

Aus der Klinik für Pferde, Allgemeine Chirurgie und Radiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Untersuchung der Konzentrationen
an Mengenelementen und essentiellen
sowie akzidentellen Spurenelementen
in Kotproben von Pferden**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Lydia Staufenbiel
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2023
Journal-Nr.: 4392

Aus der Klinik für Pferde, Allgemeine Chirurgie und Radiologie

des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

**Untersuchung der Konzentrationen an Mengenelementen und
essentiellen sowie akzidentellen Spurenelementen in Kotproben
von Pferden**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades

einer Doktorin der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Lydia Staufenbiel

Tierärztin aus Berlin

Berlin 2023

Journal-Nr.: 4392

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Gehlen

Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek

Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Diana Meemken

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): horses, faeces, horse dung, excretion, faeces collection, faeces composition, digestion, trace elements, mineral metabolism, laboratory methods, diagnostic techniques, circadian rhythm, storage

Tag der Promotion: 22.02.2023

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	PUBLIKATIONEN.....	5
1.	PUBLIKATION I.....	5
1.1.	Methodische Untersuchung zu Mengen- und Spurenelementkonzentrationen in Pferdekotproben unter besonderer Berücksichtigung des Probenentnahmeortes.....	5
1.2.	Zusammenfassung und Originalpublikation.....	6
2.	PUBLIKATION II.....	19
2.1.	Investigation of the Variation of Concentration of Quantity and Trace Elements in Equine Faecal Samples Considering Storage.....	19
2.2.	Abstract and full text.....	20
3.	PUBLIKATION III.....	33
3.1.	Methodische Untersuchungen zur Variation der Mengen- und Spurenelementkonzentrationen in Pferdekotproben im Tagesverlauf und über einen 15-Tages-Zeitraum.....	33
3.2.	Zusammenfassung und Originalpublikation.....	34
III.	ZUSAMMENFASSENDER DISKUSSION.....	45
IV.	SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	59
V.	ZUSAMMENFASSUNG.....	61
VI.	SUMMARY.....	63
VII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	65
VIII.	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....	71
IX.	DANKSAGUNG.....	72
X.	FINANZIERUNG.....	73
XI.	INTERESSENKONFLIKT.....	74
XII.	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	75

Abkürzungsverzeichnis

bzw.: beziehungsweise

et al.: und andere

GfE: Gesellschaft für Ernährungsphysiologie

ggf.: gegebenenfalls

KM: Körpermasse

Na-K-ATPase: Natrium-Kalium-ATPase / Natrium-Kalium-Ionenpumpe

OCD: Osteochondrosis dissecans

t: Zeit

TMR: Totale Mischration

z.B.: zum Beispiel

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die analysierten Spurenelemente und deren Zuordnung unterschiedlicher Autoren.....	2
---	---

I. Einleitung

„Alle Dinge sind Gift und nichts ist ohne Gift; allein die Dosis macht, dass ein Ding kein Gift ist.“ Dieser berühmte und bis heute gültige Lehrsatz des Paracelsus (*1493 oder 1494, †1541) lässt sich auch auf die Mineralstoffversorgung anwenden. Mineralstoffe lassen sich nach der Konzentration im Körper einteilen in Mengen- und Spurenelemente (Hahn 2019). Während die Mengenelemente ihrem Namen entsprechend hohe Konzentrationen über 100 mg/kg KM erreichen, bezieht sich der Begriff Spurenelement auf Mineralstoffe, welche unter 100 mg/kg KM vorliegen (McDowell 2003). Diese letzte Gruppe der Mineralstoffe lässt sich entsprechend ihrer Funktionalität unterteilen in die essentiellen Spurenelemente, welche unterschiedliche Aufgaben im Körper erfüllen und akzidentelle Spurenelemente, bei denen solche Funktionen noch nicht nachgewiesen werden konnten (Seeling 1995). Dieser Einteilung kann man bereits entnehmen, dass es bei einer Unterversorgung mit Mineralstoffen zu Mangelerscheinungen kommt, aber besonders die im Körper gering konzentrierten Spurenelemente bei einem Überangebot auch toxisch wirken können (Pfannhauser 1988). Eben diese schmale therapeutische Breite mancher Spurenelemente führt zu unterschiedlichen Einteilungen in der Literatur, da einige zwar essentiell sind, aber gemäß dem Einstiegszitat eine toxische Wirkung entfalten können. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Gruppenzugehörigkeit der 22 in dieser Arbeit analysierten Spurenelemente von drei Autoren.

Damit die Dosis der aufgenommenen Mineralstoffe kein toxisches Potential erreicht, aber auch Mangelsituationen ausgeschlossen werden können, gibt es für Mensch und Tier Bedarfsnormen, die sich auf die empfohlene Zufuhr mit der Nahrung konzentrieren. Diese nutritive Versorgungslage wird in der Tierhaltung anhand von Rationsberechnungen beurteilt, um dann mit gängigen Empfehlungen abgeglichen zu werden (Coenen und Vervuert 2019; Kamphues et al. 2014; Gesellschaft für Ernährungsphysiologie 2014; National research council 2007). Problematisch ist diese Versorgungsbeurteilung, wenn die zur Verfügung gestellte Ration nicht vollständig bzw. selektiv gefressen wird. Dies kann häufig in der Pferdehaltung beobachtet werden, da selten eine wie in der Rinderfütterung übliche Totale Mischration (TMR) verfüttert wird und die Futteraufnahme von tierindividuellen Faktoren wie dem Zahnstatus oder Alter des Pferdes abhängig ist, aber auch z.B. durch die Tagestemperatur beeinflusst wird (Coenen und Vervuert 2019). In der Einzelhaltung lässt sich die tatsächlich gefressene Ration noch gut beurteilen, spätestens jedoch bei extensiv gehaltenen Pferden auf der Weide ggf. mit freiem Zugang zu mineralischen Ergänzungsfuttermitteln stehen dem Pferdehalter wenig Möglichkeiten zur genauen Überprüfung der nutritiven Versorgungslage zur Verfügung.

I. Einleitung

	McDowell (2003)	Davies (2021)*	Suttle (2022)**
Fe	(Klassische) essentielle Spurenelemente		
Cu			
Zn			
Mn			
Se			
Co			
Cr	Essentiell	Essentiell	OBE / Ultraspurenelement
Mo	Essentiell	Essentiell	OBE / Ultraspurenelement
Si	Neues essentielles Element	Essentiell	OBE / Ultraspurenelement
B	Neues essentielles Element	Essentiell	OBE / Ultraspurenelement
As	Neues essentielles Element	Essentiell	PTE
Ni	Neues essentielles Element	Essentiell	OBE / Ultraspurenelement
Sn	Neues essentielles Element	Möglich essentiell	Nicht einzeln erwähnt, nur Hinweis in Einleitung, dass andere Autoren als essentiell einstufen
Ba	Erwähnt ohne Angabe über Essentialität	Nicht essentiell	Nicht erwähnt
Sr	Erwähnt ohne Angabe über Essentialität	Nicht essentiell	Nicht erwähnt
Pb	Neues essentielles Element	Nicht essentiell (möglich essentiell für Ratten)	PTE
Cd	Sehr toxisch, Hinweis auf sehr wenige Daten über mögliche Essentialität	Möglich essentiell für andere Spezies, essentiell für Ziegen	PTE
U	Erwähnt ohne Angabe über Essentialität	Nicht essentiell	Nicht erwähnt
Tl	Erwähnt ohne Angabe über Essentialität	Nicht essentiell	Nicht erwähnt
Al	Neues essentielles Element	Essentiell für andere Spezies	PTE
Ti	Erwähnt ohne Angabe über Essentialität	Nicht essentiell	Nicht erwähnt
Li	Neues essentielles Element	Möglich essentiell für andere Spezies (Ratten), essentiell für Ziegen	OBE / Ultraspurenelement

Tabelle 1: Die analysierten Spurenelemente und deren Zuordnung unterschiedlicher Autoren

*andere Spezies: andere als der Mensch

** OBE: Occasionally beneficial elements („gelegentlich positive Wirkung“); PTE: Potentially toxic elements (Potentiell giftige Elemente)

I. Einleitung

Daher wird häufig die metabolische Versorgungslage, klassischerweise anhand von Blut- (in der Regel Serumproben), analysiert. Wie bereits anfangs erwähnt, erfüllen die Mineralstoffe verschiedene Funktionen im Körper als Bestandteil der Knochen (Ca), von Hormonen (J) oder in Enzymkomplexen (Zn) (McDowell 2003), weshalb die Messung der ungebundenen Elemente im Transportmedium Blut nur einen Teil der Versorgungslage abbilden kann, zumal der Homöostase gemäß die Konzentrationen im selbigen nur geringen Schwankungen unterliegt (Vervuert 2021). Einen Ausweg für dieses Problem gibt die Möglichkeit der Enzymaktivitätsmessung, wie z.B. für Selen die Glutathionperoxidase (Wolff et al. 2017) oder die Coeruloplasminaktivität als Bewertungskriterium der Kupferversorgung (Granel 2002). Aktuell konnte jedoch in einem Rinderbetrieb eine Kupferintoxikation weder durch die Analyse von Kupfer noch Coeruloplasmin im Serum erkannt werden, sondern lediglich die TMR- und Kotproben zeigten die Überversorgung an (Weber et al. 2021). Ein weiterer aktueller Bericht unterstreicht die Grenzen der Analyse von Serumproben zur Beurteilung der Versorgungslage mit Cu, Zn, Se, J, Mn und Fe beim Pferd (Vervuert 2021). So eignen sich - neben der Rationsanalyse - lediglich für Selen die Analysen von Serumproben zur Beurteilung der aktuellen Versorgungssituation.

Das wirft die Frage auf, ob die Analyse von Kotproben die diagnostische Lücke zwischen der Beurteilung der nutritiven und metabolischen Versorgungslage schließen könnte. Für Rinder ist dies bereits etabliert (Staufenbiel, R. et al. 2022; Herold et al. 2020; Herold et al. 2018; Herold 2017). Bevor ein neues Probenmedium eingeführt werden kann, müssen jedoch methodische Rahmenbedingungen für die Probenentnahme geschaffen werden (Moritz 2014). Als erstes stellt sich die Frage, ob Pferdekot für die Messung mittels optischer Emissions- bzw. Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS und ICP-OES) geeignet ist. Danach müssen genaue Vorgaben zur Gewinnung der Pferdekotproben erstellt werden, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten und schlussendlich Referenzwerte erstellen zu können. In Bezug auf die gemessenen Elemente wurde der Datensatz neben den Mengenelementen (Ca, K, Mg, Na, P, S) und essentiellen Spurenelementen (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, Zn, Cr) durch akzidentelle (Al, As, B, Ba, Cd, Li, Ni, Pb, Si, Sr, Ti, Tl) ergänzt, um zunächst eine wertfreie Datensammlung zu erhalten, mit welcher der methodische Fehler bewertet werden kann.

Ziel dieser Arbeit ist Beantwortung folgender Fragestellungen:

1. Welchen Einfluss hat eine differenzierte Fütterung der Pferde auf die Konzentration der Mineralstoffe in den Kotproben?
2. Welchen Einfluss hat die Lokalisation im Pferd bzw. im Kothaufen, aus dem die Kotprobe gewonnen wird auf die Konzentration der Mineralstoffe in den Kotproben?

I. Einleitung

3. Wie verändert sich die Konzentration der unterschiedlichen Elemente innerhalb des Kothaufens und welchen Einfluss hat die Lagerdauer des Kothaufens im Freien vor der Probenentnahme auf die Konzentration der Mineralstoffe in den Kotproben?
4. Welchen Einfluss hat die Lagerungstemperatur nach der Kotprobenentnahme vor der Aufbereitung zur Analyse auf die Konzentration der Mineralstoffe in den Kotproben?
5. Wie verhält sich die Konzentration der gemessenen Elemente bei konstanter Fütterung über 24 Stunden und innerhalb von 15 Tagen?
6. Wie groß ist der relative Fehler des Gesamtversuchs?
7. Wie gut ist die Wiederholbarkeit der Messergebnisse?

II. Publikationen

1. Publikation I

1.1. Methodische Untersuchung zu Mengen- und Spurenelementkonzentrationen in Pferdekotproben unter besonderer Berücksichtigung des Probenentnahmeortes

Veröffentlichung: Tierärztliche Praxis Ausgabe G Großtiere Nutztiere 2021; 49: 178–188

DOI: <https://doi.org/10.1055/a-1482-7379>

Lydia Staufenbiel¹, Anja-Elvira Müller², Heidrun Gehlen¹

Klinik für Pferde, allgemeine Chirurgie und Radiologie, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin¹

Vet Med Labor GmbH, IDEXX Laboratories, Ludwigsburg²

You have to purchase this part online.

Anteilerläuterung

Name	Bezeichnung Autor	Erläuterung Anteil Leistung
Lydia Staufenbiel	Erstautorin	Konzipierung Versuchsaufbau Durchführung von Untersuchungen Sammlung der Daten Statistische Analyse Erstellung des Manuskripts
Anja-Elvira Müller	Co Autorin	Laboranalysen der Kotproben Kritische Revision des Manuskripts
Heidrun Gehlen	Co Autorin	Mitwirkung bei Konzipierung Versuchsaufbau Kritische Revision des Manuskripts

1.2. Zusammenfassung

Gegenstand und Ziel: Eine objektive Kontrolle der Mineralstoffversorgung erfolgt bei Pferden in der Praxis nur selten, was eine fehlerhafte Supplementierung zur Folge haben kann. Durch Beurteilung der nutritiven Versorgungslage über die Kotanalyse ließe sich diese diagnostische Lücke schließen. Voraussetzung ist die Kenntnis methodischer Einflussfaktoren auf die Mineralstoffkonzentration in den Kotproben. Vor diesem Hintergrund wurden der Einfluss des Kotprobenentnahmeorts und die Art der Mineralstoffergänzung auf die Konzentration von Mengen- und Spurenelementen in Pferdekotproben evaluiert sowie der methodische Fehler der Gesamtmethode geschätzt.

Material und Methoden: Untersucht wurden die Konzentrationen von sechs Mengen- und 22 Spurenelementen in 30 Kotproben von fünf Warmblütern, drei Haflingern und zwei Ponys, deren Mineralstoffergänzung differierte (keine Supplementierung, berechnete Menge, Mineralleckmasse zur freien Aufnahme). Die an drei Lokalisationen (kraniales Rektum, Ampulla recti, Kothaufen) gewonnenen Kotproben wurden getrocknet und mittels ICP-OES und ICP-MS analysiert. Neben der deskriptiven Beschreibung des Datensatzes wurden die Effekte der fixen Faktoren Probenentnahmeort und Mineralstoffergänzung auf die Konzentrationen der Elemente im Kot sowie die Wiederholbarkeit und der relative Fehler der Untersuchungsmethode ausgewertet.

Ergebnisse: Der Entnahmeort der Kotproben hatte keinen Einfluss auf die Konzentration der einzelnen Elemente. Die Art der Mineralstoffsupplementierung spiegelte sich signifikant und differenziert in den Konzentrationen der Elemente im Kot wider. Die Wiederholbarkeit der Analyseergebnisse war mit einem mittleren Bestimmtheitsmaß von 0,949 (0,894–0,978) und einem mittleren Median für den relativen Fehler von 0,18 (0,01–0,86) hoch.

Schlussfolgerung und klinische Relevanz: In der Studie werden die ersten methodischen Randbedingungen zur Bestimmung der Konzentration von Mengen- und Spurenelementen in Pferdekotproben dargestellt. Die Lokalisation der Kotprobenentnahme beeinflusste die Resultate nicht, somit könnte der am wenigsten invasiven Probengewinnung aus einem Kothaufen Vorzug gegeben werden. Da sich die Art der Mineralstoffergänzung in signifikant unterschiedlichen Elementkonzentrationen in den Kotproben widerspiegelt, kann anhand der Kotprobenkonzentration auf eine unterschiedlich hohe Mineralstoffaufnahme geschlossen werden.

Schlüsselwörter: Pferd, Methodik, Kotanalyse, Mineralstoffe, Probenentnahmeort

2. Publikation II

2.1. Investigation of the Variation of Concentration of Quantity and Trace Elements in Equine Faecal Samples Considering Storage

Published by EC Veterinary Science 2021, 6.10, 32-43

<https://ecronicon.com/ecve/ECVE-06-00435.php>

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Lydia Staufenbiel¹, Anja-Elvira Müller², Heidrun Gehlen¹

Horse Clinic, Freie Universität Berlin, Germany¹

Anne-Frank-Straße 7/2, 71701 Schwieberdingen, Germany²

Anteilerläuterung

Name	Bezeichnung Autor	Erläuterung Anteil Leistung
Lydia Staufenbiel	Erstautorin	Konzipierung Versuchsaufbau Durchführung von Untersuchungen Sammlung der Daten Statistische Analyse Erstellung des Manuskripts
Anja-Elvira Müller	Co Autorin	Laboranalysen der Kotproben Kritische Revision des Manuskripts
Heidrun Gehlen	Co Autorin	Mitwirkung bei Konzipierung Versuchsaufbau Kritische Revision des Manuskripts

2.2. Abstract

In order to use faecal samples as means of laboratory diagnostics to analyze the mineral supply of organisms, it is necessary to define standardized sampling requirements. The present investigations monitor the variation of concentrations of mineral compounds within faeces as well as influences, such as age and storage of the samplings. The faecal sample was separated horse dung of a female German Warmblood horse, which was appropriately provided with minerals according to supply recommendations. It was examined within nine different localizations, immediately after defecation, as well as 24 and 72 hours later. Moreover, six additional samplings of other horses were portioned into four different containers and stored for seven days at -18°C , -8°C , 8°C and 20°C . Afterwards, the samplings were dried and examined. With the help of ICP-OES and ICP-MS and due to standardized instructions 28 elements were identified. Furthermore, the relative error of the method was calculated. Within the faeces, the concentration of identified elements is increasing from inner to outer regions. Considering the horizontal and vertical variation, the former showed significant differences between three, the latter one between eleven elements. The laps of time between defecation and sample taking significantly affected the concentration of mineral compounds in 16 cases, although the samplings do not vary until 24 hours after defecation. In contrast to that, there was an increase in the concentration of mineral compounds 72 hours after sample taking. The storage does not significantly influence the concentration of mineral compounds of the faeces, except from two elements. The increase in mineral compounds together with rising sampling age and further distance to the centre of the heap is due to the relative rise, after volatile compounds decreased. The storage does not have an effect on the traceable concentration and thus, the two divergent elements are attributed to random variation. Moreover, the existing stability of concentrations in faecal samples does have a clinical relevance and, accordingly, a standardised procedure should consider sample taking of more central localizations of currently excreted dung. Additionally, in case of long-lasting storage, the samples should be kept chilled. The only exception to diverge from this procedure is the analysis of samples taken from the center of the dung within three days after defecation.

Keywords: Storage; Age of Samples; Variation; Analysis of Mineral Compounds; Horse; Faeces

Investigation of the Variation of Concentration of Quantity and Trace Elements in Equine Faecal Samples Considering Storage

Lydia Staufenbiel^{1*}, Anja-Elvira Müller² and Heidrun Gehlen¹

¹Horse Clinic, Freie Universität Berlin, Germany

²Anne-Frank-Straße 7/2, 71701 Schwieberdingen, Germany

*Corresponding Author: Lydia Staufenbiel, Horse Clinic, Freie Universität Berlin, Germany.

Received: August 24, 2021; Published: September 18, 2021

Abstract

In order to use faecal samples as means of laboratory diagnostics to analyze the mineral supply of organisms, it is necessary to define standardized sampling requirements. The present investigations monitor the variation of concentrations of mineral compounds within faeces as well as influences, such as age and storage of the samplings.

The faecal sample was separated horse dung of a female German Warmblood horse, which was appropriately provided with minerals according to supply recommendations. It was examined within nine different localizations, immediately after defecation, as well as 24 and 72 hours later. Moreover, six additional samplings of other horses were portioned into four different containers and stored for seven days at -18°C, -8°C, 8°C and 20°C. Afterwards, the samplings were dried and examined. With the help of ICP-OES and ICP-MS and due to standardized instructions 28 elements were identified. Furthermore, the relative error of the method was calculated.

Within the faeces, the concentration of identified elements is increasing from inner to outer regions. Considering the horizontal and vertical variation, the former showed significant differences between three, the latter one between eleven elements. The laps of time between defecation and sample taking significantly affected the concentration of mineral compounds in 16 cases, although the samplings do not vary until 24 hours after defecation. In contrast to that, there was an increase in the concentration of mineral compounds 72 hours after sample taking. The storage does not significantly influence the concentration of mineral compounds of the faeces, except from two elements.

The increase in mineral compounds together with rising sampling age and further distance to the centre of the heap is due to the relative rise, after volatile compounds decreased. The storage does not have an effect on the traceable concentration and thus, the two divergent elements are attributed to random variation. Moreover, the existing stability of concentrations in faecal samples does have a clinical relevance and, accordingly, a standardised procedure should consider sample taking of more central localizations of currently excreted dung. Additionally, in case of long-lasting storage, the samples should be kept chilled. The only exception to diverge from this procedure is the analysis of samples taken from the center of the dung within three days after defecation.

Keywords: Storage; Age of Samples; Variation; Analysis of Mineral Compounds; Horse; Faeces

Abbreviations

GfE: Gesellschaft für Ernährungsphysiologie/Society of Nutrition Physiology; ICP-OES: Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy; ICP-MS: Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry; n.s.: Not Significant

Introduction

After the publication of the demand recommendations of the Society of Nutrition Physiology 2014 [1], some rations in German horse stables may have been recalculated. However, this requires an analysis of the ingredients of the basic feedstuffs, especially with regard to the mineral supply, as these are not declared in nature and the content of quantity and trace elements varies greatly. This is cost-intensive and must be arranged by the farm manager for horses kept in boarding stables. So the horse owners have only limited possibilities to calculate the ration adequately. Furthermore, feed intake of horses depends on many animal and environmental factors, making it difficult to track accurate intake for these selective eaters anyway [2].

In dairy cows, the analysis of faecal samples has been recommended as an extension of the range of methods to monitor supply of quantity [3] and trace elements [4], with reference to elemental differentiation of diagnostic significance. There is a current case study of chronic copper oversupply in a dairy herd of Weber *et al.* from 2021. The authors compare the copper concentrations in feed rations (Total mixed ration) in whole blood, plasma, serum, urine, hair, liver, and faecal samples and conclude that TMR as well as liver and faecal analyses indicate copper oversupply with a clear value excursion in contrast to the other sample materials [5]. These results for cattle raise the question of whether faecal analyses can also be used in horses as an extension of the diagnostic method tool for monitoring the supply of quantity and trace elements. Since there are no systematic studies on this method so far, the first step is to clarify the methodological boundary conditions for the collection and treatment of the dung samples up to the laboratory analysis.

The location of the faecal sample collection (from the cranial rectum during a rectal examination, ampulla recti, and freshly deposited dung pile) has no significant influence on the measured faecal concentrations of quantity and trace elements. Therefore, with regard to a simple practical application, the faecal sample collection from the dung pile is recommended [6]. From this recommendation result several further questions concerning the methodological implementation, which will be investigated in this publication: 1. location-related distribution of the concentrations of the quantitative and trace elements in the dung pile (nine locations); 2. influence of the storage period (0, 1, 3 days) of the dung pile outdoors on the element concentrations; 3. influence of the storage temperature (room temperature +20°C, refrigerator +8°C, freezer -8°C and -18°C) after sampling on the analyzed element concentrations. In addition, repeat measurements of the same faecal sample were used to calculate the reproducibility of the measured values for the entire process from sample collection to final analysis.

Materials and Methods

The sample material was a freshly settled pile of faeces from a 15-year-old German sport horse mare. This has been located on a sand paddock and has been protected by a fence from manipulation by other horses. The subject has been adequately supplied with minerals according to the recommendations of the GfE [1]. Sampling from this pile has been performed at three different times in different layers and locations. Samples have been taken on day 0, immediately after weaning, day 1 (24 hours) and day 3 (72 hours later). The weather at this time has been mild to hot with single showers. For the sampling sites has been first the stratification, i.e. the vertical component distinguished into top, middle and bottom. Furthermore, a classification of the horizontal plane from the center to the outside has been made (Figure 1).

Furthermore, the sampling has been performed of six different horses, that have been randomly divided into three feeding groups [6]. From each horse, the sample has been divided into four vessels, which have subsequently been stored for seven days at room temperature (20°C), refrigerated (8°C), frozen (-8°C) and deep frozen (-18°C) before drying in a warming cabinet for 48 hours at +60°C. Samples ready for storage by drying were transferred to the IDEXX laboratory in Ludwigsburg, where the measurement of 28 elements was performed according to certified standard instructions using ICP-OES (Cu, Zn, Mn, Mo, Ca, Mg, Ba, Cr, Fe, Sr, K, S, Ti, P, Si, and Na) and ICP-MS (Se, B, Co, Ni, Pb, Cd, U, As, Tl, Al, Sn, and Li), respectively. More details on the methodology can be found in [7] and further literature.

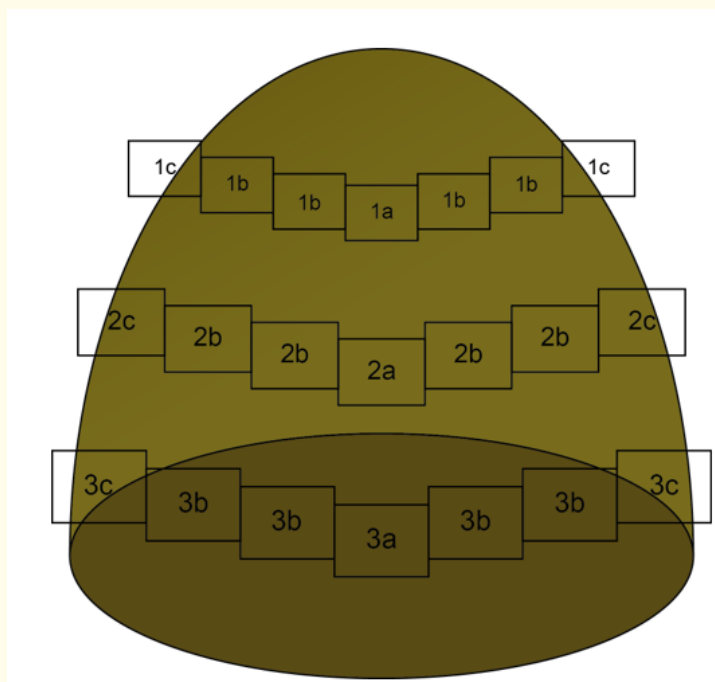


Figure 1: Draft of a heap for clarification of the sample collecting, to investigate the influence on different concentrations of mineral compounds in different localization. The vertical locations are numbered, the horizontal ones labelled with letters (two time "b", because of collecting to samples out of the middle).

Statistical analysis

The data collection and management was performed using Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation), and the statistical analysis was performed using SPSS Statistics 25 (IBM), in which the figures were also generated.

A total of 36 faecal samples were collected from a dung pile. Three fixed factors can be distinguished as grouping variables: horizontal stratification (three expressions), vertical stratification (three expressions), and sample day (time between excretion and sample collection in three expressions). The distribution of sampling locations is outlined in figure 1. The effect of these three fixed factors was performed in one computational run using the linear mixed models, analysis of variance with fixed effects [8]. Due to the size, the statistical analysis results were listed separately in the three table 1-3. Four model variants were successively calculated for the 28 different elements, once with only the three fixed factors horizontal stratification, vertical stratification, sample day without interaction and once with the three factors and optionally including the interaction day/horizontal stratum or day/vertical stratum or both interactions. By subsequently testing the normal distribution of the residuals with the Shapiro-Wilk test (Table 3), the model with the best approximation to the normal distribution was selected. In addition, to assess the homoscedasticity, the residuals were plotted graphically against the values predicted by the model and their distribution was assessed visually. The level of significance were classified in: < 0.001 (highly significant), < 0.01 (very significant) and < 0.05 (significant). In this case, a post hoc LSD test (t-test) ($p < 0.05$) followed for pair wise

comparison of mean values; results were marked with lowercase letters as index. Significantly different means are marked by different superscript letters, identical letters represent the absence of a significant difference.

To evaluate the influence of sample storage (Table 4), a univariate analysis of variance (general linear model) with repeated measures was performed. The factor storage entered the model as a measurement repetition with four expressions (-18°C, -8°C, 8°C, room temperature). If significance was demonstrated ($p < 0.05$), a pairwise comparison of the four mean values was performed using Bonferroni's post hoc test ($p < 0.05$), and the results were marked with lowercase letters as an index. Significantly different means are marked by different superscript letters, and equal letters represent the absence of a significant difference. The influence of the six horses is reported as a between-subjects effect in the model and listed as supplementary information in table 4. Horses from different feeding groups were selected to increase the between-subject variance (Figure 2 and 3).

The relative error (Table 5) was calculated from the 36 individual measurements from table 3. Due to the significant effect of sample day, the mean values were calculated for the three sample days (0, 1, 3 days after defecation) from the twelve individual readings per day. Then, the difference of individual reading and mean value was calculated for the three days. The quotient of the absolute value of this difference and the mean value gives the relative error (relative error = $[(\text{measured value A} - \text{mean value on sample day 0/1/3}) / (0.5 \text{ measured value A} + 0.5 \text{ measured value on sample day 0/1/3})]$). From the 36 numerical values for the relative error for each of the 28 elements, the mean, median, and 25% and 75% quantile values were calculated (Table 5). The relative error includes all sources of variation in the overall process from sampling at different locations in the dung pile, through storage, processing including drying, and chemical analysis.

Results

Table 1 shows the influence of horizontal dispersion within the faecal pile from the inside to the outside. It should be noted that two samples were taken from different locations of the middle between the center and the outer zone. These have been combined, resulting in the center/middle/outside distinction for the localizations (Figure 1). Significant differences have been found for magnesium, copper and aluminum, with "outside" being the significantly higher concentration measured (marked with letter "b"). Looking only at the numerical values, faecal concentrations for all six quantity elements in the "outside" region are higher or equal to the other two sampling locations. This observation result is also true for 17 of the 22 trace elements analyzed (Table 1).

	Mean value 1	Mean value 2	Mean value 3	Standard error 1+3	Standard error 2	Level of significance
n	9	18	9			
Quantity elements in g/kg dry matter						
Ca	7,1	7,6	8,5	0,49	0,35	n.s.
P	4,6	5,0	5,4	0,23	0,17	n.s.
Mg	4,2 ^a	4,1 ^a	4,7 ^b	0,17	0,12	<0,05
Na	5,1	5,0	5,1	0,16	0,12	n.s.
K	5,2	5,1	5,4	0,16	0,12	n.s.
S	1,9	1,9	1,9	0,03	0,02	n.s.
Trace elements in mg/kg dry matter						
Fe	575	583	610	12,7	9,0	n.s.
Cu	13,8 ^a	14,0 ^a	15,3 ^b	0,40	0,28	<0,05
Zn	100	100	108	4,7	3,4	n.s.

Mn	124	137	149	10,8	7,6	n.s.
Se	0,05	0,07	0,06	0,056	0,039	n.s.
Co	0,30	0,30	0,32	0,008	0,005	n.s.
Cr	0,59	0,69	0,66	0,044	0,031	n.s.
Mo	2,44	2,44	2,55	0,084	0,059	n.s.
Si	2857	2593	2668	134,3	94,9	n.s.
B	19,6	19,2	29,6	0,50	0,36	n.s.
As	0,23	0,23	0,25	0,009	0,006	n.s.
Ni	1,10	1,11	1,18	0,038	0,027	n.s.
Sn	0,15	0,15	0,14	0,021	0,015	n.s.
Ba	47,4	49,1	50,0	1,19	0,84	n.s.
Sr	38,6	43,0	43,3	2,35	1,66	n.s.
Pb	1,99	1,98	2,00	0,070	0,049	n.s.
Cd	0,17	0,17	0,17	0,008	0,006	n.s.
U	0,09	0,09	0,09	0,006	0,004	n.s.
Tl	0,55	0,56	0,59	0,015	0,011	n.s.
Al	406 ^b	354 ^a	402 ^b	15,3	10,8	<0,05
Ti	23,0	22,0	21,8	0,84	0,59	n.s.
Li	1,07	1,00	1,08	0,031	0,022	n.s.

Table 1: Influence of horizontal variation on samplings (from central to outside); 1= Central (n = 9), 2= Middle (n = 18, because of combining two sampling locations), 3= Outside; significant differences in the paired comparison are tagged with indices; n = 36.

Analogous to the horizontal dispersion, the vertical dispersion from top to bottom has also been examined (Table 2). Here, for a total of 11 of the 28 determined elements (4 of 6 quantity elements, 7 of 17 trace elements) a significant influence of the layer is present. Whereby in all cases the significantly lowest concentration (marking with letter "a") is found in the localization "middle". With the only exception of aluminum, the significantly highest concentrations of faecal elements (marked with letter "b") are found in the lower layer, being equal to those in the upper layer in eight cases (Table 2).

	Mean value 1	Mean value 2	Mean value 3	Standard error	Level of significance
n	12	12	12		
Quantity elements in g/kg dry matter					
Ca	7,2	8,1	7,8	0,43	n.s.
P	5,2	4,8	5,0	0,21	n.s.
Mg	4,4 ^b	4,0 ^a	4,7 ^b	0,15	<0,05
Na	4,8 ^a	5,1 ^{ab}	5,5 ^b	0,15	<0,01
K	5,3 ^b	4,8 ^a	5,6 ^b	0,15	<0,01
S	2,0 ^b	1,8 ^a	2,0 ^b	0,03	<0,001

Trace elements in mg/kg dry matter					
Fe	609 ^b	560 ^a	599 ^b	11,2	<0,01
Cu	14,2 ^a	13,4 ^a	15,6 ^b	0,35	<0,01
Zn	100	101	107	4,2	n.s.
Mn	143	132	134	9,5	n.s.
Se	0,02	0,07	0,09	0,049	n.s.
Co	0,32	0,30	0,30	0,007	n.s.
Cr	0,66	0,63	0,65	0,039	n.s.
Mo	2,55	2,37	2,51	0,074	n.s.
Si	2659 ^a	2459 ^a	3001 ^b	118,4	<0,05
B	20,1	18,6	19,8	0,44	n.s.
As	0,24	0,23	0,23	0,008	n.s.
Ni	1,16	1,13	1,10	0,034	n.s.
Sn	0,17	0,14	0,12	0,018	n.s.
Ba	51,5 ^b	45,0 ^a	49,8 ^b	1,05	<0,01
Sr	41,3	43,1	40,4	2,07	n.s.
Pb	2,07	1,89	1,94	0,061	n.s.
Cd	0,19 ^b	0,15 ^a	0,17 ^b	0,007	<0,01
U	0,09	0,09	0,09	0,005	n.s.
Tl	0,60 ^b	0,52 ^a	0,59 ^b	0,014	<0,05
Al	431 ^b	362 ^a	369 ^a	13,5	<0,01
Ti	21,9	21,3	23,6	0,74	n.s.
Li	1,09	0,99	1,06	0,027	n.s.

Table 2: Influence of collecting layers from top to bottom; 1= Top, 2= Middle; 3= Bottom; significant differences in the paired comparison are tagged with indices; n= 36.

To investigate the influence of the elapsed time between excretion and sampling, samples were collected directly from the freshly settled pile, 24 and 72 hours later. Here, a significant influence is found for a total of 16 of the 28 elements determined, with the quantity elements standing out again, which were all significantly influenced by sample age, with the exception of calcium (Table 3). The values of the significant differences between the sampling times show a clear trend. The measured values of the samples taken from the freshly settled faecal pile (time 0h) are significantly lowest (or equal) for all 16 elements compared to the later sampling times (marked with letter "a"). Conversely, significantly higher concentrations of faecal elements (marked with letter "b" or "c") compared to sampling from the fresh faecal pile are found in all 16 cases in the dung samples collected after 72 h of outdoor storage (Table 3).

	Mean value 0h	Mean value 24h	Mean value 72h	Standard error	Level of signi- ficance	Shapiro-Wilktest residues
n	12	12	12			
Quantity elements in g/kg dry matter						
Ca	8,0	7,1	8,0	0,43	n.s.	0,606
P	4,5 ^a	4,6 ^a	5,6 ^b	0,21	<0,01	0,590
Mg	4,2 ^a	4,2 ^a	4,8 ^b	0,15	<0,01	0,267
Na	4,8 ^a	5,2 ^b	5,3 ^b	0,15	<0,05	0,353
K	5,0 ^a	5,1 ^a	5,7 ^b	0,15	<0,01	0,046
S	1,9 ^a	1,8 ^a	2,1 ^b	0,03	<0,001	0,284

Trace elements in mg/kg dry matter						
Fe	554 ^a	568 ^a	646 ^b	11,6	<0,001	0,652
Cu	12,9 ^a	14,1 ^b	16,1 ^c	0,37	<0,001	0,748
Zn	94 ^a	99 ^{ab}	115 ^b	4,35	<0,01	0,266
Mn	148	119	143	9,8	n.s.	0,295
Se	0,03	0,01	0,14	0,051	n.s.	0,001
Co	0,31	0,29	0,31	0,007	n.s.	0,894
Cr	0,61	0,60	0,73	0,040	n.s.	0,767
Mo	2,30 ^a	2,39 ^a	2,74 ^b	0,077	<0,01	0,907
Si	2456 ^a	2597 ^a	3066 ^b	122,6	<0,01	0,870
B	19,4	18,8	20,3	0,46	n.s.	0,676
As	0,24	0,24	0,23	0,008	n.s.	0,505
Ni	1,21	1,10	1,07	0,035	n.s.	0,522
Sn	0,17	0,13	0,13	0,019	n.s.	0,137
Ba	44,9 ^a	45,8 ^a	55,7 ^b	1,09	<0,001	0,301
Sr	42,8	38,4	43,6	2,14	n.s.	0,070
Pb	1,84 ^a	1,94 ^a	2,13 ^b	0,063	<0,05	0,163
Cd	0,16 ^a	0,16 ^a	0,19 ^b	0,007	<0,05	0,039
U	0,09	0,08	0,093	0,006	n.s.	0,257
Tl	0,52 ^a	0,55 ^a	0,64 ^b	0,014	<0,001	0,067
Al	362 ^a	342 ^a	458 ^b	14,0	<0,001	0,620
Ti	21,5	21,5	23,8	0,76	n.s.	0,363
Li	1,00 ^a	0,99 ^a	1,16 ^b	0,003	<0,001	0,703

Table 3: Influence of time between defecation and collecting the samples, significant differences are tagged with indices; n = 36.

After sampling, the faecal samples must be temporarily stored until processing by drying in preparation for laboratory analysis. Figure 2 and 3 show examples of the influence of differentiated storage temperatures for a storage period of seven calendar days on the faecal concentrations of calcium and copper. The measured values vary unordered between the storage variants. Statistical testing shows no significant effect of tested storage conditions on measured faecal concentrations for 26 of the 28 elements analyzed (Table 4). Mean value 1, immediate freeze storage at -18°C after sample collection, can be used to compare the effect of higher sample storage temperature. A significant effect of storage temperature is shown for the quantity elements potassium and sulfur, although no consistent trend in the distribution of values between storage temperatures can be seen (Table 4).

	Mean value 1	Mean value 2	Mean value 3	Mean value 4	Level of significance storgae	Level of significance horses
n	6	6	6	6		
Quantity elements in g/kg dry matter						
Ca	7,2	6,8	7,0	7,6	n.s.	0,005
P	5,9	4,5	4,9	5,2	n.s.	0,000
Mg	4,2	4,0	4,4	4,4	n.s.	0,000
Na	3,5	2,9	3,8	3,6	0,111	0,007
K	6,3 ^{ab}	5,7 ^a	6,8 ^b	6,7 ^{ab}	<0,05	0,000
S	2,6 ^{ab}	2,2 ^a	2,6 ^b	2,7 ^b	<0,05	0,000

Trace elements in mg/kg dry matter						
Fe	1535	1701	1558	1547	n.s.	<0,05
Cu	17,3	15,6	17,0	17,1	n.s.	<0,01
Zn	104	92	92	107	n.s.	<0,001
Mn	258	242	234	265	n.s.	<0,05
Se	0,10	0,12	0,11	0,14	n.s.	<0,05
Co	0,55	0,58	0,54	0,64	n.s.	n.s.
Cr	1,93	2,75	2,40	2,02	n.s.	n.s.
Mo	2,01	1,72	1,58	1,56	n.s.	<0,001
Si	4375	10625	8797	5084	n.s.	<0,001
B	16,4	18,6	16,6	18,8	n.s.	<0,05
As	0,53	0,52	0,48	0,58	n.s.	<0,05
Ni	1,68	1,77	1,65	1,98	n.s.	n.s.
Sn	0,08	0,28	0,12	0,40	n.s.	n.s.
Ba	67,6	67,8	68,2	71,8	n.s.	<0,01
Sr	57,9	49,6	50,3	57,3	n.s.	<0,05
Pb	3,53	3,58	3,18	3,29	n.s.	n.s.
Cd	0,39	0,32	0,30	0,30	n.s.	0,05
U	0,07	0,12	0,08	0,101	n.s.	n.s.
Tl	0,28	0,27	0,23	0,25	n.s.	<0,05
Al	519	1096	757	1141	n.s.	n.s.
Ti	33,1	94,8	65,4	46,9	n.s.	n.s.
Li	0,99	1,59	1,19	1,61	n.s.	<0,05

Table 4: Arithmetic means of differently stored samples: 1= -18°C, 2= -8°C, 3= 8°C, 4= 20°C. The statistical significance for horses is listed separately because of different feedings groups and the temperature, the samples were stored at; n = 24.

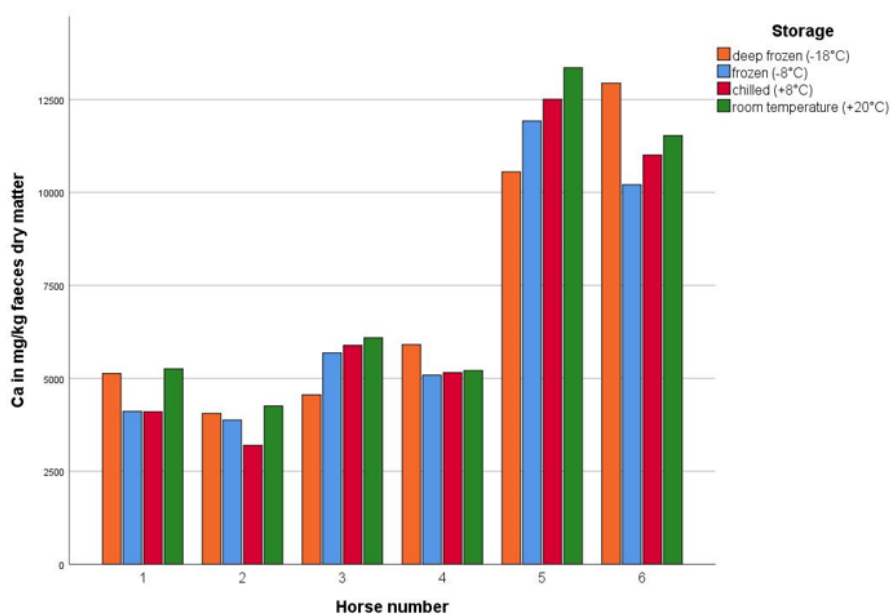


Figure 2: Influence of storage on the concentration of calcium in samples; Horses number 1 and 2 out of feeding group 1 (selected concentration of minerals); horses 3 and 4 feeding group 2: no mineral supplementation; horses 5 and 6 get minerals for free intake.

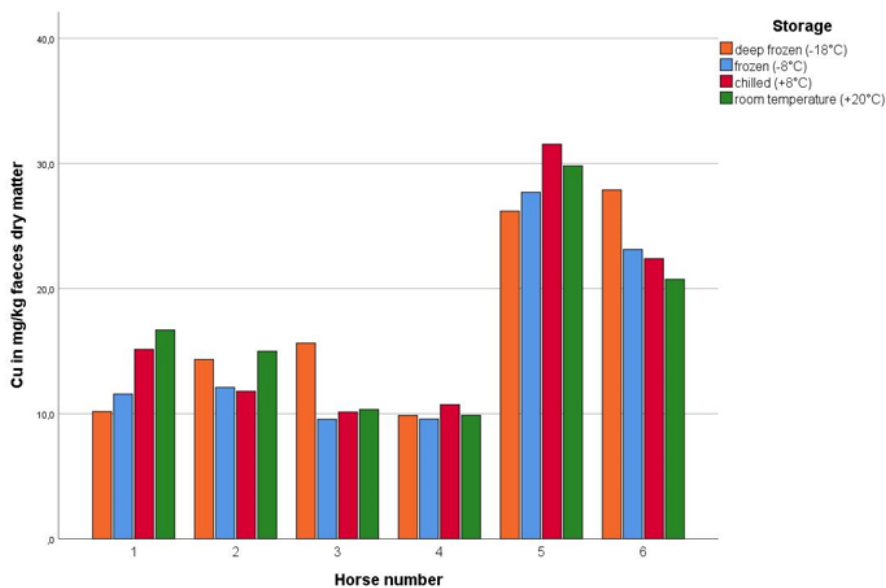


Figure 3: Copper like figure 2.

In the dung pile (Figure 1), the concentrations of the six quantity and 22 trace elements were measured 36 times repeatedly. The relative error was calculated from the differences between the measured values of the 36 individual values and the mean value (Table 5). As a relative number, it indicates the expected deviation of a measured value from the mean value. The variation in the overall procedure from faecal sample collection to storage, sample drying and laboratory analysis is included in the calculation. With the exception of selenium (0.60) and tin (0.27), the median values are below 0.20 for the other 26 elements.

	Mean value	Median	25%-Quantile	75%-Quantile
Quantity elements				
Ca	0,163	0,140	0,057	0,280
P	0,122	0,110	0,041	0,181
Mg	0,117	0,105	0,051	0,165
Na	0,112	0,082	0,026	0,134
K	0,101	0,067	0,027	0,153
S	0,066	0,056	0,026	0,100
Trace elements				
Fe	0,070	0,052	0,016	0,089
Cu	0,098	0,080	0,034	0,138
Zn	0,134	0,127	0,057	0,180
Mn	0,177	0,142	0,051	0,242

Se	0,726	0,600	0,211	0,917
Co	0,067	0,037	0,018	0,106
Cr	0,183	0,133	0,052	0,243
Mo	0,089	0,085	0,029	0,128
Si	0,163	0,154	0,076	0,235
B	0,060	0,042	0,014	0,074
As	0,084	0,074	0,024	0,111
Ni	0,083	0,076	0,038	0,118
Sn	0,360	0,270	0,098	0,486
Ba	0,094	0,076	0,046	0,119
Sr	0,118	0,077	0,042	0,168
Pb	0,097	0,084	0,037	0,138
Cd	0,158	0,131	0,076	0,201
U	0,145	0,132	0,047	0,217
Tl	0,101	0,081	0,065	0,124
Al	0,139	0,131	0,046	0,196
Ti	0,109	0,074	0,031	0,156
Li	0,080	0,058	0,031	0,128

Table 5: Relative faulta of the investigation of element concentrations from the whole process beginning with recovery of samples, reconditioning and analysis ($n = 36$).
 $relative\ fault = [(value\ A - value\ B)] / (0,5\ value\ A + 0,5\ value\ B)$.

Discussion

The dry matter content in the faeces varies in a wide range between 167 to 335 g/kg [2], which is why the reference to the dry matter is of great relevance for the evaluation of the comparability of the measured values. Although faecal analyses are used, especially in animal nutrition, to question the digestibility of minerals little information is found in the literature on the marginal conditions of sample collection. However, for the use of faecal samples for the analysis of mineral supply, these must be clarified and standardized so that reference values can be determined in the future.

The first issue of central importance for faecal sampling relates to possible both random and ordered differences in concentration of individual quantity and trace elements within the dung pile. Ideally, sampling anywhere in the faecal pile would give the same measurement result.

Horizontal dispersion in the dung pile had a significant effect on only three of the 28 elements measured, magnesium, copper and aluminum. For all three elements, the concentration from the samples collected on the outside has been the highest (Table 1). The magnesium compounds (oxide and carbonate) [9], as well as copper II sulfate pentahydrate, contained in the supplemental feeds are poorly soluble in water [10], so it can be assumed that the compounds contained in the faeces were not dissolved by the rain, but rather were much more likely flushed to the outside. This could explain the analogous distribution of copper and magnesium in the faecal pile. With regard to aluminum, it is more of a random sample effect, as the concentrations are the same on the outside and in the center (Table 1).

For all element concentrations significantly differing within the stratum (Mg, Na, K, S, Fe, Cu, Si, Ba, Cd, Tl, Al), statistically the lowest concentration was found in the central stratum without exception (Table 2). This portion is the least exposed to weathering and soil contact, so there is no decline in the soluble constituents as described below, and thus no relative increase in mineral content.

The second question of central importance to faecal sampling is directed to the length of time from weaning of the faecal pile to sample collection. It is an important finding that significant changes in faecal concentrations occur in a three-day period for five of the six quantity elements and eleven of the 22 trace elements studied (Table 3). It is noteworthy that these concentration changes are not irregular, but follow a consistent pattern for all elements. Looking at both statistical and numerical values, the highest concentrations are found in the oldest faecal samples. Those that have been outdoors for three days (Table 3). In contrast, with the exception of sodium and copper, the faecal concentrations of the measured quantity and trace elements are statistically the same on day 0 and day 1, i.e. within 24 hours of excretion. This is a very important finding for the subsequent possibility of routine analysis.

The predominant trend of increasing concentration with increasing age of the samples is probably best explained by the relative shift of the contents in the dry matter. Dry matter in horse manure averages 240 g/kg [2], 890 g/kg of which is on average accounted for by organic matter and just 110g/kg by crude ash, which contains the minerals (proximate analysis, [11]). Among others the contents of the organic matter represent, the carbohydrates, which are very water soluble due to the many hydroxyl groups [12]. Since, as described, there was light precipitation during the three days the samples were lying, one can assume a volatilization of this fraction, accounts for an average of 380 g/kg of the dry matter in the faeces, according to [2]. Since element concentrations in the faecal samples have been measured as a proportion of the dry matter, a relative increase in elements can thus be explained by a decrease in organic matter in the dry matter.

This explanatory approach can be extended to the results in table 1-3 as a common central factor. The concentration pattern can be summarized as equal or lower concentrations of quantity and trace elements being measured in the center of the dung pile during short storage periods, and conversely equal or higher concentrations being measured in the outside (top, bottom, side) dung regions, increasing with longer storage periods. But it must be emphasized that regardless of statistical significance evidence; the absolute value expressions of concentration gradients are low, which allows a recommendation for reliable practical implementation of sample collection.

Regardless of storage, the samples are stable for seven days, which can also be seen in table 4, figure 2 and 3. In the case of potassium and sulfur, random variation can be assumed, as otherwise no trend is apparent. It should be emphasized, however, that the samples were stored in a closed container and, at the variant room temperature, in the shade. This aspect is practically relevant, since no refrigerated sample transport is necessary, but for hygienic reasons the refrigerated variant is certainly to be preferred for longer storage.

The relative errors reported in table 5 are small, with median values below 0.2. They underline the practicability of the test methodology as an overall procedure. By multiplying a measured value by the magnitude of the relative error, the distance to a mean value determined from repeat measurements of the same sample can be estimated. This estimated value has the special feature of including all methodological sources of error from the collection of the faecal sample, intermediate storage, drying and sub sampling from the dried sample to the laboratory analytical performance ICP-OES or ICP-MS measurement. Such comprehensive error data are the exception in clinical chemistry. The relative errors exceed 0.2 only for tin (0.27) and especially for selenium (0.60) (Table 5). Both elements are found in the faecal samples only at low concentrations below 1 mg/kg faecal TS (Table 3), with selenium being the element with the lowest concentration of all 28 elements analyzed. Some individual readings are below the detection limit for selenium and are therefore recorded as 0 mg/kg faecal TS. Thus, the selected method for calculating the relative error for selenium has limited applicability. However, it should not be concluded from this that selenium determination is not applicable for faecal testing. Above a lower limit value to be defined, selenium measurement values should be evaluated as undetectable and excluded from statistical evaluations. This specificity for selenium matches good with the metabolic characteristics of a high absorption rate and relevant renal excretion [13].

Conclusion

For faecal concentrations of various quantity and trace elements, there is a statistically significant trend toward an increase in measured values with faecal sampling in the outer region of the dung pile compared to the center, as well as with increasing distance from the time of faecal collection. However, from the point of view of a practical application, the numerical differences in values are small, indicating the stability of the dung samples. The aim should be to standardize the sampling. Therefore, the recommendation is to collect the dung samples from a freshly settled pile from the center. This will most accurately reflect the amount of quantity and trace elements contained, as these samples are not subject to varying weather conditions. In exceptional cases, it is permissible to obtain faecal samples up to three days old from the central dung pile. The stored faecal samples show a high stability even at room temperature over 7 days, nevertheless, a sample storage cooled or frozen is to be preferred also for hygienic reasons.

Bibliography

1. Gesellschaft für Ernährungsphysiologie. "Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung von Pferden". Energie- und Nährstoffbedarf landwirtschaftlicher Nutztiere. Frankfurt am Main: DLG-Verl (2014).
2. Coenen M and Vervuert I. "Pferdefütterung". 6. Aufl. Stuttgart: Thieme (2019).
3. Herold A., et al. "Konzentrationen an Mengenelementen beim Rind in verschiedenen Probenmedien unter besonderer Berücksichtigung von Kotproben". *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 46.4 (2018): 221-228.
4. Herold A., et al. "Konzentration von Spurenelementen beim Rind in verschiedenen Probenmedien unter besonderer Berücksichtigung von Kotproben". *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 48.01 (2020): 5-14.
5. Weber J., et al. "Chronische Kupferübersversorgung als mögliches Bestandsproblem in einer deutschen Milchviehherde". *Tieraerztliche Praxis Ausgabe Grosstiere Nutztiere* 49.03 (2021): 203-209.
6. Staufenbiel L., et al. "Methodische Untersuchung zu Mengen- und Spurenelementkonzentrationen in Pferdekotproben unter besonderer Berücksichtigung des Probenentnahmeortes". *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 49.3 (2021): 178-188.
7. Mueller A., et al. "Differences in the selenium supply of horses across Europe". *Tieraerztliche Praxis Ausgabe Grosstiere Nutztiere* 40.3 (2012): 157-166.
8. Bühl A. "SPSS 23. Einführung in die moderne Datenanalyse. Bd. 4297. Always learning. 15. Aufl. Hallbergmoos: Pearson (2016).
9. Sicius H. "Erdalkalimetalle: Elemente der zweiten Hauptgruppe". In: Handbuch der chemischen Elemente. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg (2020): 1-63.
10. Sicius H. "Kupfergruppe: Elemente der ersten Nebengruppe. In: Sicius H, Hrsg. Handbuch der chemischen Elemente. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (2019): 1-40.
11. Dobenecker B and Kamphues J Hrsg. "Supplemente zur Tierernährung. Für Studium und Praxis". 12. Aufl. Hannover, Germany: M. and H. Schaper; Meyer, Helmut (2014).
12. Wachter H and Hausen A. "Chemie für Mediziner. Wachter, Arno Hausen. (de Gruyter-Lehrbuch). 4. Aufl. Berlin: De Gruyter (1982).
13. Vervuert I and Stoebe S. "Selen beim Pferd im Spannungsbogen zwischen marginaler und toxischer Versorgung". *Pferdespiegel* 16.01 (2013): 27-33.

Volume 6 Issue 10 October 2021

©All rights reserved by Lydia Staufenbiel., et al.

3. Publikation III

3.1. Methodische Untersuchungen zur Variation der Mengen- und Spurenelementkonzentrationen in Pferdekotproben im Tagesverlauf und über einen 15-Tages-Zeitraum

Veröffentlichung: Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 2022; 135: 1-9

DOI: <https://doi.org/10.2376/1439-0299-2022-5>

Lydia Staufenbiel¹, Anja-Elvira Müller², Heidrun Gehlen¹

Klinik für Pferde, allgemeine Chirurgie und Radiologie, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin¹

Anne-Frank-Straße 7/2, 71701 Schwieberdingen²

Anteilerläuterung

Name	Bezeichnung Autor	Erläuterung Anteil Leistung
Lydia Staufenbiel	Erstautorin	Konzipierung Versuchsaufbau Durchführung von Untersuchungen Sammlung der Daten Statistische Analyse Erstellung des Manuskripts
Anja-Elvira Müller	Co Autorin	Laboranalysen der Kotproben Kritische Revision des Manuskripts
Heidrun Gehlen	Co Autorin	Mitwirkung bei Konzipierung Versuchsaufbau Kritische Revision des Manuskripts

3.2. Zusammenfassung

Um Kotproben für die Beurteilung der Mineralstoffversorgung von Pferden nutzen zu können, bedarf es methodischer Untersuchungen zur Standardisierung der Probenentnahme. Untersucht wurden der Einfluss des Entnahmezeitpunktes sowie die Konzentrationsentwicklung von 28 Mengen- und Spurenelementen über einen 15-Tages-Zeitraum. Als Probanden standen sechs Pferde zur Verfügung, die in drei Fütterungsgruppen eingeteilt waren und Rationen mit unterschiedlichen Mineralstoffkonzentrationen (ohne Ergänzung, mit definierter Zulage und mit freiem Zugang zu einer Mineralleckmasse) erhalten haben. Die Kotproben wurden über 15 Tage an jedem dritten Tag um 7 Uhr und an Tag 6 alle sechs Stunden aus der Ampulla recti gewonnen. Die Analyse der 28 ausgewählten Elemente in den zuvor getrockneten Kotproben erfolgte mithilfe von optischer Emissionsspektrometrie mittels induktiv gekoppelten Plasmas (ICP-OES) bzw. durch Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS). Zur statistischen Auswertung wurde das Verfahren des linearen gemischten Modells einer Varianzanalyse mit festen Effekten (Tiernummer und Entnahmezeitpunkt bzw. Tag) gewählt, nach dem die Residuen mithilfe des Shapiro-Wilk-Testes auf Normalverteilung geprüft wurden. Bei signifikanten Unterschieden ($p < 0,05$) schloss sich ein Post-hoc-Test mit Bonferroni-Korrektur an. Die Konzentration der im Kot gemessenen Mengen- und Spurenelemente, die zu unterschiedlichen Uhrzeiten genommenen wurden, unterscheidet sich lediglich im Fall von Kalium signifikant. Die Variabilität der Messwerte ist jedoch so gering, dass die Autoren von keinem für die praktische Anwendung bedeutendem Einfluss des Entnahmezeitpunktes ausgehen. Bei einer konstanten Fütterung hat der Zeitpunkt der Probennahme keinen Einfluss auf das Ergebnis. Die Messwerte der 15-Tage-Verlaufstudie präsentierten sich für den Großteil der gemessenen Elemente innerhalb der jeweiligen Fütterungsgruppe gleichbleibend, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass bei gleichbleibender Fütterung die Ausscheidung mit dem Kot konstant ist.

Schlüsselwörter: Circadiane Ausscheidung, Mineralstoffe, Labordiagnostik

Klinik für Pferde, Freie Universität Berlin¹; Anne-Frank-Straße 7/2, 71701 Schwieberdingen²

Open Access

Berl Münch Tierärztl Wochenschr (135)

DOI 10.2376/1439-0299-2022-5

1–9

© 2022 Schlütersche Fachmedien GmbH

Ein Unternehmen der Schlüterschen

Mediengruppe

ISSN 1439-0299

Korrespondenzadresse:

lydiastaufenbiel@freenet.de

Eingegangen: 03.03.2022

Angenommen: 11.08.2022

Veröffentlicht: 27.09.2022

<https://www.vetline.de/berliner-und-muenchener-tieraerztliche-wochenschrift-open-access>

Zusammenfassung

Methodische Untersuchungen zur Variation der Mengen- und Spurenelementkonzentrationen in Pferdekotproben im Tagesverlauf und über einen 15-Tages-Zeitraum

Methodical investigation of concentration of macro and micro minerals in equine faeces in diurnal profile and 15-days-long-term study

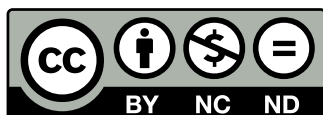
Lydia Staufenbiel¹, Anja-Elvira Müller², Heidrun Gehlen¹

Um Kotproben für die Beurteilung der Mineralstoffversorgung von Pferden nutzen zu können, bedarf es methodischer Untersuchungen zur Standardisierung der Probenentnahme. Untersucht wurden der Einfluss des Entnahmezeitpunktes sowie die Konzentrationsentwicklung von 28 Mengen- und Spurenelementen über einen 15-Tages-Zeitraum. Als Probanden standen sechs Pferde zur Verfügung, die in drei Fütterungsgruppen eingeteilt waren und Rationen mit unterschiedlichen Mineralstoffkonzentrationen (ohne Ergänzung, mit definierter Zulage und mit freiem Zugang zu einer Mineralleckmasse) erhalten haben. Die Kotproben wurden über 15 Tage an jedem dritten Tag um 7 Uhr und an Tag 6 alle sechs Stunden aus der Ampulla recti gewonnen. Die Analyse der 28 ausgewählten Elemente in den zuvor getrockneten Kotproben erfolgte mithilfe von optischer Emissionsspektrometrie mittels induktiv gekoppelten Plasmas (ICP-OES) bzw. durch Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS). Zur statistischen Auswertung wurde das Verfahren des linearen gemischten Modells einer Varianzanalyse mit festen Effekten (Tiernummer und Entnahmezeitpunkt bzw. Tag) gewählt, nach dem die Residuen mithilfe des Shapiro-Wilk-Testes auf Normalverteilung geprüft wurden. Bei signifikanten Unterschieden ($p < 0,05$) schloss sich ein Post-hoc-Test mit Bonferroni-Korrektur an. Die Konzentration der im Kot gemessenen Mengen- und Spurenelemente, die zu unterschiedlichen Uhrzeiten genommenen wurden, unterscheidet sich lediglich im Fall von Kalium signifikant. Die Variabilität der Messwerte ist jedoch so gering, dass die Autoren von keinem für die praktische Anwendung bedeutendem Einfluss des Entnahmezeitpunktes ausgehen. Bei einer konstanten Fütterung hat der Zeitpunkt der Probennahme keinen Einfluss auf das Ergebnis. Die Messwerte der 15-Tage-Verlaufstudie präsentierten sich für den Großteil der gemessenen Elemente innerhalb der jeweiligen Fütterungsgruppe gleichbleibend, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass bei gleichbleibender Fütterung die Ausscheidung mit dem Kot konstant ist.

Schlüsselwörter: Circadiane Ausscheidung, Mineralstoffe, Labordiagnostik

Summary

In order to be able to use faecal samples for the assessment of the mineral supply of horses, methodical investigations are required for the establishment of a standard for the collection of samples. The influence of the sampling time as well as the concentration development of 28 macro and micro minerals over a 15-day period were investigated. Six horses were available as probands, which were fed rations with three different mineral concentrations (none of supplement, calculated amount and mineral lick mass for free intake). Faecal samples were collected from the ampulla recti at 7 a.m. every third day for 15 days and every six hours on day 6. The measurement of concentration of the 28 selected elements in the previously dried faecal samples was performed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). For statistical analysis, the method of linear mixed model an analysis of variance with fixed effects (animal number and time of collection or day) was chosen and after that the residuals were tested for normal distribution using the Shapiro-Wilk test. In case of significant differences ($p < 0.05$), a post-hoc test with Bonferroni correc-



CC BY-NC-ND 4.0

tion followed. There were significant differences in faecal concentrations of macro and trace elements between samples taken at different times only in the case of potassium. However, the differences in measured values have such a low variability that the authors do not assume any relevant influence of the sampling time for practical application. With constant feeding, the time of sampling has no effect on the result. The measured values of the 15-day study were constant for the majority of the measured elements in the respective feeding group. Therefore, it can be concluded that the excretion with the faeces is constant if the feeding remains the same.

Keywords: circadian elimination, minerals, laboratory diagnostics

Einleitung

Eine ausgewogene Fütterung mit ausreichender Mineralstoffversorgung spielt für die Aufrechterhaltung der Pferdegesundheit eine große Rolle. Grundrationen aus Heu gegebenenfalls mit Ergänzung von Hafer enthalten in der Regel ausreichend Mengenelemente, während vor allem essenzielle Spurenelemente wie Zink, Selen und Kupfer ungenügend enthalten sind (Schubert et al. 2021). Deshalb bieten viele Pferdebesitzer mineralische Ergänzungsfuttermittel den Pferden zusätzlich an (Grimwood et al. 2016). Um eine Aussage über die Bedarfsdeckung zu treffen, muss entweder die Gesamtmenge an mit der Ration aufgenommenen Mineralstoffen (nutritive Versorgungslage) oder die dem Stoffwechsel zur Verfügung stehende Menge an Mineralstoffen (metabolische Versorgungslage) analysiert werden. Bei präziser Bestimmung der Aufnahme ist laut Zentek der Futtermittelanalyse aufgrund der genauesten Erfassbarkeit die höchste Bedeutung zuzuschreiben (Fürl 2021). Dies ist jedoch in der Pferdefütterung besonders in Extensivhaltungen schwierig exakt durchzuführen, da selten eine homogene Mischration, wie bei der Milchrinderfütterung üblich, angeboten wird und die Futteraufnahme von vielen internen und externen Faktoren beeinflusst wird (Coenen und Vervuert 2019). Die metabolische Versorgungslage wird in der Regel mithilfe von Blutproben beurteilt, dieses fungiert jedoch hauptsächlich als Transportmedium im Körper. Des Weiteren unterliegen viele Elemente hormonellen Regulierungen (Rehner und Daniel 2010) oder sind an Enzyme gebunden, wie zum Beispiel 95 % des Kupfers an Ceruloplasmin (Jeroch et al. 2020). Abschließend soll die Möglichkeit der Analyse von Indikatororganen zur Analyse des Versorgungsstatus mit Mineralstoffen genannt werden. Kośła (1988) beprobte dafür von 165 Schlachtpferden aus der DDR, den Volksrepubliken Polen und Ungarn Rippen, Mittelfußknochen, Leber, Nieren, Großhirn, Skelettmuskulatur, Blutserum, Mähnen- und Deckhaar. Zwar konnte der Versorgungsstatus der meisten Elemente (gemessen wurden P, Ca, Mg, K, Na, Fe, Ni, Mn, Zn, Li, Cu, Mo, Cd und Pb) sicher durch die Analyse der jeweiligen Indikatororgane wiedergegeben werden, ist jedoch aufgrund der Invasivität in der Pferdemedizin obsolet. Von dieser Aussage ausgenommen sind die Analysen von Haarproben, mit denen aber keine Aussage über den aktuellen Versorgungsstatus getroffen werden kann, sondern hauptsächlich längerfristige Versorgungsstörungen aufgezeigt werden (Ratjen et al. 2017, Kalashnikov et al. 2019).

Daher stellt sich die Frage, ob Kotproben als Erweiterung des diagnostischen Pools und als nicht invasiv zu gewinnendes Probenmedium geeignet wären, die Mineralstoffversorgung von Pferden zu beurteilen. Vor

einer routinemäßigen Nutzung von Kotproben muss die Probenentnahme standardisiert werden, um zunächst Referenzwerte und später vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Bisher wurde festgestellt, dass die Proben aus der Mitte eines frisch abgesetzten Kothaufen gewonnen werden können und bis zu sieben Tage bei Raumtemperatur stabil sind, außerdem wurde nur ein geringer methodischer Fehler der Methode von der Probenentnahme bis zur Laboranalyse ermittelt (Staufenbiel et al. 2021a, b). Zur weiteren Standardisierung von Kotanalysen muss festgestellt werden, inwieweit die Tageszeit die Höhe der Mineralstoffe in den Kotproben beeinflusst und ob die Kotkonzentration über einen bestimmten Zeitraum konstant ist.

Die Tageszeit beeinflusst die Futteraufnahme von Pferden. Ralston et al. stellten 1979 in einem Versuch mit ad libitum Fütterung fest, dass 49 % der Ration zwischen 8 und 17 Uhr gefressen werden, während in den restlichen 16 Stunden die Aufnahme von Futter seltener, mit weniger und kleineren Portionen stattfindet. Somit variiert auch die Aufnahme von Mengen- und Spurenelementen, was die Frage aufwirft, ob die Ausscheidung und der Gehalt im Blut tageszeitlichen Schwankungen unterliegen und der Zeitpunkt der Probenentnahme für reproduzierbare Messergebnisse beachtet werden muss.

Bei Milchkühen konnten für die Mengenelemente in unterschiedlichen Alters- und Fütterungsgruppen für P, Cl, Na und Ca nur geringe Auslenkungen im Tagesprofil von Serumproben, dagegen für K im Serum sowie Mg, Cl, K und Na im Harn starke Schwankungen festgestellt werden (Thurmann 2012). In der selben Arbeit merkt der Autor an, dass diese Ergebnisse sich nicht mit den Ergebnissen von Stampfli et al. (1980) oder Unshelm und Rappen (1968) decken, die in ihren Untersuchungen deutliche Tagesschwankungen feststellten. Widersprüchliche Aussagen finden sich in der Literatur auch bei Studien über tageszeitliche Schwankungen von Calcium und Phosphat in Serumproben von Pferden. Während Greppi et al. (1996) beschreiben, dass der Calciumgehalt im Serum weder circadian noch fütterungsbedingt beeinflusst wird, geben Lepage et al. (1991) einen Tiefpunkt zwischen 14 und 16 sowie 0 und 2 Uhr und einen Peak gegen 7 Uhr an. Der Phosphatspiegel hingegen stieg in der Studie von Greppi et al. (1996) vier Stunden nach der Fütterung, während Lepage et al. (1991) zwei Peaks gegen 16 und 4 Uhr und die niedrigsten Spiegel mittags und gegen 20 Uhr angeben. Diese divergierenden Aussagen in der Literatur zeigen, dass für die Einführung eines neuen Labordiagnostikums zunächst die methodischen Rahmenbedingungen festgelegt werden müssen, um repräsentative Messergebnisse zu erhalten. Die vorliegende Publikation beschäftigt sich mit dem Gehalt von sechs Mengen- und 22 Spurenele-

menten in Kotproben von sechs Pferden innerhalb eines 24-Stunden-Profiles sowie einer 15-Tage-Verlaufsstudie mit dem Ziel, Schwankungen innerhalb dieser Zeiten zu prüfen und Empfehlungen für die Probenentnahme auszusprechen. Zur Erhöhung der Varianz des Datensatzes erhielten die Probanden eine von drei Futtermischungen mit einem unterschiedlichen Mineralstoffgehalt. Ziel ist die Klärung, ob die Tageszeit einen Einfluss auf die Elementkonzentrationen hat und inwieweit die Ausscheidung bei gleicher Fütterung über einen längeren Zeitraum konstant bleibt, um die Probenentnahme für eine mögliche Bestimmung der Mineralstoffversorgung in Kotproben zu standardisieren.

Material und Methoden

Als Probanden standen drei Warmblüter, zwei Haflinger und ein Pony zur Verfügung, denen über 24 Stunden alle sechs Stunden eine Kotprobe aus der Ampulla recti (Staufenbiel et al. 2021b) um 19, 1, 7, 13 und 19 Uhr entnommen wurde. Diese Probenentnahme erfolgte an Tag 6 einer 15-Tage-Verlaufsstudie, in der über 15 Tage an jedem dritten Tag um 7 Uhr eine Kotprobe gewonnen wurde (Tab. 1).

TABELLE 1: Probenentnahmezeitpunkte der 15-Tage-Verlaufsstudie und vom 24-Stunden-Profil

Probenentnahme 15-Tages-Verlaufstudie an Tag:	Probenentnahme 24-Stunden Profil an Tag 6 zu folgenden Uhrzeiten:
0	19
3	1
6	7
9	13
12	19
15	

Die Haltung der Pferde erfolgte zur Reduktion einer unkontrollierten Futteraufnahme außerhalb der berechneten Ration zwischen 8 und 16 Uhr auf einem Sandauslauf mit einem ad libitum Angebot von Wasser und Heu aus einer Rundballenraufe und nachts in einer mit Sägespänen eingestreuten Box mit Zulage von ca. 7 kg Heu. Zehn Tage vor Probengewinnung wurden

TABELLE 2: Mineralstoffgehalt der an Fütterungsgruppe 2 verfütterten Mineralstoffmischung „Mineral Winter 1“ (Spezialfutter Neuruppin) sowie der Gesamtgehalt der auf den Selenbedarf ausgerichteten Ration (27 g/600 kg) und Gehalt der Mineralleckmasse „Leck SE 50-ÖVO“ (Spezialfutter Neuruppin), die den Probanden der Fütterungsgruppe 3 ad libitum zur Verfügung stand.

	Fütterungsgruppe 2: definierte Vorlage	Analysewerte einer Heuprobe	Beispielration (600 kg) Fütterungsgruppe 2	Fütterungsgruppe 3: ad libitum
	Gehalt pro kg OS Mineralstoffgemisch	Gehalt pro kg TS Heu	14 kg Heu + 27 g Mineralstoffgemisch	Gehalt pro kg OS Mineralleckmasse
Ca in g	90	10,5	135	160
P in g	21	2,1	27	40
Mg in g	75	3,6	47	35
Na in g	190		5	140
Cu in mg	1.750	2,3	76	800
Mn in mg	2.000	25,5	376	4.050
Zn in mg	6.500	39,4	672	6.075
Se in mg	45	< 0,05	> 1,2	50
Co in mg	20		0,5	25
J in mg	50		1,4	50

die Probanden zufällig in drei Fütterungsgruppen in Bezug auf die Mineralstoffversorgung eingeteilt. Die erste Gruppe erhielt zu den im Heu enthaltenen Mengen- und Spurenelementen keine Ergänzung, die zweite Gruppe bekam eine auf den Selenbedarf ausgerichtete Zulage von Mineralstoffen, während die dritte Gruppe freien Zugang zu einer mineralischen Leckmasse hatte (Staufenbiel et al. 2021b) (Tab. 2). Die Kotproben wurden nach der Entnahme bis zur weiteren Verarbeitung bei -18 °C gelagert und daraufhin im Trockenschrank für 48 Stunden bei 60 °C getrocknet. Anschließend wurde eine definierte Einwaage (0,03–0,05 g) im IDEXX Labor, Kornwestheim, Germany mittels optischer Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES: Cu, Zn, Mn, Mo, Ca, Mg, Ba, Cr, Fe, Sr, K, S, Ti, P, Si und Na) bzw. durch Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS: Se, B, Co, Ni, Pb, Cd, U, As, Tl, Al, Sn, Li) nach zertifizierten Standardanweisungen analysiert, wie es bereits für Kotproben von Rindern (Herold et al. 2018, 2020) und Pferden (Staufenbiel et al. 2021a, b) beschrieben ist. Die Tierversuchsnummer zur beschriebenen Probenentnahme lautet: 2347-A-3-1-2020.

Statistische Auswertung

Die Datenerfassung und -verwaltung erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation), die statistische Auswertung mithilfe von SPSS Statistics 25 (IBM), in welchem auch die Abbildungen erstellt wurden.

Innerhalb von 24 Stunden wurden im Abstand von sechs Stunden fünf Kotproben von sechs Probanden drei unterschiedlicher Rassen mit einer differenzierten Fütterung gewonnen. Der Probenentnahmezeitpunkt und die Tiernummer wurden als feste Faktoren definiert. Der Einfluss der Rasse, als auch der Fütterung spiegelt sich in dem festen Faktor Tiernummer wider. Die Wirkung dieser beiden festen Faktoren wurde mit dem Verfahren des linearen gemischten Modells, Varianzanalyse mit festen Effekten, durchgeführt (Bühl 2016). Die Residuen wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Zusätzlich wurden zur Einschätzung der Homoskedastizität die Residuen grafisch gegen die durch das Modell vorhergesagten Werte aufgetragen und deren Verteilung visuell beurteilt. Ein Fak-

tor wurde als statistisch signifikant bei einem p-Wert von $< 0,05$ bewertet. In diesem Fall schloss sich zum paarweisen Vergleich der Mittelwerte ein Post-hoc-Test mit Bonferroni-Korrektur ($p < 0,05$) an. Die Ergebnisse wurden mit Kleinbuchstaben als Index markiert. Signifikant unterschiedliche Mittelwerte sind durch unterschiedliche hochgestellte Buchstaben markiert, gleiche (keine) Buchstaben stehen für das Fehlen einer signifikanten Differenz. Diese Auswertung konnte bei 27 der 28 analysierten Elemente verwendet werden, für Selen war das Verfahren aufgrund der Abweichung von der Normalverteilung der Residuen unzulässig.

Im Zeitraum von 15 Tagen wurden von sechs Probanden mit einer differenzierten Fütterung aus drei unterschiedlichen Rassen sechs Kotproben entnommen. Der Probenentnahmezeitpunkt (sechs Ausprägungen) und die Tiernummer (sechs Ausprägungen) wurden als feste Faktoren definiert. Die statistische Auswertung erfolgte wie für den Einfluss der Tageszeit mit dem linearen gemischten Modell mit den fixen Faktoren Untersuchungstag und Tiernummer. Für den paarweisen Vergleich der Mittelwerte wurde ebenfalls der Post-hoc-Test mit Bonferroni-Korrektur ($p < 0,05$) angewendet.

Ergebnisse

Zur Auswertung des circadianen Einflusses sind die Mittelwerte (geschätzte Randmittel aus der Varianzanalyse) der sechsständlichen Probennahmen über 24 Stunden in Tabelle 3 dargestellt. Von allen 28 gemessenen Elementen unterscheiden sich lediglich die Mittelwerte bei Kalium signifikant. Abbildung 1 und Abbildung 2 zeigen die Werteverteilung in Abhängigkeit von der Probenentnahmezeit und dem Einzeltier exemplarisch am Beispiel von Cobalt und Eisen. Der feste Faktor Tiernummer beinhaltet dabei die tierindividuelle Variabilität, die durch unterschiedliche Fütterung und Probanden aus drei verschiedenen Rassen erhöht wurde. Die Abbildungen 1 und 2 können beispielhaft für die tierindividuellen Einflussfaktoren gesehen werden, auf eine extra Darstellung dieses festen Faktors wurde in der vorliegenden Publikation verzichtet, da der Einfluss der Fütterung in (Staufenbiel et al. 2021b) ausführlich ausgewertet wurde und der Einfluss der Rasse bei dieser geringen Probandenzahl nicht sicher statistisch überprüft werden kann. Die Cobaltkonzentrationen stellen sich differenziert zwischen den Fütterungsgruppen dar, die Tiernummern lassen sich eindeutig den erhaltenen Mineralstoffrationen zuordnen. Pferd 1 und Pferd 2 haben keine Mineralstoffergänzung erhalten, die Pferde 3 und 4 zugehörig zur Fütterungsgruppe 2 eine definierte auf Selen abgestimmte Menge eines Mineralstoffgemischs mit 20 mg Cobalt als Cobalt-II-Carbonat-Granulat je kg Ursprungssubstanz. Die Probanden 5 und 6 hatten zum Zeitpunkt der Probenentnahme eine Mineralstoffmasse mit 25 mg Cobalt-II-Granulat zur freien Aufnahme zur Verfügung. Die verschiedenen Balkenfarben stehen für die Zeitpunkte, zu denen die Proben genommen wurden, wobei die Unterschiede zwischen den Uhrzeiten sehr gering ausfallen. Gleiches gilt für Abbildung 2 am Beispiel von Eisen, wobei dieses weder in der Deklaration des Mineralstoffgemischs, welches Pferd 3 und Pferd 4 erhalten haben, noch in der Leckmasse, die den Probanden 5 und 6 zur freien Verfügung stand, aufgeführt ist.

Tabelle 4 gibt die Mittelwerte (geschätzte Randmittel) der 15-Tage-Verlaufsstudie wieder. Angegeben sind die

Werte der Mengenelemente in g/kg Kottrockensubstanz und der Spurenelemente in mg/kg Kottrockensubstanz an den jeweiligen Probenentnahmetagen. Signifikant unterschiedliche Werte ($p < 0,05$) sind mit hochgestellten Buchstaben markiert. Mit Phosphor und Kalium unterscheiden sich zwei Mengenelemente signifikant voneinander, wobei im Fall von Phosphor die absoluten Zahlenunterschiede relativ gering sind. Die Phosphorkonzentrationen streuen im Zeitverlauf willkürlich. Bei Kalium fällt dagegen eine über den Untersuchungszeitraum kontinuierliche Konzentrationszunahme auf. Sili-cium weist gegenläufig zu Kalium eine kontinuierliche Abnahme der Kotkonzentration auf. Bei Lithium wird nur am Untersuchungstag 15 eine signifikant niedrigere Kotkonzentration gemessen.

Abbildung 3 verdeutlicht am Beispiel von Selen die Werteverteilung in Abhängigkeit vom Probenstag 0 bis Probenstag 15 und der Probanden 1 bis 6. Die Wertestreuung innerhalb eines Probanden ist zwar deutlich, aber erscheint geringer als zwischen den Probanden. Wie bereits bei Abbildung 2 erläutert, spiegelt sich in den Probanden indirekt das Mineralstoffangebot über die unterschiedliche Fütterung und der Einfluss der Rasse wider. Der Faktor-Nummer der Tiernummer hat mit Ausnahme von P, Mg, K, Cu, Zn, Mo, Si, B, Ba für die anderen 19 analysierten Elemente einen signifikanten Effekt auf die Kotkonzentration (Ergebnisse der Varianzanalyse nicht dargestellt).

Diskussion

Der Gehalt von Mengen- und Spurenelementen im Pferdekot erlaubt Rückschlüsse auf die aufgenommene Menge der einzelnen Mineralstoffe (Staufenbiel et al. 2021a, b). Für die Etablierung neuer Labormethoden ist die Festlegung von präanalytischen Bedingungen zur Probennahme essenziell, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten (Moritz 2014). Dazu gehören neben der Entnahmetechnik, welche bezüglich des Entnahmeortes der Kotproben keinen signifikanten Einfluss auf die Konzentration hat (Staufenbiel et al. 2021b), auch die Tageszeit, Altersunterschiede und die erbrachte Leistung (Thurmann 2012). Des Weiteren müssen tierindividuelle Faktoren beachtet werden, welche durch die Untersuchung bei drei unterschiedlichen Rassen indirekt durch den Faktor Tiernummer einbezogen worden sind. Die Betrachtung der Einzelwerte lässt einen Einfluss vermuten, der in Folgestudien an größeren Tierzahlen zu prüfen ist. Die vorliegende Publikation dient der Feststellung, inwiefern der Entnahmezeitpunkt auf die Konzentration von 28 gemessenen Mengen- und Spurenelementen Einfluss hat und wie sich die Messwerte innerhalb einer 15-Tage-Verlaufsstudie unterscheiden.

Bezug nehmend auf das 24-Stunden-Tagesprofil konnten lediglich für Kalium signifikante Unterschiede nachgewiesen werden (Tab. 3), weshalb dieses Element nachfolgend genauer betrachtet werden soll. Kalium ist im Mittel zu 13 g/kg Trockenmasse im Kot enthalten und steigt mit höheren Gehalten im Raufutter (Coenen und Vervuert 2019). Die Absorption erfolgt überwiegend im Dünndarm und kann zu 70 % der mit dem Futter aufgenommenen Kaliummengen verwertet werden (Burger 2011), nicht genutztes Kalium wird hauptsächlich renal, aber auch fäkal ausgeschieden. Als wichtigstes intrazelluläres Ion ist Kalium maßgeblich an der Auf-

TABELLE 3: Einfluss der Probenentnahmezeit im Tagesverlauf auf die Elementkonzentrationen in Kotproben (n = 30)

	Mittelwert ¹ 19 Uhr	Mittelwert ¹ 1 Uhr	Mittelwert ¹ 7 Uhr	Mittelwert ¹ 13 Uhr	Mittelwert ¹ 19 Uhr	Standardfehler	Signifikanz p	p-Wert (Shapiro-Wilk-Test)
Mengenelemente in mg/kg Kot-TS								
Ca	7,58	6,67	7,55	7,38	6,39	0,531	0,401	0,279
P	5,10	4,42	4,87	5,78	5,01	0,479	0,408	0,207
Mg	4,23	4,15	4,38	5,00	4,35	0,224	0,101	0,865
Na	4,21	3,18	2,63	3,21	2,81	0,437	0,140	0,285
K	5,05 ^{ab}	4,37 ^a	5,18 ^{ab}	6,15 ^b	4,58 ^a	0,331	0,011	0,344
S	2,15	1,86	2,11	2,48	2,22	0,177	0,217	0,401
Spurenelemente in mg/kg Kot-TS								
Fe	1229	1079	1149	1239	1024	69,8	0,171	0,698
Cu	19,7	16,5	18,2	19,9	16,2	2,13	0,622	0,324
Zn	107,9	98,4	113,9	109,4	122,9	12,19	0,712	0,552
Mn	202,3	149,9	175,9	188,9	170,1	18,91	0,071	0,896
Se								
Co	0,531	0,438	0,487	0,489	0,423	0,028	0,082	0,572
Cr	1,718	1,760	1,800	1,978	1,685	0,096	0,261	0,971
Mo	1,57	1,41	1,53	1,76	1,45	0,177	0,694	0,875
Si	3787	5400	6126	6283	4240	762,4	0,113	0,631
B	19,1	17,6	18,4	19,5	17,6	0,870	0,426	0,695
As	0,322	0,290	0,317	0,310	0,291	0,018	0,607	0,923
Ni	1,39	1,24	1,27	1,41	1,38	0,091	0,580	0,905
Sn	0,102	0,156	0,115	0,084	0,089	0,018	0,065	0,422
Ba	54,6	49,5	50,3	53,1	55,3	4,48	0,858	0,219
Sr	56,0	44,7	50,7	51,1	47,2	3,49	0,236	0,675
Pb	3,99	2,87	3,62	3,77	2,93	0,341	0,101	0,334
Cd	0,299	0,230	0,305	0,304	0,263	0,028	0,270	0,259
U	0,107	0,108	0,106	0,115	0,105	0,008	0,907	0,366
Tl	0,188	0,190	0,196	0,231	0,232	0,011	0,061	0,222
Al	406	485	474	394	339	39,4	0,087	0,807
Ti	30,1	99,0	27,5	47,5	32,5	19,56	0,090	0,809
Li	1,15	1,22	1,04	1,05	0,92	0,069	0,059	0,543

¹ geschätzte Randmittel

^{ab} Signifikant unterschiedliche Werte (p < 0,05) sind mit hochgestellten Buchstaben markiert.

rechterhaltung des Membranpotenzials beteiligt und deshalb besonders sensibel gegenüber Veränderungen (Pasch 2006). Die renale Ausscheidung wird über das Nebennierenrindenhormon Aldosteron reguliert (Breves et al. 2022), dessen tageszeitlich schwankende Aktivität bereits 1956 beschrieben wurde (Doe et al. 1956), was die Schwankungen der Kaliumkonzentration im Plasma erklären kann (Unshelm und Rappen 1968). Pferdeschweiß enthält im Mittel 1,6 g/l Kalium (Gesellschaft für Ernährungsphysiologie 2014), somit kann ein deutlicher Abfall der Kaliumkonzentration im Plasma nach erhöhter Belastung durch vermehrte Schweißproduk-

tion erklärt werden. Die höchste Kaliumkonzentration im Tagesverlauf konnte um 13 Uhr gemessen werden. Bei Fütterung um 7:30 Uhr sind das fünf Stunden nach der mengenmäßig größten Futteraufnahme am Morgen. Somit kann die tageszeitliche Variation der Futteraufnahme als Erklärung für das gemessene Maximum der Kaliumkonzentration um 13 Uhr dienen.

Greppi et al. (1996) geben für Phosphat im Blut den höchsten Wert fünf Stunden nach der Futteraufnahme an. Die Messwerte von Phosphor unterscheiden sich bei diesem Versuch zwar nicht signifikant voneinander, dennoch ist der höchste Mittelwert auch um 13 Uhr (Tab. 3).

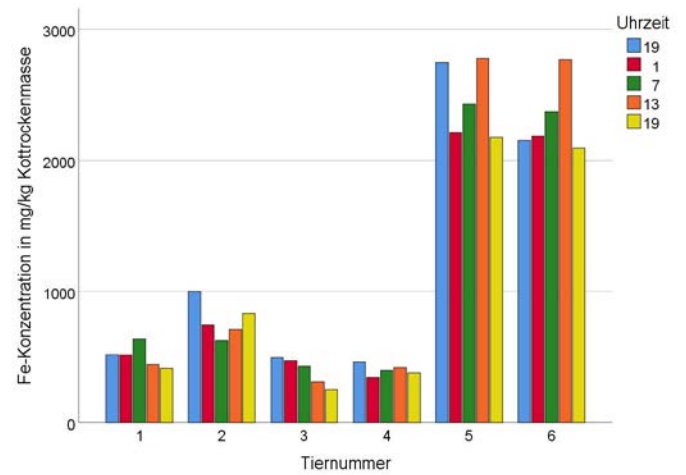
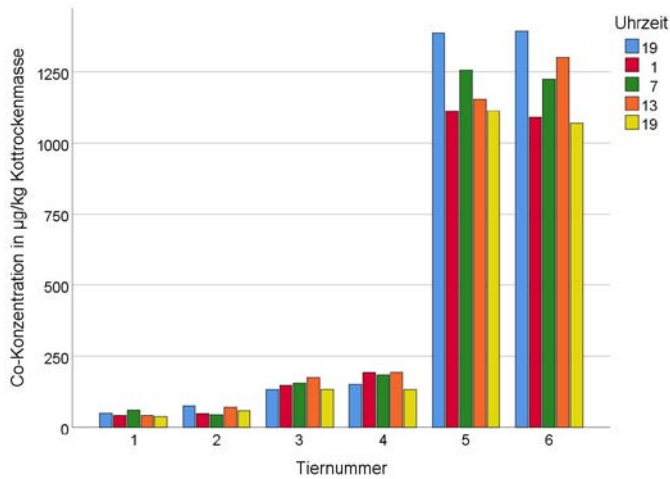


ABBILDUNG 1: Messwerte von Cobalt dargestellt als gruppierte Balkendiagramme, Pferd 1 und 2 aus Fütterungsgruppe 1 ohne Mineralstoffergänzung, 3 und 4 aus Gruppe 2 mit definierter Aufnahme, 5 und 6 Mineralleckmassen zur freien Verfügung. Die verschiedenen Farben zeigen die einzelnen Zeitpunkte der Probenentnahme um 19, 1, 7, 13 und 19 Uhr. © Lydia Staufenbiel

ABBILDUNG 2: Messwerte von Eisen dargestellt als gruppierte Balkendiagramme, Pferd 1 und 2 aus Fütterungsgruppe 1 ohne Mineralstoffergänzung, 3 und 4 aus Gruppe 2 mit definierter Aufnahme, 5 und 6 Mineralleckmassen zur freien Verfügung. Die verschiedenen Farben zeigen die einzelnen Zeitpunkte der Probenentnahme um 19, 1, 7, 13 und 19 Uhr. © Lydia Staufenbiel

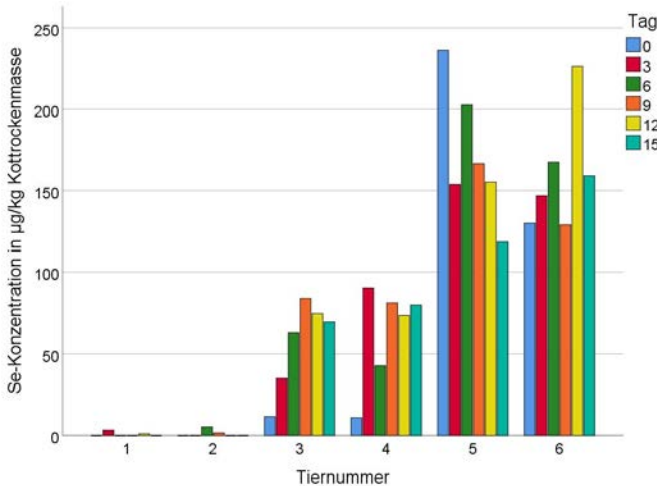


ABBILDUNG 3: Selengehalt in den Kotproben der 6 Probanden in µg/kg Kot-TM im 15 Tageverlauf, Pferd 1 und 2 ohne Substitution, 3 und 4 definierte Aufnahme, 5 und 6 freie Aufnahme. © Lydia Staufenbiel

Die Mittelwerte von Kupfer unterscheiden sich mit $p = 0,622$ im Tagesverlauf nicht signifikant und numerisch nur gering voneinander. Kupfer wird zu 24–48 % resorbiert und die wahre Verdaulichkeit vom National Research Council et al. (2007) mit 40 % angegeben. Die Resorption erfolgt vorwiegend im Dünndarm. Die Homöostase wird über die fäkale Ausscheidung des nicht gebrauchten Kupfers aufrechterhalten (Gesellschaft für Ernährungsphysiologie 2014). Die Speicherung überschüssigen Kupfers erfolgt in der Leber, was bei Wiederkäuern, insbesondere beim Schaf zu Vergiftungserscheinungen führen kann (Dobenecker und Kamphues 2014). Weber et al. (2021) konnten in einem Milchrinderbetrieb Vergiftungserscheinungen aufdecken, der Kupferüberschuss konnte nur nach Beprobung der TMR und Kotproben festgestellt werden. Alle weiteren Probenmedien (Serum, Plasma, Vollblut, Harn und

Deckhaar) ergaben Kupferkonzentrationen in der Norm und auch konnte keine erhöhten Ceruloplasmingehalte gemessen werden. In einem Versuch mit Miniaturpferden, denen eine unterschiedliche Menge Zink gefüttert wurde, konnte die oft publizierte negative Interaktionen erhöhter Zinkgaben auf die Kupferresorption nicht nachgewiesen werden, diese tritt erst bei extrem hohen Überschüssen auf (Hoyt et al. 1995). In diesem Versuch stieg die fäkale Zinkexkretion mit steigenden Gehalten im Futter, was die Arbeitshypothese der Autoren unterstützt, dass Kotproben eine gute Alternative zur Futteranalyse für die Beurteilung der Versorgungslage mit Mineralstoffen wären.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Kotkonzentrationen der Mengen- und Spurenelemente an verschiedenen Tageszeitpunkten Unterschiede aufweisen, diese jedoch so gering sind, dass sie für die praktische Anwendung von untergeordneter Rolle sein dürften (Abb. 1 und 2).

Bezug nehmend auf die Mittelwerte der 15-Tage-Verlaufsstudie unterscheiden sich diese größtenteils nicht signifikant voneinander, mit Ausnahme von Kalium. K und Si verhalten sich gegenläufig. Während der Kaliumgehalt mit abnehmender Heu- bzw. Grünfütterqualität aufgrund geringerer Düngung sinkt, könnte der Siliciumgehalt aufgrund vermehrter Sandbeimengungen im Heu oder bei der Grünfütteraufnahme steigen (Coenen und Vervuert 2019). Die Ergebnisse aus Tabelle 4 decken sich insofern gut mit der Feststellung, dass die Fütterung einen signifikanten Einfluss auf die Messwerte in den Kotproben hat (Staufenbiel et al. 2021a, b), da die Futtermittel innerhalb dieses Zeitraumes gleichbleibend war. Die einzelnen Fütterungsgruppen lassen sich anhand der Kotkonzentration unterscheiden und die Ausscheidung bleibt bei gleicher Fütterung relativ konstant (Tab. 4). Inwiefern eine wechselnde Ration den Gehalt von Mengen- und Spurenelementen beeinflusst und in welchem zeitlichen Zusammenhang die Änderung von Aufnahme und Ausscheidung stehen, muss mithilfe eines gesonderten Fütterungsversuchs geklärt

TABELLE 4: Einfluss der Probenentnahmezeit im Verlauf von 15 Tagen auf die Elementkonzentrationen in Kotproben (n = 30)

	Mittelwert ¹ Tag 0	Mittelwert ¹ Tag 3	Mittelwert ¹ Tag 6	Mittelwert ¹ Tag 9	Mittelwert ¹ Tag 12	Mittelwert ¹ Tag 15	Standard- fehler	Signifikanz p	p-Wert (Shapiro-Wilk-Test)
Mengenelemente in g/kg Kot-TS									
Ca	6,91	6,00	7,20	7,33	5,77	5,44	0,671	0,245	0,289
P	5,16 ^{ab}	4,48 ^a	6,29 ^b	5,54 ^{ab}	5,50 ^{ab}	6,30 ^b	0,396	0,027	0,207
Mg	3,94	3,73	4,51	4,22	4,19	3,57	0,409	0,608	0,888
Na	2,89	2,93	2,94	3,44	3,27	1,73	0,513	0,271	0,984
K	4,19 ^a	4,35 ^a	4,84 ^a	5,36 ^{ab}	5,78 ^{ab}	7,13 ^b	0,471	0,002	0,963
S	2,21	2,11	2,21	2,62	2,46	2,38	0,180	0,367	0,891
Spurenelemente in mg/kg Kot-TS									
Fe	1305	994	1189	1279	1093	1040	148,3	0,597	0,906
Cu	13,5	12,3	17,3	16,9	15,3	15,1	1,61	0,244	0,944
Zn	100,8	88,9	101,6	97	112,7	99,7	11,74	0,820	0,160
Mn	166,9	132,7	163,4	180,4	179,5	238,2	26,51	0,169	0,238
Se	64,7	71,5	80,1	83,4	88,5	71,2	12,54	0,771	0,214
Co	0,343	0,295	0,364	0,339	0,398	0,376	0,055	0,836	0,123
Cr	1,708	1,609	1,898	1,560	1,416	1,217	0,238	0,451	0,264
Mo	2,16	1,38	1,97	1,87	1,97	2,76	0,351	0,185	0,027
Si	7502 ^c	7354 ^c	7537 ^c	4807 ^{ab}	4349 ^{ab}	1765 ^a	835,1	0,000	0,842
B	16,5	14,3	16,0	16,8	15,8	12,5	2,018	0,659	0,790
As	0,366	0,281	0,345	0,375	0,330	0,371	0,041	0,574	0,482
Ni	0,96	1,07	1,10	1,08	1,30	1,25	0,157	0,668	0,071
Sn	0,099	0,071	0,075	0,076	0,082	0,069	0,011	0,420	0,901
Ba	52,4	39,5	57,0	57,7	54,4	40,1	5,40	0,072	0,681
Sr	42,9	34,8	50,8	56,1	47,3	43,9	5,04	0,098	0,165
Pb	2,43	1,92	2,18	2,28	2,78	2,80	0,299	0,283	0,799
Cd	0,229	0,247	0,281	0,310	0,323	0,201	0,035	0,141	0,794
U	0,083	0,074	0,075	0,066	0,062	0,051	0,010	0,307	0,374
Tl	0,284	0,143	0,175	0,243	0,285	0,132	0,047	0,086	0,793
Al	528	436	419	415	405	347	54,87	0,358	0,051
Ti	58,7	46,0	48,6	32,0	26,2	20,2	10,82	0,092	0,748
Li	1,04 ^b	1,02 ^{ab}	1,06 ^b	1,10 ^b	0,93 ^{ab}	0,65 ^a	0,087	0,013	0,46

¹ geschätzte Randmittel

^{a,b,c} Signifikant unterschiedliche Werte (p < 0,05) sind mit hochgestellten Buchstaben markiert.

werden. Bemerkenswert ist, dass selbst die Selenkonzentration entgegen der Annahme, als einziges Element keine Rückschlüsse über die Versorgungslage anhand von Kotproben zu geben (Staufenbiel et al. 2021b), sich innerhalb der 15 Tage eindeutig den Fütterungsgruppen zuordnen lässt (Abb. 3). Langner et al. (2020) beschreiben, dass es bei freiem Zugang zu mit Selen angereicherten Mineralleckmassen zu Serumkonzentrationen über den Referenzwerten (Wolff et al. 2017) kommen kann. In der vorliegenden Publikation kann darüber keine Aussage getroffen werden, weil die Kotkonzentrationen nicht mit Serumproben verglichen wurden.

Neben dem kurzzeitigen Verlauf über 15 Tage sollte für eine präzise Empfehlung zum Probenahmezeitpunkt auch eine monatsvergleichende Studie erfolgen, welche weitere Parameter wie Sonnenstunden pro Tag einbezieht (Gemeiner et al. 1978).

Für Selen konnten variable Serumkonzentrationen bei gleichbleibender Fütterung (Vervuert et al. 2000) nachgewiesen werden. Bei Eisen sind auch tageszeitliche Schwankungen beschrieben (Meyer und Lemmer 1973). Daraus folgt, dass die Erkenntnisse der vorliegenden

Publikation wichtig für eine später mögliche Nutzung von Kotproben zur Bestimmung der Mineralstoffversorgung von Pferden sind.

Die über eine unterschiedliche Mineralstoffversorgung der Pferde provozierte Erweiterung der Variation der Kotkonzentrationen an Mengen- und Spurenelementen ist mit der Ausprägung signifikanter Unterschiede zwischen den Probanden für die Mehrzahl der analysierten Elemente verbunden (Tab. 4). Die tierindividuelle Variation ist stärker als die untersuchten Zeiteffekte ausgeprägt (Abb. 1 und 2, Tab. 3). Der Zeitpunkt der Kotprobenentnahme innerhalb von 24 Stunden hat keinen signifikanten Einfluss auf die Kotkonzentrationen für die Mehrzahl der untersuchten Mengen- und Spurenelemente (Tab. 3). Die überwiegend fehlende signifikante Dynamik der Mineralstoffkonzentrationen in Kotproben über einen Zeitraum von 15 Tagen bei gleicher Fütterung der Probanden spricht für eine gute Reproduzierbarkeit der Messergebnisse (Tab. 4). Die Ergebnisse fordern dazu auf, in einem exakten Fütterungsversuch die quantitativen Beziehungen zwischen den über die Nahrung aufgenommenen und mit dem Kot ausgeschiedenen Mengen an interessierenden Elementen sowie deren zeitliche Dynamik zu untersuchen.

Danksagung

Die Autoren danken für die Unterstützung durch den Publikationsfonds der Freien Universität Berlin.

Ethische Anerkennung

Die Autoren versichern, während des Entstehens der vorliegenden Arbeit die allgemeingültigen Regeln guter wissenschaftlicher Praxis befolgt zu haben.

Interessenkonflikt

Die Autoren versichern, dass keine geschützten, beruflichen oder anderweitigen persönlichen Interessen an einem Produkt oder einer Firma bestehen, welche die in dieser Veröffentlichung genannten Inhalte oder Meinungen beeinflussen können.

Finanzierung

Diese Arbeit wurde unterstützt durch den Publikationsfonds der Freien Universität Berlin. Die Autoren versichern, dass sie Daten hierzu auf begründete Nachfrage hin bereitstellen.

Autorenbeitrag

Konzeption der Arbeit: LS, A-EM, HG.
Datenerhebung, -analyse und -interpretation: LS, A-EM.
Manuskriptentwurf: LS.
Kritische Revision des Artikels: A-EM, HG.
Endgültige Zustimmung der für die Veröffentlichung vorgesehenen Version: LS, A-EM, HG.

Literatur

- Breves G, Diener M, Gäbel G (Hrsg.) (2022):** Physiologie der Haustiere. Thieme, Stuttgart.
- Bühl A (2016):** SPSS 23. Einführung in die moderne Datenanalyse. 15. akt. Aufl. Pearson, Hallbergmoos.
- Burger AM (2011):** Literatur-Studie zur faktoriellen Ableitung des Mengenelement-Bedarfs für Erhaltung beim Pferd. Ludwig-Maximilians-Universität, München, Diss.
- Coenen M, Vervuert I (2019):** Pferdefütterung. 6. akt. Aufl. Thieme, Stuttgart.
- Dobenecker B, Kamphues J (Hrsg.) (2014):** Supplemente zur Tierernährung. Für Studium und Praxis. Schaper, Hannover.
- Doe RP, Flink EB, Goodsell MG (1956):** Relationship of diurnal variation in 17-hydroxycorticosteroid levels in blood and urine to eosinophils and electrolyte excretion. *J Clin Endocrinol Metab* 16: 196–206. DOI 10.1210/jcem-16-2-196.
- Fürll M (Hrsg.) (2021):** Tradition und Zukunft der Veterinärmedizin. 45. Internationale Leipziger Laborfortbildung, Leipzig, 8. und 9. Oktober 2021. Universität Leipzig Veterinärmedizinische Fakultät, Leipzig.
- Gemeiner M, Schnabl H, Stöckl W, Knezevic P, Kläring W (1978):** Untersuchungen zum Mineralstoffwechsel des Pferdes. *Zentralbl Veterinärmed Reihe A* 25: 562–569. DOI 10.1111/j.1439-0442.1978.tb00957.x.
- Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (2014):** Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung von Pferden. Vollst. überarb. Neuausg. DLG, Frankfurt/Main.
- Greppi GF, Casini L, Gatta D, Orlandi M, Pasquini M (1996):** Daily fluctuations of haematology and blood biochemistry in horses fed varying levels of protein. *Equine Vet J* 28: 350–353. DOI 10.1111/j.2042-3306.1996.tb03104.x.
- Grimwood K, Penaluna LA, Brown H (2016):** A Preliminary Investigation Into the Mineral Intake of Horses in the UK. *J Equine Vet Sci* 36: 44–48. DOI 10.1016/j.jevs.2015.09.012.
- Herold A, Pieper L, Müller A-E, Staufenbiel R (2018):** Konzentrationen an Mengenelementen beim Rind in verschiedenen Probenmedien unter besonderer Berücksichtigung von Kotproben. *Tierärztl Prax Ausg G Großtiere Nutztiere* 46: 221–228. DOI 10.15653/TPG-180239.
- Herold A, Müller AE, Staufenbiel R, Pieper L (2020):** Konzentration von Spurenelementen beim Rind in verschiedenen Probenmedien unter besonderer Berücksichtigung von Kotproben. *Tierärztl Prax Ausg G Großtiere Nutztiere* 48: 5–14. DOI 10.1055/a-1067-3585.
- Hoyt JK, Potter GD, Greene LW, Anderson JG (1995):** Copper balance in Miniature Horses fed varying amounts of zinc. *J Equine Vet Sci* 15: 357–359. DOI 10.1016/s0737-0806(07)80547-8.
- Jeroch H, Drochner W, Rodehutsord M, Simon O (2020):** Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere. Ernährungsphysiologie, Futtermittelkunde, Fütterung. 3. vollst. überarb. u. erw. Aufl. utb GmbH, Stuttgart.
- Kalashnikov V, Zaitsev A, Atroschenko M, Miroshnikov S, Frolov A, Zavyalov O (2019):** The total content of toxic elements in horsehair given the level of essential elements. *Environ Sci Pollut Res* 26: 24620–24629. DOI 10.1007/s11356-019-05630-z.
- Košla T (1988):** Mengen- und Spurenelementstatus, -bedarf und -versorgung des Pferdes, Habilitation. Karl-Marx-Universität Leipzig

- Langner K, Hörügel U, Donat K, Vervuert I (2020):** Selenstatus in Thüringer Pferdehaltungen in Abhängigkeit des Einsatzes selenhaltiger Mineral- und Ergänzungsfuttermittel. *Tierarztl Prax Ausg G* 48: 398–405. DOI 10.1055/a-1274-9045.
- Lepage OM, DesCôteaux L, Marcoux M, Tremblay A (1991):** Circadian rhythms of osteocalcin in equine serum. Correlation with alkaline phosphatase, calcium, phosphate and total protein levels. *Can J Vet Res* 55: 5–10.
- Meyer H, Lemmer U (1973):** Übersichtsreferat: Mineralstoff- und Spurenelementgehalt im Serum bzw. Plasma des Pferdes. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 80: 190.
- Moritz A (2014):** Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. Schattauer, Stuttgart.
- National Research Council, Division on Earth and Life Studies, Board on Agriculture and Natural Resources, Committee on Nutrient Requirements of Horses (2007):** Nutrient requirements of horses. 6th rev. ed. The National Academies Press, Washington.
- Pasch A (2006):** Die Regulation des Kaliumhaushalts. *Swiss Med Forum* 6. DOI 10.4414/smfm.2006.05867.
- Ralston SL, van den Broek G, Baile CA (1979):** Feed intake patterns and associated blood glucose, free fatty acid and insulin changes in ponies. *J Anim Sci* 49: 838–845. DOI 10.2527/jas1979.493838x.
- Ratjen A, Anke M, Fürll M (2017):** Selenium, copper and zinc contents in brown, black and white mane, coat and tail hairs in horses of two locations. *PHK* 33: 59–65. DOI 10.21836/PEM20170108.
- Rehner G, Daniel H (Hrsg.) (2010):** Das Blut – Transportsystem und Vermittler der Homöostase. In: *Biochemie der Ernährung*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 363–407.
- Schubert DC, Neustädter LT, Coenen M, Visscher C, Kamphues J (2021):** Investigations on the Effects of Different Calcium Supply Exceeding the Requirements on Mineral Serum Concentrations and Bone Metabolism in Young Warmblood Stallions. *Animals* 11: 2439. DOI 10.3390/ani11082439.
- Stampfli G, Anetrzhofer J, Stirnimann J (1980):** Einfluss der Tageszeit auf hämatologische und klinisch-chemische Parameter bei der Milchkuh. *Schweiz Arch Tierheilkd* 122: 363–374.
- Staufenbiel L, Müller A-E, Gehlen H (2021a):** Investigation of the Variation of Concentration of Quantity and Trace Elements in Equine Faecal Samples Considering Storage. *EC Veterinary Science*: 32–43.
- Staufenbiel L, Müller AE, Gehlen H (2021b):** Methodische Untersuchung zu Mengen- und Spurenelementkonzentrationen in Pferdekotproben unter besonderer Berücksichtigung des Probenentnahmeortes. *Tierarztl Prax Ausg G Großtiere Nutztiere* 49: 178–188. DOI 10.1055/a-1482-7379.
- Thurmann JP (2012):** Tagesschwankungen von Laborparametern beim Milchrind. Freie Universität, Berlin, Diss., 2013; Mensch und Buch Verl., Berlin.
- Unshelm J, Rappen WH (1968):** Individuelle, tages- und tageszeitabhängige Schwankungen von Blutbestandteilen beim Rind. *Zentralbl Vet Reihe A* 15: 418–437. DOI 10.1111/j.1439-0442.1968.tb00443.x.
- Vervuert I, Coenen M, Holtershinken M, Venner M, Rust P (2000):** Assessment of selenium status in horses – new aspects. *Tierarztl Prax Ausg G Großtiere Nutztiere* 28: 172–177.
- Weber J, Roder A, Müller AE, Pieper R, Staufenbiel R (2021):** Chronische Kupferübersorgung als mögliches Bestandsproblem in einer deutschen Milchviehherde. *Tierarztl Prax Ausg G Großtiere Nutztiere* 49: 203–209. DOI 10.1055/a-1418-3562.
- Wolff F, Müller AE, Moschos A, Köller G, Bauer A, Vervuert I (2017):** Selenkonzentration im Serum und Glutathionperoxidaseaktivität im Vollblut bei gesunden adulten Pferden. *Tierarztl Prax Ausg G Großtiere Nutztiere* 45: 362–369. DOI 10.15653/TPG-170301.

Korrespondenzadresse

Lydia Staufenbiel
 Kronskamper Str. 3
 19306 Neustadt-Glewe
 lydiastaufenbiel@freenet.de

III. Zusammenfassende Diskussion

Die Erdkruste besteht zu 99,5% aus zehn chemischen Elementen: O, Si, Al, Fe, Ca, Mg, Na, K, Ti und H (Kues und von Köckritz-Blickwede 2021). Im Gewebe der Lebewesen hingegen kommen in oft niedrigen und variablen Konzentrationen 20-30 Elemente vor (Suttle 2022). Neben Wasser und den organischen Verbindungen aus O, H, C und N verbleibt noch die Rohasche, die hauptsächlich aus den Mengen- und Spurenelementen besteht (Kamphues et al. 2014). Ihren Namen entsprechend ist die Konzentration der Mengenelemente in der Körpermasse hoch (über 100 mg/kg KM) und die der Spurenelemente niedriger (unter 100 mg/kg KM) (McDowell 2003). Die Zuordnung der sieben Mengenelemente (Ca, P, Mg, Na, K, Cl, S) trifft für alle Säugetierarten zu und lässt sich als solche auch den gängigen Versorgungsempfehlungen für Pferde entnehmen (Gesellschaft für Ernährungsphysiologie 2014; National research council 2007).

Die in der Körpersubstanz vorhandenen Spurenelemente können an Hand ihrer physiologischen Bedeutung eingeteilt werden. Diese Zuordnung ist insofern nicht immer eindeutig, da einige von ihnen potentiell toxisch sind, aber dennoch eine wichtige Funktion für die Aufrechterhaltung der Körperfunktionen haben. Der Begriff essentielles Spurenelement ist in diesem Sinne gleichzusetzen mit lebensnotwendig, bestimmte Vorgänge (z.B. Wachstum) können bei vollständiger Abwesenheit dieses Elements nicht physiologisch von statten gehen, auch wenn die restliche Versorgung und Lebensumstände optimal sind (McDowell 2003). Demnach gibt es drei Kriterien, die auf ein essentielles Spurenelement zutreffen müssen: bei Abwesenheit wird die Gesunderhaltung unterdrückt; bei Wiederzufuhr kleiner Mengen wird die Unterdrückung aufgehoben und die Retention unterliegt einer homöostatischen Regulation. Dieser Definition kann bereits entnommen werden, dass die Zuteilung zur Gruppe der essentiellen Spurenelemente mit neuen wissenschaftlichen Erkenntnissen einem ständigen Wandel unterliegt (Suttle 2022) und für einige Spezies die Essentialität z.B. im Tierversuch nachgewiesen wurde, während sie für andere nur auf Grund von Beobachtungen vermutet werden kann (Davies 2021).

Für die neun klassischen essentiellen Spurenelemente (Co, Cr, Cu, Fe, I, Mo, Mn, Se und Zn) sind eindeutige physiologische Wirkungen mit einem starken Nutzen für die verschiedenen Tierarten nachgewiesen. Die physiologische Wirkstärke der neuen essentiellen Spurenelemente (Al, As, B, Br, F, Ge, Li, Ni, Pb, Rb, Si, Sn und V) ist dagegen gering und der Nachweis überwiegend in experimentellen Studien an Versuchstieren oder bei einzelnen Nutztierarten gelungen (McDowell 2003). Die akzidentellen Spurenelemente werden dagegen nur passiv mit dem Futter aufgenommen und auch resorbiert, aber es ist bisher noch keine biologische Funktion sicher nachgewiesen worden (Seeling 1995). Die Einbeziehung dieser Elemente in Studien ist insofern sinnvoll, dass diese potentiell noch essentiell werden können,

III. Zusammenfassende Diskussion

sie analytisch mit erfasst werden, ein toxisches Potential besitzen und Zusatzinformationen z.B. über die territoriale Herkunft des Futters geben können. Die Konzentration eines Teils der akzidentellen Spurenelemente fällt ohnehin mit bei der ICP-Messung an, weshalb deren Werteentwicklung beobachtet werden kann. Auch der Begriff „Ultraspurenelement“ ist in der deutschen Literatur zu finden und bezieht sich auf Elemente, die in sehr geringer Konzentration von unter 1 mg/kg KM vorkommen (Suttle 2022). Für Pferde werden in „Clinical Signs in Humans and Animals Associated with Minerals, Trace Elements, and Rare Earth Elements“ (Davies 2021) neben den Mengenelementen Ca, Cl, K, Mg, Na, P und S folgende Spurenelemente als essentiell aufgeführt: As, B, Co, Cr, Cu, F, Fe, I, Mn, Mo, Ni, Se und Zn. Im Folgenden soll kurz auf die Elemente eingegangen werden, für die beim Pferd Symptome bei einem Mangel oder aber auch Überschuss bekannt sind.

Beginnend mit den Mengenelementen kann ein Calciummangel bei Fohlen zu Rachitis und bei Adulten zu Osteomalazie und Lahmheiten führen, was sekundär auch durch ein enges Ca:P-Verhältnis hervorgerufen werden kann (Coenen und Vervuert 2019). Ein Magnesiummangel führt allgemein zu klinischen Symptomen wie verzögertem Wachstum, Tetanus (vor allem Weidetetanie bei Wiederkäuern) einhergehend mit Muskelkrämpfen und mangelnder Koordination sowie peripherer Vasodilatation. Pferde hingegen sind selten von der Weidetetanie betroffen, ein Mangel äußert sich bei dieser Spezies insbesondere durch steigende Nervosität, Muskelzittern und Ataxie, die in einem Kollaps mit forcierter, schwerfälliger Atmung, Schwitzen und Rudern der Gliedmaßen beim niedergegangenen Pferd und im schlimmsten Fall auch dem Tod enden kann (McDowell 2003). Außerdem sind eine vermehrte Mineralisation der Aorta, des Weichteilgewebes und daraus folgender Degeneration post mortem beschrieben (National research council 2007). Die Phosphorversorgung ist beim Pferd meistens ausreichend, was nicht zuletzt an der Möglichkeit liegt, Phytinphosphor ähnlich gut wie anorganischen zu verwerten (Coenen und Vervuert 2019). Dennoch kann bei einem Mangel Rachitis beim Fohlen, Lahmheit, Osteomalazie, Osteofibrose, fibröse Osteodystrophie mit einhergehender Kiefervergrößerung („Big Head“) bei Adulten auftreten (Davies 2021). Wie bereits beim Calcium angesprochen, kann eine Überversorgung mit Phosphor zu einer verminderten Kalzifizierung der Knochen und einem sekundären Hyperparathyreoidismus führen. Kaliummangelsituationen wurden lange Zeit nicht untersucht, da mit herkömmlichen Rationen der Bedarf gedeckt wird. Dennoch kann ein Kaliummangel besonders bei Jungpferden zu einem reduzierten Appetit und vermindertem Wachstum führen (McDowell 2003). Während für Chlorid keine Mangelzustände beschrieben sind, kann ein Natriummangel zu Anorexie durch unkoordiniertes Kauen und verminderter Futteraufnahme führen. Pferde mit einem Mangel fallen häufig durch Belecken oder Aufnahme von Sand und Steinen oder anderen salzigen Oberflächen auf, nehmen vermindert Wasser

III. Zusammenfassende Diskussion

auf, woraus ein herabgesetzter Hautturgor resultiert. Außerdem kann ein Natriummangel zu verändertem Gangbild mit Muskelspasmen und allgemeiner Lethargie führen (Davies 2021). Als letztes Mengenelement soll Schwefel genannt sein, für das bei Monogastriern keine direkten Mangelsituationen auftreten (McDowell 2003). Eine Intoxikation kann beim Pferd zu Krämpfen, Zyanose, Ikterus, forcierter Atmung bis hin zu Atemnot und Tod des Tieres führen (Davies 2021).

Nach den Mengen- folgen die essentiellen Spurenelemente. Kupfermangel wird mit einer Prädisposition für die Entstehung von OCDs in Verbindung gebracht, wobei dies schon kritisch hinterfragt wurde (Granel 2002). Ein Jodmangel führt laut *Davies* beim Pferd zur Entstehung eines Strumas sowie zu Fertilitätsstörungen und Totgeburten. Auch die toxische Wirkung von Jod äußert sich durch Entstehung eines Strumas beim Fohlen sowie Skelettveränderungen (Coenen und Vervuert 2019). Das nächste essentielle, aber zugleich toxische Spurenelement ist Eisen. Ein Mangel führt bekanntermaßen zu Anämie und daraus folgend zu Blässe, aber auch Atemnot, Pneumonie, Wachstumsverzögerung, Diarrhö, Lethargie, Schwäche und verändertes Haarkleid sind beschrieben (McDowell 2003). Die meisten Symptome, die durch die Toxizität hervorgerufen werden, sind beim Fohlen beschrieben. Dazu zählen z.B. Dehydratation unter anderem auf Grund von Diarrhö durch Erosion der Dünndarmzotten, Ikterus nach Akkumulation des Eisens in der Leber und einer daraus folgenden Degeneration. Schlussendlich kann im schlimmsten Fall die toxische Eisenwirkung zu Koma und Tod bei Fohlen führen. Abzugrenzen davon sind noch einmal die akuten Symptome einer Eisenvergiftung, die mit Anorexie, Koagulopathie, Depression, Ikterus und neurologischen Erscheinungssymptomen beim Adulten beschrieben sind. Bei einer chronischen Eisenvergiftung ist hauptsächlich die Leber betroffen, in Form einer asymptomatisch auftretenden Hämosiderose oder einer zu Leberversagen führenden Hämochromatose (Davies 2021). Beim Mangan handelt es sich um ein essentielles Spurenelement, für welches lange Zeit kaum Berichte über einen ausgeprägten Mangel in der Literatur vorhanden waren (Gesellschaft für Ernährungsphysiologie 2014). 2021 wurde nach Wissen der Autorin die erste groß angelegte aktuelle Studie über die Möglichkeit der Überprüfung der oralen Mangansupplementierung durch Blutprobenanalysen veröffentlicht (Theiner et al. 2021). Eine unzureichende Versorgung führt laut *Suttle* zu Störungen beim Aufbau von Bindegewebe und Knochenbildung (Suttle 2010). Für Molybdän sind in der gängigen Literatur keine Versorgungsempfehlungen beschrieben, eine toxische Wirkung kann sich beim Fohlen durch Rachitis äußern (Davies 2021). Das essentielle Spurenelement mit der geringsten therapeutischen Breite und einer daraus resultierenden vielfachen Untersuchung des Versorgungsstatus ist Selen (Vervuert und Stoebe 2013). Als wichtiger Bestandteil in verschiedenen Enzymen, deren Funktion vor allem im Redoxstoffwechsel liegt, wird ein

III. Zusammenfassende Diskussion

Selenmangel häufig in Verbindung mit Myopathien ermittelt (Gesellschaft für Ernährungsphysiologie 2014). Die Weißmuskelkrankheit geht besonders bei neugeborenen Fohlen mit degenerativen Herzmuskel- und Skelettveränderungen einher, die sich durch Schmerzhaftigkeit, steifen Gang, Lethargie und Saugschwierigkeiten äußern. Außerdem schwächt eine ungenügende Selenversorgung das Immunsystem und lässt nur unzureichende Reaktionen auf Impfungen zu (Coenen und Vervuert 2019). Selenintoxikationen äußern sich akut durch Kolik, Diarrhö, Blindheit mit Kopfpresen, Lahmheit bis Ausschuten, Lethargie, Tachykardie und Tachypnoe. Chronische Verlaufsformen sind besonders durch Verlust des Langhaars sowie aufgetriebene Kronsäume zu erkennen (Davies 2021). Ein Zinkmangel hat Einfluss auf ein verzögertes Wachstum sowie Hautveränderungen in Form von Akanthose, Hyperkeratose bzw. Parakeratose und Alopezie (McDowell 2003). Für Fluor als äußerst toxisches Element werden Symptome mit veränderter Knochenoberfläche, Zahnabszessen und daraus resultierender Kieferschwellung, Zahnveränderungen, Hypersalivation und verminderter Futteraufnahme sowie teilweise auftretender Lahmheit bei einem Überangebot beschrieben (Davies 2021). Dieses Beispiel bringt uns auf die Aussage vom Anfang der Diskussion zurück, dass die Zuteilung eines Spurenelements zu „essentiell“ einem ständigen Wandel unterliegt und viele „Ultraspurenelemente“ zwar eine Funktion für das Leben eines Organismus erfüllen, ihr Bedarf jedoch so gering ist, dass keine Mangelsituationen auftreten und sie aus diesem Grund noch keine weitere Aufmerksamkeit der Wissenschaft erlangt haben.

Diese kurze Übersicht in die verfügbare Literatur unterstreicht die Notwendigkeit der Überwachung der Bedarfsdeckung von Mengen- und Spurenelementen, mit deren Mangel aber auch Überschuss klinische Symptome auftreten können. Im Sinne der Prävention ist jedem Tierbesitzer, aber auch dem betreuenden Tierarzt daran gelegen, Abweichungen in der Ration vor dem Auftreten von Leistungsdepression oder gar einer Erkrankung zu erkennen. Üblicherweise werden dafür mit dem Futter aufgenommene Mengen ermittelt und mit Bedarfsempfehlungen abgeglichen, wonach die Ration angepasst werden kann. Dies erfordert jedoch eine Futtermittelanalyse der Grundfuttermittel, die in der Regel von den Stallbetreibern in Auftrag gegeben wird. Bei Mehrzahl der in Pensionsställen gehaltenen Pferden ist dadurch für den Pferdebesitzer eine exakte Rationsanalyse nur schwer umsetzbar. Zusätzlich ist eine Futtermittelanalyse, bei der neben den herkömmlichen analytischen Befunden wie z.B. Trockensubstanz, Rohasche, -protein und -fett auch interessierende Mineralstoffe untersucht werden, kostenintensiv. Einen Ausweg dafür können zusammengefasste Analysedaten mit Mittelwerten der letzten Jahre geben, wie z.B. von der LUFA Nordwest veröffentlicht (LUFA Nordwest 2022). Mit Hilfe dieser frei zugänglichen Daten kann der Mineralstoffgehalt der Ration geschätzt werden, unklar bleibt dennoch die Information über die tatsächliche

III. Zusammenfassende Diskussion

Aufnahme. Zusätzlich müssen bei einigen Elementen wie z.B. Zink nicht nur die aufgenommene Menge beurteilt werden, sondern auch die dargereichten Verbindungen sowie ggf. antagonistisch wirkende Elemente (Vervuert 2021).

Daraus ergibt sich folgerichtig der Wunsch von Pferdebesitzern, eine Information über den aktuellen Versorgungsstatus ihrer Tiere zu erhalten. Dieser wird mehrheitlich über Blut- bzw. Serumproben beurteilt und so sind z.B. bei IDEXX Na, K, P, Ca, Mg, Cu, Zn, Se und beim Fohlen Fe Parameter des „großen Pferdeprofils“ (IDEXX 2022). Diese haben jedoch bei einer Mehrzahl von Elementen nur eine geringe Aussagekraft (Vervuert 2021). Einen Ausweg kann die Analyse von spurenelementhaltigen Enzymen bzw. ihrer Aktivität geben. Ein Beispiel dafür wäre die Coeruloplasminaktivität als Indikator für die Versorgung mit Cu (Hussein und Staufenbiel 2012), die in einem Fallbericht über eine chronische Überversorgung jedoch auch keine erhöhten Werte aufzeigte (Weber et al. 2021). Für Fe ist bekannt, dass es im Blut an das Transportprotein Transferrin gebunden ist (McDowell 2003), weshalb eine Kombination aus diesem und freiem Fe im Serum sich für die Beurteilung der Fe-Versorgung eignet (Vervuert 2021).

Eine weitere Möglichkeit ist die Beprobung von Indikatororganen, die auf Grund der hohen Invasivität trotz hoher Aussagekraft der Ergebnisse nicht nutzbar ist (Kośła 1988). Diese Aussage trifft selbstverständlich nicht auf die Analyse von Haarproben zu, diese bilden jedoch nur eine chronische Fehlversorgung ab und die Probenaufbereitung und Analytik bringt höhere Kosten und analytische Unsicherheiten mit sich (Mueller et al. 2012).

Die aufgeführten Grenzen der bisher zur Verfügung stehenden Analysetools führen zu der Frage, ob nicht, wie für Rinder bereits publiziert (Staufenbiel, R. et al. 2022; Herold et al. 2018), Pferdekotproben zur Beurteilung der Mineralstoffversorgung genutzt werden könnten. Vor der Einführung eines neuen diagnostischen Verfahrens stellt sich zunächst die Frage der Nutzbarkeit, welche von der Praktikabilität der Probensammlung kombiniert mit einer geringen Invasivität für das Tier und nicht zuletzt Kosten für die Probenlagerung, -verarbeitung und -analyse abhängig ist. Selbstverständlich bringen diese Punkte keinen Zugewinn, wenn keine aussagekräftigen Messergebnisse hervorgebracht werden können. Die vorliegende Arbeit überprüft die Möglichkeit der Nutzung von Kotprobenanalysen zur Beurteilung des Versorgungsstatus von Pferden mit Mengen- und Spurenelementen. Deutlich hervorzuheben ist dabei, dass es sich zunächst um eine wertfreie Datensammlung handelt, mit der neben der Beantwortung verschiedener Fragestellungen zur Probennahme, die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse und der relative Fehler der Methode bewertet werden soll. Das Hauptziel vor der Nutzung von Kotproben zur Überprüfung des Versorgungsstatus von Pferden mit Mineralstoffen ist die Erstellung von Referenzwerten, wie es für Rinder bereits publiziert ist

III. Zusammenfassende Diskussion

(Staufenbiel, R. et al. 2022; Herold et al. 2018). Dies ist jedoch nicht Teil der vorliegenden Arbeit und muss in Zukunft an größeren Probandengruppen erfolgen.

Zur Beantwortung der Fragestellungen wurden insgesamt 150 Kotproben mit Hilfe der optischen Emissions- und Massenspektrometrie nach zertifizierten Standardanweisungen im IDEXX Labor Ludwigsburg analysiert. Diese Methode stellt eine validierte Analytik dar und kam bereits vorher bei Rinderkotproben zur Anwendung (Staufenbiel, R. et al. 2022; Herold et al. 2020; Herold et al. 2018). Analysiert wurden sechs Mengenelemente Ca, K, Mg, Na, P und S sowie 22 Spurenelemente Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, Zn, Al, As, B, Ba, Cd, Cr, Li, Ni, Pb, Si, Sr, Ti, Tl, U und Sn. Neben den essentiellen Spurenelementen wurden auch akzidentelle ergänzt, um das Verfahren bei vielen Elementen anzuwenden und dadurch eine möglichst große Aussagekraft über die Wiederholbarkeit der Messergebnisse und den relativen Fehler der Gesamtmethode zu erhalten. Für die spätere Nutzung der Methode zur Überprüfung der Mineralstoffversorgung von Pferden sind akzidentelle Elemente von untergeordnetem Interesse, bei der Erstellung von Referenzwerten wird sich in einem späteren Versuch auf die Mengen- und essentiellen Spurenelemente konzentriert werden, wie bereits bei Rindern geschehen (Staufenbiel, R. et al. 2022; Herold 2017).

Zuerst widmen wir uns der Frage, welchen Einfluss eine differenzierte Fütterung auf die Konzentration der gemessenen Elemente in den Kotproben hat. Dazu wurden insgesamt zehn Pferde in drei unterschiedliche Fütterungsgruppen eingeteilt und haben keine Mineralstoffergänzung, eine definierte auf die Bedarfsdeckung von Selen ausgerichtete Ergänzung erhalten oder hatten freien Zugang zu mineralischen Leckmassen (Staufenbiel et al. 2021b). Die Ergebnisse zeigen eine eindeutige Zuordnung der Probanden anhand der Mineralstoffkonzentrationen in den Kotproben zu den Fütterungsgruppen. Daraus könnte man schließen, dass die Aufnahme mit dem Futter im direkten Zusammenhang mit der Ausscheidung über den Kot steht. Jedoch sollte dies insofern kritisch gesehen werden, dass für jedes Element einzeln der Exkretionsweg einschließlich der Resorption und dem Metabolismus für das Pferd betrachtet werden muss. Für Mineralstoffe lassen sich nämlich nicht aus der scheinbaren Verdaulichkeit (Differenz zwischen der mit dem Futter aufgenommenen und der mit dem Kot ausgeschiedenen Nährstoffmenge) Rückschlüsse auf die wahre Verdaulichkeit ableiten (Kamphues et al. 2014). Vor allem muss die renale Ausscheidung, aber auch Verluste über die Atemluft und besonders bei der Spezies Pferd, die bekanntermaßen hypertonen Schweiß produziert, Verluste von Elektrolyten über denselben betrachtet werden. In der Tierernährung nutzt man zur Erfassung der wahren Verdaulichkeit Verdaulichkeitsstudien, die in den 1970er Jahren eine Hochphase hatten (Güldenhaupt 1979; Mundt 1978; Argenzio et al. 1974; Wedemeyer 1970). In einer ausführlichen Literaturstudie wurden diese und viele weitere ausgewertet und mit Hilfe der fäkalen und renalen Verlusten

III. Zusammenfassende Diskussion

faktoriell der Mengenelementbedarf von Pferden abgeleitet (Burger 2011). Die Autorin stellte für Phosphor keine signifikanten endogenen renalen Verluste fest, woraus sich die faktorielle Ableitung der Bedarfsnorm für dieses Element aus der fäkalen Exkretion ergibt, im Fall der anderen untersuchten Elemente (Ca, Mg, Na, K, Cl) hatte die renale Ausscheidung einen signifikanten Anteil an den Gesamtverlusten. Dies sollte dementsprechend vor der Ableitung von Referenzwerten zur Beurteilung der Versorgungslage anhand von Kotproben überprüft werden. In der vorliegenden Studie konnte jedoch ein enger Zusammenhang zwischen mit der Ration aufgenommenen und mit dem Kot ausgeschiedenen Mineralstoffen nachgewiesen werden. Daraus folgt die begründete Annahme, dass Kotproben nach weiteren Versuchen unter besonderer Betrachtung der anderen Exkretionswege, ein mögliches neues Probenmedium zur Analyse des Versorgungsstatus von Pferden mit Mineralstoffen werden können.

Nach der wichtigen Feststellung dieser ersten Hauptaussage – Pferdekotproben spiegeln differenziert die Aufnahme wider und eignen sich prinzipiell für die Analyse der Mineralstoffversorgung von Pferden – stellt sich die nächste Frage bezüglich der Probengewinnung. Dazu wurde der gleichen Gruppe, zehn Probanden eingeteilt in drei unterschiedliche Fütterungsgruppen, jeweils drei Kotproben aus unterschiedlichen Lokalisationen entnommen (Staufenbiel et al. 2021b). Als erstes wurden Proben auf Armeslänge aus dem Colon descendens gewonnen. Beim adulten Großpferd kommt ein normalgroßer Untersucher bis auf Höhe des 17. Rippenpaars (Baumgartner und Wittek 2017), bei einer Länge des Rektums von ca. 20-30 cm und Colon descendens von 2-4 m, wird dieses bei der Rektaluntersuchung nicht verlassen (König und Liebich 2015; Budras und Röck 2009). Am Übergang zum Rektum verstreicht die dorsale Taenie desselbigen und die Tunica muscularis ist mit ca. 1,5 mm nur halb so dick wie in der übrigen Mastdarmwand, weshalb auf ca. 20 cm eine Prädispositionsstelle für Rupturen entsteht (Budras und Röck 2009). Dennoch ist das Risiko einer iatrogenen Rektumperforation beim Einhalten unterschiedlicher Vorsichtsmaßnahmen, wie z.B. Fixierung des Pferdes in einem Untersuchungsstand, ausreichende Gleitfähigkeit des Untersucherarms mit Gleitgel, ggf. Anwendung von Spasmolytika oder Sedativa, relativ gering (Brehm et al. 2016). Das führt zu der Legitimation dieser Probenentnahme unter Anwendung der genannten Vorgaben. Die zweite Lokalisation, aus der Kotproben der zehn Probanden gewonnen wurden, war die Ampulla recti, eine retroperitoneal gelegene Erweiterung des Mastdarms vor dem Übergang in den Afterkanal (Salomon et al. 2015). Diese Unterteilung ist insofern sinnvoll gewesen, da eine Resorption von Wasser und Mineralien im Colon kurz vor dem Rektum erfolgt (Hildebrandt et al. 2015). Die Resorptionsleistung des Rektums findet z.B. Anwendung bei der rektalen Verabreichung von Magnesiumpräparaten bei Kälbern (Bacon et al. 1990) oder wird bei der

III. Zusammenfassende Diskussion

Medikamentenapplikation genutzt (Rosé 2012). Die letzte Lokalisation befand sich außerhalb der Pferde in dem eine Probe aus einem frisch abgesetzten Kothaufen gewonnen wurde. In der Studie konnte nachgewiesen werden, dass bei keinem der 28 gemessenen Elemente der Entnahmeort einen signifikanten Einfluss auf die Konzentration der Mineralstoffe in den 30 Kotproben hatte. Diese Erkenntnis ist von zentraler Bedeutung für eine später mögliche Nutzung von Kotproben zur Beurteilung der Mineralstoffversorgung von Pferden, da selbstverständlich trotz des geringen Risikos einer iatrogenen Verletzung der am wenigsten invasiven Möglichkeit der Probengewinnung aus einem abgesetzten Haufen der Vorzug zu geben ist.

Die nächste Fragestellung bezieht sich auf die Feststellung, dass die Proben aus einem abgesetzten Haufen gewonnen werden können. Muss man bei der Entnahme Besonderheiten bezüglich Lokalisation innerhalb des Haufens beachten und wie lang darf dieser vorher im Freien liegen? Dazu wurde ein Haufen einer mit Mineralstoffen adäquat nach Versorgungsempfehlung der GfE (Gesellschaft für Ernährungsphysiologie 2014) versorgten 15-jährigen Deutschen Sportpferdestute an drei Tagen an insgesamt zwölf unterschiedlichen Lokalisationen beprobt (Staufenbiel et al. 2021a). Der Haufen lag auf einem Sandpaddock und wurde durch einen Zaun vor Manipulation geschützt. Die Witterung war im Versuchszeitraum mild bis heiß mit einzelnen Schauern. Die Beprobung erfolgte zum Zeitpunkt $t=0$, direkt nach dem Absetzen, $t=24$, 24 Stunden nach dem Kotabsatz und $t=72$, an Tag 3. Zur Beurteilung der Entnahmestelle innerhalb des Kothaufens, wurde dieser in drei Schichten von oben nach unten (vertikale Gliederung) und vier horizontale Bereiche von zentral nach außen gehend gegliedert. Diese Untersuchung ist wichtig für die Standardisierung der Probenentnahme. Kritisch zu sehen ist im Nachhinein das Studiendesign bezüglich der Untergliederung des Kothaufens, zumal die zwei mittleren Bereiche der horizontalen Gliederung in der statistischen Auswertung zusammengefasst wurden, da die Lokalisationen sehr nah aneinander lagen und die Messwerte sich wenig unterschieden. Auch ist fraglich, ob die Überprüfung der Konzentrationsänderungen bei Lagerung des Kothaufens im Freien über drei Tage notwendig war oder eine Überprüfung bis 24 Stunden gereicht hätte. Bei einem Kotabsatz alle 90 bis 120 Minuten (Coenen und Vervuert 2019), sollte es den Pferdebesitzern möglich sein einen frischen Kothaufen zu beproben. Nützlich ist die Aussage, dass es keine signifikanten Unterschiede der Mineralstoffkonzentration in den Kotproben zwischen $t=0$ und $t=24$ gibt. Dies generiert die Möglichkeit bei einer Bestandsuntersuchung von auf der Weide gehaltenen Pferden einfach und zuverlässig Proben zu gewinnen. Ziel der Studie war die Ausarbeitung eines Standards zur Probenentnahme und die Empfehlung lautet, die Probe aus der Mitte eines frisch abgesetzten Haufens zu nehmen. Bei längerer Lagerung im Freien kann es zu Auswaschungsprozessen der löslichen Anteile der Kotmasse mit dem Niederschlag kommen

III. Zusammenfassende Diskussion

und somit zu einem relativen Anstieg der enthaltenen Mineralstoffe. Außerdem können die nicht löslichen Elemente in die äußeren und tieferen Schichten gespült werden, wo auch ein Konzentrationsanstieg gemessen werden konnte. Bei der Beprobung der untersten Schicht ist auch eine Verunreinigung der Proben mit Sand oder dem jeweiligen Untergrund, auf dem der Haufen liegt, möglich, was einen Anstieg der darin enthaltenen Elemente zur Folge hätte.

Weiterhin soll geklärt, ob es Besonderheiten beim Transport und der Lagerung nach der Probenentnahme bis zur Aufbereitung zu beachten gibt. Die ersten Proben wurden bei -18°C tiefgefroren bevor die Trocknung im Wärmeschrank bei $+60^{\circ}\text{C}$ über 48 Stunden erfolgte. Die verbleibende Trockenmasse wurde vor der Analyse gesiebt, um grobe Bestandteile, wie unverdaute Pflanzenteile, zu eliminieren und daraufhin eine bestimmte Einwaage zwischen 28,7 und 44,9 mg mittels ICP-MS und ICP-OES zu analysieren. Die Lagerung der ersten Proben bei -18°C begründen die Autoren mit der möglichst geringen (bio)chemischen und mikrobiologischen Veränderung der Kotprobe. Für Blutproben konnte nachgewiesen werden, dass gekühlte Lagerung ($+4^{\circ}\text{C}$) die Aktivität der Na-K-ATPase senkt, was einen vermehrten Ausstrom von Kalium aus den Zellen und somit einen erhöhten Wert nach vier Stunden gekühlter Lagerung in Serum oder Plasma zur Folge hatte. Ein niedriger Natriumwert konnte aus dem selben Grund nach 24 Stunden festgestellt werden. Nach achtstündiger Lagerung bei Raumtemperatur konnte ein Anstieg des anorganischen Phosphats durch Hydrolyse des organischen Phosphors auf Grund vermehrter Aktivität der alkalischen Phosphatase nachgewiesen werden, was sich bei Lagerung bei 30°C noch verstärkte (Narayanan 2000). Im ersten Moment könnte man sich fragen, ob diese Erkenntnisse in Bezug auf Kotproben überhaupt relevant sind, da die Zell- und somit auch Enzymaktivität im Kot nicht offensichtlich ist. In Humankotproben konnten jedoch bei Untersuchungen zu Kottransplantationen 10^7 Epithelzellen pro g Ursprungsmasse nachgewiesen werden (Bojanova und Bordenstein 2016). Da die Enzymaktivität mit niedrigeren Temperaturen sinkt (Daniel et al. 2008), war der Ansatz, bei -18°C eine möglichst hohe Probenstabilität zu erreichen. In der Praxis ist das jedoch nicht immer gut durchführbar, viele Autoapotheken verfügen zwar über einen Kühlschrank, aber wohl die wenigsten über die Möglichkeit zum Tiefgefrieren. Abgesehen vom Transport wäre die Lagerung in der Praxis vor der Aufbereitung gekühlt oder bei Raumtemperatur energieeffizienter und leichter realisierbar. Auf Grundlage dieser Überlegungen wurden die Proben von sechs Probanden aus drei unterschiedlichen Fütterungsgruppen in vier Teile geteilt und über sieben Tage bis zur Aufbereitung bei -18°C , -8°C , $+8^{\circ}\text{C}$ und Raumtemperatur ($+20^{\circ}\text{C}$) gelagert (Staufenbiel et al. 2021a). Die Proben wiesen eine hohe Stabilität auf, lediglich bei Schwefel und Kalium konnten signifikant unterschiedliche Mittelwerte nachgewiesen werden, wobei die absoluten Zahlen nur geringfügig und willkürlich streuen. Bemerkenswert unter dem oben angesprochenen Aspekt ist, dass der höchste

III. Zusammenfassende Diskussion

Kaliummittelwert bei gekühlter Lagerung festgestellt werden konnte. Im Umkehrschluss müsste die Enzymaktivität der Na-K-ATPase bei tiefgefrorener Lagerung am niedrigsten sein, also hätte hier der höchste Kaliumwert und bei Raumtemperatur der niedrigste Mittelwert nachgewiesen werden müssen. Da die Werteverteilung jedoch keinem Trend folgt, gehen die Autoren weiterhin von einer willkürlichen und zufälligen Streuung aus. Diese trifft nur auf die zwei Mengenelemente Kalium und Schwefel zu, der Rest der 28 analysierten Elemente wies keine signifikanten Unterschiede auf, weshalb kein gekühlter Transport nach der Probenentnahme notwendig ist. Gleiches gilt für die Lagerung in der Praxis vor der Probenaufbereitung, jedoch sollte dabei der hygienische Aspekt bei längerer Zeit nicht außer Acht gelassen werden. Ein wichtiger Hinweis für die Lagerung bei Raumtemperatur ist, dass diese im Versuch in dicht geschlossenen Probengefäßen an einem schattigen Ort erfolgte. Die abschließende Empfehlung nach dem Versuch lautet, die Proben bei längerer Lagerung aus hygienischen Aspekten gekühlt aufzubewahren, es müssen jedoch beim Transport keine Besonderheiten bezüglich der Temperatur beachtet werden.

Die nächste Fragestellung bezieht sich auf die circadiane Ausscheidung der analysierten Elemente mit den Kotproben. Beeinflusst der Tageszeitpunkt der Probennahme die Konzentration der Mineralstoffe? Dazu wurden von sechs Probanden aus drei unterschiedlichen Fütterungsgruppen über einen 24-Stundenzeitraum alle sechs Stunden Kotproben aus der Ampulla recti gewonnen (Staufenbiel, L. et al. 2022). Der Versuch diente zur Beantwortung der Frage, ob die Tageszeit die Ausscheidung von 28 Mengen- und Spurenelementen mit dem Kot beeinflusst. Bei der Erstellung von Blutbildern beim Menschen muss z. B. beachtet werden, dass die Leukozytenanzahl am Abend höher ist als am Morgen (Narayanan 2003). Auch bei Milchkühen konnten im Tagesprofil von P, Cl, Na und Ca geringe Auslenkungen in Serumproben festgestellt werden, wohingegen K einer starken tageszeitlichen Beeinflussung unterlag. Außerdem schwankten die Konzentrationen von Mg, Cl, K und Na im Urin im Tagesprofil stark (Thurmann 2013). In dieser Arbeit wurde auch darauf verwiesen, dass diese Ergebnisse sich nicht mit denen anderer Autoren decken, weshalb eine Untersuchung von tageszeitlichen Schwankungen der interessierenden Parameter in den Probenmedien vor Einführung eines neuen Analyseverfahrens von Bedeutung ist. In den vorherigen Untersuchungen konnte bereits festgestellt werden, dass die mit der Ration aufgenommenen Mineralstoffe sich differenziert in den Kotkonzentrationen darstellen. Für Pferde konnte eine Beeinflussung der Futteraufnahme durch die Tageszeit nachgewiesen werden. 49% der Ration werden zwischen 8 und 17 Uhr gefressen, während in der restlichen Zeit die Futteraufnahme seltener und in kleineren Portionen stattfindet (Ralston et al. 1979). Auch das bestätigt die Notwendigkeit des Versuchs, ebenso wie die circadiane Beeinflussung von Ca und P in Serumproben von Pferden. Zwischen 14 und 16 Uhr sowie 0 und 2 Uhr konnte

III. Zusammenfassende Diskussion

ein Tiefpunkt für Serumcalcium festgestellt werden und ein Peak gegen 7 Uhr. Für P konnten zwei Peaks gegen 16 und 4 Uhr und Tiefpunkte mittags und gegen 20 Uhr ermittelt werden (Lepage et al. 1991). In einer anderen Studie wurden keine tageszeitlichen Schwankungen von Ca und Peaks für P vier Stunden nach Futteraufnahme angegeben (Greppi et al. 1996). In unserer Studie konnten lediglich für Kalium signifikant unterschiedliche Werte ermittelt werden. Als wichtigstes intrazelluläres Kation ist Kalium maßgeblich an der Aufrechterhaltung des Membranpotentials beteiligt (Pasch 2006). In der Trockenmasse von Pferdekot beträgt die durchschnittliche Konzentration 13 g/kg und steigt mit höheren Gehalten im Raufutter (Coenen und Vervuert 2019). Nach einer bis zu 70%igen Absorption des mit der Ration aufgenommenen Kaliums wird nicht genutztes Kalium hauptsächlich renal, aber auch fäkal ausgeschieden (Burger 2011). Die renale Ausscheidung wird hauptsächlich über das Nebennierenrindenhormon Aldosteron reguliert (Breves et al. 2022), dessen tageszeitliche Aktivitätsschwankungen schon lange Zeit bekannt sind (Doe et al. 1956). Zweifelhaft ist, inwiefern die Schwankungen von Kalium von praktischer Bedeutung für die spätere Nutzung von Kotproben zur Bestimmung der Mineralstoffversorgung von Pferden relevant sind. Durch den hohen Kaliumgehalt im Grünfutter sind Mangelsituationen selten, weshalb eine Überprüfung beim gesunden Pferd von fraglicher Bedeutung ist (National research council 2007). Die ansonsten sehr geringen und keinem Trend folgenden Schwankungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass der Entnahmezeitpunkt keinen Einfluss auf die Konzentration der untersuchten Elemente in Pferdekotproben hat. Diese Erkenntnis deckt sich sehr gut mit der Möglichkeit die Proben aus einem bis zu 24 Stunden alten Kothaufen zu entnehmen, bei welchem der Zeitpunkt des Kotabsatzes ggf. auch nicht mehr sicher bestimmt werden kann.

Weiterhin stellte sich die Frage, wie sich die Kotkonzentration der Elemente über einen längeren Zeitraum bei konstanter Fütterung verhält. Dafür wurde von sechs Probanden aus drei unterschiedlichen Fütterungsgruppen an jedem dritten Tag um 7 Uhr über einen 15-Tageszeitraum eine Kotprobe aus der Ampulla recti gewonnen (Staufenbiel, L. et al. 2022). Zur Reduktion einer unkontrollierten Futteraufnahme neben der berechneten Ration erfolgte die Haltung der Pferde über den Versuchszeitraum auf einem Sandpaddock mit ad libitum Zugang zu Wasser und Heu aus einer Rundballenraufe bzw. nachts in einer mit Sägespänen eingestreuten Box mit Vorlage von ca. 7 kg Heu. Zehn Tage vor der ersten Probenentnahme wurden die Probanden zufällig in drei Fütterungsgruppen eingeteilt. Die erste Gruppe erhielt keine Mineralstoffzulage, die zweite eine auf den Selenbedarf ausgerichtete Ergänzung eines Mineralstoffgemisches und den Probanden der dritten Fütterungsgruppe stand eine Mineralstoffleckmasse zur freien Verfügung. Hervorzuheben sei an dieser Stelle die Notwendigkeit der Überprüfung der Selenkonzentration, da es sich um das essentielle Spurenelement mit der geringsten therapeutischen Breite handelt (Vervuert und Stoebe 2013).

III. Zusammenfassende Diskussion

Die Bestimmung der aktuellen Selenversorgungslage ist gut in Serumproben möglich (Vervuert 2021), allerdings konnten schwankende Serumkonzentrationen bei gleichbleibender Fütterung nachgewiesen werden (Vervuert et al. 2000). Im Tagesprofil wurde auf Grund einer fehlenden Normalverteilung kein Post-hoc-Test mit Bonferroni-Korrektur zum paarweisen Vergleich der Mittelwerte durchgeführt. Bei einer konstanten Fütterung ist es jedoch auch bei Selen möglich, die Fütterungsgruppen anhand der Kotkonzentration zuzuordnen, was entgegen der ersten Feststellungen die Möglichkeit offen lässt, auch die Selenversorgung anhand von Kotproben zu überprüfen. Bezugnehmend auf die weiteren analysierten Elemente, unterscheiden sich die Mittelwerte der Kotkonzentration von P, K, Si und Li über den Versuchszeitraum signifikant. Im Fall von P sind die absoluten Zahlenunterschiede gering und folgen keinem Trend, weshalb von einer zufälligen Streuung ausgegangen wird. Die Kaliumwerte hingegen sind über den Versuchszeitraum kontinuierlich gestiegen, was für höhere Konzentrationen im Heu durch eine zunehmende Futterqualität sprechen könnte. Ebenso würde sich das gegenläufige Verhalten von Si und Li erklären lassen, die wahrscheinlich durch Sandbeimengungen im Grundfutter aufgenommen wurden. Diese Vermutungen sowie eine genaue Betrachtung interessierender Elemente bezüglich zeitlicher Zusammenhänge zwischen Aufnahme mit dem Futter und Höhe der Kotkonzentration sollten in einem gesonderten Fütterungsversuch abgeklärt werden. Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch eine Analyse von Serum- bzw. Plasmaproben, um vergleichsweise die Kotkonzentration und den Versorgungsstatus der Probanden nach den aktuell anerkannten Referenzwerten interessierender Elemente zu prüfen. Abschließend zum jetzigen Kenntnisstand kann das Fazit gezogen werden, dass die Kotkonzentration der 28 analysierten Elemente über einen 15-Tageszeitraum bei konstanter Fütterung mit vier Ausnahmen gleich bleibt, was die These unterstützt, mit Kotproben die Mineralstoffversorgung von Pferden analysieren zu können.

Nach der Betrachtung der unterschiedlichen Einflussfaktoren auf die Mineralstoffkonzentrationen in den Pferdekotproben ist es möglich Standardanweisungen für die Probenahme zu formulieren und somit die Grundlage für die Erstellung von Referenzwerten zu schaffen. Eine weitere wesentliche Fragestellung bezüglich der Methodik muss jedoch vorher beantwortet werden. Wie hoch ist der relative Fehler der Methode von der Probenahme bis zur abgeschlossenen Analyse im Labor? Dazu wurde innerhalb eines Kothaufens 36 mal wiederholt die Konzentration von sechs Mengen- und 22 Spurenelementen gemessen (Staufenbiel et al. 2021a). Aus den daraus kalkulierten Messwertdifferenzen der 36 Einzelwerte zum Mittelwert ist der relative Fehler bestimmt worden. Dieser gibt als Relativzahl die zu erwartende Abweichung eines Messwertes vom Mittelwert an, wobei die Variation der gesamten Methodik über die Kotprobengewinnung, Aufbereitung und Analyse im Labor

III. Zusammenfassende Diskussion

einbezogen wird. Die ermittelten relativen Fehler sind mit Medianwerten unter 0,2 mit Ausnahme von Selen (0,60) und Zinn (0,27) gering. Sie unterstreichen die Praktikabilität der Untersuchungsmethodik als Gesamtverfahren. Durch Multiplikation eines Messwertes mit dem Betrag des relativen Fehlers kann die Entfernung zu einem aus Wiederholungsmessungen der gleichen Probe ermittelten Mittelwert eingeschätzt werden. Dieser Schätzgröße kommt die Besonderheit zu, dass alle methodischen Fehlerquellen von der Entnahme der Kotprobe, Zwischenlagerung, Trocknung und Teilprobenentnahme aus der getrockneten Probe bis zur laboranalytischen Durchführung der ICP-OES- oder ICP-MS-Messung eingeschlossen sind. Solche umfassenden Fehlerangaben sind in der klinischen Chemie die Ausnahme. Die relativen Fehler überschreiten nur für Zinn (0,27) und vor allem für Selen (0,60) den Wert von 0,2. Beide Elemente werden in den Kotproben nur in einer niedrigen Konzentration unter 1 mg/kg Kot-TS gefunden, wobei Selen das Element mit der geringsten Konzentration aller 28 analysierten Elemente ist. Einige Einzelmesswerte liegen unterhalb der Nachweisgrenze für Selen und werden deshalb mit dem Betrag von 0 mg/kg Kot-TS registriert. Damit ist das gewählte Verfahren zur Berechnung des relativen Fehlers für Selen nur eingeschränkt anwendbar. Daraus ist jedoch nicht der Schluss abzuleiten, dass die Selenbestimmung für Kotuntersuchungen nicht anwendbar ist. Ab einem festzulegenden unteren Grenzwert sollten Selenmesswerte als nicht nachweisbar bewertet und von statistischen Auswertungen ausgeschlossen werden. Diese Besonderheit beim Selen steht in guter Übereinstimmung mit den metabolischen Eigenschaften einer hohen Resorptionsrate und einer relevanten renalen Exkretion (Vervuert und Stoebe 2013).

Eine weitere und vorerst die letzte Fragestellung bezieht sich auf die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse. Dazu wurden 30 Wertpaare als Wiederholungsmessungen identifiziert und zur Beurteilung der Wiederholbarkeit der Kotanalysen von der Probenahme über die Aufbereitung und Analyse im Labor genutzt (Staufenbiel et al. 2021b). Dabei gibt r^2 als Bestimmtheitsmaß die relative Übereinstimmung bei Wiederholungsmessungen an, es ist also ein Maß für die Güte der Anpassung durch die Regressionsgerade (Bühl 2016). Bei 26 der 28 analysierten Elemente lag das Bestimmtheitsmaß über 0,9, was bedeutet, dass es eine über 90%ige Übereinstimmung zwischen den Wiederholungsmessungen gibt. Davon ausgenommen sind Selen ($r^2= 0,894$) und Zinn ($r^2=0,899$), was sich durch niedrige Konzentrationen in den Kotproben begründen lässt und nicht zuletzt noch immer eine gute Reproduzierbarkeit darstellt. Nicht außer Acht lassen darf man bei dieser hohen Reproduzierbarkeit der Messergebnisse, dass es sich lediglich um 30 Stichproben handelt, da das Bestimmtheitsmaß mit einer höheren Stichprobenanzahl tendiert zu sinken (Fahrmeir et al. 2013).

III. Zusammenfassende Diskussion

Die vorliegende Arbeit schafft die methodischen Grundlagen, die Mineralstoffkonzentrationen in Pferdekotproben reproduzierbar zu bestimmen. Dabei können zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Rückschlüsse auf den Versorgungsstatus gezogen werden. Die durchgeführten Versuche ermöglichen Standardanweisungen für die Kotprobengewinnung zu formulieren, die später für die Erstellung von Referenzwerten genutzt werden können. Dafür müssen in Zukunft interessierende Elemente bestimmt und ihre Resorption und Exkretion untersucht werden. Danach können die Kotkonzentrationen mit dem aktuellen Versorgungsstatus, der nach dem derzeitigen Wissensstand über Serumproben bestimmt wird, verglichen und Referenzwerte erstellt werden. Außerdem sollten in einem gesonderten Fütterungsversuch die Dynamik von interessierenden Elementen bei wechselndem Mineralstoffangebot in der Ration untersucht werden. Mit dieser Aussicht sollte es in Zukunft möglich sein, die Mineralstoffversorgung von Pferden anhand von Kotproben zu beurteilen, einem Diagnostikum, das nicht invasiv gewonnenes Probenmaterial nutzt, sich durch eine hohe Stabilität auszeichnet und die Aufnahme differenziert widerspiegelt.

IV. Schlussfolgerungen

Folgende Schlussfolgerungen können formuliert werden:

1. Eine differenzierte Fütterung der Probanden hat einen signifikanten Einfluss auf die Konzentration der Mineralstoffe in den Kotproben.
2. Zur Kotprobengewinnung wird die Beprobung aus der Mitte eines abgesetzten Haufens empfohlen. Damit ist die Möglichkeit einer nicht-invasiven Probengewinnung gegeben. Alternativ können Kotproben unter Minimierung möglicher Risiken für die beprobende Person und Pferd aus der Ampulla recti gewonnen werden.
3. Bei der Beprobung eines im Freien abgesetzten Haufens sollte dieser möglichst frisch sein. Alternativ kann ein bis zu 24-Stunden alter Kothaufen, der geringen Witterungseinflüssen ausgesetzt war, beprobt werden.
4. Ein gekühlter Transport und Lagerung der Kotproben nach der Gewinnung bis zur weiteren Verarbeitung ist nicht notwendig. Aus hygienischen Aspekten wird bei hohen Außentemperaturen der Transport und die Lagerung gekühlt oder zumindest im Schatten empfohlen.
5. Die Kotkonzentration variiert bei konstanter Fütterung im 24-Studentagesprofil und über einen 15-Tageversuchszeitraum nur bei wenigen Elementen. Die dynamische Konzentrationsentwicklung interessierender Mineralstoffe in Kotproben muss in einem gesonderten Fütterungsversuch abschließend beurteilt werden.
6. Der relative Fehler für den gesamten Ablauf von der Kotprobengewinnung über die Aufbereitung und Probenversand in das Labor bis zur Elementanalyse ist gering und überschreitet nur im Fall von Zinn (0,27) und vor allem bei Selen (0,60) den Wert von 0,2.
7. Die Reproduzierbarkeit der Messungen ist mit einem Bestimmtheitsmaß von über 0,9 hoch. Knapp davon ausgenommen sind Selen ($r^2= 0,894$) und Zinn ($r^2=0,899$).

V. Zusammenfassung

Untersuchung der Konzentrationen an Mengenelementen und essentiellen sowie akzidentellen Spurenelementen in Kotproben von Pferden

Mengen- und Spurenelemente erfüllen im Körper vielfältige Aufgaben, unter anderem als Bestandteil von Knochen, Enzymkomplexen oder Hormonen. Die Mengenelemente Ca, Cl, K, Mg, Na, P und S kommen in hohen Konzentrationen im Körper vor und werden reichlich mit der Nahrung aufgenommen. Bei den Spurenelementen unterscheidet man ihrer Funktion entsprechend zwischen essentiellen und akzidentellen. Erstere haben eine lebensnotwendige Funktion für den Organismus, letztere werden mit der Nahrung aufgenommen, ohne dass für sie eine physiologische Funktion nachgewiesen ist. Auf beide Gruppen der Spurenelemente trifft zu, dass ihre Konzentration im Körper nur gering ist und sie bei erhöhter Aufnahme ein toxisches Potential besitzen. Daher ist die Versorgungsanalyse wichtig für die Gesunderhaltung, denn sowohl Mangel- als auch Überschusssituationen können zu Leistungseinbußen und Erkrankungen führen. Die nutritive Versorgungslage über Rationsanalysen lässt sich bei Selektivfressern wie Pferden, besonders in extensiver Haltung auf der Weide, nur schwer exakt bestimmen. Die metabolische Versorgungslage wird mit Hilfe von Blutproben analysiert, diese sind jedoch nur für wenige Elemente geeignet, um eine Fehlversorgung sicher anzuzeigen.

Ziel dieser Arbeit war die Überprüfung der Möglichkeit, Kotproben zur Beurteilung der Versorgung von Pferden mit 28 ausgewählten Mengen- und Spurenelementen zu nutzen. Gemessen wurden mittels optischer Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES): Cu, Zn, Mn, Mo, Ca, Mg, Ba, Cr, Fe, Sr, K, S, Ti, P, Si und Na bzw. mit der Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS): Se, B, Co, Ni, Pb, Cd, U, As, Tl, Al, Sn und Li. Es standen insgesamt zehn Pferde als Probanden zur Verfügung, die in drei unterschiedliche Fütterungsgruppen eingeteilt wurden. Die erste erhielt neben den in den Grundfuttermitteln enthaltenen Mineralstoffen keine Ergänzung, die zweite eine auf den Selenbedarf nach Bedarfsempfehlungen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE) abgestimmte Mineralstoffsupplementierung und der dritten Gruppe stand eine mineralisierte Leckmasse zur freien Verfügung. Zur Beantwortung der methodischen Rahmenbedingungen wurden zunächst Kotproben aus zwei unterschiedlichen Lokalisationen im Pferd (Colon descendens und Ampulla recti) sowie eine aus einem frisch abgesetzten Kothaufen gewonnen. In einem weiteren Versuch wurde der Haufen eines optimal versorgten Probanden drei Tage in verschiedenen Lokalisationen beprobt. Außerdem wurden die Kotproben sieben Tage bei unterschiedlichen Temperaturen (-18, -8, 8 und 20°C) vor der weiteren Verarbeitung gelagert. Jeweils zwei Probanden der drei unterschiedlichen Fütterungsgruppen wurden

V. Zusammenfassung

innerhalb eines 24-Stundenzeitraums alle sechs Stunden und über einen 15-Tages-Zeitraum alle drei Tage aus der Ampulla recti beprobt. Schlussendlich wurde der erhaltene Datensatz genutzt, um den methodischen Fehler des gesamten Untersuchungsablaufes von der Kotprobenentnahme, über die Lagerung sowie Aufbereitung und dem Probenversand, bis zur Elementanalyse, zu ermitteln. Außerdem wurde die Reproduzierbarkeit der Messungen festgestellt.

Die unterschiedliche Fütterung der Probanden spiegelt sich differenziert in der Kotkonzentration wider und gibt somit Grund zu der Annahme, dass Kotproben sich für die Analyse der Mineralstoffversorgung von Pferden eignen. Hinsichtlich der Entnahmestelle gab es keine signifikanten Unterschiede der drei Lokalisationen, womit der am wenigsten invasiven Methode aus einem abgesetzten Haufen der Vorzug zu geben ist. Innerhalb des Haufens konnten variierende Konzentrationen einzelner Elemente in unterschiedlichen Lokalisationen festgestellt werden. Bezüglich der Lagerdauer des Haufens im Freien vor der Beprobung gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Probengewinnung direkt nach dem Kotabsatz und 24 Stunden später. Im 72 Stunden alten Kothaufen unterschieden sich einige Elemente signifikant, weshalb die Empfehlung lautet, die Proben aus einem frisch abgesetzten Haufen zu nehmen. Für die Bestandsuntersuchung auf der Weide können jedoch auch bis zu 24 Stunden alte Haufen beprobt werden. Bei gleichbleibender Fütterung unterscheiden sich wenige Elemente signifikant im 24-Studentagesprofil (K) sowie in der 15-Tage-Verlaufsuntersuchung (P, K, Si, Li). Genaue Zusammenhänge zwischen Futteraufnahme und Konzentrationsdifferenzen in den Kotproben sowie die renale Ausscheidung müssten zu einem späteren Zeitpunkt mit Hilfe eines gesonderten Fütterungsversuchs abschließend beurteilt werden. Mit einem relativen methodischen Fehler von unter 0,2 für den Gesamtversuch von der Probenahme, über die Aufbereitung und Analyse im Labor weist das Verfahren eine geringe systematische Abweichung auf. Ausgenommen davon sind Selen (0,60) und Zinn (0,27). Grund dafür sind sehr geringe, im Fall von Selen zum Teil nicht messbare Konzentrationen in den Kotproben. Für die Güte des Gesamtversuchs spricht die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse mit einem Bestimmtheitsmaß von über 0,9 oder knapp darunter bei Selen (0,894) und Zinn (0,899).

Die vorliegende Arbeit unterstützt die Möglichkeit, Kotproben für die Analyse des Versorgungsstatus von Pferden mit Mineralstoffen zu nutzen. Als Ergebnis stehen die methodischen Rahmenbedingungen zur Verfügung, mit denen die Probennahme standardisiert werden kann. Das ermöglicht in weiteren Versuchen bei größeren Probandenzahlen Referenzwerte für Mineralstoffkonzentrationen in Pferdekotproben zu erstellen und diese zur Versorgungsanalyse zu nutzen.

VI. Summary

Investigation of concentration of minerals and essential as well as accidental trace elements in fecal samples of horses

Minerals and trace elements fulfill a variety of functions in the organism, for example as components of bones, enzyme complexes or hormones. The minerals Ca, Cl, K, Mg, Na, P and S are present in high concentrations in the body and are taken up enough with food. According to their function, trace elements are divided into essential and accidental elements. The former have vital functions for the organism, while this has not yet been proven for the latter. Elements of both groups only occur in low concentrations in the body and may be toxic at increased intake. Since both, deficiencies and excesses, can lead to reduced performance and diseases, supply analysis is an important aspect in maintaining the health of horses. The nutritive situation measured by means of ration analysis is difficult to determine accurately in selective feeders such as horses, especially in extensive pasture management. The metabolic supply situation based on blood samples is only suitable for a few elements to indicate malnutrition.

The aim of this study was to assess the possibility of using fecal samples for the analysis of the supply of horses with 28 selected minerals and trace elements. The following elements were measured by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES): Cu, Zn, Mn, Mo, Ca, Mg, Ba, Cr, Fe, Sr, K, S, Ti, P, Si and Na. Furthermore, the following elements were quantified by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS): Se, B, Co, Ni, Pb, Cd, U, As, Tl, Al, Sn and Li. In total, ten trial horses were divided into three different feeding groups. The first received no supplementation in addition to the minerals contained in the basic feeds, while the second group received mineral supplementation adapted to selenium requirements, and the third group had a mineralized lick for free intake. To answer the methodological framework, fecal samples were first obtained from two different localizations in the horse (colon descendens and ampulla recti), and one from a fresh dung heap. In another experiment, the pile of an optimally fed horse was sampled for three days in different localizations. Additionally, fecal samples were stored for seven days at different temperatures (-18, -8, 8, and 20°C) before further processing. The dung of two horses from each of the three different feeding groups were sampled from the ampulla recti every six hours within a 24-hour period and every three days over a 15-day period. Eventually, the obtained data set was used to determine the relative error of the study, as well as the repeatability of the measurements.

Differences in feeding are differentially represented in the fecal concentration. As there were no significant differences shown between the three sampling localizations, the least invasive

VI. Summary

method from a settled heap is to be preferred. Within the heap, varying concentrations of individual elements could be detected in different localizations. Regarding the storage time of the pile outdoor before sampling, there were no significant differences between immediately after defecation and 24 hours later. In the 72-hour old dung heap, some elements differed significantly. Thus, it is recommended to sample fresh piles, but for the analysis of herds in the pasture, piles can be sampled for up to 24 hours after defecation. Without changes in feeding, only few elements differ significantly in the 24-hour daily profile (K), as well as in the 15-day period (P, K, Si, Li). Precise relation between feed intake and differences in fecal concentration, as well as renal excretion, would need to be assessed in a separate feeding trial. With a relative error of less than 0.2 for the whole study from sampling to preparation and analysis in the laboratory, the method has a low systematic deviation. This cannot be applied to selenium (0.60) and tin (0.27), due to the very low concentration in the fecal samples or, in the case of selenium, non-measurable concentrations. The repeatability of the results with a coefficient of determination above 0.9 or just below for selenium (0.894) and tin (0.899) indicates the quality of this study.

The present study supports the possibility of using fecal samples for the analysis of mineral supply in horses. As a result, the methodological framework is appropriate to standardize sampling. This enables to create reference values for mineral concentrations in horse feces samples in further trials with larger numbers horses and to use them for supply analysis.

VII. Literaturverzeichnis

Argenzio RA, Lowe JE, Hintz HF, Schryver HF (1974):

Calcium and phosphorus homeostasis in horses.

The Journal of nutrition, 104 (1): 18–27. doi: 10.1093/jn/104.1.18.

Bacon JA, Bell MC, Miller JK, Ramsey N, Mueller FJ (1990):

Effect of Magnesium Administration Route on Plasma Minerals in Holstein Calves Receiving Either Adequate or Insufficient Magnesium in Their Diets.

Journal of Dairy Science, 73 (2): 470–473. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(90)78693-6.

Baumgartner W, Wittek T (2017):

Klinische Propädeutik der Haus- und Heimtiere

9., aktualisierte und erweiterte Auflage, Stuttgart: Enke Verlag

ISBN 9783132402744

Bojanova DP, Bordenstein SR (2016):

Fecal Transplants: What Is Being Transferred?

PLoS biology, 14 (7): e1002503. doi: 10.1371/journal.pbio.1002503.

Brehm W, Gehlen H, Ohnesorge B, Wehrend A (2016)

Handbuch Pferdepraxis

4., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag

ISBN: 9783132196216

Breves G, Diener M, Gäbel G, Bruckmaier RM, Gerstberger R, Fromm M, Hammon H, Kaske M, Schemann M, Weißmann A (2022):

Physiologie der Haustiere

6., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG

ISBN: 9783132438354

Budras K-D, Röck S (2009):

Atlas der Anatomie des Pferdes. Lehrbuch für Tierärzte und Studierende

6., überarbeitete Auflage, Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG

ISBN: 978-3-89993-043-6

Bühl A (2016):

SPSS 23. Einführung in die moderne Datenanalyse

15., aktualisierte Auflage. Hallbergmoos: Pearson

ISBN: 978-3-86894-297-2

Burger AM (2011):

Literatur-Studie zur faktoriellen Ableitung des Mengenelement-Bedarfs für Erhaltung beim Pferd.

Dissertation, München: Ludwig-Maximilians-Universität München.

Coenen M, Vervuert I (2019):

Pferdefütterung

6., aktualisierte Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag

ISBN: 978-3-13-241178-4

Daniel RM, Danson MJ, Eisenthal R, Lee CK, Peterson ME (2008):

The effect of temperature on enzyme activity: new insights and their implications.

Extremophiles, 12 (1): 51–59. doi: 10.1007/s00792-007-0089-7

VII. Literaturverzeichnis

Davies M (2021):
Clinical Signs in Humans and Animals Associated with Minerals, Trace Elements, and Rare Earth Elements
First edition. Oxford: Academic Press Inc an Imprint of Elsevier
ISBN: 978-0-323-89976-5

Doe RP, Flink EB, Goodsell MG (1956):
Relationship of diurnal variation in 17-hydroxycorticosteroid levels in blood and urine to eosinophils and electrolyte excretion.
The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 16 (2): 196–206. doi: 10.1210/jcem-16-2-196

Fahrmeir L, Kneib T, Lang S, Marx B (2013):
Regression. Models, Methods and Applications
2. Auflage, Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag
doi: 10.1007/978-3-662-63882-8; E-ISBN: 978-3-662-63882-8

Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (2014)
Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung von Pferden
Vollständig überarbeitete Neuauflage, Frankfurt am Main: DLG-Verlag
ISBN: 978-3-7690-0805-0

Granel M (2002):
Die Mengen- und Spurenelementversorgung von Warmblutfohlen während des ersten Lebenshalbjahres unter Berücksichtigung des Vorkommens der Osteochondrose.
Dissertation, Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover.

Greppi GF, Casini L, Gatta D, Orlandi M, Pasquini M (1996):
Daily fluctuations of haematology and blood biochemistry in horses fed varying levels of protein.
Equine veterinary journal, 28 (5): 350–353. doi: 10.1111/j.2042-3306.1996.tb03104.x.

Güldenhaupt V (1979):
Verträglichkeit und Verdaulichkeit eines Alleinfutters für Pferde in Kombination mit Stroh.
Dissertation, Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover.

Hahn A (2019):
Mineralstoffe
In: Lebensmittelchemie/Hrsg.: Matissek R, Baltus W: 8. Auflage, S. 99-118
Berlin; Heidelberg: Springer Spektrum – doi: 10.1007/978-3-662-47112-8; E-ISBN: 978-3-662-47112-8

Herold A (2017):
Untersuchungen zu den Konzentrationen an Mengen- und Spurenelementen beim Rind in verschiedenen Probenmedien unter besonderer Berücksichtigung von Kotproben.
Dissertation, Berlin: Freie Universität Berlin.

Herold A, Müller A-E, Staufenbiel R, Pieper L (2020):
Konzentration von Spurenelementen beim Rind in verschiedenen Probenmedien unter besonderer Berücksichtigung von Kotproben.
Tierärztl Prax Ausg G Großtiere Nutztiere 2020; 48(01): 5-14. doi: 10.1055/a-1067-3585.

VII. Literaturverzeichnis

Herold A, Pieper L, Müller A-E, Staufenbiel R (2018):
Konzentrationen an Mengenelementen beim Rind in verschiedenen Probenmedien unter besonderer Berücksichtigung von Kotproben
Tierärztl Prax Ausg G Großtiere Nutztiere 2018; 46: 221–228. doi: 10.15653/TPG-180239.

Hildebrandt J-P, Bleckmann H, Homberg U (2015):
Penzlin - Lehrbuch der Tierphysiologie
8. Auflage, Berlin; Heidelberg: Springer Spektrum
ISBN: 978-3-642-55368-4

Hussein HA, Staufenbiel R (2012):
Variations in Copper Concentration and Ceruloplasmin Activity of Dairy Cows in Relation to Lactation Stages with Regard to Ceruloplasmin to Copper Ratios.
Biological Trace Element Research, 146 (1): 47–52. doi: 10.1007/s12011-011-9226-3.

IDEXX (2022):
Leitungsverzeichnis Pferd (Stand 2019)
Abgerufen am: 31.10.2022 um 08.19 Uhr, von <https://www.idexx.de/de/veterinary/reference-laboratories/tests-and-services/#menu>

Kamphues J, Wolf P, Coenen M, Eder K, Iben C, Kienzle E, Liesegang A, Männer K, Zebeli Q, Zentek J (2014)
Supplemente zur Tierernährung. Für Studium und Praxis
12., überarbeitete Auflage, Hannover: M.& H. Schaper
ISBN: 978-3-7944-0240-3

König HE, Liebich H-G (2015):
Anatomie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis
6., überarbeitete und erweiterte Auflage, Stuttgart: Schattauer
ISBN: 978-3-7945-2984-1

Kośła T (1988)
Mengen- und Spurenelementstatus, -bedarf und -versorgung des Pferdes.
Habilitation, Leipzig: Karl-Marx-Universität Leipzig.

Kues WA, von Köckritz-Blickwede M (2021):
Biochemie für die Tiermedizin
1. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag
ISBN: 9783132401655

Lepage OM, DesCôteaux L, Marcoux M, Tremblay A (1991):
Circadian rhythms of osteocalcin in equine serum. Correlation with alkaline phosphatase, calcium, phosphate and total protein levels.
Can J Vet Res. Jan;55(1):5-10. PMID: 1884284; PMCID: PMC1263405.

LUFA Nordwest (2022):
Heuauswertung 2021
Abgerufen am: 31.10.2022 um 07.44 Uhr, von <https://www.lufa-nordwest.de/index.cfm/nav/9/article/2006.html>

McDowell LR (2003):
Minerals in Animal and Human Nutrition
Second Edition, Amsterdam: Elsevier Science B.V.
ISBN: 0 444 51367 1

VII. Literaturverzeichnis

Moritz A (2014):

Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin

7., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, Stuttgart: Schattauer GmbH

ISBN: 9783794527373

Mueller A, Bertram A, Moschos A (2012):

Saisonale und überregionale Unterschiede der Selenversorgung bei Pferden.

Tierärztl Prax Ausg G Großtiere Nutztiere 2012; 40: 157–166. doi: 10.1055/s-0038-1623113

Mundt H-C (1978):

Untersuchungen über die Verdaulichkeit von aufgeschlossenem Stroh beim Pferd.

Dissertation, Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover.

Narayanan S (2000):

The preanalytic phase. An important component of laboratory medicine.

American journal of clinical pathology, 113 (3): 429–452. doi: 10.1309/C0NM-Q7R0-LL2E-B3UY.

Narayanan S (2003):

Preanalytical Issues in Hematology.

Laboratoriums Medizin, 27 (7-8): 243–248. doi: 10.1046/j.1439-0477.2003.03045.x.

National research council (2007):

Nutrient requirements of horses

Sixth revised edition, Washington: The national academies Press

ISBN-13: 978-0-309-10212-4

Pasch A (2006):

Die Regulation des Kaliumhaushalts.

Swiss Medical Forum – Schweizerisches Medizin-Forum, 6 (20).

doi: 10.4414/smf.2006.05867.

Pfannhauser W (1988):

Essentielle Spurenelemente in der Nahrung

1. Auflage, Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag

doi: 10.1007/978-3-642-72861-7; E-ISBN: 978-3-642-72861-7

Ralston SL, van den Broek G, Baile CA (1979):

Feed intake patterns and associated blood glucose, free fatty acid and insulin changes in ponies.

Journal of animal science, 49 (3): 838–845. doi: 10.2527/jas1979.493838x.

Rosé A (2012):

Epilepsie beim Hund.

team.konkret, 8 (01): 8–11. doi: 10.1055/s-0031-1295524.

Salomon F-V, Geyer H, Gille U (2015):

Anatomie für die Tiermedizin

3., aktualisierte und erweiterte Auflage, Stuttgart: Enke-Verlag

ISBN: 978-3-8304-1288-5

VII. Literaturverzeichnis

Seeling W (1995):

Spurenelemente

In: Intensivmedizin/Hrsg.: Benzer H, Buchardi H, Larsen R, Suter PM, 7. Auflage, S. 607-611
Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag

doi: 10.1007/978-3-642-97929-3; E-ISBN: 978-3-642-97929-3

Staufenbiel L, Müller AE, Gehlen H (2022)

Methodische Untersuchungen zur Variation der Mengen- und Spurenelementkonzentrationen in Pferdekotproben im Tagesverlauf und über einen 15-Tages-Zeitraum.

Berl Münch Tierärztl Wochenschr (135): 1-9. doi: 10.2376/1439-0299-2022-5

Staufenbiel L, Müller A-E, Gehlen H (2021a):

Investigation of the Variation of Concentration of Quantity and Trace Elements in Equine Faecal Samples Considering Storage

EC Veterinary Science, (6.10): 32–43. URL: <https://www.econicon.com/ecve/ECVE-06-00435.php>

Staufenbiel L, Müller A-E, Gehlen H (2021b):

Methodische Untersuchung zu Mengen- und Spurenelementkonzentrationen in Pferdekotproben unter besonderer Berücksichtigung des Probenentnahmeortes.

Tierärztl Prax Ausg G Großtiere Nutztiere 2021; 49: 178–188. doi: 10.1055/a-1482-7379.

Staufenbiel R, Schmitt R, Müller AE, Staufenbiel L (2022):

Untersuchungen zum Zusammenhang der Konzentrationen an essenziellen Spurenelementen in totalen Mischrationen und Kotproben bei Holstein Friesian Milchkühen und Ableitung von Kotreferenzwerten.

Schweizer Archiv für Tierheilkunde, 164 (10): 709–719. doi: 10.17236/sat00370.

Suttle N F (2010):

Mineral nutrition of livestock

Fourth edition, Wallingford; Oxfordshire: CAB Publishing

ISBN-13: 9781845934729

Suttle N F (2022):

Mineral nutrition of livestock

5th Edition, Wallingford; Oxfordshire: CAB Publishing

doi: 10.1079/9781789240924.0000; E-ISBN: 9781 78924 0931

Theiner E, Weber C, Müller E, Venner M, Finkler-Schade C, Vervuert I (2021):

Effekte einer oralen Mangansupplementierung mit unterschiedlichen Verbindungen auf die Mangankonzentrationen in Vollblut und Serum von Stuten und Saugfohlen. Tierärztliche Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere / Nutztiere 2021; 49: 392 – 40. doi: 10.1055/a-1656-2610.

Thurmann J-P (2013):

Tagesschwankungen von Laborparametern beim Milchrind.

Dissertation, Berlin: Freie Universität Berlin.

Vervuert I (2021):

Wie gut reflektieren Spurenelemente im Serum die entsprechende Versorgung beim Pferd? Pferdespiegel 2021; 24: 113 - 118. doi: 10.1055/a-1406-6753.

VII. Literaturverzeichnis

- Vervuert I, Coenen M, Holtershinken M, Venner M, Rust P (2000):
Aktuelle Befunde zur Beurteilung der Selenversorgung beim Pferd.
Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere / Nutztiere 2000; 28: 172–177.
- Vervuert I, Stoebe S (2013):
Selen beim Pferd im Spannungsbogen zwischen marginaler und toxischer Versorgung.
Pferdespiegel 2013; 16: 27 – 33. doi: 10.1055/s-0032-1328311.
- Weber J, Roder A, Müller AE, Pieper R, Staufenbiel R (2021):
Chronische Kupferübersversorgung als mögliches Bestandsproblem in einer deutschen
Milchviehherde.
Tierärztl Prax Ausg G Großtiere Nutztiere 2021; 49: 203–209. doi: 10.1055/a-1418-3562.
- Wedemeyer H C (1970):
Untersuchungen zum Calcium-, Phosphor- und Natrium-Umsatz des erwachsenen Pferdes
Dissertation, Göttingen: Universität Göttingen.
- Wolff F, Müller A-E, Moschos A, Köller G, Bauer A, Vervuert I (2017):
Selenkonzentration im Serum und Glutathionperoxidaseaktivität im Vollblut bei gesunden
adulten Pferden
Tierärztl Prax Ausg G Großtiere Nutztiere 2017; 45: 362-369. doi: 10.15653/TPG-170301.

VIII. Publikationsverzeichnis

Teile dieser kumulativen Dissertation wurden wie folgt veröffentlicht:

Publikationen in Fachzeitschriften:

- I. Staufenbiel L., Müller A.-E., Gehlen H. Methodische Untersuchung zu Mengen- und Spurenelementkonzentrationen in Pferdekotproben unter besonderer Berücksichtigung des Probenentnahmeortes. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe G, Großtiere/Nutztiere* **2021**, 49, 178–188, Angenommen 14.01.2021
- II. Staufenbiel L., Müller A.-E. und Gehlen H. Investigation of the Variation of Concentration of Quantity and Trace Elements in Equine Faecal Samples Considering Storage. *EC Veterinary Science* **2021**, 6.10, 32-43, Angenommen 18.09.2021
- III. Staufenbiel L., Müller A.-E. und Gehlen H. Methodische Untersuchungen zur Variation der Mengen- und Spurenelementkonzentrationen in Pferdekotproben im Tagesverlauf und über einen 15-Tages-Zeitraum. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* **2022** 135, 1–9, Angenommen 11.08.2022

IX. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Betreuerin Prof. Dr. Heidrun Gehlen, für die Möglichkeit meine Dissertation unter ihrer Anleitung verfassen zu dürfen, bedanken. Trotz der räumlichen Entfernung bei der Erarbeitung der Publikationen und der Dissertation konnte sie mir stets und unkompliziert bei allen Fragen weiterhelfen, meine Texte verbessern und hatte für jedes Problem eine Lösung parat.

Ein ganz herzlicher Dank geht auch an Dr. Anja-Elvira Müller, die mit -zumindest wirkte es so auf mich- voller persönlicher Hingabe all meine Proben unter anderem an Wochenenden und Feiertagen analysiert hat. Auch habe ich mich sehr über die Möglichkeit eines Besuchs in ihren faszinierenden Laborräumen gefreut, der mir die ICP-Messungen zumindest etwas näher gebracht hat. Vielen Dank für all Ihre Bemühungen, ohne die diese Arbeit niemals entstanden wäre!

Die besten Ideen sind nichts wert ohne Probanden, die einem -in meinem Fall Kotproben- zur Verfügung stellen. Daher geht an dieser Stelle mein Dank an das gesamte Hofteam vom Galgenberghof Müncheberg, allen voran Patricia und Lisa, die mich bei der Beprobung und Fütterung der lieben Pferde unterstützt haben.

Weiterhin möchte ich meinen Freunden in Leipzig danken, die mich während der Doppelbelastung im Staatsexamen immer unterstützt haben, insbesondere Paula und Christina, für ihre sprachliche und grafische Nachhilfe. Aber auch meiner lieben Sophie möchte ich an dieser Stelle danken, dass sie bei den Hunderunden immer ein offenes Ohr für meine aktuellen Probleme hatte und mir nicht zuletzt half, auch mal den Kopf frei zu bekommen.

Auch erwähnen möchte ich meinen lieben Willi, der all meine Launen in der Schlussphase aushalten musste und seine tollen Eltern, die mich kulinarisch (und auch mental) umsorgt haben und mir mal eben bei einer Last-Minute-Übersetzung unter die Arme gegriffen haben.

Und wie heißt es so schön -last but not least- möchte ich meinen Eltern danken ohne deren Unterstützung ich nicht an dem Punkt stehen würde, diese Zeilen verfassen zu können! Dir, liebe Mama, verdanke ich nicht nur mein Durchhaltevermögen und laut Papa auch ein Talent zu schreiben, sondern war es auch Deine Kraft, die mir immer den Rücken gestärkt hat. Danke, dass es Dich gibt! Und vielen Dank Papa, dass Du mich immer wieder angespornt hast weiterzumachen und stets ein offenes Ohr für meine Fragen, Sorgen und Ängste hattest!

X. Finanzierungsquellen

Teile dieser Arbeiten wurden finanziell unterstützt durch den Publikationsfonds der Freien Universität Berlin und stehen somit einer breiten Öffentlichkeit kostenlos zur Verfügung.

XI. Interessenkonflikt

Im Rahmen dieser Arbeit bestehen keine Interessenkonflikte durch Zuwendungen Dritter.

XII. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Neustadt-Glewe, den 22.02.2023

Lydia Staufenbiel

