrix crystals. The MALDI-TOF MS measurements were performed using a Microflex LT (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). The analysis of the generated data was executed with the Software—Biotyper OC incl. Taxonomy (Version 3.1.66, Bruker Daltonik, Bremen, Germany) and its automated settings.

#### 2.4.5. FT-IR

The Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) measurement was applied to *E. coli* strains because of their role as indicator and reservoir bacteria as described in the introduction. Additionally, some studies related to the application of FT-IR have shown that the stability of the bacterial cell mass remains stable up to 24 h after subculturing [31]. For cell masses grown for shorter/longer periods or in other nutrient solutions, the FT-IR spectra sometimes differ considerably. Therefore, reproducible and meaningful information can only be expected from cell masses obtained under standardized conditions [32,33]. To ensure these standardized conditions during FT-IR measurement, all *E. coli* strains were cultured on the same medium, incubated at the same room temperature for exactly 24 h. The restrained growth of *Campylobacter* spp. did not allow this standardized measurement with the sample size, since the incubation time had to be extended if the growth rate was too slow or the colonies were too small.

For each *E. coli* strain, three biological replicates were prepared for FT-IR measurement. The material from each colony was removed from the agar technical after exactly 24 h of incubation using a 1-µL disposable loop. The amount was equivalent to an overloaded inoculation loop. It is important to note that the cell material was only removed from the confluent growth zone. The cell material was transferred to a 1.5-mL reaction tube that was prefilled with 50 µL ethanol (70%) and four inert metal cylinders (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany), then mixed by shaking at 250 rounds for 15 s. The 70% ethanol

killed the microorganisms, thus stopping their ongoing metabolic activities. To increase the surface tension of the suspension, 50  $\mu\text{L}$  of deionized water was added. Then, 15  $\mu\text{L}$  of each isolate suspension was pipetted onto three spots (technical replicates) of the 96-well microtiter plate (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). The spots on the plate had to be completely dried at 37 °C in an incubator (approximately 30 min) before they were subjected to FT-IR measurement.

Additionally, a quality control for each FT-IR measurement was required. This was carried out by pipetting 12  $\mu\text{L}$  of each Bruker Infrared Test Standards Solutions (IRTS 1 and IRTS 2) on the same microtiter plate. These two standard solutions are part of the Bruker IR Biotyper kit (Bruker, Bremen, Germany). Finally, FT-IR spectroscopy was performed using an IR biotyper spectrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) according to the instructions of the producer [34]. Briefly, each *E. coli* strain was automatically scanned 64 times. Spectra were acquired up to 1500  $\text{cm}^{-1}$  with a spectral resolution of 3  $\text{cm}^{-1}$  and an aperture of 10 mm. All 64 spectra obtained from a single strain were automatically combined, resulting in a single spectrum. The analysis of the generated data was carried out using Biotyper software (Bruker Daltoniks, Bremen, Germany, version 1.5.0.90) and its automatic settings. The spectral data were automatically converted to dendrograms using the average mean spectra method that was further used for the statistical analysis (Chi-square test).

### 2.5. Analysis for Similarities

For each bacterial group, *Campylobacter* spp. and *E. coli*, the similarity of their protein spectra obtained by the MALDI-TOF MS, were analyzed using the clustering program BioNumerics (version 7.6, Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

Additionally, the similarity of the *E. coli* strains (isolated from animals,  $n = 240$ ) was investigated by FT-IR spectroscopy. This involves comparing each spectrum within a species to all other spectra recorded using the same protocols and methods. The comparison of two spectra provides a spectral distance value. The more two spectra match, the smaller the spectral distance (Bruker Daltonik GmbH, 2017).

### 2.6. Statistical Analysis

#### 2.6.1. Pearson's Correlation

To evaluate the correlation between pasture types and the occurrence of the investigated bacteria in pigs/in soil samples, a Pearson correlation coefficient ( $r$ , Microsoft Excel, 2016) was computed. The strength of the correlation for absolute values of  $r$  is interpreted as follows;  $r = 0-0.19$  is regarded as very weak, 0.20–0.39 as weak, 0.40–0.59 as moderate, 0.60–0.79 as strong and 0.80–1.0 as a very strong correlation (Evans, 1996). Additionally, the  $p$ -value was calculated based on a two-tailed  $t$ -test analysis in order to evaluate whether the correlation was statistically significant. In Microsoft Excel, the  $p$ -value was calculated using the formula = T.VERT.2S ( $t$ ;df). The T.VERT.2S = two-tailed  $t$ -test,  $t = t$ -value and  $df =$  degree of freedom. The results were interpreted as statistically significant if the  $p$ -value was less than 0.05.

#### 2.6.2. Chi-Square

The chi-square test (SPSS software, version 26.0) was used to examine the similarity of genotype identification of *E. coli* with FT-IR spectroscopy with respect to two research questions. First, whether the type of husbandry (mixed/symbiotic vs. control pasture) had a significant influence on the formation of the clusters and, second, whether the animal species had a corresponding influence. Pearson's chi-square test was calculated with calculation of a continuity correction. An asymptotic significance (two-sided), or  $p$ -value obtained by chi-square test less than 0.05 means that there is a statistically significant relationship between the factors and clusters. In addition, a likelihood-ratio test was performed. To exclude the possibility of inaccuracies in the chi-square due to small sample

sizes, the frequencies to be observed were checked using Fisher's exact test and the linear correlation was also determined.

### 3. Results

The pre-sampling result showed that the prevalence of *Campylobacter* spp. was 10% in pigs, 20% in chickens, and 0% in soil samples. For *E. coli* it was 100% in all animal samples and 30% in soil samples.

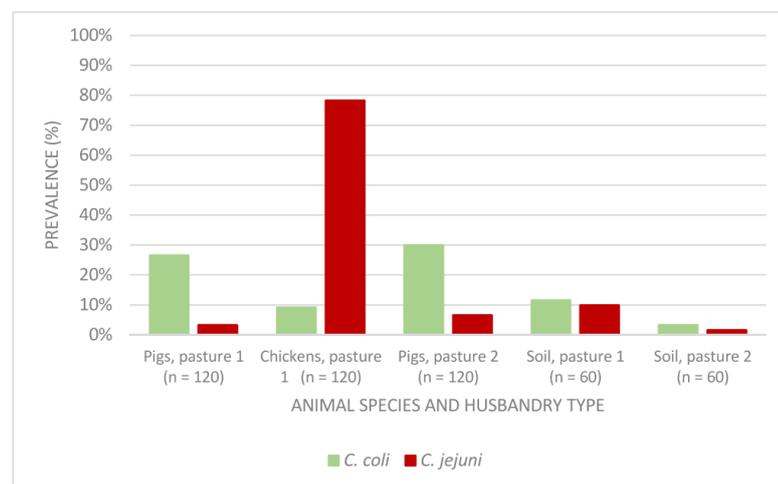
In the main experiment, a total of 639 bacterial strains were isolated from 120 cloacal swabs from chickens, 240 rectal swabs from pigs, and 120 soil samples. These included 438 strains of *E. coli* and 201 strains of *Campylobacter* spp.

*Salmonella* spp. could not be isolated in any of the investigated samples.

#### 3.1. Detection and Similarity Analysis of *Campylobacter* spp.

A total of 201 *Campylobacter* strains were isolated from 51.4% of all investigated animals and 12.5% of all soil samples. The prevalences of these bacteria were 87.5% in chickens and 33.3% (30.0% and 36.7% for pasture 1 and 2, respectively) in pigs. Species identification by MALDI-TOF MS revealed that 43.8% and 56.2% were *Campylobacter coli* and *C. jejuni*, respectively.

Figure 2 shows the distribution in detail and the prevalence of *Campylobacter* spp. in each animal group and in soil samples. The highest prevalence of *C. jejuni* was found in chickens (78.3%), while *C. coli* was mostly found in pigs (28.5% in total, and 27.0% and 30.0% of pigs from pasture 1 and 2, respectively). The prevalences of *C. jejuni* in pigs (3.3% and 6.7% for pasture 1 and 2, respectively) and *C. coli* in chickens (9.2%) were relatively low. The distribution of *C. coli* and *C. jejuni* in soil samples from pasture 1 was similar (12.0% and 10.0%, respectively), as well as in soil samples from pasture 2, where the prevalence was remarkably lower (3.0% and 2.0%, respectively) than pasture 1, but not statistically significant ( $p > 0.05$ ).

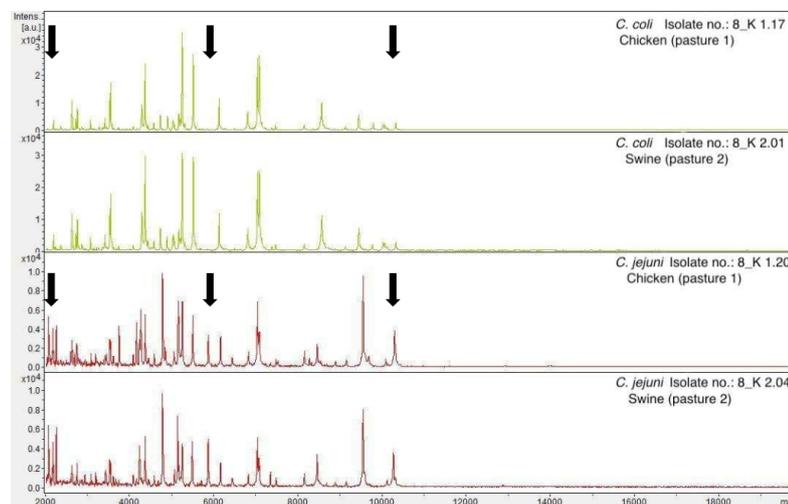


**Figure 2.** Prevalence of *Campylobacter* spp. in animal and soil samples from two husbandry types. Pasture 1: pigs and chickens were kept together (mixed husbandry). Pasture 2: pigs alone.

According to the Pearson correlation coefficient ( $r$  value), no correlation between husbandry types and detection of *C. coli* ( $r = 0.03$ ,  $p = 0.57$ ) as well as detection of *C. jejuni* in pigs ( $r = 0.08$ ,  $p = 0.24$ ) was found. For soil samples, a weak positive correlation was found between pasture type 1 and the contamination with *C. coli* and *C. jejuni* in soil ( $r = 0.18$ ,  $r = 0.16$ , respectively). This means it was more likely to detect both *C. coli* and *C. jejuni* in

ground samples from pasture type 1 than from pasture type 2. However, the correlation was evaluated as statistically not significant ( $p = 0.05$ , and  $p = 0.08$ , respectively).

Results of a similarity analysis of the protein spectra obtained by MALDI-TOF MS using the clustering program Bionumerics show that *Campylobacter* strains were classified into two major subgroups, *C. coli* and *C. jejuni*. The protein spectra of the same *Campylobacter* species were similar, regardless of their origin (chickens, pigs, or soil samples). Figure 3 shows the protein spectra of *C. coli* and *C. jejuni* isolated from chickens and pigs exemplarily. The peaks of the spectra within the same *Campylobacter* spp. (*C. coli*/*C. jejuni*) did not show any differences among isolates obtained from different samples (pigs/chicken/soil) and from different pastures. The differences of the peaks of MALDI-TOF spectra between *C. coli* and *C. jejuni* were indicated with arrows in Figure 2.



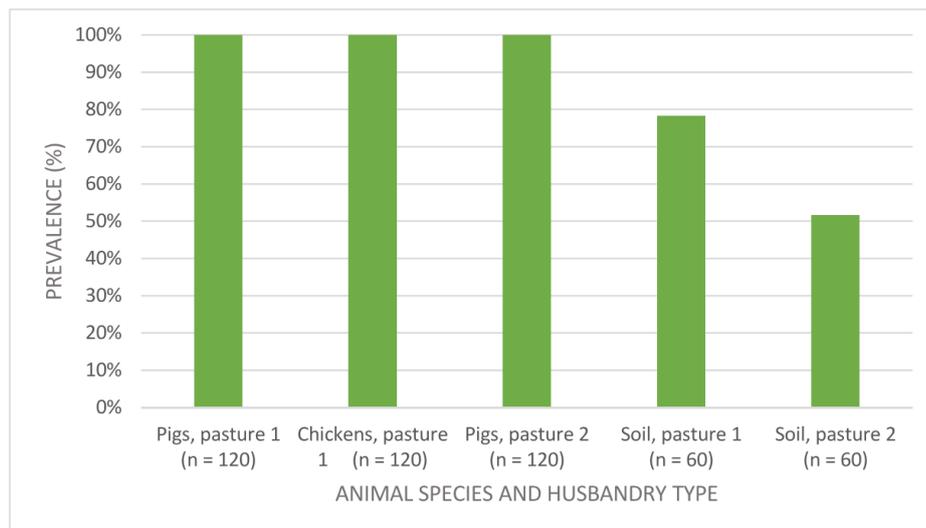
**Figure 3.** Examples of MALDI-TOF MS mass spectra of *C. coli* and *C. jejuni* isolated from chickens and pigs. Arrows indicate peaks that are absent or present in both species.

### 3.2. Detection and Similarity Analysis of *Escherichia coli*

As shown in Figure 4, 438 strains of *E. coli* were isolated from all animal swab samples, while in soil samples they were found in a wide range among sampling runs (between 0% and 100%) without recognizable influence of the duration of grazing. The average prevalence of *E. coli* in soil samples obtained from 12 sampling runs was 78.3% and 51.6% in pasture 1 and 2, respectively. The shedding of *E. coli* in ground samples was further analyzed using Pearson's correlation coefficient. A weak correlation was found between pasture types and the prevalence of *E. coli* ( $r = 0.28$ ) in ground samples and shedding of *E. coli* on pasture 1 was evaluated as statistically significantly higher than on pasture 2 ( $p = 0.002$ ).

Results obtained from similarity analysis (Bionumerics, Applied Maths) showed that the protein spectra of *E. coli* obtained by MALDI-TOF MS from all sample types have a high similarity (data not shown). The spectra were distributed randomly and were not grouped in sample types (pig/chicken swabs or soil samples) or husbandry types (pigs with chickens vs. pigs alone), but were rather grouped in sampling time (from September 2019 to October 2020). By comparing the spectra obtained from the same sampling run, it was observed that at the beginning of the study (sampling runs one to three) that there was a high diversity in the spectra of *E. coli*, resulting in a high number of clusters. Each cluster included isolates from both husbandry types and/or animal species. In the course of time (sampling runs 4–12), the number of clusters was reduced to one to three, since the

spectra of the isolates became more similar, independent of whether they were isolated from chickens or pigs from pasture 1 or pasture 2. According to this analysis, a manifest transformation of a single *E. coli* isolate was not detected.



**Figure 4.** Prevalence of *Escherichia coli* in animal and soil samples from two husbandry types. Pasture 1: pigs and chickens were kept together (mixed husbandry). Pasture 2: pigs alone.

In addition, FT-IR spectroscopy was used to analyze whether the spectra of *E. coli* (isolated from animals,  $n = 240$ ) converge over time or whether species-dependent differences persist. *E. coli* cultures that were used for FT-IR spectrometry always showed very uniform and brisk growth within the same cultivation period. Differences between the FT-IR spectra due to technical errors could be excluded by the three biological and three technical replicates or, if necessary, deviating spectra could be sorted out. The comparison of the three technical replicates and the three biological replicates showed that the spectra of one and the same biomass matched. After that, the dendrograms used for statistical analysis were generated as follows: for each sample run, one dendrogram contained the spectra of *E. coli* from the pigs kept in both husbandry types (pasture 1 and 2) and another dendrogram contained the spectra of *E. coli* from the chickens and pigs kept in pasture 1 (mixed husbandry).

Regarding the interpretation of the created dendrograms, the most important aspect was to find a reasonable cut-off value for distance to see which spectra belong to the same cluster. Since the cut-off value for differentiation at the strain level for bacteria varies slightly in each run, a stable cut-off value of 0.300 was set for differentiation. The cut-off value was set to be as low as possible to achieve a high discriminatory power, but also high enough for the technical replicates to not spread across multiple clusters. As a result, at least one major cluster occurred in all sampling runs, as shown in Figure 5.

The aim of the cluster evaluation was to find out whether the spectrum of the respective individual animal could be sorted into the corresponding cluster of its group. For this purpose, the largest cluster was determined and it was checked whether predominantly pig or chicken samples occurred in this cluster, and it thus was named the “pig cluster” or “chicken cluster”. Subsequently, the number 1 or 0 was assigned for each individual animal sample. Number 1 meant that the animal sample could be sorted according to its cluster, while 0 meant that the animals were outside the assigned cluster.



**Table 1.** Chi-square test (FT-IR dendrograms). Influence of husbandry type on the cluster formation of *E. coli* isolated from pigs from pasture 1 ( $n = 120$ ) and pasture 2 ( $n = 120$ ).

Total	Value	Degree of Freedom	Asymptomatic Significance z (Two-Sided)	Exact Significance z (Two-Sided)	Exact Significance z (One-Sided)
Pearson's chi-square test	0.000	1	0.984		
Continuity correction	0.000	1	1.000		
Likelihood-ratio test	0.000	1	0.984		
Fisher's exact test				1.000	0.551
Linear correlation	0.000	1	0.984		
Number of valid cases	225				

**Table 2.** Chi-square test (FT-IR dendrograms): Influence of animal species on the cluster formation of *E. coli* isolated from pigs ( $n = 120$ ) and chickens ( $n = 120$ ) from pasture 1.

Total	Value	Degree of Freedom	Asymptomatic Significance z (Two-Sided)	Exact Significance z (Two-Sided)	Exact Significance z (One-Sided)
Pearson's chi-square test	1.153	1	0.283		
Continuity correction	0.868	1	0.351		
Likelihood-ratio test	1.154	1	0.283		
Fisher's exact test				0.321	0.176
Linear correlation	1.148	1	0.284		
Number of valid cases	231				

All isolates that did not pass the quality check during the FT-IR measurement were automatically sorted out so that the numbers of valid cases used for both statistical analyses were  $n = 225$  (Table 1) and  $n = 231$  (Table 2).

Furthermore, a multifactorial approach with the generalized linear model (GLM; distribution form of the dependent variable binomial) was applied to investigate the influence of animal species and husbandry type on the distribution of spectra. With the respective results, no statistically significant effects were found (animal species:  $p = 0.256$ , husbandry:  $p = 0.899$ ).

#### 4. Discussion

Topics related to animal welfare of livestock are increasingly discussed in society and have a high influence on consumer decisions regarding whether to buy meat and meat products. A symbiotic or mixed rearing system, in which, for example, two animal species are kept together in the same free ranging area, can significantly contribute to an increased animal welfare status [35]. Another major issue in the critical examination of agriculture is sustainability. Due to global issues such as the ever-growing global population, climate change and an increasing demand for animal protein, the need for more sustainable animal agriculture is more urgent than ever. The pressure to maximize the production of milk and meat has disturbed the equilibrium between feeding and yield, animal welfare, environmental impact and public acceptance [36,37]. More and more ways are being sought to make agriculture more sustainable in the long run and therefore more viable for the future [38]. If the food supply for the growing world population is to be secured in the long term, production systems and consumption patterns will have to change. The challenge is to increase yields on existing lands without leaching it out and losing its fertility [39]. Shared animal husbandry is an approach which is based on the same fundamental idea. By keeping two different species of animals together, only one pasture is needed instead of the usual two, thus increasing the capacity utilization of the space with positive effects on both sustainability and animal welfare. In addition, as observed as a side finding of this study, chickens always spread throughout the pasture and used all of the space for scratching and foraging. This may be a result of their positive feeling of being protected by the pigs from any of their foes such as birds of prey. On the contrary, many different studies have

shown that even with a large free-range area, chickens stay very close to their coop out of fear [40,41], and only use the free-range area if they can find protection in the form of a shelter [42]. The findings of the present study clearly demonstrate the protective function of pigs in a mixed husbandry system.

However, the assumption that natural bacterial infection and disease transmission between animal species can increase when different animal species are kept together might impede the implementation of this rearing system for example due to veterinary authority reservations. Therefore, this study was conducted to prove whether the rearing system (pasture 1: chickens and pigs together; pasture 2: only pigs) has an influence on the prevalence of important zoonotic pathogens like *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. and *E. coli*, and whether there is an increased exchange of these isolates, as determined by MALDI-TOF MS and FT-IR spectra. For this purpose, a total of 240 pigs and 120 chickens were investigated between September 2019 and October 2020. Altogether, 438 *E. coli* and 201 *Campylobacter* strains were isolated and identified by MALDI-TOF MS.

In this study, *Salmonella* spp. could not be isolated in any of the investigated samples. With 8743 cases reported in 2019, salmonellosis is the second most common notifiable bacterial gastrointestinal disease in humans in Europe [11]. Farm animals (e.g., poultry, pigs and cattle) are considered to be the main reservoir, since almost all infected animals do not show any clinical symptoms [23]. A study conducted by the Federal Office of Consumer Protection and Food Safety in Germany (2020) showed that the prevalence of *Salmonella* spp. in caecal content samples of broiler was 2.6% and of broiler turkeys 2.4%, while 4.6% of fecal samples of wild boars and 4.0% of slaughtered fattening pigs were positive for this genus [43]. Although the prevalence of *Salmonella* spp. in farm animals in Germany is relatively low, they were included in the analysis for this study. Within livestock, there are several ways for *Salmonella* transmission, e.g., via latently infected animals, contaminated feed, or other vectors such as rodents, insects, wild birds and contaminated objects [21,22]. Free-range animals, such as in this study, could have a high risk of exposure to these vectors. Additionally, various studies have shown that free-range chickens have a higher prevalence of *Salmonella* spp. [44,45]. On the other hand, once *Salmonella* spp. entered the crops, the transmission rate was much lower in free range and especially in organic farming systems since there is more space available for each animal [46], and probably due to the better welfare aspects that could lead to a higher immune status of animal herds [47].

Thermophilic *Campylobacter* spp. could be detected in both pigs and chickens with a relatively similar prevalence to a study carried out in Bavaria (Germany) [48]. In this study, the detection rate of *Campylobacter* spp. in pigs (33,3% in total, 30% in pasture 1 and 36,7% in pasture 2) is slightly lower than in the above-mentioned study (36 %) and is considerably lower than the prevalence detected in other regions such as the Netherlands (46% [16] and 85% [49]). In a study from the United Kingdom, the prevalence of *Campylobacter* spp. is variable depending on the health status of animals, e.g., 77% for sick pigs compared to 44% for healthy pigs [3]. However, it should be noted that apart from ours and the Bavarian prevalence study, all the above-described studies collected the samples at the postmortem stage at the slaughterhouse. Stress and conditions during transport of animals to the slaughterhouse can increase the susceptibility of animals to the disease as well as the risk of disease transmission, possibly explaining the high prevalence of *Campylobacter* spp. in slaughtered pigs, as found in the mentioned studies. In addition to the moderate prevalence of *Campylobacter* spp. in pigs, a high colonization with thermophilic *Campylobacter* spp. (88%) in the chicken group was observed and is similar to data previously collected in Bavaria (75%, [48]). Regarding the bacterial species, *C. jejuni* and *C. coli* show a very different prevalence in the respective animal species in this study. The high prevalence of *C. jejuni* in poultry (over 78%) is consistent with previous reports, considering it as the most commonly detected *Campylobacter* species in chickens and as a natural gut inhabitant [16]. The low detection rate (5%) of *C. jejuni* and the predominance of *C. coli* in pigs are also consistent with the results of numerous studies [17,50,51].

The correlation of husbandry types (pasture 1 vs. pasture 2) and the risk of infection with *Campylobacter* spp. was analyzed. Pigs that were in close contact with chickens (pasture 1) have a risk of infection with *C. coli* similarly high to pigs that were kept alone (control group, pasture 2). However, pigs kept in pasture 2 showed a weak correlation to the risk of infection with *C. jejuni*, which is the species that is more frequently found in chickens. The prevalence of *C. jejuni* in the present study was higher in the pigs kept alone than in the pigs kept together with chickens (7% vs. 3%, respectively). Similar results were observed in Denmark, where pig herds kept alone or together with cattle have a tendency of increasing infection with *C. jejuni* than pig herds kept with poultry (i.e., 7.8%, 12.8%, and 4.4% of investigated pig herds, respectively) [50]. In this context, it may be possible that *C. jejuni* has adapted itself to invade other animal species when its specific host (poultry) is not present.

The shedding of *Campylobacter* spp. into soil/ground of pastures was additionally investigated. The prevalences of both *Campylobacter* species in soil samples from pasture 1 were higher than in soil samples from pasture 2. This may be due to the higher concentration of animals in the pasture (35 pigs and 250 chickens in 5 ha for pasture 1, and only 35 pigs for pasture 2). However, the difference was evaluated as statistically non-significant. According to the results of this study, it can be concluded that being kept on pasture 1 (pigs and chickens on mixed husbandry) did not increase the risk of infection of pigs with *Campylobacter* spp. compared to being kept on pasture 2 (pigs kept alone).

The cluster analysis of protein spectra of *Campylobacter* strains ( $n = 201$ ) obtained by MALDI-TOF MS show that the strains were not sorted into groups based on husbandry, but solely into two groups according to the species *C. jejuni* and *C. coli*. The single spectra of the same *Campylobacter* species (*C. coli*/*C. jejuni*) show no differences between those of the pigs/chickens from pasture 1 (mixed husbandry) to the spectra of the pigs from pasture 2 (control group). Since there was no contact between the chickens (pasture 1) and the pigs of the control group during the project, transmission by direct contact can be ruled out. This result confirmed that no alteration regarding the protein composition of a single *Campylobacter* spp. was detected using this method, which does not indicate an increased exchange of these pathogens.

*E. coli* are mostly considered as harmless commensals, but this species also includes pathogenic variants that are associated with a variety of infections in humans and animals. They can be classified into non-pathogenic, commensal, intestinal pathogenic and extraintestinal pathogenic strains. *E. coli* exhibit a very flexible genome that quickly acquires genetic information horizontally. The genomic region contributes to the rapid evolution of variants [52]. Because of this resulting wide range of phenotypes, *E. coli* is a well-suited model organism for tracking studies. Pronounced genomic plasticity leads to a large variability. Other genomic changes such as DNA rearrangements and point mutations can also constantly alter the genome content and thus the fitness and competitiveness of individual variants in specific niches [53,54]. *E. coli* were isolated from all animal samples ( $n = 360$ ). The shedding of *E. coli* in ground samples of pasture 1 (78.3%) was statistically significantly higher than of pasture 2 (51.6%), which may be the result of the higher concentrations of animals in pasture 1, as described in the discussion part for *Campylobacter* spp. By using protein spectrum analysis, the change of an individual strain and the formation of strain clusters can be recognized; thus, their spectra obtained by MALDI-TOF MS and from FT-IR proceeded to similarity analysis and the data was statistically evaluated. The mass spectrometry analysis was applied in this study, since previous studies have shown it to be highly reliable in terms of discriminatory power and the identification accuracy of microorganisms [33,55–57]. Additionally, it requires less material and cost and is rather easy to be conducted with a high number of samples. It may be noted that the results obtained could be extended in subsequent studies using next generation sequencing (NGS) or whole genome sequencing. One possibility would also be the combined and complementary NGS and MALDI-TOF MS techniques for bacterial characterization [58]. However, it was already mentioned in some studies that the 16S rRNA gene, which was often used for the NGS

analysis, is rather insufficient at differentiating bacteria down to species level [59]. Thus, using this gene, the differentiation between *C. jejuni* and *C. coli* and between *E. coli* strains might also not be possible [60]. Therefore, specific gene sequences have to be properly selected for the genome analysis.

MALDI-TOF MS spectra of *E. coli* strains isolated within the same sampling run showed a high similarity. Subsequently, the spectra of all *E. coli* isolates ( $n = 438$ ) were clustered according to the sampling time. Similar results were obtained by FT-IR analysis, indicating that the husbandry types (symbiotic living of chickens and pigs vs. pigs alone) and animal species (pigs vs. chickens) did not have any influence on the cluster formation of FT-IR spectra of *E. coli* isolates. Since an alteration of *E. coli* strains isolated from both animal species and husbandry types was not detected, an increased risk for pathogen exchange due to the symbiotic animal husbandry could not be observed in the one-year study period. However, it has to be mentioned that a methodological limitation of the study relates to the number of investigated colonies per plate. As described in the section material and methods, only one colony of *Campylobacter* spp./*E. coli* per culture plate was investigated by MALDI-TOF MS and FT-IR. In a single animal, there could be different bacterial strains. In this context, the observed effect might have been more pronounced if more colonies had been sampled.

Altogether, traditional culturing and state-of-the-art-methods (MALDI-TOF MS, FT-IR and similarity analysis) were applied to evaluate whether there was a risk of increasing disease transmission between two animal species that were kept together for one year. The results indicate that there is no species barrier regarding the transmission of *Campylobacter* spp. and *E. coli* between pigs and chickens. The prevalences of both *Campylobacter* spp. in both animal species are similar to the results of other studies conducted in the same region (Bavaria, Germany). Additionally, a high prevalence of *C. jejuni* in chickens did not result in a high infection rate of this bacteria in pigs raised in the same pasture. Furthermore, the characteristic alteration of *E. coli* was neither observed in the strains originally isolated from pigs or from chickens.

In terms of food safety, it can be concluded that keeping these animals together in free-ranging husbandry does not increase disease susceptibility and transmission regarding *Campylobacter* spp. and *E. coli*. Subsequently, meat and their products from mixed animal husbandry have no additional risk of being contaminated with pathogens (*Campylobacter* spp., *Salmonella* spp.) and indicator bacteria (*E. coli*). The most important factors when aiming to keep infection rates at a low level are the hygienic management of the animal herd, farm biosecurity, and the density of animals. This study was conducted under optimal conditions, where the animals had plenty of space (the legal requirements for access of chickens to open-air runs (broilers) are 4 m<sup>2</sup> (organic) or 2 m<sup>2</sup> (conventional) [61]), and were raised on pastures that have not been used for a long time. To verify the results obtained in this study, further investigations are required, for example, under the condition that stocking density is increased and/or when the pastures have been continually used for rearing animals.

## 5. Conclusions

This study was conducted to investigate the influence of symbiotic animal husbandry on the risk of bacterial transmission between pigs and chickens and the risk of the exchange of bacterial isolates between both animal species. The results do not indicate an increased risk of transmission for pigs when they are kept together with chickens in a mixed husbandry system (pasture 1) compared to a pasture with pigs alone (pasture 2). The prevalence of *Campylobacter* spp. in pigs was 30.0% in pasture 1 and 36.7% in pasture 2, and 0% regarding *Salmonella* spp. and 100% for *E. coli* for both pastures. Results obtained by similarity analysis of the MALDI-TOF MS and FT-IR spectra show that husbandry types and animal species did not have any influence on the cluster formation of *Campylobacter* spp. and *E. coli* strains, indicating that protein alteration of isolates of both bacterial species did not occur to a significant extent during the studied period. Therefore, in addition

to the highly positive effects on animal welfare and sustainability associated with the symbiotic rearing system, a higher risk of transmission of the investigated pathogens was not ascertained. Neither the composition of the animal groups nor the duration of grazing rearing had a significant influence on the similarity or exchange of individual pathogens in this study. Thus, the advantages of keeping pigs and chickens together under good grazing conditions are not diminished by the possible transmission of pathogens.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.G. and K.S.; methodology, E.K., S.D.-I. and K.S.; validation, E.K., S.D.-I. and K.S.; formal analysis, E.K. and S.D.-I.; investigation, E.K.; resources, K.S.; data curation, E.K. and S.D.-I.; writing—original draft preparation, E.K.; writing—review and editing, K.S. and S.D.-I.; visualization, E.K.; supervision, K.S.; project administration, K.S. and E.K.; funding acquisition, K.S. and M.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was funded by the Schweisfurth Foundation (Munich, Germany) and Software AG—Foundation (Darmstadt, Germany).

**Institutional Review Board Statement:** After consultation with the responsible authority in the Bavarian State (Germany), no ethical statement of approved animal trials was required for our study. Similar study designs in Germany were also conducted without ethical approvals [62].

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data is contained within the article.

**Acknowledgments:** We would like to thank the Team of Herrmannsdorfer Landwerkstätten (Bavaria State, Germany) for their active support during the sampling process. The authors' great thanks due to their skillful laboratory works are for Sebastian Schlef, Verena Hohenester and Erika Altgenug from the Chair of Food Safety and—Analytics (LMU, Munich). A special thank goes to Sven Reese from the Chair of Animal Anatomy (LMU, Munich) for the statistical data analysis. This article is dedicated to Karl Ludwig Schweisfurth († 2020), a pioneer in the welfare of farm animals and organic food production.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

1. Christoph-Schulz, I. SocialLab—Nutztierhaltung im Spiegel der Gesellschaft. *J. Consum. Prot. Food Saf.* **2018**, *13*, 145–236. [[CrossRef](#)]
2. Jochimsen, H. An ethical foundation for careful animal husbandry. *NJAS—Wagening. J. Life Sci.* **2013**, *66*, 55–63. [[CrossRef](#)]
3. Brumfiel, G. Animal-rights activists invade Europe. *Nature* **2008**, *451*, 1034–1036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Albernaz-Gonçalves, R.; Olmos, G.; Hötzel, M. My pigs are ok, why change?—Animal welfare accounts of pig farmers. *Animal* **2021**, *15*, 100154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Wissenschaftlicher Beirat Agrarpolitik beim BMEL. *Wege zu Einer Gesellschaftlich Akzeptierten Nutztierhaltung. Kurzfassung des Gutachtens*; Wissenschaftlicher Beirat Agrarpolitik beim BMEL: Berlin, Germany, 2015.
6. Eurobarometer, S. *Attitudes of EU Citizens towards Animal Welfare*; European Commission: Brussels, Belgium, 2007.
7. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft. Deutschland, Wie es Isst. Available online: [https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Broschueren/Ernaehrungsreport2017.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Broschueren/Ernaehrungsreport2017.pdf?__blob=publicationFile) (accessed on 25 February 2022).
8. Tallentire, C.W.; Edwards, S.A.; Van Limbergen, T.; Kyriazakis, I. The challenge of incorporating animal welfare in a social life cycle assessment model of European chicken production. *Int. J. Life Cycle Assess.* **2019**, *24*, 1093–1104. [[CrossRef](#)]
9. Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung. Ökologische Tierhaltung. Available online: <https://www.praxis-agrar.de/tier/artikel/oekologische-tierhaltung/> (accessed on 25 February 2022).
10. Aerts, S.; Lips, D.; Spencer, S.; Decuyper, E.; De Tavernier, J. A new framework for the assessment of animal welfare: Integrating existing knowledge from a practical ethics perspective. *J. Agric. Environ. Ethics* **2006**, *19*, 67–76. [[CrossRef](#)]
11. European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA J.* **2021**, *19*, e06971.
12. European Food Safety Authority. *The European Union One Health 2019 Zoonoses Report*; EFSA: Parma, Italy, 2021.
13. Robert-Koch-Institut. *Campylobacter-Enteritis*. Available online: [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Campylobacter.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Campylobacter.html) (accessed on 1 April 2022).
14. Friedman, C.R.; Hoekstra, R.M.; Samuel, M.; Marcus, R.; Bender, J.; Shiferaw, B.; Reddy, S.; Ahuja, S.D.; Helfrick, D.L.; Hardnett, F.; et al. Risk Factors for Sporadic Campylobacter Infection in the United States: A Case-Control Study in FoodNet Sites. *Clin. Infect. Dis.* **2004**, *38*, S285–S296. [[CrossRef](#)]

15. Endtz, H.P. 50—Campylobacter Infections. In *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*, 10th ed.; Ryan, E.T., Hill, D.R., Solomon, T., Aronson, N.E., Endy, T.P., Eds.; Elsevier: London, UK, 2020; pp. 507–511.
16. Møller Nielsen, E.; Engberg, J.; Madsen, M. Distribution of serotypes of Campylobacter jejuni and C. coli from Danish patients, poultry, cattle and swine. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **1997**, *19*, 47–56. [[CrossRef](#)]
17. Alter, T.; Gaull, F.; Kasimir, S.; Gürtler, M.; Mielke, H.; Linnebur, M.; Fehlhaber, K. Prevalences and transmission routes of Campylobacter spp. strains within multiple pig farms. *Vet. Microbiol.* **2005**, *108*, 251–261. [[CrossRef](#)]
18. Robert-Koch-Institut. *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2020*; RKI: Berlin, Germany, 2021.
19. Duijkere, E.V.; Wannet, W.J.B.; Houwers, D.J.; Pelt, W.V. Serotype and Phage Type Distribution of Salmonella Strains Isolated from Humans, Cattle, Pigs, and Chickens in The Netherlands from 1984 to 2001. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 3980–3985. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Shivaprasad, H. Fowl typhoid and pullorum disease. *Rev. Sci. Tech.* **2000**, *19*, 405–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Silva, C.; Calva, E.; Maloy, S. One Health and Food-Borne Disease: Salmonella Transmission between Humans, Animals, and Plants. *Microbiol. Spectr.* **2014**, *2*, 26082128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Ellington, C.; Hebron, C.; Crespo, R.; Machado, G. Unraveling the Contact Network Patterns between Commercial Turkey Operation in North Carolina and the Distribution of Salmonella Species. *Pathogens* **2021**, *10*, 1539. [[CrossRef](#)]
23. Robert-Koch-Institut. Salmonellose (Salmonellen-Gastroenteritis). *RKI-Ratgeber Ärzte* **2016**, *13*. [[CrossRef](#)]
24. Allocati, N.; Masulli, M.; Alexeyev, M.F.; Di Ilio, C. Escherichia coli in Europe: An Overview. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2013**, *10*, 6235–6254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Kayser, F.H. *Medical Microbiology*; Thieme: Stuttgart, Germany, 2005; p. 292.
26. Schwaiger, K.; Harms, K.; Hölzel, C.; Meyer, K.; Karl, M.; Bauer, J. Tetracycline in liquid manure selects for co-occurrence of the resistance genes tet(M) and tet(L) in Enterococcus faecalis. *Vet. Microbiol.* **2009**, *139*, 386–392. [[CrossRef](#)]
27. Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen. *Probenahme und Untersuchung am 21.9./3.11.2011 in der Umgebung der Deponie Eyller Berg*; LANUV/NRW: Essen, Germany, 2011.
28. Lauer, W.F.; Martinez, F.L.; Patel, A. Validation of RAPID'E. coli 2 for Enumeration and Differentiation of Escherichia coli and Other Coliform Bacteria in Selected Foods Performance-Tested Method SM 050601. *J. AOAC Int.* **2007**, *90*, 1284–1315. [[CrossRef](#)]
29. BIORAD. *RAPID'E.coli 2 for Water Testing for the Enumeration of Escherichia coli and Coliforms in Drinking Water for Human Consumption*; Adgene Laboratoire: Le Hom, France, 2019.
30. Bruker Daltonik GmbH. *Compass 1.4 for FLEX Series User Manual, Doc No. 269834. User Manual—Volume 1*; Bruker Daltonik GmbH: Bremen, Germany, 2015.
31. Filip, Z.; Hermann, S.; Demnerová, K. FT-IR spectroscopic characteristics of differently cultivated Escherichia coli. *Czech J. Food Sci.* **2009**, *26*, 458–463. [[CrossRef](#)]
32. Naumann, D.; Helm, D.; Labischinski, H. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature* **1991**, *351*, 81–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ekruth, J.; Gottschalk, C.; Ulrich, S.; Gareis, M.; Schwaiger, K. Differentiation of S. chartarum (Ehrenb.) S. Hughes Chemotypes A and S via FT-IR Spectroscopy. *Mycopathologia* **2020**, *185*, 993–1004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Bruker Daltonik GmbH. *Biotyper IR. User Manual. Doc. No. 5022573 ed*; Bruker Daltonik GmbH: Bremen, Germany, 2017.
35. Herrmannsdorfer Landwirtschafts-Gesellschaft. Weideschweine und Symbiotische Landwirtschaft. Available online: <https://www.herrmannsdorfer.de/landwirtschaft/symbiotisch/> (accessed on 11 March 2022).
36. Eisler, M.C.; Lee, M.R.; Tarlton, J.F.; Martin, G.B.; Beddington, J.; Dungait, J.A.; Greathead, H.; Liu, J.; Mathew, S.; Miller, H. Agriculture: Steps to sustainable livestock. *Nature* **2014**, *507*, 32–34. [[CrossRef](#)]
37. Elzen, B.; Bos, B. The RIO approach: Design and anchoring of sustainable animal husbandry systems. *Technol. Forecast. Soc. Change* **2019**, *145*, 141–152. [[CrossRef](#)]
38. Murgueitio, E.; Barahona, R.; Chará, J.; Flores, M.; Mauricio, R.; Molina, J. The intensive silvopastoral systems in Latin America sustainable alternative to face climatic change in animal husbandry. *Cuba. J. Agric. Sci.* **2016**, *49*, 541–554.
39. Bundesministerium für Wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung. Nachhaltige Landwirtschaft. Available online: [https://www.bmz.de/de/entwicklungspolitik/ernaehrungssicherung/nachhaltige-landwirtschaft#anc=id\\_51074\\_51074](https://www.bmz.de/de/entwicklungspolitik/ernaehrungssicherung/nachhaltige-landwirtschaft#anc=id_51074_51074) (accessed on 27 April 2022).
40. Stadig, L.M.; Rodenburg, T.B.; Ampe, B.; Reubens, B.; Tuytens, F.A.M. Effects of shelter type, early environmental enrichment and weather conditions on free-range behaviour of slow-growing broiler chickens. *Animal* **2017**, *11*, 1046–1053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Landwirtschaft, B.L.F. *Evaluierung Alternativer Haltungsverfahren für Legehennen*; LfL: Thüringen, Germany, 2004.
42. Dawkins, M.S.; Cook, P.A.; Whittingham, M.J.; Mansell, K.A.; Harper, A.E. What makes free-range broiler chickens range? In Situ measurement of habitat preference. *Anim. Behav.* **2003**, *66*, 151–160. [[CrossRef](#)]
43. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL). *Zoonosen-Monitoring 2020*; BVL: Osceola, FL, USA, 2021.
44. Parry, S.; Palmer, S.; Slader, J.; Humphrey, T.; Group, S.E.W.I.D.L. Risk factors for salmonella food poisoning in the domestic kitchen—a case control study. *Epidemiol. Infect.* **2002**, *129*, 277–285. [[CrossRef](#)]
45. Leotta, G.A.; Suzuki, K.; Alvarez, F.; Nuñez, L.; Silva, M.; Castro, L.; Faccioli, M.; Zarate, N.; Weiler, N.; Alvarez, M. Prevalence of Salmonella spp. in backyard chickens in Paraguay. *Int. J. Poultry Sci.* **2010**, *6*, 533–536. [[CrossRef](#)]
46. Bailey, J.; Cosby, D. Salmonella prevalence in free-range and certified organic chickens. *J. Food Prot.* **2005**, *68*, 2451–2453. [[CrossRef](#)]

47. Staley, M.; Conners, M.G.; Hall, K.; Miller, L.J. Linking stress and immunity: Immunoglobulin A as a non-invasive physiological biomarker in animal welfare studies. *Horm. Behav.* **2018**, *102*, 55–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit. Prävalenz von Thermophilen Campylobacter spp. in Kotproben von Rindern, Schweinen und Geflügel Sowie in Lebensmittelproben. Available online: [https://www.lgl.bayern.de/forschung/forschung\\_interdisziplinaer/fp\\_campylobacter\\_kotproben\\_lebensmittelproben.htm](https://www.lgl.bayern.de/forschung/forschung_interdisziplinaer/fp_campylobacter_kotproben_lebensmittelproben.htm) (accessed on 16 March 2022).
49. Weljtens, M.J.B.M.; Bijker, P.G.H.; Van der Plas, J.; Urlings, H.A.P.; Biesheuvel, M.H. Prevalence of campylobacter in pigs during fattening; an epidemiological study. *Vet. Q.* **1993**, *15*, 138–143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Boes, J.; Nersting, L.; Nielsen, E.M.; Kranker, S.; Enøe, C.; Wachmann, H.C.; Baggesen, D.L. Prevalence and Diversity of Campylobacter jejuni in Pig Herds on Farms with and without Cattle or Poultry. *J. Food Prot.* **2005**, *68*, 722–727. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Wang, Y.; Dong, Y.; Deng, F.; Liu, D.; Yao, H.; Zhang, Q.; Shen, J.; Liu, Z.; Gao, Y.; Wu, C.; et al. Species shift and multidrug resistance of Campylobacter from chicken and swine, China, 2008–14. *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *71*, 666–669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Dobrindt, U. (Patho-)Genomics of Escherichia coli. *Int. J. Med. Microbiol.* **2005**, *295*, 357–371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Thomas, C.M.; Nielsen, K.M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 711–721. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Cameron, A.D.; Redfield, R.J. Non-canonical CRP sites control competence regulons in Escherichia coli and many other  $\gamma$ -proteobacteria. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 6001–6014. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Dubois, D.; Leyssene, D.; Chacornac, J.P.; Kostrzewa, M.; Schmit, P.O.; Talon, R.; Bonnet, R.; Delmas, J. Identification of a Variety of Staphylococcus Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48*, 941–945. [[CrossRef](#)]
56. Ilina, E.N.; Borovskaya, A.D.; Serebryakova, M.V.; Chelysheva, V.V.; Momynaliev, K.T.; Maier, T.; Kostrzewa, M.; Govorun, V.M. Application of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the study of Helicobacter pylori. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 328–334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Nagy, E.; Maier, T.; Urban, E.; Terhes, G.; Kostrzewa, M. Species identification of clinical isolates of Bacteroides by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* **2009**, *15*, 796–802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Sabença, C.; de Sousa, T.; Oliveira, S.; Viala, D.; Théron, L.; Chambon, C.; Hébraud, M.; Beyrouthy, R.; Bonnet, R.; Caniça, M.; et al. Next-Generation Sequencing and MALDI Mass Spectrometry in the Study of Multiresistant Processed Meat Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE). *Biology* **2020**, *9*, 89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Fadeev, E.; Cardozo-Mino, M.G.; Rapp, J.Z.; Bienhold, C.; Salter, I.; Salman-Carvalho, V.; Molari, M.; Tegetmeyer, H.E.; Buttigieg, P.L.; Boetius, A. Comparison of two 16S rRNA primers (V3–V4 and V4–V5) for studies of arctic microbial communities. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 637526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Hansson, I.; Persson, M.; Svensson, L.; Engvall, E.O.; Johansson, K.-E. Identification of nine sequence types of the 16S rRNA genes of Campylobacter jejuni subsp. jejuni isolated from broilers. *Acta Vet. Scand.* **2008**, *50*, 10. [[CrossRef](#)]
61. DLG. *DLG Merkblatt 406: Haltung von Masthühnern*; DLG Verlag: Frankfurt, Germany, 2017.
62. Schwaiger, K.; Storch, J.; Bauer, C.; Bauer, J. Development of selected bacterial groups of the rectal microbiota of healthy calves during the first week postpartum. *J. Appl. Microbiol.* **2020**, *128*, 366–375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## 4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Umsetzbarkeit einer neuen, nachhaltigeren Haltungform im Sinne des Tierschutzes zu prüfen, indem das potenzielle Risiko des Erregeraustauschs bei der gemeinsamen Weidehaltung von Schweinen und Hühnern analysiert wurde. In dieser Studie wurde untersucht, ob diese Haltungspraxis die Prävalenz wichtiger Zoonoseerreger und Indikatorkeime wie *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. und *E. coli* beeinflusst und ob es zu einer verstärkten Übertragung zwischen den beiden Tierarten kommt. Hierzu wurden die Ergebnisse von kultureller Anzucht, MALDI-TOF MS und FT-IR der aus beiden Haltungformen (Weide 1: Hühner und Schweine gemeinsam/Versuchsweide; Weide 2: nur Schweine/Kontrollweide) isolierten Bakterien miteinander verglichen. Die Anwendung von MALDI-TOF MS ermöglicht nicht nur eine präzise Identifikation der Spezies, sondern auch die gleichzeitige Erstellung von Spektren zur anschließenden Clusteranalyse. Durch die Kombination mit der FT-IR können somit eine für statistisch valide Ergebnisse erforderliche umfangreiche Anzahl von Proben und Isolaten für die Clusteranalyse erstellt werden. Die Durchführung einer Genanalyse bei einer derart großen Probenmenge hätte erheblich mehr Aufwand und Kosten verursacht (Sabença et al., 2020).

In dem Zeitraum von September 2019 bis Oktober 2020 wurden 120 Bodenproben sowie Rektal- bzw. Kloakentupfer von 240 Schweinen bzw. 120 Hühnern kulturell auf das Vorkommen von *E. coli*, *Campylobacter* spp. und *Salmonella* spp. untersucht. Von jeder kulturell positiven Probe wurde ein Isolat mittels MALDI-TOF MS und FT-IR vergleichend analysiert. Insgesamt wurden 438 *E. coli* und 201 *Campylobacter* spp.-Stämme untersucht. Salmonellen wurden in keiner Probe nachgewiesen (Kaeder et al., 2022).

### 4.1 Überprüfung eines Erregeraustauschs zwischen Schwein und Huhn

#### 4.1.1 *Escherichia coli*

*E. coli* wurden aus allen untersuchten Rektal- bzw. Kloakentupfern isoliert (n = 360). In den Bodenproben, welche während der Belegung der Weiden entnommen wurden, war die *E. coli* Prävalenz auf Weide 1 mit 78,3 % statistisch signifikant höher als auf Weide 2 mit 51,6 % (Kaeder et al., 2022). Diese Diskrepanz ist möglicherweise auf die unterschiedliche Besatzdichte

von Tieren zurückzuführen, da Weide 2 lediglich mit Schweinen belegt wurde und auf Weide 1 zusätzlich zu der gleichen Menge an Schweinen noch Hühner gehalten wurden. Auf diese Vermutung wird im Diskussionsteil von *Campylobacter* spp. noch näher eingegangen.

Die Spektren, welche durch die Messung mittels MALDI-TOF MS und FT-IR gewonnen wurden, wurden einer Ähnlichkeitsanalyse unterzogen und die gewonnenen Daten statistisch ausgewertet, da bei der Proteinspektrometrie die Veränderung eines einzelnen Stamms und die Bildung von Clustern zwischen verschiedenen Isolaten erkannt werden können. In Bezug auf die Trennschärfe und die Identifikationsgenauigkeit von Mikroorganismen erwies sich die Massenspektrometrie in vorangegangenen Studien als sehr zuverlässig (Dubois et al., 2010; Ekruth et al., 2020; Ilina et al., 2010; Nagy et al., 2009).

Generell wiesen alle *E. coli*, die innerhalb desselben Probenahmeverganges isoliert wurden, eine hohe Ähnlichkeit in den MALDI-TOF-MS-Spektren auf - unabhängig davon, von welcher Tierart oder Weide sie entnommen wurden. Auffällig war außerdem, dass sich bei allen Isolaten (n = 438) Cluster bildeten, welche abhängig von dem Zeitpunkt der Probenahme waren. Die Konsistenz der Ergebnisse in der FT-IR-Analyse bestätigt die Befunde aus der MALDI-TOF-Analyse, die darauf hinweisen, dass weder die Haltungsbedingungen (gemeinsame oder alleinige Haltung) noch die Tierart (Schwein oder Huhn) einen Einfluss auf die Clusterbildung der entsprechenden Spektren der *E. coli*-Isolate hatten.

Beim Vergleich der Spektren aus ein und demselben Beprobungsdurchgang wurde festgestellt, dass zu Beginn der Studie (Beprobungsdurchgänge eins bis drei) eine hohe Diversität in den Spektren von *E. coli* bestand, was zu einer großen Anzahl von Clustern führte. Jedes Cluster umfasste Isolate aus beiden Haltungsformen und/oder Tierarten. Im Laufe der Zeit (Beprobungsläufe 4-12) reduzierte sich die Anzahl der Cluster auf ein bis drei, da sich die Spektren der Isolate immer mehr ähnelten, unabhängig davon, ob sie von Hühnern oder Schweinen von Weide 1 oder Weide 2 isoliert wurden. Eine manifeste Transformation eines einzelnen *E. coli* Isolats wurde nach dieser Analyse nicht festgestellt. Methodisch muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass jeweils nur eine Kolonie pro Anreicherung mittels MALDI-TOF MS und FT-IR untersucht wurde. Hätte man pro Tier mehrere Bakterienisolate untersucht, wäre der zu beobachtende Effekt ggf. noch ausgeprägter gewesen (Kaeder et al., 2022).

#### 4.1.2 *Campylobacter* spp.

Thermophile *Campylobacter* konnten bei beiden Tierarten nachgewiesen werden; die Prävalenzen ähnelten dabei einer Studie, welche ebenso in Bayern durchgeführt wurde (LGL, 2014). Die *Campylobacter* spp. Prävalenz bei Schweinen (33,3 % insgesamt) liegt geringfügig niedriger als in der oben genannten Studie (36 %), wobei Letztere aber noch deutlich niedriger ist als in anderen Regionen, wie zum Beispiel in Studien aus den Niederlanden (46 % (Møller Nielsen et al., 1997) und 85 % (Weljens et al., 1993)) oder in Studien aus dem Vereinigten Königreich; dort lag die Prävalenz bei Schweinen bei 69,3 % (Milnes et al., 2008). Eine mögliche Erklärung für die abweichenden Ergebnisse ist, dass bei allen außer dieser und der anderen bayerischen Studie die Proben postmortal im Schlachthof entnommen wurden. Durch den engen Kontakt der Tiere und den Stress beim Transport zum Schlachthof könnte es sein, dass die Anfälligkeit der Tiere für eine Infektion und das Risiko einer Erregerübertragung erhöht waren (Kaeder et al., 2022) und somit zu einer erhöhten Prävalenz geführt haben.

Im Gegensatz zur mäßigen Prävalenz bei Schweinen konnten thermophile *Campylobacter* spp. bei der untersuchten Hühnergruppe häufig nachgewiesen werden (88 %). Auch diese Zahlen ähneln den Daten, welche zuvor in Bayern erhoben wurden (75 %) (LGL, 2014).

Zwischen den beiden Spezies *C. jejuni* und *C. coli* zeigten sich sehr unterschiedliche Prävalenzen in Bezug auf die jeweilige Tierart.

Die hohe Prävalenz von *C. jejuni* bei Geflügel (über 78 %) stimmt mit früheren Berichten überein, wonach es sich dabei um die am häufigsten bei Hühnern nachgewiesene *Campylobacter*-Spezies handelt und dort zu den natürlichen Darmbewohnern gehört (Møller Nielsen et al., 1997). Die dagegen sehr niedrige Nachweisrate (5 %) von *C. jejuni* bei Schweinen und das klare Überwiegen von *C. coli* stimmen ebenfalls mit zahlreichen vorangegangenen Studien überein ((Alter et al., 2005; Boes et al., 2005; Wang et al., 2015). Die Fragestellung dieser Studie war allerdings vielmehr, inwieweit eine gemeinsame Haltung von Schweinen und Hühnern zur Übertragung von *Campylobacter* spp. zwischen beiden Tierarten führt. Schweine, die engen Kontakt mit Hühnern hatten (Weide 1), wiesen eine ähnliche *C. coli* Prävalenz auf wie Schweine, welche allein gehalten wurden (Weide 2). Bei den Hühnern lag die *C. coli* Prävalenz über den kompletten Zeitraum mit 9 % auf einem gleichbleibenden Niveau.

Überraschenderweise zeigten die Schweine der alleinigen Haltung (Weide 2) eine etwas höhere *C. jejuni* Prävalenz (7 %) als die Schweine in gemeinsamer Haltung (3 %), trotz der hohen Prävalenz bei den Hühnern (88 %). Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen einer Studie aus Dänemark. Dort konnten in Schweinebeständen, die allein oder mit Rindern gehalten wurden, häufiger *C. jejuni* nachgewiesen werden, wohingegen Schweinebestände in gemeinsamer Haltung mit Geflügel niedrigere Infektionsraten aufwiesen (7,8 %, 12,8 % und 4,4 %) (Boes et al., 2005). Es ist möglich, dass *C. jejuni* sich an andere Tierarten anpasst, wenn sein spezifischer Wirt (Geflügel) nicht vorhanden ist (Kaeder et al., 2022).

Neben den Tupferproben wurde auch der Boden auf das Vorkommen von *Campylobacter* spp. untersucht. Hier wurde festgestellt, dass die Prävalenz im Boden von Weide 1 höher war als die Prävalenz von Weide 2. Die Verteilung von *C. coli* und *C. jejuni* in den Bodenproben von Weide 1 war ähnlich (12,0 % bzw. 10,0 %), ebenso wie in den Bodenproben von Weide 2, wo die Prävalenz deutlich niedriger war (3,0 % bzw. 2,0 %) als auf Weide 1, jedoch nicht statistisch signifikant ( $p > 0,05$ ). Eine mögliche Erklärung ist, dass die höhere Besatzdichte der Tiere (35 Schweine und 250 Hühner auf 2,5 ha auf Weide 1 gegen 35 Schweine auf Weide 2) ursächlich für diese Ergebnisse waren (Kaeder et al., 2022).

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die gemeinsame Haltung (Weide 1) im Vergleich zur alleinigen Haltung nicht zu einer erhöhten *Campylobacter* spp. Prävalenz führt.

Des Weiteren zeigt die Clusteranalyse der Proteinspektren aller mittels der MALDI-TOF MS gemessenen *Campylobacter* ( $n = 201$ ), dass sich die Stämme nicht nach der Haltungsform gruppierten, sondern lediglich nach ihrer Art (*C. jejuni/C. coli*). Die Einzelspektren der gleichen *Campylobacter*-Spezies (*C. coli/C. jejuni*) zeigen keine Unterschiede zwischen den Spektren der Schweine/Hühner von Weide 1 (Mischhaltung) zu den Spektren der Schweine von Weide 2 (Kontrollgruppe) (Kaeder et al., 2022). Da über einen Doppelzaun sichergestellt werden konnte, dass es während der Projektlaufzeit zu keinem Kontakt zwischen den Hühnern auf Weide 1 und den Schweinen der Kontrollgruppe kam, kann eine Übertragung durch direkten Kontakt ausgeschlossen werden. Daher lässt sich durch die Anwendung dieser Methode das Ergebnis unterstützen, dass die Art der Tierhaltung keine Hinweise auf eine erhöhte

Übertragung von Krankheitserregern liefert, da keine Veränderungen in der Proteinstruktur der verschiedenen *Campylobacter* spp. nachgewiesen werden konnten.

#### **4.1.3 *Salmonella* spp.**

Bei keiner der untersuchten Proben konnten in dieser Studie *Salmonella* spp. isoliert werden (Kaeder et al., 2022).

Eine Studie des Bundesamts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit in Deutschland (2020) zeigte, dass die Prävalenz von *Salmonella* spp. in Kotproben von Masthähnchen 2,6 % und von Masttruthühnern 2,4 % betrug, während 4,6 % der Kotproben von Wildschweinen und 4,0 % der geschlachteten Mastschweine positiv auf Salmonellen getestet wurden (BVL, 2021). Es zeigt sich zwar nur eine geringe Prävalenz in den Nutztierbeständen, allerdings wurden Salmonellen in die Studie mit aufgenommen, da die Freilandhaltung, wie im Literaturteil beschrieben, viele verschiedene Möglichkeiten der Erregerübertragung bietet. Außerdem haben verschiedene Studien gezeigt, dass Hühner in der Freilandhaltung grundsätzlich eine höhere Prävalenz von *Salmonella* spp. aufweisen (Leotta et al., 2010; Parry et al., 2002). Allerdings ist die Übertragungsrate in der Freilandhaltung und insbesondere im ökologischen Landbau viel geringer, da mehr Platz für jedes Tier zur Verfügung steht (Bailey und Cosby, 2005) und wahrscheinlich die besseren Tierschutzbedingungen zu einem erhöhten Immunstatus der Herden führen konnte (Staley et al., 2018).

## **4.2 Tierwohl, artgemäße und nachhaltige Nutztierhaltung**

Die Möglichkeit, verschiedene Tierarten, wie in diesem Fall Hühner und Schweine, gemeinsam auf Weideflächen zu halten, kann verschiedene positive Einflüsse haben. Neben der Möglichkeit, mit dieser Form der Haltung den Tierschutz zu verbessern (Herrmannsdorfer Landwerkstätten Glonn GmbH & Co. KG, 2020), kann eine nachhaltigere Art der Tierhaltung gefördert werden. Durch die gemeinsame Haltung von zwei verschiedenen Tierarten wird nur eine statt der üblichen zwei Weiden benötigt, was die Auslastung der Fläche erhöht und sich positiv auf das Tierwohl auswirkt. Außerdem zeigte sich, so eine Nebenbeobachtung dieser Studie, dass sich die Hühner auf der gesamten Weide verteilen und somit den gesamten Teil der Weide zum Scharren und zur Futtersuche nutzen. Es könnte sein, dass sich die Hühner von

den Schweinen geschützt fühlen, da verschiedene Studien in der Vergangenheit gezeigt haben, dass Hühner auch bei viel zur Verfügung stehender Fläche immer nah am Stall bleiben (LfL, 2004; Stadig et al., 2017) und einen Auslauf nur dann nutzen, wenn sie Schutz in Form eines Unterstandes finden (Dawkins et al., 2003).

Vorbehalte gegen die gemischte Art der Tierhaltung werden oft von Seiten der Veterinärbehörden geäußert. Es wird vermutet, dass die Interaktion verschiedener Tierarten nicht nur die Übertragung von bakteriellen Infektionen begünstigen könnte, was zu vermehrten Krankheitsausbrüchen führt, sondern auch eine potenzielle Kontaminationsquelle für Lebensmittel darstellen könnte.

Einzug in die Lebensmittelvermarktung hat der Begriff „Tierwohl“ durch die Haltungsformkennzeichnung der Initiative Tierwohl gefunden. Diese Initiative ist ein Zusammenschluss verschiedener deutscher Lebensmittelketten, der Landwirtschaft und Fleischwirtschaft. Seit April 2019 werden Lebensmittel teilweise mit einem vierstufigen Tierwohllabel gekennzeichnet. Bei diesem Label werden die Haltungsformen in vier Stufen eingeteilt; von Stufe 1 „Stallhaltung“, entspricht den gesetzlichen Mindestanforderungen, bis Stufe 4 „Premium“, zu welcher Bioprodukte zählen. (Gesellschaft zur Förderung des Tierwohls in der Nutztierhaltung mbH). Auch staatlich wird eine Tierwohlkennzeichnung verbindlich in die Kennzeichnung aufgenommen, damit die Haltungsbedingungen für den Verbraucher ersichtlich werden. Diese ist im aktuellen Koalitionsvertrag vereinbart; der passende Gesetzesentwurf passierte Mitte Oktober 2022 den Deutschen Bundestag, und am 24. August 2023 ist das entsprechende Gesetz in Kraft getreten. Hier soll es sich um eine verbindliche fünfstufige Tierwohlskala handeln; von „Haltungsform Stall“ bis „Haltungsform Bio“ (BMEL, 2022, 2023).

Das größte Problem, dem die landwirtschaftliche Viehwirtschaft gegenübersteht, ist die immer weiter steigende weltweite Bevölkerungspopulation (Thompson, 2015). Im Sinne des Tierwohls müsste die Nachfrage nach tierischem Protein bestenfalls sinken, allerdings steigt die Nachfrage weltweit weiter an. Dadurch werden landwirtschaftliche Viehwirtschaften zu größerer und verstärkter Bewirtschaftung getrieben. In Deutschland geht der Tierbestand an Nutztieren seit Jahren zwar zurück; so sank die Zahl der Schweine von 2012 bis 2022 um

20,8 %, allerdings sanken in der gleichen Zeit die Anzahl der Schweinehaltungsbetriebe um 41 %. Somit steigt der Tierbestand je Betrieb weiter an (Statistisches Bundesamt, 2022).

Insgesamt führen die größer werdenden Tierzahlen pro Produzenten zu mehr Effizienz, allerdings existiert eine enorme Gefahr des ökologischen Einflusses auf das Klima, das Grundwasser, die Luftqualität und auch des negativen Einflusses auf das Tierwohl des einzelnen Nutztieres. So werden beispielsweise 10 bis 12 % der klimarelevanten Gase weltweit durch die Landwirtschaft verursacht (Fließbach et al., 2008). Die Bestandsdichte musste die letzten Jahrzehnte für diese Art der Haltung deutlich erhöht werden und die artgerechte Tierhaltung mit entsprechendem Platz und sozialen Interaktionen musste gleichermaßen zurückstecken. Die Nutztierhaltung wurde immer mehr technologisiert, und die Vorstellung von einer artgerechten Tierhaltung, in der jedes Tier eine Einzelbedeutung besitzt, wurde immer unrealistischer (Werkheiser, 2020).

Insgesamt ist die Nachhaltigkeit in der Nutztierhaltung wichtig, um die Bedürfnisse der heutigen Generation zu erfüllen, ohne die Bedürfnisse zukünftiger Generationen zu gefährden, und um sicherzustellen, dass die Nutztierhaltung sowohl ökologisch als auch sozial verantwortlich ist. So sind die derzeitigen Ernährungssysteme sowohl Teil der Ursache als auch Opfer dieser Umweltveränderungen (BMZ, 2022). Durch den Druck, die Produktion von Fleisch und Fleischprodukten zu maximieren, wird das Gleichgewicht zwischen Fütterung und Ertrag massiv verschoben und ist im Umkehrschluss nicht mehr mit Tierschutz- und Umweltaspekten in Einklang zu bringen (Eisler et al., 2014; Elzen und Bos, 2019). Um die Landwirtschaft nachhaltiger und damit zukunftsfähig zu machen, wird stetig nach neuen Ansätzen im Bereich der Nutztierhaltung gesucht (Murgueitio et al., 2016). Wenn die Nahrungsmittelversorgung der wachsenden Weltbevölkerung langfristig gesichert werden soll, müssen sich Produktionssysteme und Konsummuster grundlegend ändern. Die Herausforderung besteht darin, die Erträge auf den bestehenden Böden zu steigern, ohne sie auszulaugen und damit ihre Fruchtbarkeit zu reduzieren (BMZ, 2022). Durch die steigende Weltbevölkerung ist die Sicherung der Ernährungssicherheit und der natürlichen Ressourcen zu einer politischen und gesellschaftlichen Kernaufgabe des 21. Jahrhunderts geworden. In Deutschland und Europa wird die Situation durch unterschiedlich produktive Regionen erschwert. Auf der einen Seite gibt es Gegenden, welche hoch produktiv sind und durch intensive Nutzung zwar hohe Erträge erzielen, wobei die natürlichen Ressourcen allerdings

aufgebraucht werden. Auf der anderen Seite wird in unproduktiven Gegenden die Nutzung stillgelegt (EEA, 2010; Feindt et al., 2019).

Die Erhaltung des Bodens ist gesamtgesellschaftlich zu betrachten, damit er auch für die nachfolgenden Generationen noch ertragreich ist. Die erzeugten Nahrungsmittel sollen von bestmöglicher Qualität sowie sicher sein und aus erneuerbaren Ressourcen einer ökologisch ausgewogenen Wirtschaft stammen, einschließlich Boden, Grundwasser und begrenzter Rohstoffe. Um die langfristige Erhaltung der natürlichen Ressourcen sicherzustellen, ist es erforderlich, die Tierhaltung ebenfalls in Richtung Nachhaltigkeit zu entwickeln (acatech, 2019). Ein möglichst gesundes Ökosystem muss durch Minderung der Treibhausgasemission und Reduzierung von Klimarisiken zukunftsfähig gemacht werden (BMZ, 2022).

### **4.3 Konsequenzen für die gemeinsame Weidehaltung**

Der Fokus dieser Studie lag darauf, mittels konventioneller Kultivierung und moderner Methoden (MALDI-TOF MS, FT-IR und Ähnlichkeitsanalyse) herauszufinden, ob es eine erhöhte Erregerübertragung zwischen zwei Tierarten gibt, welche von einer Weide stammen, die ein Jahr ununterbrochen belegt wurde. Die Prävalenzen der beiden *Campylobacter* spp. in beiden Tierarten entsprechen den Ergebnissen anderer Studien, welche in der gleichen Region (Bayern, Deutschland) durchgeführt wurden. Außerdem führte eine hohe Prävalenz von *C. jejuni* bei Hühnern nicht zu einer hohen Infektionsrate dieses Bakteriums bei Schweinen, welche auf der gleichen Weide gehalten wurden. Des Weiteren wurde anhand der MALDI-TOF MS und FT-IR Analyse keine Annäherung in der Clusterbildung von *E. coli* im Vergleich zu vor der gemeinsamen Haltung bei den Schweinen oder bei den Hühnern beobachtet (Kaeder et al., 2022).

Im Hinblick auf die Lebensmittelsicherheit kann der Schluss gezogen werden, dass die gemeinsame Haltung dieser Tiere nicht zu einer erhöhten Übertragung von *Campylobacter* spp. und *E. coli* führt. Folglich lassen sich in dieser Studie keine Hinweise auf ein zusätzliches Risiko einer Kontamination für Fleisch und seine Erzeugnisse aus gemischter Tierhaltung erkennen (*Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *E. coli*). Die wichtigsten Maßnahmen, um die Infektionsraten auf einem niedrigen Niveau zu halten, sind ein gutes Hygienemanagement der Herde, die Biosicherheit im Betrieb und eine angepasste Tierdichte. Es ist anzumerken, dass

diese Studie unter optimalen Bedingungen durchgeführt wurde. Die Tiere hatten viel Platz (rund 12,5 m<sup>2</sup> pro Huhn und rund 83 m<sup>2</sup> pro Schwein), während die gesetzlichen Anforderungen für den Zugang zur Auslauffläche von Masthähnchen 4 m<sup>2</sup> (ökologisch) bzw. 2 m<sup>2</sup> (konventionell) betragen. Bei Schweinen sind die gesetzlichen Anforderungen für den Zugang zur Auslauffläche nur in der ökologischen Haltung geregelt (1,3 m<sup>2</sup> drinnen, plus 1 m<sup>2</sup> im Freien) (BMEL, 2020; DLG, 2017). Außerdem wurden sie auf Weiden gehalten, die seit über 10 Jahren nicht mehr landwirtschaftlich genutzt wurden. Um die Ergebnisse dieser Studie zu verifizieren, sind weitere, längerfristige Untersuchungen erforderlich, in denen die beschriebenen Bedingungen modifiziert werden (erhöhte Besatzdichte, kontinuierlich genutzte Weidefläche, etc.).

## 5 Zusammenfassung

In dieser Studie wurde die gemeinsame Weidehaltung verschiedener Tierarten (Schweine und Hühner) als Möglichkeit betrachtet, tierschutzrelevante Synergieeffekte zu nutzen und die Nachhaltigkeit in der Tierhaltung zu steigern. Die Vorteile der symbiotischen Haltung von Hühnern und Schweinen sind besserer Futterzugang für Hühner durch das Aufwühlen des Bodens sowie Schutz vor Raubtieren, z. B. Füchsen oder Greifvögeln und Schutz der Schweine vor Ektoparasiten durch die Hühner. Gleichzeitig wurde überprüft, inwieweit durch diese Art der Haltung ein erhöhter mikrobieller Austausch zwischen den Tieren stattfindet, welcher in der Konsequenz über Kontaminationen die Sicherheit der aus ihnen gewonnenen Lebensmittel für den Verbraucher negativ beeinflussen könnte. Dazu wurde die Prävalenz ausgewählter lebensmittelrelevanter Zoonoseerreger bzw. Indikatorkeime (*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia (E.) coli*) bei Schweinen und Hühnern und dem Boden, auf dem sie gehalten wurden (Weide 1 = gemeinsame Haltung Schweine/Hühner; Weide 2 = Kontrollgruppe Schweine) über einen Zeitraum von 12 Monaten durch monatliche bakteriologische Untersuchungen von Rektal- bzw. Kloakentupfern sowie von Bodenproben ermittelt. Um die Ähnlichkeiten der isolierten Bakterienstämme zu untersuchen, wurden die Proteinspektren von *Campylobacter* spp. und *E. coli* unter Verwendung von MALDI-TOF MS (Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung mit Flugzeitanalyse (time of flight) Massenspektrometrie) und dem Clustering-Programm BioNumerics verglichen. Zusätzlich wurden die aus den Tieren isolierten *E. coli* (n = 360) mittels FT-IR- (Fourier-Transformations-Infrarot-) Spektroskopie vergleichend untersucht. Die Prävalenz von *Campylobacter* spp. bei Schweinen betrug 30,0 % auf Weide 1 und 36,7 % auf Weide 2; in keiner Probe (Boden, Rektal-, Kloakentupfer) konnten Salmonellen nachgewiesen werden (Prävalenz 0 %). In allen Rektal- und Kloakentupfern wurden *E. coli* nachgewiesen (Prävalenz 100 %). Der Pearson-Korrelationskoeffizient (*r*-Wert) zeigt keine Korrelation zwischen den Haltungsformen und dem Nachweis von *C. coli* ( $r = 0,03$ ,  $p = 0,57$ ) sowie dem Nachweis von *C. jejuni* bei Schweinen ( $r = 0,08$ ,  $p = 0,24$ ). Die Ähnlichkeitsuntersuchungen der MALDI-TOF MS- und FT-IR-Spektren ergaben, dass die Haltungsform und die Tierart keinen Einfluss auf die Clusterbildung von *Campylobacter* spp. und *E. coli* hatten (Pearson's Chi-Quadrat-Test: asymptotische Signifikanz (zweiseitig) = 0,984 und 0,283). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass während des untersuchten Zeitraums nur geringfügige

---

Veränderungen in den Isolaten der beiden Bakterienarten auftraten. Dies legt nahe, dass das Risiko dieser Bakterien zwischen Schweinen und Hühnern nicht signifikant erhöht ist. Die Vorteile der gemeinsamen Weidehaltung unter günstigen Bedingungen bleiben daher unbeeinträchtigt, da weder die Gruppenzusammensetzung noch die Dauer der Weidehaltung einen messbaren Einfluss auf den Austausch ausgewählter Krankheitserreger hatte. Es gibt somit keine Anzeichen dafür, dass die gemeinsame Haltung von Schweinen und Hühnern ein erhöhtes Risiko für die Lebensmittelsicherheit darstellt.

## 6 Summary

In this study, the common grazing of different animal species (pigs and chickens) was considered as a possibility to use synergy effects that are relevant for animal welfare, and to increase sustainability in animal husbandry. The advantages of symbiotic husbandry of chickens and pigs are better access to feed for chickens by churning up the soil, as well as protection from predators, e.g. foxes or birds of prey, and protection of pigs from ectoparasites by the chickens. Additionally, it was examined to what extent this type of husbandry results in an increased microbial exchange between the animals, which in consequence, could negatively influence the safety of the food obtained from them for the consumer through contamination. For this purpose, the prevalence of selected food-relevant zoonotic pathogens or indicator germs (*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia (E.) coli*) was investigated. Over a period of 12 months, monthly bacteriological examinations of rectal or cloacal swabs and soil samples of the soil on which the animals were kept (pasture 1 = joint pig/chicken husbandry; pasture 2 = control group pigs) were carried out. To investigate the similarities of the isolated bacterial strains, the protein spectra of *Campylobacter* spp. and *E. coli* were compared using MALDI TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionization with time-of-flight (TOF) mass spectrometry) and the clustering program BioNumerics. In addition, *E. coli* isolated from the animals (n = 360) were comparatively analyzed by FT-IR (Fourier Transform Infrared) spectroscopy. The prevalence of *Campylobacter* spp. in pigs was 30.0% in pasture 1 and 36.7% in pasture 2; *Salmonella* was not detected in any sample (soil, rectal, cloacal swabs; prevalence 0%). *E. coli* was detected in all rectal and cloacal swabs (prevalence 100%). The Pearson correlation coefficient (*r*-value) showed no correlation between the husbandry systems and the detection of *C. coli* ( $r = 0.03$ ,  $p = 0.57$ ) and the detection of *C. jejuni* in pigs ( $r = 0.08$ ,  $p = 0.24$ ). The similarity tests of the MALDI TOF MS and FT IR spectra revealed that the husbandry system and animal species had no effect on the clustering of *Campylobacter* spp. and *E. coli* (Pearson's chi-square test: asymptotic significance (two-sided) = 0.984 and 0.283, respectively). The results indicate that only minor changes occurred in the isolates of the two bacterial species during the period studied. This suggests that the risk of these bacteria is not significantly increased between pigs and chickens. Thus, the benefits of shared grazing under favorable conditions remain unaffected because neither group composition nor duration of grazing had a measurable effect on the exchange of selected

pathogens. There is no evidence that keeping pigs and chickens together poses an increased risk to food safety.

## 7 Literaturverzeichnis

ABEBE, E., GUGSA, G. & AHMED, M. (2020) Review on major food-borne zoonotic bacterial pathogens. *Journal of Tropical Medicine* 2020

ACATECH (2019) Nachhaltige Landwirtschaft (acatech HORIZONTE). Hrsg. ACATECH – DEUTSCHE AKADEMIE DER TECHNIKWISSENSCHAFTEN. München

ALTER, T., GAULL, F., KASIMIR, S., GÜRTLER, M., MIELKE, H., LINNEBUR, M. & FEHLHABER, K. (2005) Prevalences and transmission routes of *Campylobacter* spp. strains within multiple pig farms. *Veterinary microbiology* 108, 251-261

AMARA, A., ZIANI, Z. & BOUZOUBAA, K. (1995) Antibioresistance of *Escherichia coli* strains isolated in Morocco from chickens with colibacillosis. *Veterinary microbiology* 43, 325-330

ARNDT, T. (2019) Infrarot-Spektrometrie. In *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, Springer. 1248-1249

BAILEY, J. & COSBY, D. (2005) *Salmonella* prevalence in free-range and certified organic chickens. *Journal of Food Protection* 68, 2451-2453

BANERJI, S., SIMON, S., TILLE, A., FRUTH, A. & FLIEGER, A. (2020) Genome-based *Salmonella* serotyping as the new gold standard. *Scientific Reports* 10, 4333

BÄUMLER, A. J., HARGIS, B. M. & TSOLIS, R. M. (2000) Tracing the Origins of *Salmonella* Outbreaks. *Science* 287, 50-52

BECKER, H. & OPPERMAN, R. (1994) Der Ärger mit der Landwirtschaft. Umweltkritik und Ablehnung landwirtschaftlicher Produktion als Alltagserfahrung der heutigen Landwirtschaft. *Proceedings "Schriften der Gesellschaft für Wirtschafts- und Sozialwissenschaften des Landbaues eV"* 30, 379-386

BERGTHORSSON, U. & OCHMAN, H. (1995) Heterogeneity of genome sizes among natural isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 177, 5784-5789

BERTRAND, S., RIMHANEN-FINNE, R., WEILL, F., RABSCH, W., THORNTON, L., PEREVOŠČIKOV, J., VAN PELT, W., HECK, M. & TEAM, E. E. (2008) *Salmonella* infections associated with reptiles: the current situation in Europe. *Eurosurveillance* 13, 18902

BFR (2009) Bundesamt für Risikobewertung: Vorkommen von pathogenen Mykobakterien bei Mastschweinen.

[https://mobil.bfr.bund.de/cm/343/vorkommen\\_von\\_pathogenen\\_mykobakterien\\_bei\\_mast\\_schweinen.pdf](https://mobil.bfr.bund.de/cm/343/vorkommen_von_pathogenen_mykobakterien_bei_mast_schweinen.pdf). Letzter Zugriff 10.06.2023

BFR (2020) Bundesamt für Risikobewertung: Next Generation Sequencing - Möglichkeiten und Grenzen beim Gesundheitsschutz von Mensch und Tier. <https://mobil.bfr.bund.de/cm/343/next-generation-sequencing-moeglichkeiten-und-grenzen-beim-gesundheitsschutz-von-mensch-und-tier.pdf>. Letzter Zugriff 10.08.2023

BISCHOFF, S. C. (2009) Escherichia coli – Pathogenitätsfaktoren und probiotisches Potenzial. Thieme

BLAHA, T. (1993) Epidemiological bases of salmonellosis. Deutsche Geflügelwirtschaft und Schweineproduktion (Germany), pp. 7-9

BLE (2020a) Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung: Schweinehaltung in Deutschland. <https://www.praxis-agrar.de/tier/schweine/schweinehaltung-in-deutschland/>. Letzter Zugriff 27.02.2020

BLE (2020b) „Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung“, Ökologische Tierhaltung. <https://www.praxis-agrar.de/tier/artikel/oekologische-tierhaltung/>. Letzter Zugriff 25.02.2020

BLE (2023a) Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung: Grundlagen der Haltung von Öko-Mastschweinen. <https://www.oekolandbau.de/landwirtschaft/tier/spezielle-tierhaltung/schweine/oekologische-mastschweinehaltung/grundlagen-der-haltung-von-oeko-mastschweinen/>. Letzter Zugriff 07.04.2023

BLE (2023b) Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung: Grundlagen der ökologischen Geflügelhaltung. <https://www.oekolandbau.de/landwirtschaft/oekologische-tierhaltung/oekologische-gefluegelhaltung/>. Letzter Zugriff 25.03.2023

BLE (2023c) Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung: Was ist nachhaltige Landwirtschaft? <https://www.landwirtschaft.de/landwirtschaft-verstehen/wie-funktioniert-landwirtschaft-heute/was-ist-nachhaltige-landwirtschaft>. Letzter Zugriff 19.06.2023

BMEL (2017) Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft: Deutschland, wie es isst. <https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Broschueren/Ernaehrungsreport2017.pdf?blob=publicationFile>. Letzter Zugriff 25.02.2020

BMEL (2020) Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft: Schweine. <https://www.bmel.de/DE/themen/tiere/nutztiere/schweine/schweine.html>. Letzter Zugriff 20.06.2020

BMEL (2021) Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft: Deutschland, wie es isst. <https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/Broschueren/ernaehrungsreport-2021.pdf?blob=publicationFile&v=6>. Letzter Zugriff 20.10.2021

BMEL (2022) Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft: BMEL-Haushalt auf hohem Niveau – und im Plus zur Vor-Corona-Zeit. Nr. 31/2022 edn

BMEL (2023) Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft: Weg frei: Die Tierhaltungskennzeichnung kommt. <https://www.bmel.de/DE/themen/tiere/tierschutz/tierhaltungskennzeichnung/tierhaltungskennzeichnung.html>. Letzter Zugriff 13.09.2023

BMJV (30.6.2017) Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz: Verordnung zum Schutz landwirtschaftlicher Nutztiere und anderer zur Erzeugung tierischer Produkte gehaltener Tiere bei ihrer Haltung (Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung - TierSchNutztV).

BMZ (2022) Bundesministerium für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung: Nachhaltige Landwirtschaft. [https://www.bmz.de/de/entwicklungspolitik/ernaehrungssicherung/nachhaltige-landwirtschaft#anc=id\\_51074\\_51074](https://www.bmz.de/de/entwicklungspolitik/ernaehrungssicherung/nachhaltige-landwirtschaft#anc=id_51074_51074). Letzter Zugriff 27.04.2022

BMZ (2023) Bundesministerium für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung: Nachhaltigkeit (nachhaltige Entwicklung). <https://www.bmz.de/de/service/rechtliche-hinweise>. Letzter Zugriff 19.06.2023

BOES, J., NERSTING, L., NIELSEN, E. M., KRANKER, S., ENØE, C., WACHMANN, H. C. & BAGGESEN, D. L. (2005) Prevalence and Diversity of *Campylobacter jejuni* in Pig Herds on Farms with and without Cattle or Poultry. *Journal of Food Protection* 68, 722-727

BROOM, D. M. & FRASER, A. F. (2015) Domestic animal behaviour and welfare, Frasereditors, 20083100834, English, Book, UK, (Ed.4), Wallingford, (ix + 438 pp.), Cabi

BROWN, M. J. & WINNICKER, C. (2015) Chapter 39 - Animal Welfare. In *Laboratory Animal Medicine (Third Edition)*. Hrsg. FOX, J. G., ANDERSON, L. C., OTTO, G. M., PRITCHETT-CORNING, K. R., WHARY, M. T. Boston, Academic Press. 1653-1672

BRUKER DALTONIK GMBH, B. (2017) Biotyper IR. User manual. Doc. No. 5022573 ed.

BRUKER DALTONIK GMBH, B. (2022) FT-IR Spektroskopie Grundlagen. <https://www.bruker.com/de/products-and-solutions/infrared-and-raman/ft-ir-routine-spectrometer/what-is-ft-ir-spectroscopy.html>. Letzter Zugriff 03.01.2023

BRUMFIEL, G. (2008) Animal-rights activists invade Europe. *Nature* 451, 1034-1036

BUSCH, R. J. & KUNZMANN, P. (2004) Leben mit und von Tieren. In *Ethisches Bewertungsmodell zur Tierhaltung in der Landwirtschaft*. München, Utzverlag

BVL (2021) Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit: Zoonosen-Monitoring 2020, BVL-Report · 17.3, Berichte zur Lebensmittelsicherheit. [https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01\\_Lebensmittel/04\\_Zoonosen\\_Monitoring/Zoonosen\\_Monitoring\\_Bericht\\_2020.pdf?blob=publicationFile&v=6](https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/04_Zoonosen_Monitoring/Zoonosen_Monitoring_Bericht_2020.pdf?blob=publicationFile&v=6). Letzter Zugriff 10.04.2022

BZL (2023) Das Bundesinformationszentrum Landwirtschaft: Ökologische Tierhaltung. <https://www.praxis-agrar.de/tier/tierhaltung/oekologische-tierhaltung>. Letzter Zugriff 03.03.2023

CAMERON, A. D. S. & REDFIELD, R. J. (2006) Non-canonical CRP sites control competence regulons in *Escherichia coli* and many other  $\gamma$ -proteobacteria. *Nucleic acids research* 34, 6001-6014

- CHAKRAVORTY, S., HELB, D., BURDAY, M., CONNELL, N. & ALLAND, D. (2007) A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of microbiological methods* 69, 330-339
- CHRISTOPH-SCHULZ, I. (2018) SocialLab – Nutztierhaltung im Spiegel der Gesellschaft. *Journal of Consumer Protection and Food Safety* 13, 145-236
- CLARK, A. E., KALETA, E. J., ARORA, A. & WOLK, D. M. (2013) Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical microbiology reviews* 26, 547-603
- CLARRIDGE, J. E. (2004) Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical microbiology reviews* 17, 840-862
- CLEARY, J., LAI, L.-C., SHAW, R. K., STRAATMAN-IWANOWSKA, A., DONNENBERG, M. S., FRANKEL, G. & KNUTTON, S. (2004) Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology* 150, 527-538
- DAWKINS, M. S., COOK, P. A., WHITTINGHAM, M. J., MANSELL, K. A. & HARPER, A. E. (2003) What makes free-range broiler chickens range? In situ measurement of habitat preference. *Animal behaviour* 66, 151-160
- DLG (2017) Deutsche Landwirtschaftsgesellschaft: Haltung von Masthühnern. DLG-Merblatt 406 3. Auflage
- DOBRINDT, U. (2005) (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology* 295, 357-371
- DUBOIS, D., LEYSSENE, D., CHACORNAC, J. P., KOSTRZEWA, M., SCHMIT, P. O., TALON, R., BONNET, R. & DELMAS, J. (2010) Identification of a Variety of *Staphylococcus* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 941-945
- DUDEN (2023) Nachhaltigkeit, die. In Wörterbuch. Hrsg. CORNELSEN VERLAG GMBH
- DUIJKEREN, E. V., WANNET, W. J. B., HOUWERS, D. J. & PELT, W. V. (2002) Serotype and Phage Type Distribution of *Salmonella* Strains Isolated from Humans, Cattle, Pigs, and Chickens in The Netherlands from 1984 to 2001. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 3980-3985
- EEA (2010) European Environment Agency: 10 messages for 2010 Agricultural ecosystems. <https://www.eea.europa.eu/publications/10-messages-for-2010-agricultural-ecosystems>.  
Letzter Zugriff 21.06.2023
- EFSA (2022) European Food Safety Authority: The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/j.efsa.2022.7666>.  
Letzter Zugriff 12.09.2023

- EFSA (2023) Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit: Lebensmittelbedingte Zoonosen. <https://www.efsa.europa.eu/de/topics/topic/foodborne-zoonotic-diseases#ver>öffentlicht. Letzter Zugriff 14.09.2023
- EHRNSBERGER, R. (2000) Nachhaltige Bodenbewirtschaftung und Bodenschutz. Osnabrücker Naturwissenschaftliche Mitteilungen Bd 26, 139-152
- EISLER, M. C., LEE, M. R., TARLTON, J. F., MARTIN, G. B., BEDDINGTON, J., DUNGAIT, J. A., GREATHEAD, H., LIU, J., MATHEW, S. & MILLER, H. (2014) Agriculture: steps to sustainable livestock. *Nature* 507, 32-34
- EKRUTH, J., GOTTSCHALK, C., ULRICH, S., GAREIS, M. & SCHWAIGER, K. (2020) Differentiation of *S. chartarum* (Ehrenb.) *S. Hughes* Chemotypes A and S via FT-IR Spectroscopy. *Mycopathologia* 185, 993-1004
- ELZEN, B. & BOS, B. (2019) The RIO approach: Design and anchoring of sustainable animal husbandry systems. *Technological Forecasting and Social Change* 145, 141-152
- ERBS, KOHLHAAS & METZGER (2022a) TierSchG § 1 Rn. 1-3. In 243. EL August 2022
- ERBS, KOHLHAAS & METZGER (2022b) TierSchG § 2 Rn. 1. In 234. EL August 2022
- ERBS, KOHLHAAS & METZGER (2022c) TierSchNutztV § 2 Rn. 1-14. In 243. EL August 2022
- EUROPEAN COMMISSION (2007) Attitudes of EU citizens towards Animal Welfare. [https://www.politique-animaux.fr/fichiers/eurobarometer\\_-\\_attitudes\\_of\\_eu\\_citizens\\_towards\\_animal\\_welfare-2007.pdf](https://www.politique-animaux.fr/fichiers/eurobarometer_-_attitudes_of_eu_citizens_towards_animal_welfare-2007.pdf). Letzter Zugriff 16.08.2022
- FAWC (2009) Farm Animal Welfare Council: Animal Welfare in Great Britain: Past, Present and Future. <http://www.fawc.org.uk>. Letzter Zugriff 12.06.2023
- FEINDT, P. H., KRÄMER, C., FRÜH-MÜLLER, A., HEISSENHUBE, A., PAHL-WOSTL, C., PURNHAGEN, K. P., THOMAS, F., VAN BERS, C. & WOLTERS, V. (2019) Ein neuer Gesellschaftsvertrag für eine nachhaltige Landwirtschaft: Wege zu einer integrativen Politik für den Agrarsektor, Springer Nature
- FLIEGER, A., MIELKE, M. & TIETZE, E. (2013) Role of pathogen surveillance and subtyping in outbreak recognition of food-borne bacterial infections: Microbiological perspective-Aims, methods and prospects of pathogen subtyping. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* 56, 42-46
- FLIESSBACH, A., SCHMID, H. & NIGGLI, U. (2008) Die Vorteile des Öko-Landbaus für das Klima. *Ökologie & Landbau*, 17-19
- FRASER, D. (2018) 7 - Animal welfare: Translating science into practice. In *Advances in Agricultural Animal Welfare*. Hrsg. MENCH, J. A., Woodhead Publishing. 129-143
- FRASER, D., WEARY, D. M., PAJOR, E. A. & MILLIGAN, B. N. (1997) A scientific conception of animal welfare that reflects ethical concerns

FRIEDMAN, C. R., HOEKSTRA, R. M., SAMUEL, M., MARCUS, R., BENDER, J., SHIFERAW, B., REDDY, S., AHUJA, S. D., HELFRICK, D. L., HARDNETT, F., CARTER, M., ANDERSON, B. & TAUXE, R. V. (2004) Risk Factors for Sporadic *Campylobacter* Infection in the United States: A Case-Control Study in FoodNet Sites. *Clinical Infectious Diseases* 38, S285-S296

GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DES TIERWOHLIS IN DER NUTZTIERHALTUNG MBH (2022) Haltungsmform. <https://www.haltungsmform.de/ueber-uns/>. Letzter Zugriff 03.04.2022

GÜNZLER, H. & GREMLICH, H.-U. (2012) IR-Spektroskopie: Eine Einführung. WILEY-VCH GmbH & Co KGaA, Weinheim, Berlin

HAAS, G. (2003) Ökobilanz: Wie ökologisch ist der ökologische Landbau? In *Der kritische Agrarbericht 2003*, AgrarBündnis e.V., AG Land- und Regionalentwicklung, Universität Gesamthochschule Kassel. 128-134

HARMSSEN, D. (2004) 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. *Asm News* 70, 19-24

HEBBELSTRUP JENSEN, B., OLSEN, K. E., STRUVE, C., KROGFELT, K. A. & PETERSEN, A. M. (2014) Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews* 27, 614-630

HERRES, W. & GRONHOLZ, J. (1984) Understanding FT-IR data processing. Part 1, 352-356

HERRMANNSDORFER LANDWERKSTÄTTEN GLONN GMBH & CO. KG (2020) WEIDESCHWEINE UND SYMBIOTISCHE LANDWIRTSCHAFT. <https://www.herrmannsdorfer.de/landwirtschaft/symbiotisch/>. Letzter Zugriff 11.03.2020

HERZOG, F. (2018) Tierschutzgesetz. In *Handbuch Tierethik: Grundlagen – Kontexte – Perspektiven*. Hrsg. ACH, J. S., BORCHERS, D. Stuttgart, J.B. Metzler. 337-340

HIRT, M., MORITZ, FELDE (2023) Tierschutzgesetz. München, Verlag Franz Vahlen

HÖRNING, B., TOBER, O. & TRIESCHMANN, M. (2011) Freiland Schweinehaltung. <http://ktbl.de/index.php?id=953>. Letzter Zugriff 04.06.2021

HOY, S. (2016) Tierwohl. Worüber reden wir eigentlich. *DLG-Mitteilungen* 11, 1-3

HUANG, D. B., MOHANTY, A., DUPONT, H. L., OKHUUSEN, P. C. & CHIANG, T. (2006) A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of medical microbiology* 55, 1303-1311

HYLLESTAD, S., IVERSEN, A., MACDONALD, E., AMATO, E., BERGE, B. Å. S., BØE, A., SANDVIN, A., BRANDAL, L. T., LYGSTAD, T. M. & NASEER, U. (2020) Large waterborne *Campylobacter* outbreak: use of multiple approaches to investigate contamination of the drinking water supply system, Norway, June 2019. *Eurosurveillance* 25, 2000011

ILINA, E. N., BOROVSKEYA, A. D., SEREBRYAKOVA, M. V., CHELYSHEVA, V. V., MOMYNALIEV, K. T., MAIER, T., KOSTRZEWA, M. & GOVORUN, V. M. (2010) Application of matrix-assisted

laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the study of *Helicobacter pylori*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24, 328-334

JANSEN, K. & VELLEMA, S. (2004) *Agribusiness and society: Corporate responses to environmentalism, market opportunities and public regulation*, Zed Books

JOCHEMSEN, H. (2013) An ethical foundation for careful animal husbandry. *NJAS - Wageningen, Journal of Life Sciences* 66, 55-63

KAEDER, E., DORN-IN, S., GAREIS, M. & SCHWAIGER, K. (2022) Symbiotic Husbandry of Chickens and Pigs Does Not Increase Pathogen Transmission Risk. *Foods* 11, 3126

KAYSER, F. H., BIENZ, K. A., ECKERT, J. & ZINKERNAGEL, R. M. (2005) *Medical Microbiology*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

KEELING, L., EVANS, A., FORKMAN, B. & KJAERNES, U. (2013) Welfare Quality® principles and criteria. In *Improving farm animal welfare*, Springer. 91-114

KLÖBLE, U. (2010) Datensammlung" Ökologischer Landbau". Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL), D-Darmstadt

LAISTER, S. (2003) Allgemeiner Überblick über die Grundsätze einer artgemäßen Tierhaltung. [https://raumberg-gumpenstein.at/jdownloads/Tagungen/Bautagung/Bautagung\\_2003/3b\\_2003\\_laister.pdf](https://raumberg-gumpenstein.at/jdownloads/Tagungen/Bautagung/Bautagung_2003/3b_2003_laister.pdf).  
Letzter Zugriff 05.03.2023

LEOTTA, G. A., SUZUKI, K., ALVAREZ, F., NUÑEZ, L., SILVA, M., CASTRO, L., FACCIOLI, M., ZARATE, N., WEILER, N. & ALVAREZ, M. (2010) Prevalence of *Salmonella* spp. in backyard chickens in Paraguay. *International Journal of Poultry Science*, 1682-8356

LFL (2004) Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft: Evaluierung alternativer Haltungsformen für Legehennen. [https://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/publikationen/daten/schriftenreihe/p\\_19790.pdf](https://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/publikationen/daten/schriftenreihe/p_19790.pdf).  
Letzter Zugriff 18.06.2023

LGL (2012) Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit: *Escherichia coli* (*E. coli*). [https://www.lgl.bayern.de/tiergesundheit/tierkrankheiten/bakterielle\\_pilzinfektionen/escherichia\\_coli/index.htm](https://www.lgl.bayern.de/tiergesundheit/tierkrankheiten/bakterielle_pilzinfektionen/escherichia_coli/index.htm).  
Letzter Zugriff 04.06.2023

LGL (2014) Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit: Prävalenz von thermophilen *Campylobacter* spp. in Kotproben von Rindern, Schweinen und Geflügel sowie in Lebensmittelproben. [https://www.lgl.bayern.de/forschung/forschung\\_interdisziplinaer/fp\\_campylobacter\\_kotproben\\_lebensmittelproben.htm](https://www.lgl.bayern.de/forschung/forschung_interdisziplinaer/fp_campylobacter_kotproben_lebensmittelproben.htm).  
Letzter Zugriff 16.03.2022

LORZ, A. & METZGER, E. (2019) *Tierschutzgesetz*. München, CH Beck Verlag

- MARTIN, J. & EDWARDS, S. (1994) Feeding behaviour of outdoor sows: the effects of diet quantity and type. *Applied Animal Behaviour Science* 41, 63-74
- MARTINS, F. H., RAJAN, A., CARTER, H. E., BANIASADI, H. R., MARESSO, A. W. & SPERANDIO, V. (2022) Interactions between Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) and Gut Commensals at the Interface of Human Colonoids. *Mbio* 13, e01321-01322
- MCLAFFERTY, F. & TUREČEK, F. (1995) Interpretation von Massenspektren Spektrum. Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin
- MERCER, H., POCURULL, D., GAINES, S., WILSON, S. & BENNETT, J. (1971) Characteristics of antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from animals: relationship to veterinary and management uses of antimicrobial agents. *Applied microbiology* 22, 700-705
- MERMIN, J., HUTWAGNER, L., VUGIA, D., SHALLOW, S., DAILY, P., BENDER, J., KOEHLER, J., MARCUS, R., ANGULO, F. J. & GROUP, E. I. P. F. W. (2004) Reptiles, amphibians, and human *Salmonella* infection: a population-based, case-control study. *Clinical Infectious Diseases* 38, S253-S261
- MILNES, A., STEWART, I., CLIFTON-HADLEY, F., DAVIES, R., NEWELL, D., SAYERS, A., CHEASTY, T., CASSAR, C., RIDLEY, A. & COOK, A. (2008) Intestinal carriage of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, thermophilic *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica*, in cattle, sheep and pigs at slaughter in Great Britain during 2003. *Epidemiology & Infection* 136, 739-751
- MØLLER NIELSEN, E., ENGBERG, J. & MADSEN, M. (1997) Distribution of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from Danish patients, poultry, cattle and swine. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 19, 47-56
- MURGUEITIO, E., BARAHONA, R., CHARÁ, J., FLORES, M., MAURICIO, R. & MOLINA, J. (2016) The intensive silvopastoral systems in Latin America sustainable alternative to face climatic change in animal husbandry. *Cuban Journal of Agricultural Science* 49
- NAGY, E., MAIER, T., URBAN, E., TERHES, G. & KOSTRZEWA, M. (2009) Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection* 15, 796-802
- NAUMANN, D. (2001) FT-infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research. *Applied spectroscopy reviews* 36, 239-298
- NIGGLI, U. (2018) Wie muss Nutztierhaltung als essentieller Bestandteil nachhaltiger Landwirtschaft gestaltet werden? Tagungsband. Nutztierhaltung-Basis der Landwirtschaft in Bayern. 100 Jahre Kompetenzzentrum für Nutztiere Grub, 9-17
- NIGGLI, U. & FLIESSBAC, A. (2009) Gut fürs Klima? Ökologische und konventionelle Landwirtschaft im Vergleich. In *Der kritische Agrarbericht*, ABL Verlag. 103-109
- OPRIESSNIG, T., FORDE, T. & SHIMOJI, Y. (2020) *Erysipelothrix* Spp.: past, present, and future directions in vaccine research. *Frontiers in Veterinary Science* 7, 174

PARRY, S., PALMER, S., SLADER, J., HUMPHREY, T. & GROUP, S. E. W. I. D. L. (2002) Risk factors for salmonella food poisoning in the domestic kitchen—a case control study. *Epidemiology & Infection* 129, 277-285

PERKINS, D. N., PAPPIN, D. J., CREASY, D. M. & COTTRELL, J. S. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *ELECTROPHORESIS: An International Journal* 20, 3551-3567

PFEIFER, D. & OSSOWSKI, N. (2021) Hühner werden mobil. In Abschlussbericht EIP-Agri-Projekt, Kompetenzzentrum Ökologischer Landbau (KÖL) Rheinland-Pfalz Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinhessen-Nahe-Hunsrück Bad Kreuznach

POPOFF, M. Y., BOCKEMÜHL, J. & GHEESLING, L. L. (2004) Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann–White scheme. *Research in microbiology* 155, 568-570

PRAGER, R. & TSCHÄPE, H. (2003) [Genetic fingerprinting (PFGE) of bacterial isolates for their molecular epidemiology]. *Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift* 116, 474-481

REYMANN, T. (2016) Vergleichende Überprüfung des Tierschutzes in Schlachthöfen anhand rechtlicher Vorgaben und fachlicher Leitparameter. Dissertation, LMU München

RKI (2000) Robert-Koch-Institut: Listeriose. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Listeriose.html#doc2396598bodyText3](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Listeriose.html#doc2396598bodyText3). Letzter Zugriff 04.07.2023

RKI (2009) Robert-Koch-Institut: Salmonellose (Salmonellen-Gastroenteritis), RKI-Ratgeber für Ärzte. [https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/3712/salmonellose-\(salmonellen-gastroenteritis\).pdf?isAllowed=y&sequence=2](https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/3712/salmonellose-(salmonellen-gastroenteritis).pdf?isAllowed=y&sequence=2). Letzter Zugriff 25.08.2023

RKI (2019) Robert-Koch-Institut: Campylobacter-Enteritis. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Campylobacter.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Campylobacter.html). Letzter Zugriff 01.04.2020

RKI (2021) Robert-Koch-Institut: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2020. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch\\_2020.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2020.html). Letzter Zugriff 31.03.2022

RKI (2023) Robert-Koch-Institut: Antworten auf häufig gestellte Fragen zur zoonotischen Influenza bei Menschen. <https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Gefluegelpest/Gefluegelpest.html>. Letzter Zugriff 09.08.2023

ROLLE, M. & MAYR, A. (2007) Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, Enke Verlag, Stuttgart, 8., überarbeitete Auflage

ROSNER, B. (2017) Campylobacter-Enteritis – Risikofaktoren und Infektionsquellen in Deutschland. <https://edoc.rki.de/handle/176904/2874>. Letzter Zugriff 26.09.2023

SABENÇA, C., DE SOUSA, T., OLIVEIRA, S., VIALA, D., THÉRON, L., CHAMBON, C., HÉBRAUD, M., BEYROUTHY, R., BONNET, R., CANIÇA, M., POETA, P. & IGREJAS, G. (2020) Next-Generation Sequencing and MALDI Mass Spectrometry in the Study of Multiresistant Processed Meat Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE). *Biology* 9, 89

SACCHI, C. T., WHITNEY, A. M., REEVES, M. W., MAYER, L. W. & POPOVIC, T. (2002) Sequence diversity of *Neisseria meningitidis* 16S rRNA genes and use of 16S rRNA gene sequencing as a molecular subtyping tool. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 4520-4527

SANDER, J. (1993) Pathogenesis of salmonella infections in humans. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 100, 283-285

SCHNEIDER, M. (2017) Die intestinale Mikrobiota beim Hund. kleintier konkret, Enke Verlag in Georg Thieme Verlag KG Stuttgart 20, 37-38

SCHUBERT, K. M. K. (2020) Das Politiklexikon. Bonn, DIETZ

SCHUBERT, S. & WIESER, A. (2011) Einsatz der Matrix-Assisted Laser Desorption/ionisation-Time of Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) in der mikrobiologischen Routinediagnostik/Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiological routine diagnostics. *Journal of Laboratory Medicine* 35, 195-203

SCHWAIGER, K., HARMS, K., HÖLZEL, C., MEYER, K., KARL, M. & BAUER, J. (2009) Tetracycline in liquid manure selects for co-occurrence of the resistance genes tet(M) and tet(L) in *Enterococcus faecalis*. *Veterinary microbiology* 139, 386-392

STADIG, L. M., RODENBURG, T. B., AMPE, B., REUBENS, B. & TUYTTENS, F. A. M. (2017) Effects of shelter type, early environmental enrichment and weather conditions on free-range behaviour of slow-growing broiler chickens. *Animal* 11, 1046-1053

STALEY, M., CONNERS, M. G., HALL, K. & MILLER, L. J. (2018) Linking stress and immunity: Immunoglobulin A as a non-invasive physiological biomarker in animal welfare studies. *Hormones and Behavior* 102, 55-68

STATISTISCHES BUNDESAMT (2021) Viehbestand in Betrieben mit konventionellem und ökologischem Landbau. <https://www.destatis.de/DE/Themen/Branchen-Unternehmen/Landwirtschaft-Forstwirtschaft-Fischerei/Tiere-Tierische-Erzeugung/Tabellen/oekologischer-landbau-viehbestand.html>. Letzter Zugriff 04.06.2023

STATISTISCHES BUNDESAMT (2022) Pressemitteilung Nr. 266 vom 27. Juni 2022. [https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2022/06/PD22\\_266\\_413.html;jsessionid=D55DC56CDF14634756532668D9A82B6D.live721](https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2022/06/PD22_266_413.html;jsessionid=D55DC56CDF14634756532668D9A82B6D.live721). Letzter Zugriff 28.10.2022

STATISTISCHES BUNDESAMT (2023a) Pressemitteilung Nr. 051 vom 8. Februar 2023. [https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2023/02/PD23\\_051\\_413.html](https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2023/02/PD23_051_413.html). Letzter Zugriff 04.04.2023

- STATISTISCHES BUNDESAMT (2023b) Pressemitteilung Nr. N 018 vom 17. März 2023. [https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2023/03/PD23\\_N018\\_413.html](https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2023/03/PD23_N018_413.html).  
Letzter Zugriff 04.04.2023
- THOMAS, C. M. & NIELSEN, K. M. (2005) Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature reviews microbiology* 3, 711-721
- THOMPSON, P. B. (2015) *From field to fork: Food ethics for everyone*, Oxford University Press, USA
- THORNE, J. L., KISHINO, H. & PAINTER, I. S. (1998) Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. *Molecular biology and evolution* 15, 1647-1657
- THORNS, C. J. (2000) Bacterial food-borne zoonoses. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 19, 226-239
- TSCHÄPE, H. (2000) Lebensmittelbedingte Infektionskrankheiten durch Bakterien. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 43, 758-769
- TSCHÄPE, H. & KÜHN, H. (1993) Virulenz und Verbreitung der Enteritis-Salmonellen. In *Ökosystem Darm V*, Springer. 14-38
- WANG, Y., DONG, Y., DENG, F., LIU, D., YAO, H., ZHANG, Q., SHEN, J., LIU, Z., GAO, Y., WU, C. & SHEN, Z. (2015) Species shift and multidrug resistance of *Campylobacter* from chicken and swine, China, 2008–14. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 71, 666-669
- WELJTENS, M. J. B. M., BIJKER, P. G. H., VAN DER PLAS, J., URLINGS, H. A. P. & BIESHEUVEL, M. H. (1993) Prevalence of campylobacter in pigs during fattening; an epidemiological study. *Veterinary Quarterly* 15, 138-143
- WERKHEISER, I. (2020) Technology and responsibility: a discussion of underexamined risks and concerns in Precision Livestock Farming. *Animal Frontiers* 10, 51-57
- WISSENSCHAFTLICHER BEIRAT AGRARPOLITIK BEIM BMEL (2015) *Wege zu einer gesellschaftlich akzeptierten Nutztierhaltung. Kurzfassung des Gutachtens*. Hrsg. BMEL. Berlin
- WOESE, C. R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiological reviews* 51, 221-271
- XING, J., WANG, H., BROOKES, P. C., SALLES, J. F. & XU, J. (2019) Soil pH and microbial diversity constrain the survival of *E. coli* in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 128, 139-149

## 8 Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt meiner Doktormutter, Frau Univ.-Prof. Dr. habil. Karin Schwaiger. Neben der Möglichkeit diese interessante Arbeit unter Ihrer Leitung anzufertigen, möchte ich auch die Unterstützung auf menschlicher Ebene nicht missen. Besonders danke ich ihr für das Vertrauen, mir unter etwas anderen Umständen die Stelle am Lehrstuhl ermöglicht zu haben. Nur durch ihre fortlaufende Unterstützung und die ebenso erhellenden sowie erheiternden Gespräche, war das Fertigstellen dieser Arbeit möglich.

Ich möchte außerdem besonders Dr. Samart Dorn-In danken, der dieses Projekt so spontan als mein Betreuer übernommen hat; er hatte immer ein offenes Ohr für jede meine Fragen und hat mit seiner fachlichen Kompetenz diese Arbeit sehr bereichert.

Des Weiteren danke ich der Schweisfurth Stiftung und der Software AG Stiftung für ihre finanzielle Unterstützung. Dem Team der Herrmannsdorfer Landwerkstätten danke ich für ihre Unterstützung in der praktischen Umsetzung des Projektes und Herrn Karl Schweisfurth für die tiefen und interessanten Einblicke in die Arbeit in Glonn.

Im Zuge der statistischen Einordnung und Auswertung danke ich Herrn PD Dr. habil. Sven Reese. Sowohl während der Projektplanung als auch der Auswertung haben mir die zahlreichen Denkanstöße sehr weitergeholfen.

Selbstverständlich gilt mein Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhls für ihre große Unterstützung. Besonders möchte ich mich bei Herrn Sebastian Schlef, Frau Verena Hohenester, Frau Barbara Fritz und Frau Erika Altgenug für ihre engagierte Hilfe bei der Umsetzung des Projektes bedanken. Frau Dr. Julia Ekruth und Frau Dr. Eunike Bahlinger danke ich von Herzen für die Kaffee- und Hunde-intensiven Schaffenspausen und ihre herzliche Aufnahme. Frei nach dem Motto „besser spät als nie“ danke ich Frau Dr. Sirkka Mang für die Freundschaft und die sehr spontanen Korrekturlesungen.

Abschließend gilt mein größter und persönlichster Dank meiner großartigen Familie allen voran meinem Mann Maximilian Kaeder und meinen Eltern Mette und Thomas Kaeder. Auf ihre Unterstützung konnte ich zu jeder Zeit zählen. Ich bin Ihnen unendlich dankbar, dass Sie mich während des Studiums und der Promotion zu jeder Zeit auf allen Ebenen unterstützt haben.