

FACHBEREICH BIOCHEMIE, CHEMIE UND PHARMAZIE  
DER GOETHE UNIVERSITÄT IN FRANKFURT AM MAIN, DEUTSCHLAND



Charakterisierung des Mikrobioms und des Virioms unterschiedlicher  
Marsupialia-Arten mit Next Generation Sequencing-Methoden unter  
Berücksichtigung verschiedener Umweltfaktoren

Masterarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades eines Master of Science im Studiengang Biochemie

(M. Sc.)

vorgelegt von Jan-Hendrik Kaub

Matrikelnummer: 7270730

Frankfurt a. M., 11. Dezember 2023

Gutachter: Prof. Dr. Paul W. Dierkes

Zweitgutachter: Dr. Rupert Abele

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	2
Abbildungsverzeichnis .....	4
Tabellenverzeichnis.....	7
Abkürzungsverzeichnis .....	8
Abstract .....	10
Zusammenfassung.....	11
Einleitung.....	12
Material & Methoden.....	15
Chemikalien- und Geräteliste .....	15
Boden-, Futter- und Kotproben .....	16
DNS-Extraktion und Barcoding .....	17
Sequenzierung.....	19
Datenverarbeitung .....	19
Software .....	23
Ergebnisse.....	25
Alpha-Diversität.....	25
Mikrobiom Bakterien.....	25
Mikrobiom Pilze.....	32
Mikrobiom Viren.....	38
Vergleiche Boden-, Futter- und Kotproben - Bakterien.....	46
Vergleiche Boden-, Futter- und Kotproben - Pilze .....	49
Vergleiche in Richness, Shannon-Index und ENS.....	52
Beta-Diversität.....	58
Readzahl Vergleiche.....	61
Diskussion.....	64
Alpha-Diversität Bakterien.....	64
Alpha-Diversität Pilze.....	64

Alpha-Diversität Viren .....	65
Vergleiche Boden-, Futter- und Kotproben .....	66
Vergleiche von Richness, Shannon-Index und ENS.....	66
Beta-Diversität.....	67
Readzahl-Vergleiche .....	68
Ausblick .....	69
Literaturverzeichnis .....	70
Anhang .....	73
Zootabelle mit Abkürzungen (Metadaten).....	73
Alpha-Diversität.....	77
Mikrobiom Bakterien.....	77
Mikrobiom Pilze.....	83
Mikrobiom Viren.....	89
Beta-Diversität.....	94
Eidesstattliche Versicherung.....	97

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gegenüberstellung der Futter-, Boden- und Kotproben der Bennettkängurus aus Augsburg.....	26
Abbildung 2: Gegenüberstellung der Futter-, Boden- und Kotproben der Bennettkängurus aus Landau. ....	27
Abbildung 3: Gegenüberstellung der Futter-, Boden- und Kotproben der Bennettkängurus aus Neuwied. ....	28
Abbildung 4: Gegenüberstellung der Futter-, Boden- und Kotproben der Östlichen Grauen Riesenkängurus aus Neuwied.....	29
Abbildung 5: Gegenüberstellung der Futter-, Boden- und Kotproben der Östlichen Grauen Riesenkängurus aus Schwerin. ....	30
Abbildung 6: Gegenüberstellung der Futter- und Kotproben der Koalas aus Duisburg. ....	31
Abbildung 7: Gegenüberstellung der Futter- und Kotproben der Bennettkängurus aus Neunkirchen. ....	31
Abbildung 8: Gegenüberstellung der Futter-, Boden- und Kotproben der Bennettkängurus aus Augsburg.....	32
Abbildung 9: Gegenüberstellung der Futter-, Boden- und Kotproben der Bennettkängurus aus Landau. ....	33
Abbildung 10: Gegenüberstellung der Futter-, Boden- und Kotproben der Bennettkängurus aus Neuwied. ....	34
Abbildung 11: Gegenüberstellung der Futter-, Boden- und Kotproben der Östlichen Grauen Riesenkängurus aus Neuwied.....	35
Abbildung 12: Gegenüberstellung der Futter-, Boden- und Kotproben der Östlichen Grauen Riesenkängurus aus Schwerin. ....	36
Abbildung 13: Gegenüberstellung der Futter- und Kotproben der Koalas aus Duisburg. ....	37
Abbildung 14: Gegenüberstellung der Futter- und Kotproben der Bennettkängurus aus Neunkirchen. ....	38
Abbildung 15: Gegenüberstellung der Kotproben (A), Futterproben (B) und Bodenproben (C) der Bennettkängurus aus Augsburg.....	39
Abbildung 16: Gegenüberstellung der Kotproben (A), Futterproben (B) und Bodenproben (C) der Bennettkängurus aus Landau. ....	40
Abbildung 17: Gegenüberstellung der Kotproben (A), Futterproben (B) und Bodenproben (C) der Bennettkängurus aus Neuwied. ....	41
Abbildung 18: Gegenüberstellung der Kotproben (A), Futterproben (B) und Bodenproben (C) der Östlichen Grauen Riesenkängurus aus Neuwied.....	42

Abbildung 19: Gegenüberstellung Kotproben (A), Futterproben (B) und Bodenproben (C) der Östlichen Grauen Riesenkängurus aus Schwerin. ....	43
Abbildung 20: Gegenüberstellung der Kotproben (A) und Futterproben (B) der Koalas aus Duisburg. ....	44
Abbildung 21: Gegenüberstellung der Kotproben (A) und Futterproben (B) der Bennettkängurus aus Neunkirchen. ....	45
Abbildung 22: Zusammenfassung aller Bodenproben. ....	46
Abbildung 23: Zusammenfassung aller Futterproben. ....	47
Abbildung 24: Zusammenfassung aller Kotproben. ....	48
Abbildung 25: Zusammenfassung aller Bodenproben. ....	49
Abbildung 26: Zusammenfassung aller Futterproben. ....	50
Abbildung 27: Zusammenfassung aller Kotproben. ....	51
Abbildung 28: Vergleich Richness. ....	53
Abbildung 29: Vergleich Shannon-Index. ....	54
Abbildung 30: Vergleich ENS. ....	55
Abbildung 31: Richness Vergleich Boden-, Futter- und Kotproben. ....	56
Abbildung 32: Shannon-Index Vergleich Boden-, Futter- und Kotproben. ....	57
Abbildung 33: ENS Vergleich Boden-, Futter- und Kotproben. ....	57
Abbildung 34: NMDS-Plot Bakterien. ....	58
Abbildung 35: NMDS-Plot Pilze. ....	59
Abbildung 36: NMDS-Plot Viren. ....	60
Abbildung 37: Vergleich der Richness aller Proben mit der Anzahl der Reads ....	61
Abbildung 38: Vergleich des Shannon-Index aller Proben mit der Anzahl der Reads ....	62
Abbildung 39: Vergleich der ENS aller Proben mit der Anzahl der Reads ....	63
Abbildung 40: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Baumkängurus (Bakterien) ....	77
Abbildung 41: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Bennettkängurus (Bakterien) ....	78
Abbildung 42: (Anhang) Kotprobe des Bürstenschwanzkängurus (Bakterien) ....	78
Abbildung 43: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Flinkwallabys (Bakterien) ....	79
Abbildung 44: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Koalas (Bakterien) ....	79
Abbildung 45: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Östlichen Grauen Riesenkängurus (Bakterien) ....	80
Abbildung 46: (Anhang) Kotprobe des Rattenschwanzkängurus (Bakterien) ....	80
Abbildung 47: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Roten Riesenkängurus (Bakterien) .	81
Abbildung 48: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Sumpfwalabys (Bakterien) ....	81
Abbildung 49: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Tasmanischen Teufel (Bakterien) ....	82
Abbildung 50: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Wombats (Bakterien) ....	82

Abbildung 51: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Baumkängurus (Pilze) .....	83
Abbildung 52: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Bennettkängurus (Pilze).....	84
Abbildung 53: (Anhang) Kotprobe des Bürstenschwanzkängurus (Pilze).....	84
Abbildung 54: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Flinkwallabys (Pilze).....	85
Abbildung 55: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Östlichen grauen Riesenkängurus (Pilze) .....	85
Abbildung 56: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Koalas (Pilze).....	86
Abbildung 57: (Anhang) Kotprobe des Rattenkängurus (Pilze) .....	86
Abbildung 58: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Roten Riesenkängurus (Pilze) .....	87
Abbildung 59: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Sumpfwallabys (Pilze).....	87
Abbildung 60: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Tasmanischen Teufel (Pilze).....	88
Abbildung 61: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Wombats (Pilze).....	88
Abbildung 62: (Anhang) Alle Kotproben der Bennettkängurus zusammen (Viren) .....	89
Abbildung 63: (Anhang) Alle Kotproben der Baumkängurus zusammen (Viren).....	89
Abbildung 64: (Anhang) Kotprobe des Bürstenschwanzkängurus (Viren) .....	90
Abbildung 65: (Anhang) Alle Kotproben der Flinkwallabys zusammen (Viren).....	90
Abbildung 66: (Anhang) Alle Kotproben der Östlichen Grauen Riesenkängurus zusammen (Viren)....	91
Abbildung 67: (Anhang) Alle Kotproben der Koalas zusammen (Viren).....	91
Abbildung 68: (Anhang) Kotprobe des Rattenkängurus (Viren) .....	92
Abbildung 69: (Anhang) Alle Kotproben der Roten Riesenkängurus zusammen (Viren) .....	92
Abbildung 70: (Anhang) Alle Kotproben der Sumpfwallabys zusammen (Viren).....	93
Abbildung 71: (Anhang) Alle Kotproben der Tasmanischen Teufel zusammen (Viren).....	93
Abbildung 72: (Anhang) Alle Kotproben der Wombats zusammen (Viren) .....	94
Abbildung 73: (Anhang) PCoA-Plot Bakterien. ....	94
Abbildung 74: (Anhang) PCoA-Plot Pilze. ....	95
Abbildung 75: (Anhang) PCoA-Plot Viren. ....	95
Abbildung 76: (Anhang) Gesamtreads pro Flongle Flow Cell. ....	96

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsgüter-, Chemikalien- und Geräteliste .....	15
Tabelle 2: Liste der Kotproben .....	16
Tabelle 3: Liste der Futterproben .....	17
Tabelle 4: Liste der Bodenproben .....	17
Tabelle 5: Metadaten mit allen Proben und deren IDs.....	73

## Abkürzungsverzeichnis

ENS = Effective Number of Species

NA = Not Assigned

NMDS = Non-metric Multidimensional Scaling

PCoA = Principal Coordinates Analysis

Die IDs der einzelnen Proben sind nach einem bestimmten Muster gestaltet. Die ersten drei Buchstaben stehen für den Zoo, die folgenden Buchstaben für die Spezies und die Zahl am Ende für die Probennummer.

„BEN“ =	Bennettkänguru	„KOA“ =	Koala
„BKAE“ =	Baumkänguru	„RAT“ =	Rattenkänguru
„BUER“ =	Bürstenschwanzkänguru	„RRK“ =	Rotes Riesenkänguru
„FLK“ =	Flinkwallaby	„SUM“ =	Sumpfwallaby
„GRK“ =	Östl. Graues Riesenkänguru	„WOM“ =	Wombat
„AUG“ =	Augsburg	„MUE“ =	München
„BER“ =	Tierpark Berlin	„KOP“ =	Kopenhagen
„KRE“ =	Krefeld	„SCH“ =	Schwerin
„DUI“ =	Duisburg	„ZUE“ =	Zürich
„LAN“ =	Landau	„HEI“ =	Heidelberg
„NEK“ =	Neunkirchen	„NUR“ =	Nürnberg
„NEU“ =	Neuwied		

Futterproben haben am Ende verschiedene Bezeichnungen, je nach Futterart:

„PEL“ =	Pellets	„GEM“ =	Gemüse	„MUS“ =	Müsli
---------	---------	---------	--------	---------	-------

„GRU“ = Grünfutter                      „HEU“ = Heu                      „STR“ = Stroh

Bodenproben haben am Ende die Bezeichnung „BOD“.

Wird in Grafiken nur die Abkürzung für den Zoo und die Spezies ohne die Nummer verwendet, handelt es sich um die Gesamtwerte aller Tiere dieser Spezies von diesem Zoo. Bei einer Zusammenfassung aller Futterproben für eine Tierart in einem Zoo wird die Endung „FUTTER“ verwendet.

Beispiele:

MUERRK5 = Rotes Riesenkänguru aus München, Proben-Nr. 5

AUGBEN = Alle Bennettkängurus aus Augsburg

NEUGRKMUS = Futterprobe „Müsli“ des Östl. Grauen Riesenkängurus aus Neuwied

LANBENBOD = Bodenprobe aus dem Gehege der Bennettkängurus aus Landau

SCHGRKFUTTER= Alle Futterproben der Östl. Grauen Riesenkängurus aus Schwerin

Eine Ausnahme bilden die Proben aus Duisburg, welche mit „DUI0711“ oder „DUI0811“ beginnen. Hier wurden andere Buchstabenfolgen für die Proben gewählt:

„BENN“ = Bennettkänguru                      „TEUF“ = Tasmanischer Teufel

„KOLA“ = Koala                      „WOMB“ = Wombat

„SUMF“ = Sumpfwallaby                      „PLAN“ = Plantage

Die Proben „Plantage“ beziehen sich auf Eukalyptusblätter, welche an die Koalas aus Duisburg verfüttert werden.

## Abstract

Thanks to the rapid development of the latest next generation sequencing methods, it is now possible to sequence large quantities of genetic material within a very short time and at low cost. This makes it possible to carry out large-scale projects to analyze the metagenome of many different individuals simultaneously. In this study, a total of 124 soil, feed and faecal samples from eleven different Marsupialia species were analyzed and evaluated using nanopore sequencing in order to find out more about the microbiome of these species and to determine which environmental factors can have an influence on it. The evaluation of the results showed clear parallels between the bacterial composition of the feed and fecal samples, as well as overlaps between the mycobiome of the animals and that of the feed and soil samples. Furthermore, differences between the bacterial microbiomes of carnivorous and herbivorous Marsupialia species were found by comparing the different animal species with each other.

## Zusammenfassung

Durch die rasante Entwicklung neuer Next Generation Sequencing-Methoden ist es heutzutage möglich, große Mengen an Erbgut innerhalb kürzester Zeit unter geringem Kostenaufwand zu sequenzieren. Dies ermöglicht es, großflächig angelegte Projekte zur Metagenomanalyse vieler verschiedener Individuen simultan durchzuführen. In dieser Arbeit wurden insgesamt 124 Boden-, Futter- und Kotproben von elf verschiedenen Marsupialia-Arten mittels Nanopore Sequencing analysiert und ausgewertet, um mehr über das Mikrobiom dieser Arten in Erfahrung zu bringen und um herauszufinden, welche Umweltfaktoren auf ebendieses Einfluss nehmen können. Die Auswertung der Ergebnisse zeigte deutliche Übereinstimmungen zwischen der bakteriellen Zusammensetzung der Futter- und Kotproben sowie Überschneidungen des Mykobioms der Tiere mit jenem der Futter- und Bodenproben. Beim Vergleich der verschiedenen Tierarten untereinander konnten des Weiteren Unterschiede zwischen den bakteriellen Mikrobiomen karnivorer und herbivorer Marsupialia-Arten festgestellt werden.

## Einleitung

Das Mikrobiom umfasst die Gesamtheit aller Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze und Archeen aber auch Viren, die einen gemeinsamen Lebensraum besiedeln. Ein solcher Lebensraum für Mikroorganismen kann z.B. der Verdauungstrakt oder die Haut von einem Menschen oder einem Tier sein. In der Regel leben der Wirt und sein Mikrobiom symbiotisch zusammen, sodass die Mikroorganismen von einem geschützten Biotop und Nährstoffen profitieren und den Wirt im Gegenzug dafür bei der Verwertung dieser Nährstoffe unterstützen und ihn vor gewissen Pathogenen oder Toxinen schützen [1]. Die Zusammensetzung und der Zustand des Mikrobioms in Lebewesen wirken sich somit stark auf die körperliche Gesundheit ihres Wirts aus und können dabei sowohl positive als auch negative Einflüsse haben. So können gewisse Mikroorganismen tumorbegünstigende Vorgänge auslösen oder auch inhibieren, wie beispielsweise *Fusobacterium nucleatum* und *Bacteroides fragilis*, die das Risiko für Darmkrebs erhöhen können [2,3]. Demgegenüber konnten Studien zeigen, dass Vertreter der Spezies *Akkermansia muciniphila* und *Bifidobacterium longum* eine gewisse Immunität gegen diese Krebsart liefern können [4]. Der Einflussbereich des Mikrobioms reicht sogar über den Verdauungstrakt hinaus und kann sich auch auf andere Organe wie das Gehirn, Herz und Nieren auswirken [5,6]. Das Mikrobiom eines Lebewesens kann sich im Laufe der Zeit auch verändern, was von Faktoren wie z.B. Ernährung, Alter, Krankheit und Genetik abhängen kann [7]. Auch Medikamente wie Antibiotika oder Cortison können Einfluss auf das Mikrobiom haben [8]. Wenn das Mikrobiom durch Fehlernährung oder, wie oben erwähnt, durch Medikamente oder andere Substanzen in ein Ungleichgewicht gerät und an Biodiversität verliert, spricht man von einer Dysbiose, was einen erheblichen Einfluss auf das Nerven- und Immunsystem haben kann und so neben Krebs auch entzündliche Erkrankungen begünstigt [9].

Dysbiosen können neben Krankheitsursache auch Symptom einer Krankheit sein, was sie für die Diagnostik interessant werden lässt. Durch diesen Umstand rückt die Mikrobiombestimmung und damit auch Next Generation Sequencing, in ein neues Licht und dient bereits heute in der Humanmedizin als wichtiges Werkzeug zur Früherkennung von Krankheiten und Risiken. Somit lassen sich bereits im Voraus Präventivmaßnahmen ergreifen, um das Risiko einer späteren Erkrankung zu minimieren [10].

Next Generation Sequencing-Methoden lösten die Sanger-Sequenzierung ab, bei der die DNS-Sequenz des zu untersuchenden Organismus äußerst Zeit- und Arbeitsintensiv aus vielen kleinen DNS-Fragmenten zusammengesetzt und analysiert werden musste. Im Gegensatz dazu kann mit den neuen Verfahren der Next Generation Sequencing, wie z.B. Illumina oder Ion Torrent sogar mehrere Genome parallel innerhalb weniger Stunden sequenziert werden, was mit der veralteten Sanger-

Sequenzierungs-Methode zum Teil Jahre gedauert hätte [11]. Durch diese Zeitersparnis fielen auch die Kosten für derartige Genom-Analysen, was sie für ein breiteres Anwendungsspektrum, wie z.B. Mikrobiombestimmungen, zum Einsatz kommen ließ. In dieser Arbeit wird die Nanopore Technology als Sequenzierungsmethode verwendet. Das Funktionsprinzip dieser Methode besteht darin, dass die zu sequenzierenden DNS-Abschnitte mithilfe eines Adapterproteins an einer Pore innerhalb einer Membran fixiert werden. Diese DNS-Abschnitte werden anschließend durch die Pore geführt, an der kontinuierlich mittels Elektroden das elektrische Potential gemessen wird. Dieses Potential ändert sich je nachdem, welche Nukleinbase der DNS-Sequenz in diesem Moment die Pore passiert, was durch die Elektroden registriert und an den Computer weitergegeben wird. Dieser Vorgang wiederholt sich für jedes weitere DNS-Fragment immer wieder an bis zu mehreren hundert Poren gleichzeitig [12]. Aus den so erhaltenen Daten lässt sich dann die genaue Sequenz der Fragmente ermitteln und z.B. mit verschiedenen Datenbanken abgleichen, um die Identität des Organismus zu ermitteln, von dem das DNS-Fragment stammt. Auf diese Weise lassen sich nicht nur viele Organismen gleichzeitig identifizieren, wie es für ein Mikrobiombestimmung notwendig ist, sondern auch deren phylogenetischen Beziehungen zueinander ermitteln [6].

Die Bestimmung des Mikrobioms eines Organismus kann dazu beitragen, die Beziehung zwischen Wirt und Mikroorganismen genauer zu charakterisieren, um den Einfluss ebendieser auf die Entwicklung und Gesundheit des Wirts besser zu verstehen. Zudem kann es neue Erkenntnisse darüber bringen, wie Mikroorganismen zur Pathophysiologie von Krankheiten beitragen und somit bei der Entwicklung neuer therapeutischer und diagnostischer Methoden helfen [6].

Seit dem Aufkommen der Next Generation Sequencing-Methoden wurde immer mehr in dieser Richtung geforscht und ist heute ein fester Bestandteil der wissenschaftlichen Forschungsgebiete geworden. Bisher lag das Hauptaugenmerk jedoch auf dem bakteriellen Mikrobiom, während das Mykobiom weniger Beachtung erfuhr [13]. Das sogenannte Mykobiom ist ein Teilbereich des Mikrobioms und umfasst die darin lebenden Pilzarten. Zu diesen Teilbereichen gehört beispielsweise auch das Viriome, welches die Viren eines Mikrobioms in sich zusammenfasst. Das Mykobiom macht beim Menschen nur einen kleinen Teil des Mikrobioms aus, spielt jedoch trotzdem eine wichtige Rolle bei der Homeostase und hängt ebenso wie das bakterielle Mikrobiom von Umweltfaktoren ab, wie z.B. Ernährung oder Medikamente sowie vom Körpergewicht, Geschlecht oder Alter [14]. Ebenso kann eine Dysbiose des Mykobioms Störungen des Immunsystems nach sich ziehen sowie gewisse Krankheitsbilder von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hervorrufen [15].

In diesem Kontext wird die Relevanz weiterer Untersuchungen des Mykobioms im Speziellen, aber auch des Virioms klar ersichtlich. Allerdings sind diesbezüglich immer noch viele Tierarten ungenügend erforscht und es zeigt sich, dass die Priorität für solche Forschungen bisher eher auf dem Menschen

und auf Nutztieren lag. Auch die Mikroorganismen selbst, die im Menschen oder Nutztieren vorkommen, sind deutlich besser erforscht und katalogisiert als jene, die aus den Mikrobiomen von weniger erforschten Tieren stammen [13]. Dieser Umstand zeigt sich deutlich in Datenbanken, für die immer noch viele DNS-Sequenzen unbekannt sind und keinem Mikroorganismus zugeordnet werden können.

In der vorliegenden Arbeit sollen einige dieser weniger erforschten Aspekte genauer betrachtet werden, indem bei den untersuchten Marsupialia-Arten auch ein besonderes Augenmerk auf deren Mykobiom und Viriom gelegt wird. Außerdem sollen die Einflüsse von Umweltfaktoren wie Ernährung und Umgebung auf das Mikrobiom dieser Marsupialia-Arten genauer untersucht werden. Dies geschieht durch Vergleiche zwischen Futter- und Bodenproben aus dem Gehege der entsprechenden Tiere mit deren Kotproben. Erkenntnisse aus dieser Forschung könnten in Zukunft dabei helfen, Krankheiten und Dysbiosen dieser Tierarten zu erkennen und besser zu verstehen, um diese besser diagnostizieren und behandeln zu können. Zudem könnten die Ergebnisse der hier untersuchten Tiere zu einer artgerechten Haltung in Tiergehegen beitragen und für den Artenschutz in freier Wildbahn von Bedeutung sein.

## Material & Methoden

### Chemikalien- und Geräteliste

Die nachfolgende Tabelle 1 enthält die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsgüter, Chemikalien und Laborgeräte.

Tabelle 1: Verbrauchsgüter-, Chemikalien- und Geräteliste

Verbrauchsgüter			
Name	ID/Modell	Hersteller	Unternehmenssitz
Flongle Sequencing Expansion	EXP-FSE001	Oxford Nanopore Technologies	UK
Rapid PCR Barcoding Kit	SQK-RPB004	Oxford Nanopore Technologies	UK
Rapid Barcoding Kit	SQK-RBK004	Oxford Nanopore Technologies	UK
Flongle Flow Cell, Pk.1	FLO-FLG001	Oxford Nanopore Technologies	UK
QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit	Cat. No. 51804	Quiagen	Niederlande
DNeasy Plant Mini Kit	Cat. No. 69104	Quiagen	Niederlande

Chemikalien			
Name	ID/Modell	Hersteller	Unternehmenssitz
Trizma hydrochloride solution (1M)	T3038-1L	Merck	USA
1X dsDNA BR Working Soution	Q33231	Thermo Fisher Scientific	USA
Qubit 1X dsDNA BR Standard	Q33263	Thermo Fisher Scientific	USA

Laborgeräte			
Name	ID/Modell	Hersteller	Unternehmenssitz
Vortex Mixer	BV1000	Benchmark Scientific	USA
my FUGE Mini Centrifuge	C1008-B	Benchmark Scientific	USA
High Speed Microcentrifuge	C1612-E	Benchmark Scientific	USA
my BLOCK Mini Dry Bath	BSH200	Benchmark Scientific	USA
Feinwaage	ABS 80-4	Kern & Sohn	Deutschland
Qubit 4 Fluorometer	Q33226	Thermo Fisher Scientific	USA
Wippschüttler	444-0145	VWR International	USA
PCR Thermocycler	Biometra Tone 96G	Analytik Jena	Deutschland
MinION Mk1B	MIN-101B	Oxford Nanopore Technologies	UK

## Boden-, Futter- und Kotproben

Die in dieser Arbeit verwendeten Kotproben stammen von insgesamt elf Spezies innerhalb der Gruppe der Beuteltiere aus dreizehn verschiedenen Zoos in Deutschland, Dänemark und der Schweiz. Zusätzlich wurden aus einigen dieser Zoos auch Futterproben von drei Tierarten, sowie Bodenproben von zwei Tierarten gesammelt. Die Gesamtzahl der Proben setzt sich zusammen aus 125 Kot-, 16 Futter- und fünf Bodenproben, die von Tierärzten und -pflegern aus den Gehegen der entsprechenden Tiere gesammelt wurden. Die ungleiche Verteilung der Probenzahl zwischen den verschiedenen Spezies liegt größtenteils an deren Verfügbarkeit. So sind beispielsweise rote Riesenkängurus deutlich häufiger in europäischen Zoos anzutreffen als Tasmanische Teufel [16]. Auch technische Aspekte spielen eine Rolle, da im speziellen Fall des Rattenkängurus dessen Kot aufgrund seiner Größe und der dichten Bepflanzung der Gehege nur schwer zu finden ist.

Die Proben wurden in sterilen Kunststoffröhrchen gesammelt und unter Aufrechterhaltung einer Kühlkette transportiert und gelagert. Eine genaue Auflistung aller Proben ist in den nachfolgenden Tabellen 2, 3 und 4 zu sehen.

*Tabelle 2: Liste der Kotproben*

Kotproben		
Spezies	Anzahl	Zoo
Baumkänguru	7	Krefeld
Baumkänguru	11	Tierpark Berlin
Bennettkänguru	2	Augsburg
Bennettkänguru	2	Duisburg
Bennettkänguru	1	Landau
Bennettkänguru	5	Neunkirchen
Bennettkänguru	4	Neuwied
Bürstenschwanzkänguru	1	Duisburg
Flinkwallaby	9	München
Östliches Graues Riesenkänguru	6	Kopenhagen
Östliches Graues Riesenkänguru	9	Krefeld
Östliches Graues Riesenkänguru	4	Neuwied
Östliches Graues Riesenkänguru	8	Schwerin
Koala	6	Duisburg
Koala	3	Zürich
Rattenkänguru	1	Kopenhagen
Rotes Riesenkänguru	6	Heidelberg
Rotes Riesenkänguru	10	München
Rotes Riesenkänguru	10	Nürnberg

Sumpfwallaby	2	Duisburg
Sumpfwallaby	4	München
Tasmanischer Teufel	2	Duisburg
Wombat	4	Duisburg
Wombat	8	Kopenhagen

Tabelle 3: Liste der Futterproben

Futterproben		
Spezies	Anzahl	Zoo
Bennettkänguru	2	Augsburg
Bennettkänguru	3	Landau
Bennettkänguru	1	Neunkirchen
Bennettkänguru	2	Neuwied
Östliches Graues Riesenkänguru	3	Neuwied
Östliches Graues Riesenkänguru	3	Schwerin
Koala	2	Duisburg

Tabelle 4: Liste der Bodenproben

Bodenproben		
Spezies	Anzahl	Zoo
Bennettkänguru	1	Augsburg
Bennettkänguru	1	Landau
Bennettkänguru	1	Neuwied
Östliches Graues Riesenkänguru	1	Neuwied
Östliches Graues Riesenkänguru	1	Schwerin

## DNS-Extraktion und Barcoding

Die DNS-Extraktion wurde mithilfe der Extraktionskits QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit und DNeasy Plant Mini Kit der Firma Quiagen durchgeführt, die im Nachfolgenden der Übersicht wegen als Fecal- bzw. Plant-Kit aufgeführt werden. Da die Futterproben größtenteils pflanzlichen Ursprungs sind, wurde für diese das Plant-Kit verwendet, während für die Kot- und Bodenproben das Fecal-Kit verwendet wurde.

Für die Extraktion mittels Fecal-Kit werden verschiedene Lösungen und spezielle Tubes benötigt, die alle im Lieferumfang des Kits enthalten sind. Zunächst wurden 200 bis 250 mg aus der jeweiligen Kot- bzw. Bodenprobe entnommen und in ein separates PowerBead Pro Tube gegeben, mit Lösung CD1

versetzt und mehrere Minuten lang auf einem Vortex Mixer geschüttelt, um die Zellen zu lysieren. Anschließend wurden die Proben abzentrifugiert und mit Lösung CD2 gemischt, die etwaige PCR-Inhibitoren entfernen soll. Nach Zugabe von Lösung CD3 konnten die Proben auf MB Spin Columns geladen und deren DNS nach dem Waschen mit den Lösungen EA und C5 mithilfe von Lösung C6 eluiert werden.

Auch beim Plant-Kit sind alle nachfolgenden Lösungen und Utensilien abgesehen von Mörser und Stößel im Lieferumfang des Kits enthalten. Zunächst wurden alle Futterpellets im Mörser zerkleinert, mit Pufferlösung AP1 und RNase A versetzt und anschließend einige Minuten bei 65 °C inkubiert. Bei Futterproben, die aus Gras, Heu, Stroh oder Gemüse bestanden, wurde der Zerkleinerungsschritt mit dem Mörser ausgelassen und das Pflanzenmaterial direkt mit den beiden Lösungen inkubiert. Nach der Zugabe von Pufferlösung P3 und einem Inkubationsschritt auf Eis wurden die Proben in QIAshredder spin columns transferiert und zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben mit Lösung AW1 versetzt und in DNeasy Mini spin columns pipettiert. Nach zwei Waschvorgängen mit Lösung AW2 konnte die fertig extrahierte DNS aus den Pflanzenproben mit dem Elutionspuffer AE eluiert werden.

Abschließend wurde die DNS-Konzentration mit Hilfe des Qubit 4 Fluorometers gemessen.

Die genauen Protokolle mit allen Arbeitsschritten und den exakten Zeit- und Maßangaben des Fecal- und des Plant-Kits sind auf der Firmenwebseite von Quiagen abrufbar [17,18].

Ausgenommen von diesem Extraktionsverfahren sind alle Kot- und Futterproben aus Duisburg, deren ID mit „DUI0811“ bzw. „DUI0711“ beginnt. Deren DNS wurde bereits zuvor von einem externen Anbieter extrahiert.

Nach der DNS-Extraktion wurde den Genfragmenten aus insgesamt acht Proben ein spezifischer Barcode mit Hilfe des Rapid Barcoding Kits angehängt. Somit ließen sich im weiteren Verlauf immer acht Proben gleichzeitig auf der Flongle Flow Cell analysieren und sie anhand ihres spezifischen Barcodes auseinanderhalten. Hierfür wurden zunächst die Template DNS und der jeweilige Rapid Barcode im PCR Thermocycler miteinander verbunden. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurden die Proben mit magnetischen AMPure XP Beads versetzt, auf einem Wippschüttler gemischt und über einem Magneten mehrmals mit Ethanollösung gewaschen. Nach Resuspension der AMPure XP Beads wurden die DNS-Fragmente mit einem Elutionspuffer von den Beads gelöst und mit Rapid Adapter RAP versetzt, welcher im späteren Verlauf bei der Sequenzierung an die Poren in der Membran der Flongle Flow Cell bindet.

Einige Proben, insbesondere die Futterproben, wiesen einen zu geringen DNS-Gehalt auf, um mit der Sequenzierung fortzufahren. Diese Proben wurden zunächst erneut extrahiert und im Falle des Fortbestehens einer zu niedrigen DNS-Konzentration mit dem Rapid PCR Barcoding Kit

weiterverarbeitet, um die DNS zu amplifizieren. Die Anzahl der Zyklen im PCR Thermocycler für die jeweilige Probe sind im Anhang der Tabelle 5 zu entnehmen.

Das Protokoll für das Rapid PCR Barcoding Kit ist dem oben beschriebenen Rapid Barcoding Kit sehr ähnlich, mit dem großen Unterschied, dass die DNS-Fragmente zunächst im PCR Thermocycler amplifiziert werden.

Die genauen Protokolle des Rapid Barcoding Kits und des Rapid PCR Barcoding Kits sind auf der Firmenwebseite von Oxford Nanopore Technologies zu finden [19,20]. Lediglich die Zyklenzahl im PCR-Kit wurde für diesen Versuchsaufbau, wie oben bereits erwähnt, abgeändert.

## Sequenzierung

Vor Beginn der Sequenzierung wird die Flongle Flow Cell über einen Adapter in den MinION eingelegt und mit dem Computer verbunden. Über die Software MinKNOW muss anschließend ein Flow Cell-Check durchgeführt werden, welcher die Verfügbarkeit und Funktion der Poren innerhalb der Flongle Flow Cell prüft. Die Firma Oxford Nanopore Technologies garantiert für mindestens 50 funktionsfähige Poren. Sollte diese Zahl unterschritten werden, tritt der Garantiefall ein und der Preis der Flow Cell wird rückerstattet.

Während des Flow Cell-Checks wurden Flush Buffer und der Sequencing Buffer, der die insgesamt acht Proben mit den unterschiedlichen Barcodes enthält, angesetzt. Nach einem bestandenen Flow Cell-Checks wurde dann zunächst der Flush Buffer und anschließend der Sequencing Buffer in die Flongle Flow Cell pipettiert, ohne Luftblasen in das System zu bringen. Abschließend wurde die Sequenzierung über die Schaltfläche in der Software MinKNOW gestartet und lief in der Regel über Nacht.

## Datenverarbeitung

Nachdem die extrahierte und aufbereitete DNS die Flongle Flow Cell passiert hat und die Messung abgeschlossen ist, können die hieraus gewonnenen Daten weiterverarbeitet und ausgewertet werden. Da das Programm auch Ordner für Barcodes anlegt, die nicht im Experiment verwendet werden, müssen diese zunächst gelöscht werden. Anschließend lässt sich mit dem nachfolgenden Befehl in den entsprechenden Elternorder navigieren, in dem ab jetzt alle weiteren Schritte zur Datenverarbeitung stattfinden.

```
cd ~/Schreibtisch/master_jan_nicole/Auswertung_450length/
```

Nun können mithilfe der untenstehenden Schleife gleich mehrere Arbeitsschritte hintereinander automatisch ausgeführt werden. Zuerst wird mit `for i in $(ls -I unclassified)` in alle Unterordner, außer „unclassified“, navigiert, da diese jeweils eine der acht verschiedenen Proben

enthalten und nach dem entsprechenden Barcode benannt sind. Der Inhalt dieser Ordner wird zusammengefasst und erhält die Endung `fastq.gz`, was es dem Programm ermöglicht, die daraus entstandenen Dateien mit `gzip` zu entpacken. Mit dem Befehl `porechop` werden die Barcode-Adapter von den DNS-Sequenzen getrennt, sodass nur noch die eigentliche Sequenz des entsprechenden Reads übrigbleibt. `NanoFilt` filtert alle Reads heraus, deren Länge eine vorher festgelegte Anzahl an Basenpaaren unterschreitet, oder deren Qualityscore unter einem gewissen Level ist. In diesem Fall wird mit `-l 450 -q 6` die Mindestlänge auf 450 Basenpaare und der Qualityscore auf 6 gesetzt. Um diese Parameter sinnvoll zu wählen, können mit dem Befehl `NanoPlot` Grafiken von den gefilterten und ungefilterten Reads erstellt werden. Reads unter einer gewissen Länge können aufgrund dessen nämlich nicht mehr eindeutig einem einzelnen Organismus zugeordnet werden. Anschließend wird das Dateiformat der Reads mit `seqtk` von `fastq` zu `fasta` geändert, um diese mit den Datenbanken von `Kraken2` und `Kaiju` abgleichen zu können. `Kraken2` beinhaltet die Datenbanken `bacteria` und `archaea_viral_protozoa_fungi`, die jeweils die entsprechenden Organismen hinterlegt haben. Daraus resultieren die Output-Dateien mit der Endung `kraken-out_bac` für die Bakterien und `kraken-out_vir_fun` für Viren und Pilze. `Kaiju` enthält die Datenbanken `kaiju_db_nr.fmi`, `kaiju_db_fungi.fmi` und `kaiju_db_viruses.fmi`, welche jeweils die Einträge für Bakterien, Pilze oder Viren enthalten. Nach Abgleich der Reads mit diesen Datenbanken werden die Output-Dateien mit den Endungen `kaiju-out_bac`, `kaiju-out_fun` und `kaiju-out_vir` ausgegeben. Die Anzahl der zu verwendenden Prozessorkerne wird bei `Kraken2` mittels `--threads` bzw. bei `Kaiju` mittels `-z` auf 15 gesetzt.

Nun können die jeweiligen Output-Dateien aus `Kraken2` und `Kaiju` zusammengefügt werden. Dies geschieht mit dem Befehl `kaiju-mergeOutputs`, nachdem sie durch `sort -k2,2` nach ihren Namen sortiert wurden. Das genaue Verfahren der Zusammenführung wird mit `-c` definiert. In diesem Fall ist hier der Wert „2“ angegeben, welcher angibt, dass die Taxon-Identifizierung der zweiten Datei übernommen wird, die hinter `-j` steht. Im Zuge dieser Arbeit wurde die Taxon-Identifizierung von `Kaiju` angewandt. Die entsprechenden Output-Dateien sind die zusammengefügten Listen mit den Endungen `combined_bac.out`, `combined_fun.out` und `combined_vir.out`. Die Option `-v` am Ende ermöglicht die Ausgabe von weiteren Zusatzinformationen wie `Readname`, `NCBI Taxon-Identifizierung`, `Länge` und `Score` der besten Übereinstimmungen mit der Datenbank sowie den allgemeinen Vermerk „C“ oder „U“ für „classified“ oder „unclassified“.

```
for i in $(ls -I unclassified); do cat ./${i}/* > ${i}.fastq; mv  
${i}.fastq ${i}.fastq.gz; gzip -d ${i}.fastq.gz; porechop -i  
${i}.fastq -o ${i}.fastq_trim; NanoFilt ${i}.fastq_trim -l 450 -q 6
```

```
> ${i}_filt.fastq; NanoPlot --fastq ${i}.fastq --N50 -o
${i}.fastq_nanoplot; NanoPlot --fastq ${i}_filt.fastq --N50 -o
${i}_filt.fastq_nanoplot; seqtk seq -a ${i}_filt.fastq >
${i}_filt.fastq.fasta; ~/Schreibtisch/nanopore/kraken2/./kraken2 --
db ~/Schreibtisch/nanopore/kraken2/bacteria/ --threads 15 --report
${i}_filt.fastq.fasta_kreport_bac ${i}_filt.fastq.fasta >
${i}_filt.fastq.fasta_kraken-out_bac;
~/Schreibtisch/nanopore/kraken2/./kraken2 --db
~/Schreibtisch/nanopore/kraken2/archaea_viral_protozoa_fungi/ --
threads 15 --report ${i}_filt.fastq.fasta_kreport_vir_fun
${i}_filt.fastq.fasta > ${i}_filt.fastq.fasta_kraken-out_vir_fun;
~/Schreibtisch/nanopore/kaiju-v1.9.0-linux-x86_64/./kaiju -z 15 -t
~/Schreibtisch/nanopore/kaiju-v1.9.0-linux-x86_64/nodes.dmp -f
~/Schreibtisch/nanopore/kaiju-v1.9.0-linux-x86_64/nr/kaiju_db_nr.fmi
-i ${i}_filt.fastq.fasta -o ${i}_filt.fastq.fasta_kaiju-out_bac;
~/Schreibtisch/nanopore/kaiju-v1.9.0-linux-x86_64/./kaiju -z 15 -t
~/Schreibtisch/nanopore/kaiju-v1.9.0-linux-x86_64/nodes.dmp -f
~/Schreibtisch/nanopore/kaiju-v1.9.0-linux-
x86_64/fungi/kaiju_db_fungi.fmi -i ${i}_filt.fastq.fasta -o
${i}_filt.fastq.fasta_kaiju-out_fun; ~/Schreibtisch/nanopore/kaiju-
v1.9.0-linux-x86_64/./kaiju -z 15 -t ~/Schreibtisch/nanopore/kaiju-
v1.9.0-linux-x86_64/nodes.dmp -f ~/Schreibtisch/nanopore/kaiju-
v1.9.0-linux-x86_64/viruses/kaiju_db_viruses.fmi -i
${i}_filt.fastq.fasta -o ${i}_filt.fastq.fasta_kaiju-out_vir;
~/Schreibtisch/nanopore/kaiju-v1.9.0-linux-x86_64/./kaiju-
mergeOutputs -i <(sort -k2,2 ${i}_filt.fastq.fasta_kraken-
out_vir_fun) -j <(sort -k2,2 ${i}_filt.fastq.fasta_kaiju-out_vir) -o
${i}_combined_vir.out -c 2 -v; ~/Schreibtisch/nanopore/kaiju-v1.9.0-
linux-x86_64/./kaiju-mergeOutputs -i <(sort -k2,2
${i}_filt.fastq.fasta_kraken-out_vir_fun) -j <(sort -k2,2
${i}_filt.fastq.fasta_kaiju-out_fun) -o ${i}_combined_fun.out -c 2 -
v; ~/Schreibtisch/nanopore/kaiju-v1.9.0-linux-x86_64/./kaiju-
mergeOutputs -i <(sort -k2,2 ${i}_filt.fastq.fasta_kraken-out_bac) -
j <(sort -k2,2 ${i}_filt.fastq.fasta_kaiju-out_bac) -o
${i}_combined_bac.out -c 2 -v; done
```

Nach dem Zusammenführen der Daten werden nun mit der Funktion `kaiju2table` die Output-Dateien zu einer Tabelle zusammengefasst und hierin die Namen in Abhängigkeit vom ausgewählten Taxon zugeordnet. Hierfür benötigt es die Dateien `nodes.dmp` und `names.dmp`, die bei den Optionen `-t` und `-n` angegeben werden. Das taxonomische Level wird mit der Option `-r` auf „family“ gesetzt und mit `-l` lassen sich weitere taxonomische Level in der Tabelle anzeigen, die in diesem Fall „superkingdom“ und „family“ sind. Diese Befehlsschleife wird jeweils für Bakterien, Pilze und Viren angewandt, mit dem Unterschied, dass bei dem Befehl für die Viren noch die Option `-e` angegeben wird, damit auch die Taxonomielevel unterhalb von „superkingdom“ angezeigt werden.

```
for x in *combined*bac.out; do ~/Schreibtisch/nanopore/kaiju-v1.9.0-
linux-x86_64/./kaiju2table -t ~/Schreibtisch/nanopore/kaiju-v1.9.0-
linux-x86_64/nodes.dmp -n ~/Schreibtisch/nanopore/kaiju-v1.9.0-
linux-x86_64/names.dmp -r family -l superkingdom,family -o
${x}_summary.tsv ${x}; done && for x in *combined*fun*; do
~/Schreibtisch/nanopore/kaiju-v1.9.0-linux-x86_64/./kaiju2table -t
~/Schreibtisch/nanopore/kaiju-v1.9.0-linux-x86_64/nodes.dmp -n
~/Schreibtisch/nanopore/kaiju-v1.9.0-linux-x86_64/names.dmp -r
family -l kingdom,family -o ${x}_summary.tsv ${x}; done && for x in
*combined*vir*; do ~/Schreibtisch/nanopore/kaiju-v1.9.0-linux-
x86_64/./kaiju2table -t ~/Schreibtisch/nanopore/kaiju-v1.9.0-linux-
x86_64/nodes.dmp -n ~/Schreibtisch/nanopore/kaiju-v1.9.0-linux-
x86_64/names.dmp -r family -l superkingdom,family -e -o
${x}_summary.tsv ${x}; done
```

Im nachfolgenden Abschnitt werden die Überschriften mit dem Befehl `tail` entfernt und unter der Endung `_ohne` gespeichert. Im Anschluss werden all diese neu benannten Dateien mittels `cat` zusammengefügt und unter den Namen `all_samples_bac`, `all_samples_fun` und `all_samples_vir` gespeichert. Abschließend werden alle Dateien mit der Endung `_ohne` ordnungshalber gelöscht.

```
for x in *bac*summary*; do tail -n +2 ${x} > ${x}_ohne; done && cat
*bac*_ohne > all_samples_bac && rm *bac*_ohne && for x in
*fun*summary*; do tail -n +2 ${x} > ${x}_ohne; done && cat
*fun*_ohne > all_samples_fun && rm *fun*_ohne && for x in
*vir*summary*; do tail -n +2 ${x} > ${x}_ohne; done && cat
*vir*_ohne > all_samples_vir && rm *vir*_ohne
```

In diesem Schritt wird zunächst mit dem Befehl `echo` eine neue Datei mit dem Inhalt `"file\tpercent\treads\ttaxom_ID\tsuperkingdom\tname"` erstellt. `\t` drückt

Tabstops aus, sodass „file“, „percent“ usw. getrennt und später in Microsoft Excel in unterschiedliche Zellen eingetragen werden. Diese neu erstellte Datei wird `header.tsv` genannt und anschließend mittels `cat` mit jeweils `all_samples_bac`, `all_samples_fun` und `all_samples_vir` zusammengefügt, um so die Überschriften überall einzufügen. Diese neuen Dateien werden mittels `$(basename "$(dirname "$(dirname "$PWD)")")").tsv` benannt. Dies bewirkt, dass die jeweilige Datei den Namen des dritten Überordners als Namensendung erhält, um bei großen Datenmengen und Verschiedenen Sequenzierungsdurchgängen die Übersichtlichkeit zu bewahren.

```
echo -e "file\tpercent\treads\ttaxom_ID\tsuperkingdom\tname" >
header.tsv && cat header.tsv all_samples_vir > vir_final_$(basename
"$(dirname "$(dirname "$(dirname "$PWD)")")").tsv && rm header.tsv
&& echo -e "file\tpercent\treads\ttaxom_ID\tsuperkingdom\tname" >
header.tsv && cat header.tsv all_samples_bac > bac_final_$(basename
"$(dirname "$(dirname "$(dirname "$PWD)")")").tsv && rm header.tsv
&& echo -e "file\tpercent\treads\ttaxom_ID\tkingdom\tname" >
header.tsv && cat header.tsv all_samples_fun > fun_final_$(basename
"$(dirname "$(dirname "$(dirname "$PWD)")")").tsv && rm header.tsv
```

Abschließend werden alle so erhaltenen Ergebnisse mit dem Befehl `mv` in einem einzigen gemeinsamen Ordner abgespeichert.

```
mv *final_$(basename "$(dirname "$(dirname "$(dirname
"$PWD)")")").tsv
~/Schreibtisch/master_jan_nicole/Auswertung_450length/kaiju-kraken
```

## Software

- Kaiju (Version 1.9.0)
- Zusatzinhalte:
  - `kaiju_db_nr.fmi`
  - `kaiju_db_fungi.fmi`
  - `kaiju_db_viruses.fmi`

Die Software Kaiju wandelt DNS-Sequenzen in Proteinsequenzen um und gleicht diese dann mit ihren Datenbanken ab, um sie einem Taxon zuzuordnen.

- Kraken2 (Januar 2023)
- Zusatzinhalte:
  - `Bacteria`

- archaea\_viral\_protozoa\_fungi

Das Programm Kraken2 vergleicht die DNS-Sequenzen direkt mit ihren Datenbanken, indem es die Nukleinbasen in Gruppen (k-mers) einteilt, um sie schneller abgleichen zu können.

- Krona (Version 2.8.1)

Die Anwendung Krona aus dem KronaTools-Paket wurde verwendet um die Sunburst-Diagramme für die viralen Mikrobiome zu erstellen, da so einzelne Spezies besser im Zusammenhang mit ihrer Familienzugehörigkeit dargestellt werden können als in Barplot-Diagrammen, die z.B. für das bakterielle Mikrobiom oder das Mykobiom herangezogen wurden.

- Microsoft Excel (Microsoft Office Home and Student 2016)

Das Standardrechenprogramm Excel von Microsoft wurde für jegliche Form der Rohdatenformatierung herangezogen sowie für Tabellen und die Grafiken für die Korrelation zwischen Readzahlen und Richness/Shannon-Index/ENS.

- MinKNOW (Version 5.2.13)

Das Programm MinKNOW bildet die Schnittstelle zwischen dem Output der Flongle Flow Cell und dem angeschlossenen Computer.

- R (Version 4.3.1)

Zusatzinhalte:

- library(readxl)
- library(tidyr)
- library(ggplot2)
- library(dplyr)
- library(entropy)
- library(tidyverse)
- library(reshape2)
- library(dunn.test)
- library(vegan)
- library(phyloseq)

R ist eine Software für statistische Berechnungen und Grafiken. In dieser Arbeit wurden die Barplots und die Boxplots der Alpha-Diversität, sowie die NMDS- und PCoA-Plots der Beta-Diversität mit R erstellt. Auch alle statistischen Berechnungen wurden mit diesem Programm ausgeführt.

## Ergebnisse

### Alpha-Diversität

Die Alpha-Diversität gibt die Artenvielfalt in einem bestimmten Lebensraum an, indem sie die Anzahl der unterschiedlichen Spezies beschreibt. In diesem Fall ist der betrachtete Lebensraum der Verdauungstrakt der verschiedenen Tiere, bzw. der Boden des Tiergeheges oder die Oberfläche der Futterprobe. Die Abundanz der Individuen innerhalb einer Spezies wird in der Alpha-Diversität nicht berücksichtigt. In diesem Abschnitt wird die Alpha-Diversität der Tierarten untereinander und mit jener aus ihrer Nahrung und Umgebung verglichen.

#### Mikrobiom Bakterien

Die Abundanz der in den Barplots gezeigten Familien wurde anhand der Anzahl ihrer Reads quantitativ ermittelt und in den Grafiken in Prozent angegeben.

Abbildung 1 zeigt den Vergleich des bakteriellen Mikrobioms von Futter-, Boden- und Kotproben der Bennettkängurus aus Augsburg. Am Auffälligsten ist hier die Gemeinsamkeit zwischen den Futter- und Kotproben bezüglich der hohen Abundanz von Vertretern der Clostridiaceae (27,10% Futter, 23,09% Kot) und Lachnospiraceae (28,52% Futter, 28,67% Kot). Dieses Muster zeigt sich ebenfalls in allen nachfolgenden Vergleichen (siehe Abbildungen 2-7) in unterschiedlich starker Ausprägung. Des Weiteren finden sich auch Vertreter der Familien Bacteroidaceae (1,62% Futter, 7,35% Kot), Erysipelotrichaceae (1,12% Futter, 3,63% Kot), Peptostreptococcaceae (12,04% Futter, 2,10% Kot), Ruminococcaceae (1,10% Futter, 12,02% Kot) und Streptococcaceae (1,42% Futter, 1,00% Kot) sowohl in den Futter- als auch in den Kotproben. Vertreter der Familie Bacillaceae (0,48% Futter, 2,39% Kot, 2,63% Boden) lassen sich in Futter-, Boden- und Kotproben nachweisen.

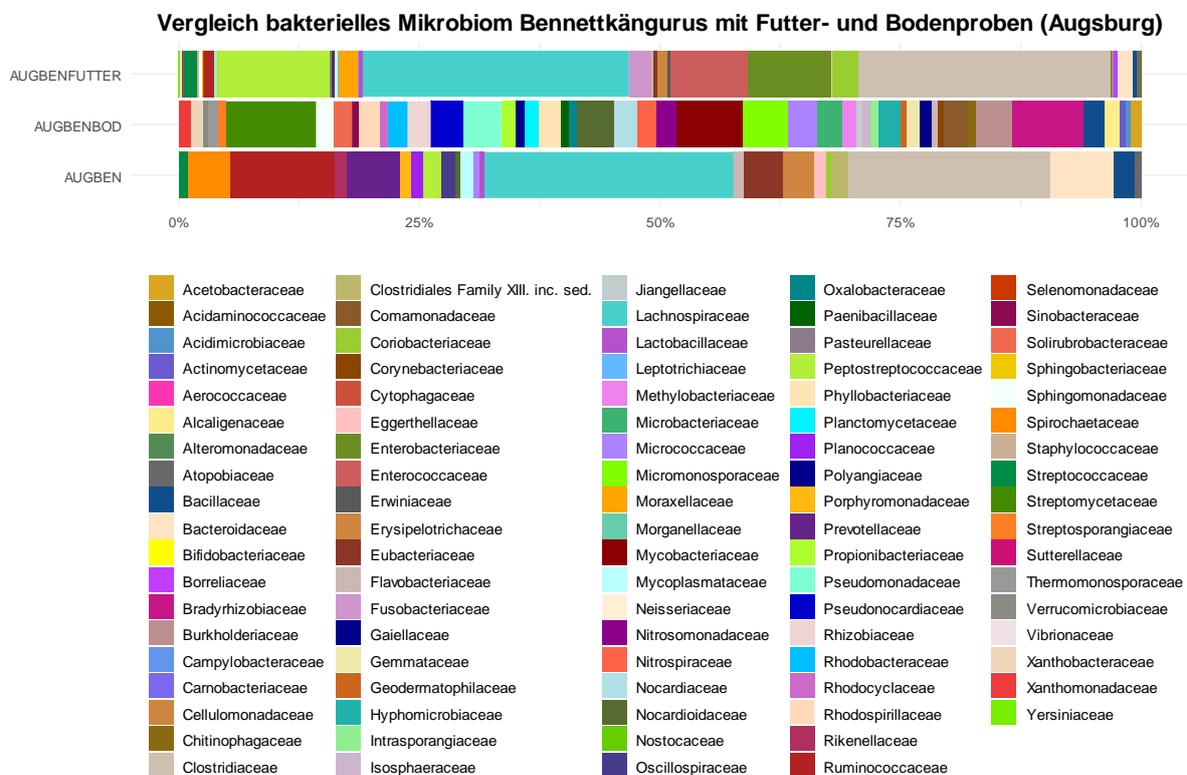


Abbildung 1: Gegenüberstellung der Futter-, Boden- und Kotproben der Bennettkängurus aus Augsburg. Futterproben (n = 2), Bodenprobe (n = 1), Kotproben (n = 2)

Die Gegenüberstellung der Proben der Bennettkängurus aus Landau (siehe Abbildung 2) zeigt wieder eine große Ähnlichkeit zwischen Futter- und Kotproben. Auch hier sind Vertreter der Familien Clostridiaceae (28,59% Futter, 15,32% Kot) und Lachnospiraceae (28% Futter, 26,45% Kot) am häufigsten anzutreffen. Weitere Familien, die sowohl in Futter- als auch Kotproben vorkommen sind Bacteroidaceae (1,73% Futter, 3,63% Kot), Enterobacteriaceae (7,4% Futter, 1,06% Kot), Enterococcaceae (7,3% Futter, 1,52% Kot), Erysipelotrichaceae (1,29% Futter, 3,13% Kot) und Moraxellaceae (2,13% Futter, 6,62% Kot). Bacillaceae (4,92% Kot, 3,81% Boden) und Comamonadaceae (2,39% Kot, 4,81% Boden) sind die gemeinsamen Familien der Kot- und Bodenproben.

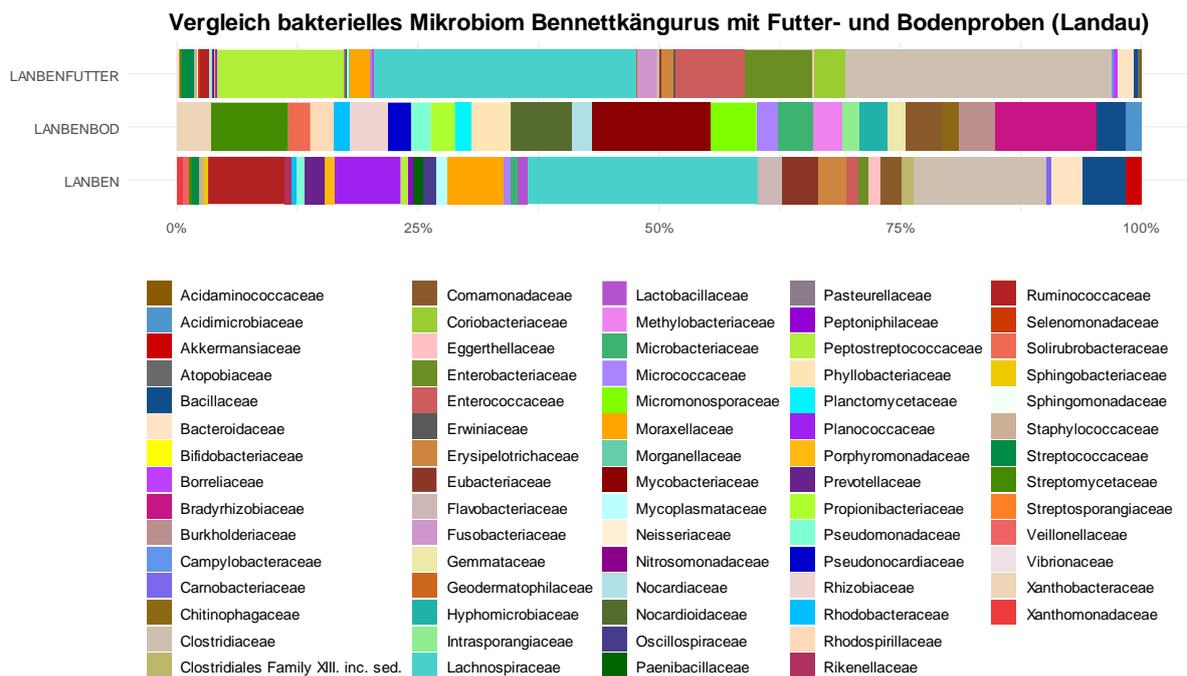


Abbildung 2: Gegenüberstellung der Futter-, Boden- und Kotproben der Bennettkängurus aus Landau. Futterproben (n = 3), Bodenprobe (n = 1), Kotproben (n = 1)

Auch im Vergleich der Futter-, Kot- und Bodenproben der Bennettkängurus aus Neuwied (Siehe Abbildung 3) sind Vertreter der Clostridiaceae (28,5% Futter, 16,66% Kot) und Lachnospiraceae (28,57% Futter, 20,73% Kot) am häufigsten vertreten. Vertreter der Familien Bacteroidaceae (1,36% Futter, 10,42% Kot), Enterobacteriaceae (10,58% Futter, 7,38% Kot), Enterococcaceae (4,21% Futter, 3,24% Kot), Erysipelotrichaceae (1,12% Futter, 1,91% Kot) und Peptostreptococcaceae (13,41% Futter, 2,79% Kot) sind sowohl in Futter- als auch Kotproben in geringerem Maße vertreten. Die einzige Familie, die beiderseits in Kot- und Bodenproben vertreten ist, sind Spezies der Bacillaceae (3,09% Kot, 1,51% Boden).

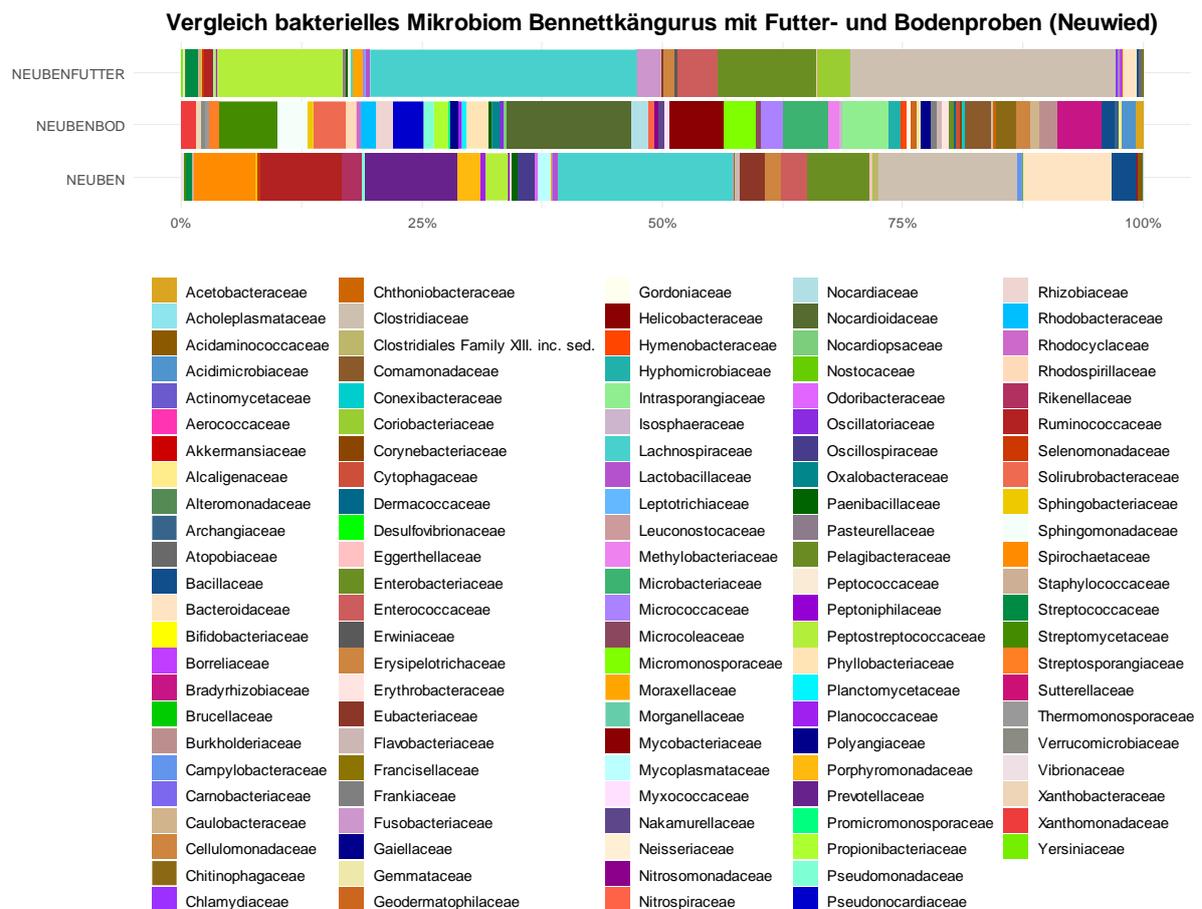


Abbildung 3: Gegenüberstellung der Futter-, Boden- und Kotproben der Bennettkängurus aus Neuwied. Futterproben (n = 2), Bodenprobe (n = 1), Kotproben (n = 4)

Die Proben der Östlichen Grauen Riesenkängurus aus Neuwied (Abbildung 4) zeigen abermals die größte Ähnlichkeit zwischen Futter- und Kotproben in Bezug auf die Abundanz von Vertretern der Familien Clostridiaceae (28,53% Futter, 19,58% Kot) und Lachnospiraceae (30,3% Futter, 28,21% Kot), gefolgt von Bacteroidaceae (1,59% Futter, 14,06% Kot), Enterococcaceae (6,02% Futter, 3,81% Kot), Erysipelotrichaceae (1,18% Futter, 2,83% Kot), Peptostreptococcaceae (12,76% Futter, 2,04% Kot), Ruminococcaceae (1,01% Futter, 10,9% Kot) und Streptococcaceae (1,17% Futter, 1,25% Kot). Micrococcaceae (5,52% Kot, 2,24% Boden) kommen sowohl in Kot- als auch in Bodenproben vor.

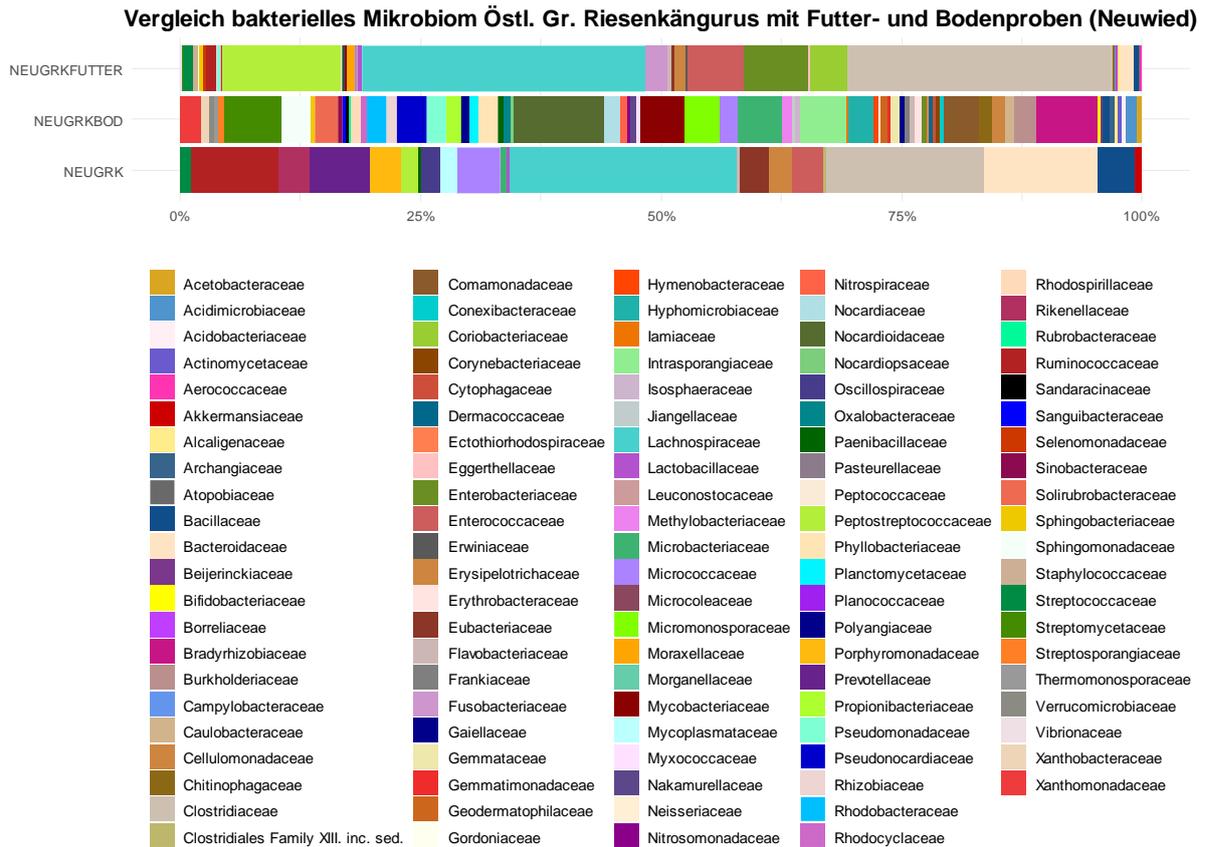


Abbildung 4: Gegenüberstellung der Futter-, Boden- und Kotproben der Östlichen Grauen Riesenkängurus aus Neuwied. Futterproben (n = 3), Bodenprobe (n = 1), Kotproben (n = 4)

Bei Betrachtung der Futter- und Kotproben der Östlichen Grauen Riesenkängurus aus Schwerin (Abbildung 5) zeichnen sich wieder die Familien Clostridiaceae (20,46% Futter, 22,39% Kot) und Lachnospiraceae (18,98% Futter, 36,63% Kot, 1,13% Boden) durch ihre hohe Abundanz in den beiden Probenarten aus, wobei letztere auch in der Bodenprobe vorhanden sind. Weitere gemeinsame Familien sind Erysipelotrichaceae (1,2% Futter, 3,87% Kot), Peptostreptococcaceae (10,06% Futter, 1,07% Kot) und Streptococcaceae (1,08% Futter, 4,34% Kot). Bacillaceae (1,06% Futter, 1,82% Kot, 6,06% Boden) kommen in allen drei Probenarten vor, wie auch bei den Bennettkängurus aus Augsburg (siehe Abbildung 1).

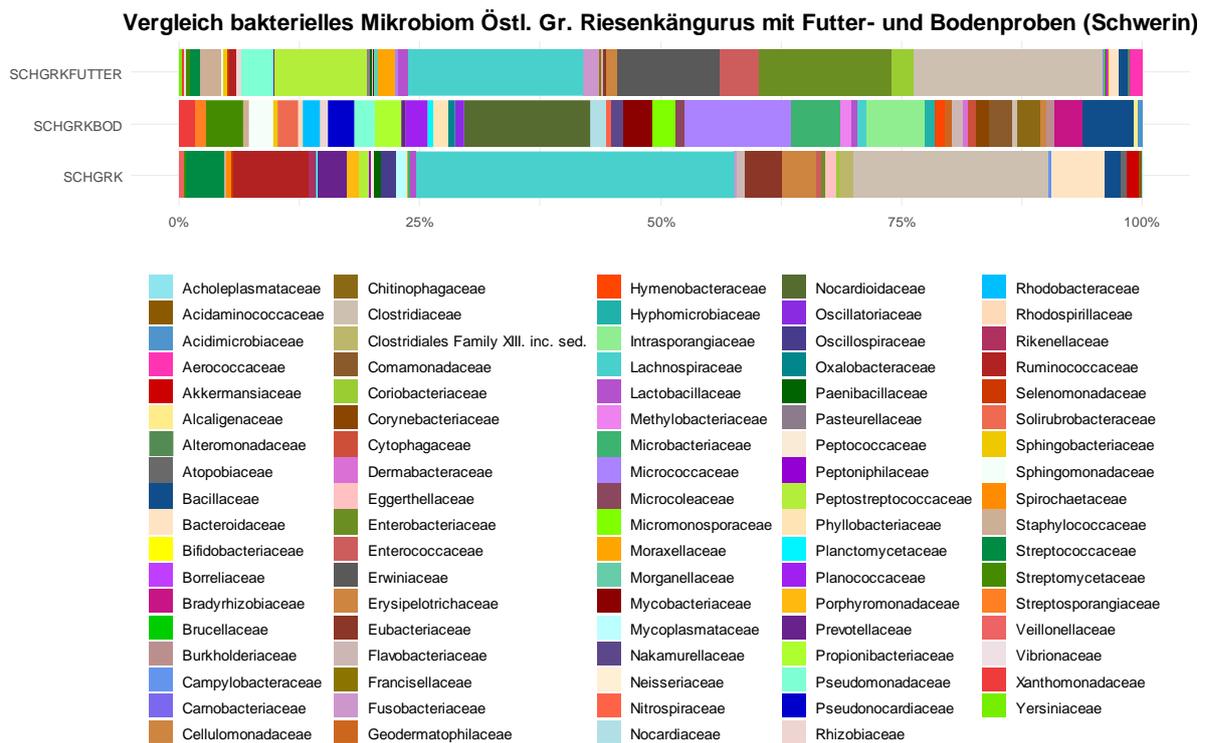


Abbildung 5: Gegenüberstellung der Futter-, Boden- und Kotproben der Östlichen Grauen Riesenkängurus aus Schwerin. Futterproben (n = 3), Bodenprobe (n = 1), Kotproben (n = 8)

Der Vergleich zwischen den Futter- und Kotproben der Koalas aus Duisburg (Abbildung 6) zeigt ebenfalls Vertreter von Clostridiaceae (17,34% Futter, 7,67% Kot) und Lachnospiraceae (1,51% Futter, 19,17% Kot) in beiden Probenarten, wenn auch diesmal nicht als die größten Familien. Weitere Familien, die in beiden Probenarten vorkommen sind Bacteroidaceae (2,14% Futter, 77,32% Kot), Flavobacteriaceae (14,95% Futter, 1,43% Kot) und Staphylococcaceae (5,53% Futter, 4,18% Kot).

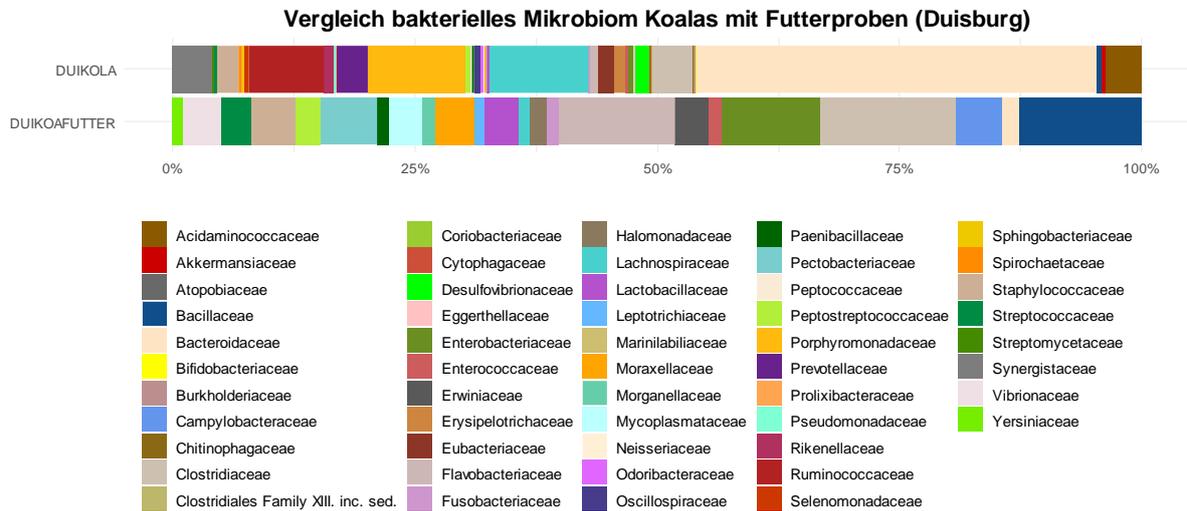


Abbildung 6: Gegenüberstellung der Futter- und Kotproben der Koalas aus Duisburg. Futterproben (n = 2), Kotproben (n = 6)

Die Futter- und Kotproben der Bennettkängurus aus Neunkirchen (Abbildung 7) zeigen wieder eine größere Abundanz von Clostridiaceae (24,23% Futter, 14,72% Kot) und Lachnospiraceae (32,16% Futter, 13,59% Kot). Bacteroidaceae (2,26% Futter, 5,6% Kot) und Ruminococcaceae (1,32% Futter, 8,73% Kot) sind weitere gemeinsame Bakterienfamilien.

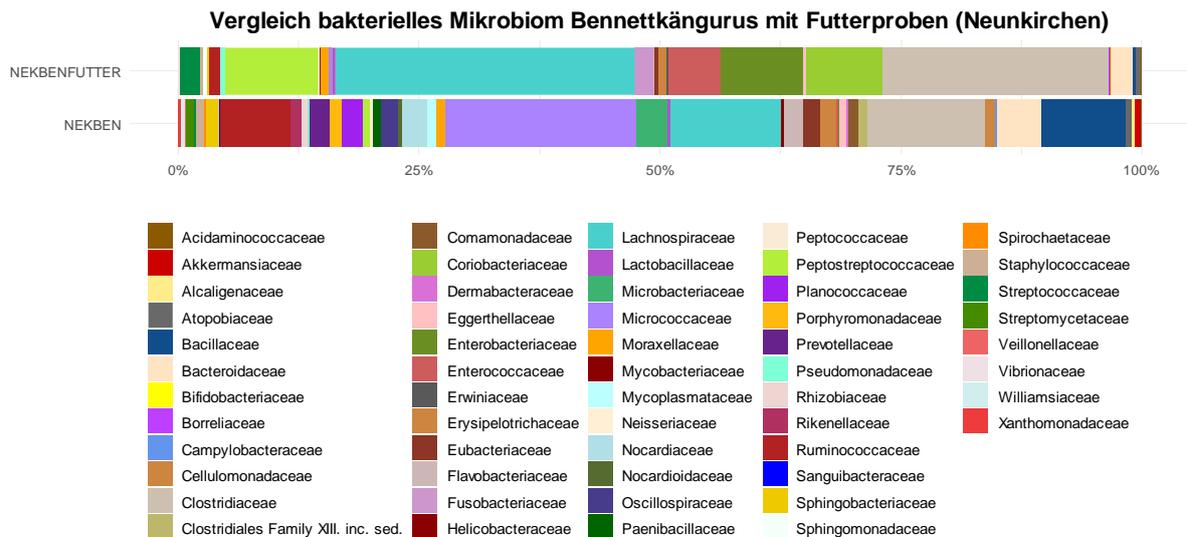


Abbildung 7: Gegenüberstellung der Futter- und Kotproben der Bennettkängurus aus Neunkirchen. Futterproben (n = 1), Kotproben (n = 5)

Mikrobiom Pilze

Im Vergleich der Mykobiome in den Futter-, Boden- und Kotproben der Bennettkängurus aus Augsburg (Abbildung 8) lassen sich Vertreter der Familien Aspergillaceae (8,27% Futter, 37,5% Kot, 17,28% Boden), Glomeraceae (1,4% Futter, 18,75% Kot, 6,17% Boden) und Saccharomycetaceae (6,46% Futter, 43,75% Kot, 4,94% Boden) in allen drei Probenarten nachweisen. Die einzige Pilzfamilie, die allein in Futter- und Kotproben nachweisbar ist, ist Pichiaceae (1,5% Futter, 18,75% Kot).

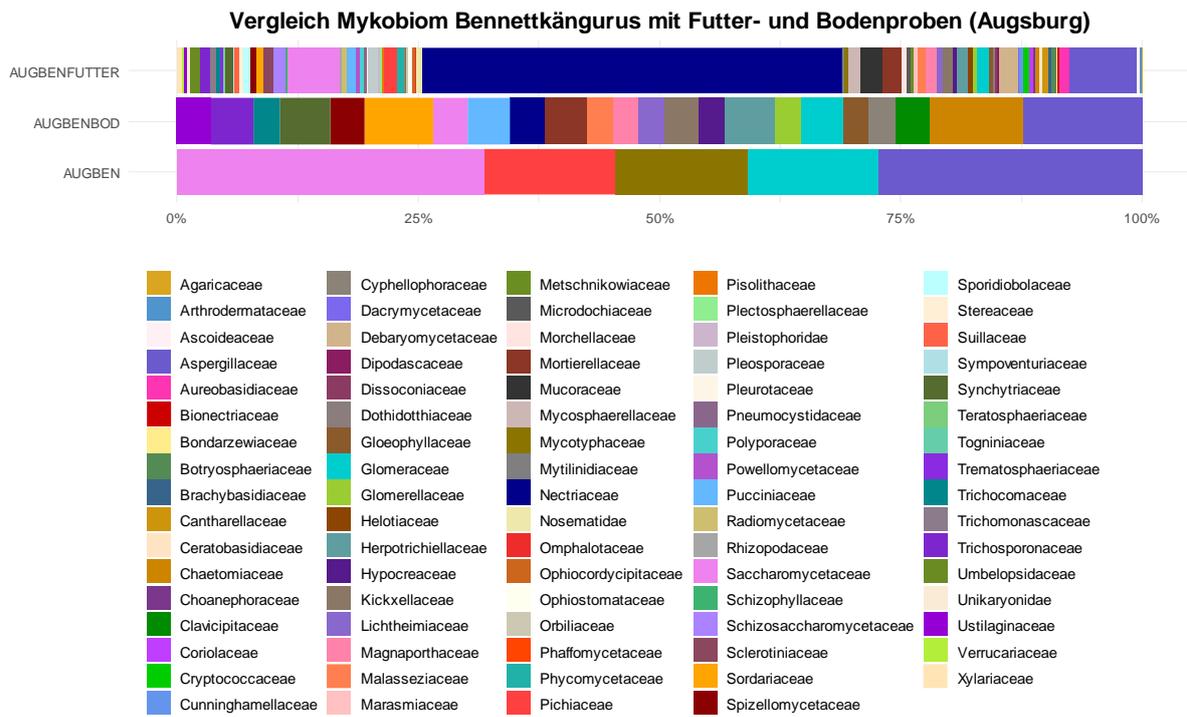


Abbildung 8: Gegenüberstellung der Futter-, Boden- und Kotproben der Bennettkängurus aus Augsburg. Futterproben (n = 2), Bodenprobe (n = 1), Kotproben (n = 2)

Abbildung 9 zeigt den Vergleich von Proben der Bennettkängurus aus Landau. Vertreter der Familien Aspergillaceae (10,13% Futter, 9,23% Kot, 13,95% Boden), Magnaporthaceae (1,63% Futter, 6,15% Kot, 6,98% Boden), Mortierellaceae (2,49% Futter, 7,69% Kot, 6,98% Boden), Saccharomycetaceae (7,36% Futter, 26,15% Kot, 9,3% Boden) und Sordariaceae (1,91% Futter, 6,15% Kot, 6,98% Boden) sind in allen drei Probenarten anzutreffen. In den Futter- und Kotproben sind Cryptococcaceae (1,82% Futter, 4,62% Kot), Debaryomycetaceae (3,25% Futter, 6,15% Kot), Pucciniaceae (1,05% Futter, 6,15% Kot) und Schizosaccharomycetaceae (1,82% Futter, 10,77% Kot)nachweisbar. Die Familien Glomeraceae (6,15% Kot, 9,3% Boden) und Ustilaginaceae (6,15% Kot, 6,98% Boden) sind sowohl in den Boden- als auch in den Kotproben nachweisbar.

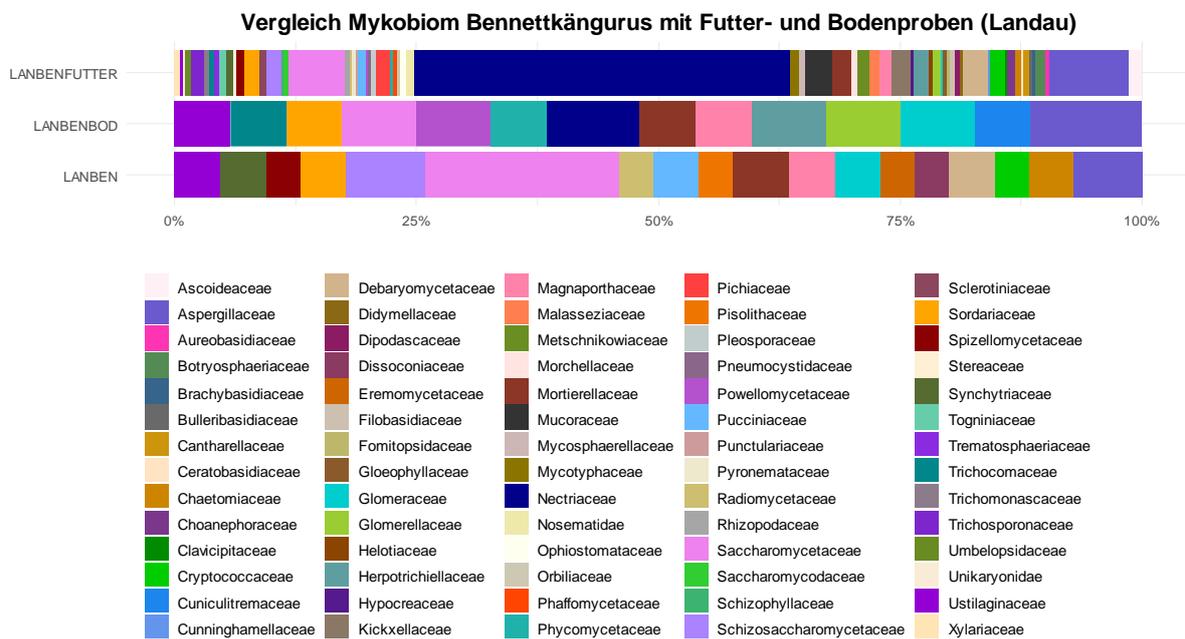


Abbildung 9: Gegenüberstellung der Futter-, Boden- und Kotproben der Bennettkängurus aus Landau. Futterproben (n = 3), Bodenprobe (n = 1), Kotproben (n = 1)

In der Gegenüberstellung der Futter-, Boden- und Kotproben der Bennettkängurus aus Neuwied (Abbildung 10) sind Aspergillaceae (3,16% Futter, 15,5% Kot, 11,33% Boden) und Saccharomycetaceae (2,91% Futter, 17,34% Kot, 8% Boden) ebenfalls wieder in allen Probenarten vertreten, sowie Debaryomycetaceae (1,24% Futter, 9,23% Kot, 4% Boden), Herpotrichiellaceae (1,42% Futter, 4,06% Kot, 9,33% Boden) und Nectriaceae (77,79% Futter, 1,48% Kot, 4,67% Boden). Zu den Familien, die jeweils in den Kot- und Bodenproben zu finden sind, gehören Chaetomiaceae (1,11% Kot, 5,33% Boden), Corioloraceae (1,11% Kot, 2,67% Boden), Cryptococcaceae (2,95% Kot, 2% Boden), Glomeraceae (4,06% Kot, 3,33% Boden), Glomerellaceae (1,85% Kot, 6,67% Boden), Kickxellaceae (6,64% Kot, 3,33% Boden), Mortierellaceae (5,9% Kot, 4,67% Boden), Mycosphaerellaceae (2,21% Kot, 2% Boden), Pleosporaceae (2,21% Kot, 4% Boden), Powellomycetaceae (1,48% Kot, 4% Boden), Sordariaceae (6,27% Kot, 6,67% Boden), Sporidiobolaceae (2,95% Kot, 2,67% Boden), Synchytriaceae (2,21% Kot, 6% Boden), Trichocomaceae (2,21% Kot, 4% Boden), Trichosporonaceae (1,11% Kot, 6% Boden), Umbelopsidaceae (5,17% Kot, 2,67% Boden) und Ustilaginaceae (1,48% Kot, 2,67% Boden).

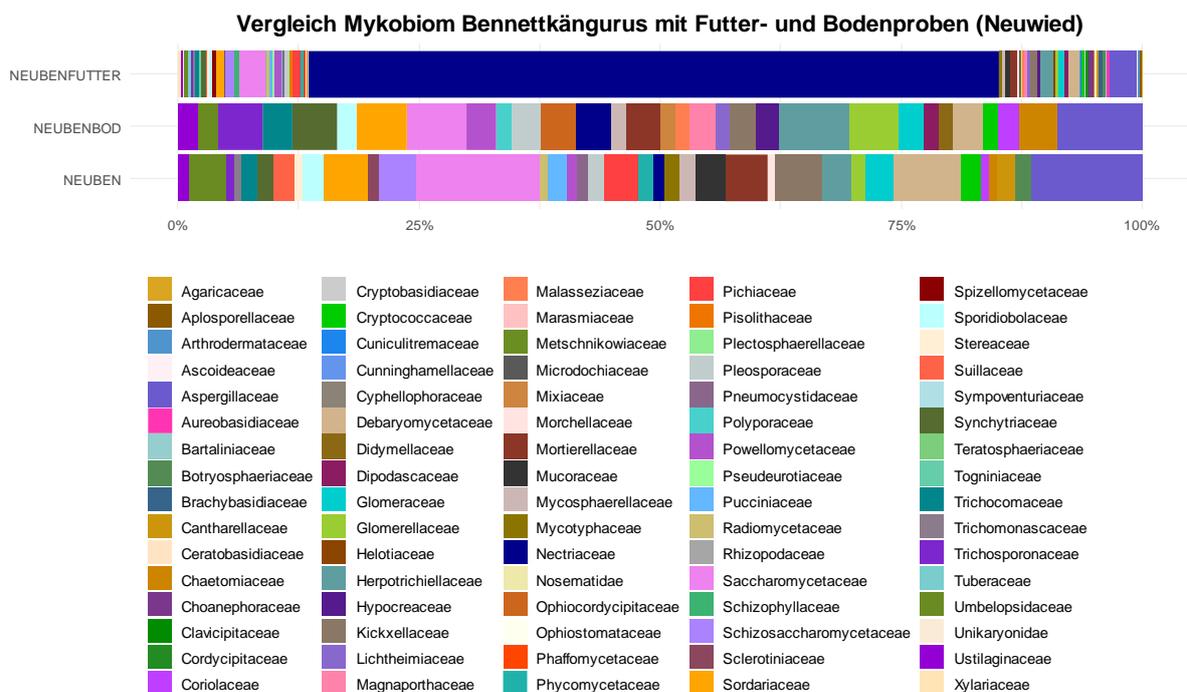


Abbildung 10: Gegenüberstellung der Futter-, Boden- und Kotproben der Bennettkängurus aus Neuwied. Futterproben (n = 2), Bodenprobe (n = 1), Kotproben (n = 4)

Im Vergleich zwischen den drei Probenarten der Östlichen Grauen Riesenkängurus aus Neuwied (siehe Abbildung 11) fällt zunächst der große Anteil an Sordariaceae in den Kotproben auf. Dies liegt an der Probe NEUGRK4, welche 126 Reads dieser Familie enthält, während die übrigen drei Kotproben lediglich null bis vier Reads von Sordariaceae enthalten. Vertreter der Familien Aspergillaceae (12,23% Futter, 7,02% Kot, 14,39% Boden), Debaryomycetaceae (3,13% Futter, 2,34% Kot, 3,79% Boden), Herpotrichiellaceae (1,99% Futter, 1,75% Kot, 12,12% Boden), Mortierellaceae (1,99% Futter, 1,75% Kot, 3,79% Boden), Mycosphaerellaceae (2,75% Futter, 1,75% Kot, 3,03% Boden), Saccharomycetaceae (6,35% Futter, 5,85% Kot, 6,82% Boden) und Sordariaceae (1,8% Futter, 76,02% Kot, 2,27% Boden) lassen sich in Futter-, Boden- und Kotproben nachweisen, während sich Morchellaceae (1,04% Futter, 1,75% Kot) und Mucoraceae (1,9% Futter, 2,34% Kot) nur in Futter- und Kotproben nachweisen lassen. Vertreter der Familien Chaetomiaceae (2,34% Kot, 4,55% Boden), Pseudeurotiaceae (3,51% Kot, 3,03% Boden) und Trichocomaceae (1,75% Kot, 3,79% Boden) lassen sich sowohl in Kot- als auch Bodenproben nachweisen.

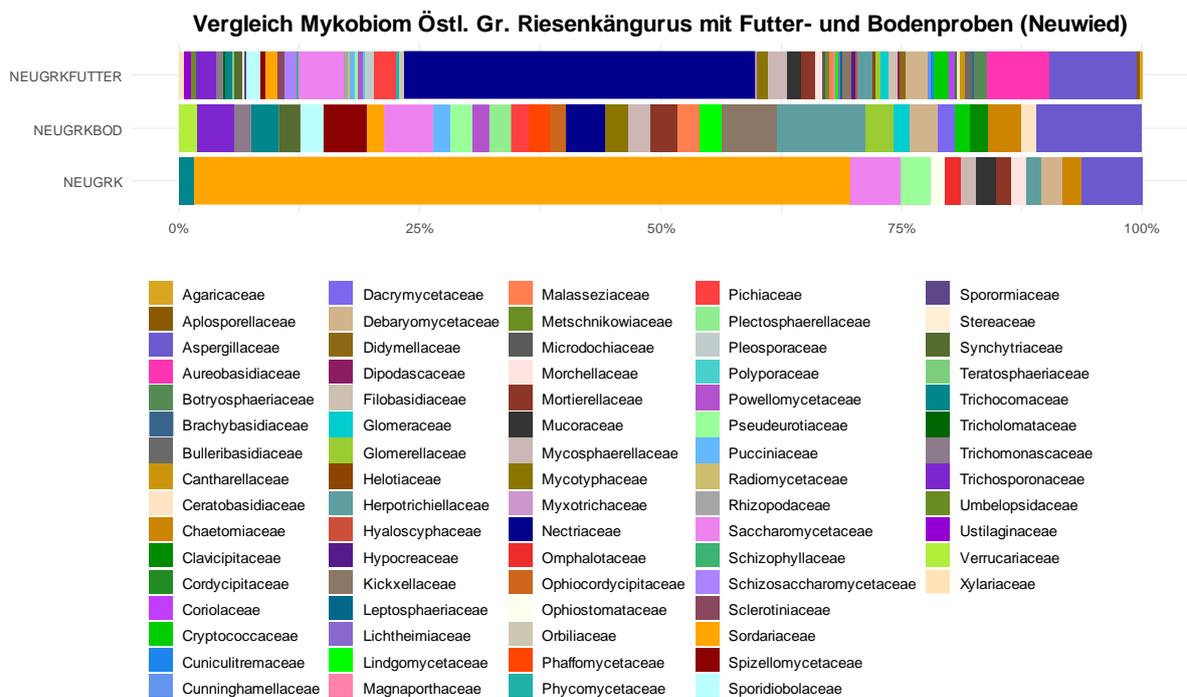


Abbildung 11: Gegenüberstellung der Futter-, Boden- und Kotproben der Östlichen Grauen Riesenkängurus aus Neuwied. Futterproben (n = 3), Bodenprobe (n = 1), Kotproben (n = 4)

Abbildung 12 zeigt den Vergleich unter den Proben der Östlichen Grauen Riesenkängurus aus Schwerin. Hier treten die Familien Aspergillaceae (10,72% Futter, 16,19% Kot, 12,5% Boden), Chaetomiaceae (1,09% Futter, 1,08% Kot, 5% Boden), Cryptococcaceae (1,98% Futter, 1,44% Kot, 5% Boden), Debaryomycetaceae (2,18% Futter, 5,76% Kot, 6,25% Boden), Glomerellaceae (1,43% Futter, 1,08% Kot, 7,5% Boden), Nectriaceae (66,14% Futter, 2,16% Kot, 7,5% Boden), Saccharomycetaceae (3,62% Futter, 26,62% Kot, 6,25% Boden) und Sordariaceae (1,5% Futter, 3,6% Kot, 8,75% Boden) in allen gezeigten Probenarten auf. Die Familien Morchellaceae (1,57% Futter, 1,08% Kot), Mortierellaceae (1,16% Futter, 5,4% Kot), Mucoraceae (1,23% Futter, 1,08% Kot), Pichiaceae (1,09% Futter, 10,07% Kot) und Trichocomaceae (1,09% Futter, 1,08% Kot) sind gemeinsam in Futter- und Kotproben anzutreffen. Gemeinsam in den Kot- und Bodenproben sind Vertreter der Familien Botryosphaeriaceae (1,08% Kot, 3,75% Boden), Herpotrichiellaceae (1,08% Kot, 10% Boden), Kickxellaceae (8,63% Kot, 5% Boden), Magnaporthaceae (1,08% Kot, 3,75% Boden), Synchytriaceae (4,32% Kot, 5% Boden), Umbelopsidaceae (3,96% Kot, 3,75% Boden), Ustilaginaceae (1,44% Kot, 5% Boden) und Xylariaceae (1,08% Kot, 3,75% Boden) zu finden.

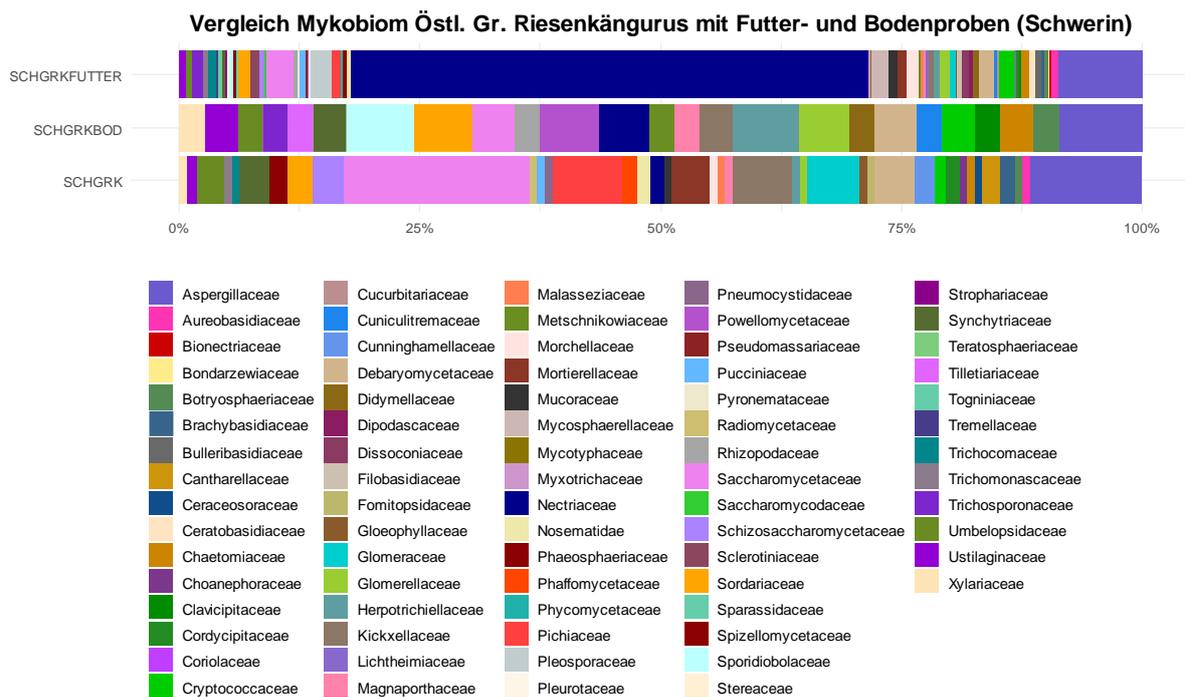


Abbildung 12: Gegenüberstellung der Futter-, Boden- und Kotproben der Östlichen Grauen Riesenkängurus aus Schwerin. Futterproben (n = 3), Bodenprobe (n = 1), Kotproben (n = 8)

Die Futter- und Kotproben der Koalas aus Duisburg (Abbildung 13) weisen beide Vertreter der Familien Aspergillaceae (13,97% Futter, 15,79% Kot), Chaetomiaceae (8,09% Futter, 4,31% Kot), Debaryomycetaceae (14,71% Futter, 6,46% Kot), Glomerellaceae (7,35% Futter, 3,59% Kot), Magnaporthaceae (5,15% Futter, 2,63% Kot), Mortierellaceae (2,57% Futter, 6,94% Kot), Mycosphaerellaceae (2,94% Futter, 3,11% Kot), Nectriaceae (14,34% Futter, 10,53% Kot), Phycomycetaceae (1,1% Futter, 1,67% Kot), Pichiaceae (1,1% Futter, 3,83% Kot), Saccharomycetaceae (30,88% Futter, 15,07% Kot), Schizosaccharomycetaceae (1,84% Futter, 5,98% Kot), Sordariaceae (5,51% Futter, 3,83% Kot), Synchytriaceae (1,84% Futter, 5,02% Kot) und Trichocomaceae (1,84% Futter, 1,44% Kot) auf.

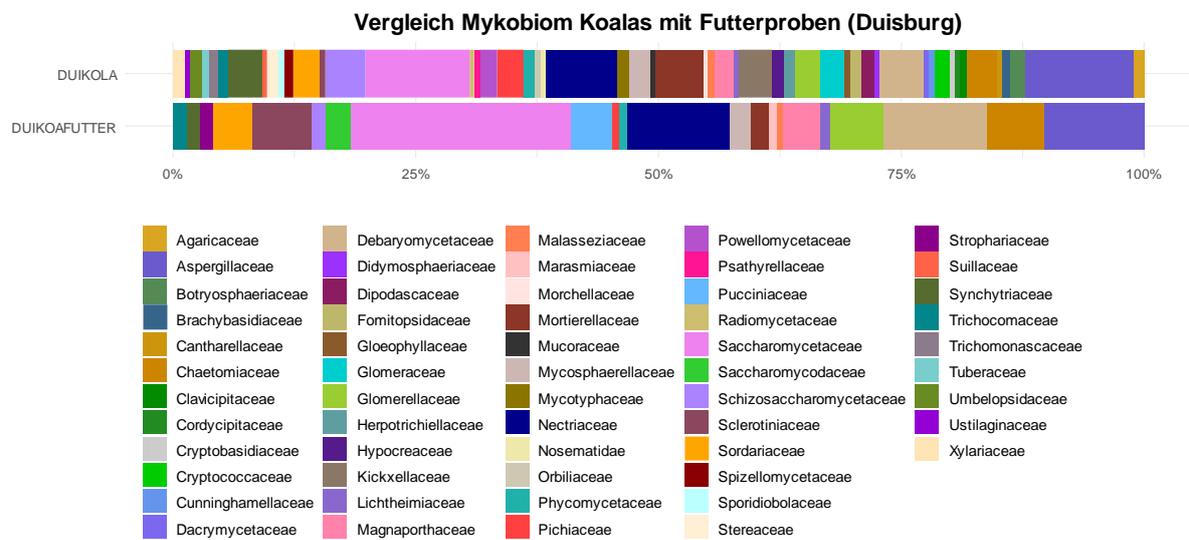


Abbildung 13: Gegenüberstellung der Futter- und Kotproben der Koalas aus Duisburg. Futterproben (n = 2), Kotproben (n = 6)

Der Vergleich zwischen den Futter- und Kotproben der Bennettkängurus aus Neunkirchen (Abbildung 14) zeigt Übereinstimmungen bezüglich der Familien Aspergillaceae (8,28% Futter, 6,38% Kot), Debaryomycetaceae (3,31% Futter, 7,45% Kot), Glomerellaceae (1,32% Futter, 2,13% Kot), Herpotrichiellaceae (3,15% Futter, 2,84% Kot), Kickxellaceae (1,99% Futter, 2,48% Kot), Malasseziaceae (1,32% Futter, 1,42% Kot), Mucoraceae (1,66% Futter, 1,06% Kot), Nectriaceae (59,93% Futter, 2,48% Kot), Pichiaceae (2,48% Futter, 1,06% Kot), Saccharomycetaceae (4,47% Futter, 9,57% Kot), Schizosaccharomycetaceae (2,81% Futter, 3,9% Kot), Spizellomycetaceae (1,49% Futter, 1,77% Kot) und Trichosporonaceae (1,32% Futter, 1,42% Kot).

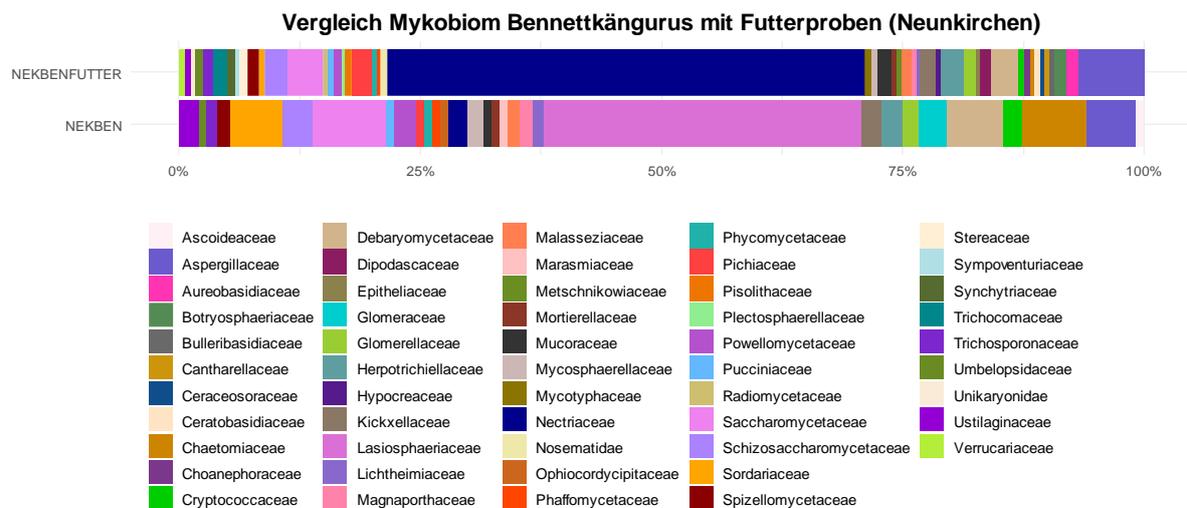


Abbildung 14: Gegenüberstellung der Futter- und Kotproben der Bennettkängurus aus Neunkirchen. Futterproben (n = 1), Kotproben (n = 5)

## Mikrobiom Viren

Die Nachfolgenden Abbildungen zeigen die durchschnittlichen viralen Mikrobiome der unten genannten Tiere mit den dazugehörigen Futter- und Bodenproben. Da in nahezu allen Proben immer die gleichen wenigen Familien auftreten, während die dazugehörigen Spezies zumeist mit nur einem einzigen Individuum vertreten sind, werden in diesem Teil Sunburst-Diagramme zur Darstellung verwendet.

Der Vergleich der viralen Mikrobiome von Futter-, Boden- und Kotproben der Bennettkängurus aus Augsburg (siehe Abbildung 15) zeigt in Bezug auf die Familien eine größere Ähnlichkeit zwischen Boden- und Kotproben. In beiden Probenarten zeigen sich ähnliche Anteilsverhältnisse von Myoviridae, Siphoviridae und Phycodnaviridae, während in den Futterproben der Anteil der Myoviridae stark überwiegt. Außerdem finden sich unter letztgenannter Familie auffällig viele Viren der Spezies Escherichia virus P1.

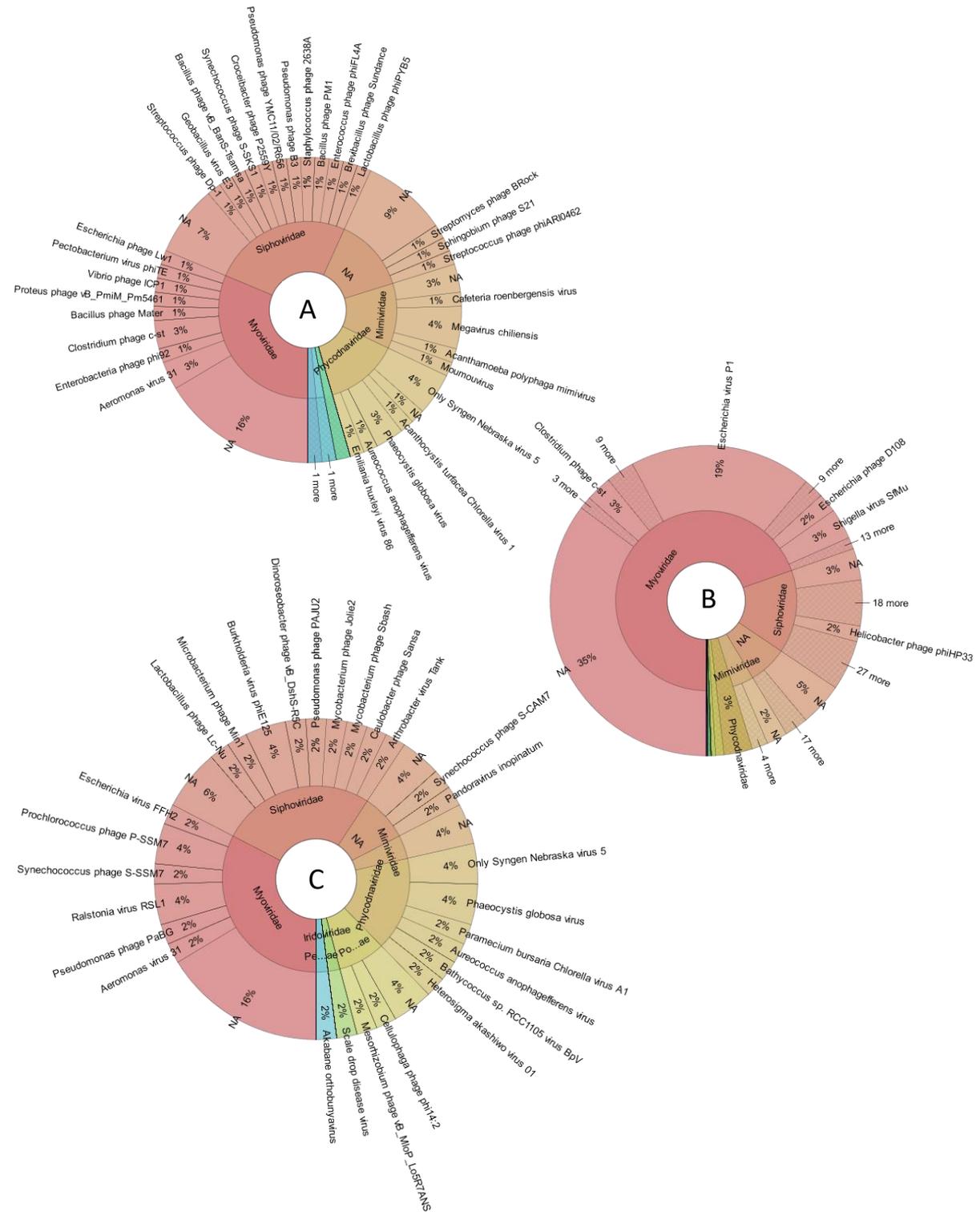


Abbildung 15: Gegenüberstellung der Kotproben (A), Futterproben (B) und Bodenproben (C) der Bennettkängurus aus Augsburg. Futterproben (n = 2), Bodenprobe (n = 1), Kotproben (n = 2)

Die Viriome der Bennettkängurus aus Landau (siehe Abbildung 16) zeigen auch größere Ähnlichkeiten zwischen den Boden- und Kotproben. Auffällig ist hierbei, dass der gesamte Anteil der Phycodnaviridae der Bodenprobe nur aus Viren der Spezies Only Syngen Nebraska virus 5 besteht. Die Futterprobe besteht zum größten Teil aus Vertretern der Familie Myoviridae, von dem ein großer Teil das Escherichia

virus P1 ausmacht. Außerdem findet sich in den Futterproben, im Gegensatz zu den anderen, ein größerer Teil Caulimoviridae.

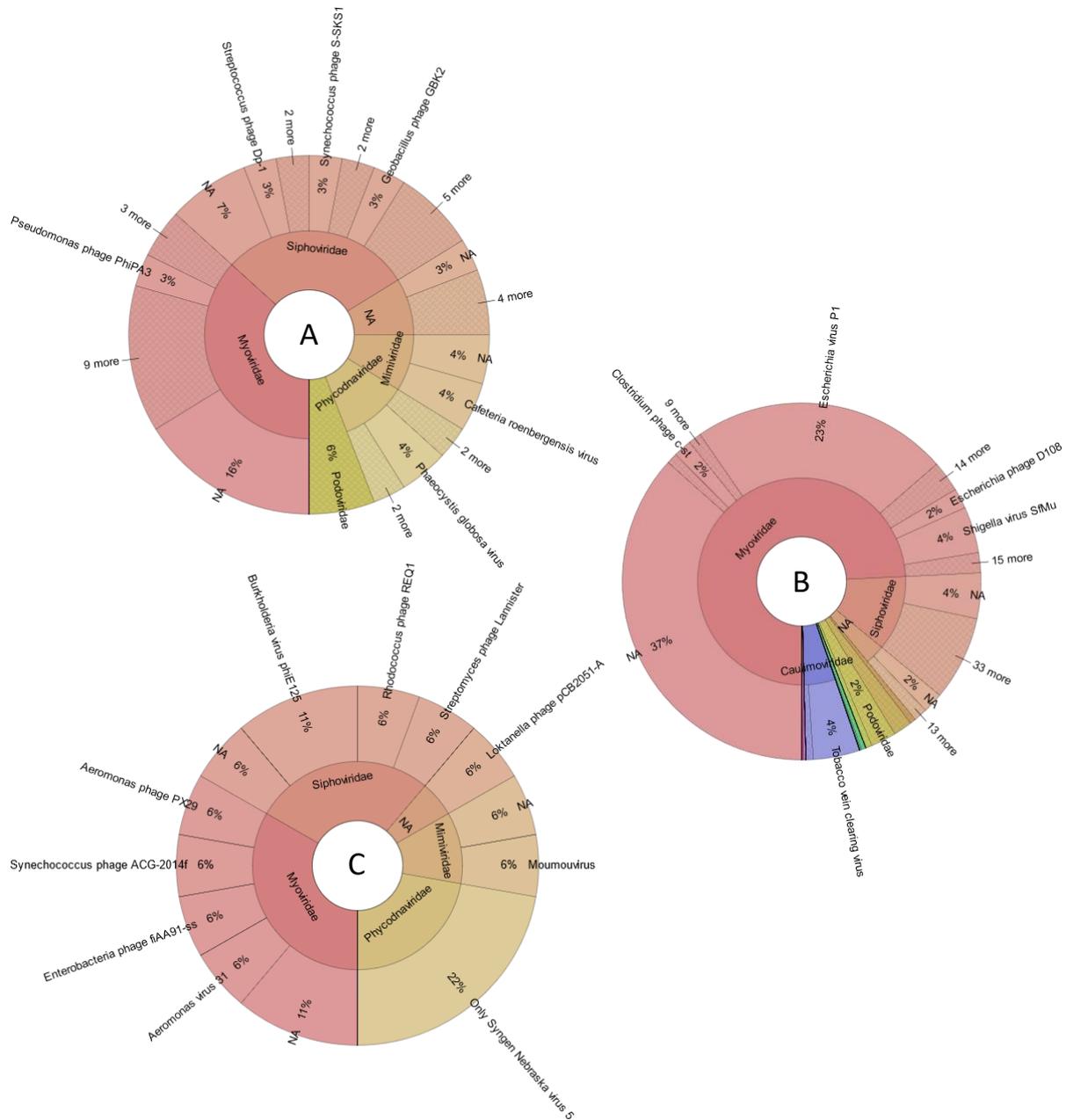


Abbildung 16: Gegenüberstellung der Kotproben (A), Futterproben (B) und Bodenproben (C) der Bennettkängurus aus Landau. Futterproben (n = 3), Bodenprobe (n = 1), Kotproben (n = 1)

In Abbildung 17 zeichnen sich beim Vergleich der Futter-, Kot- und Bodenproben der viralen Mikrobiome der Bennettkängurus aus Neuwied ebenfalls mehr Ähnlichkeiten zwischen Boden- und Kotproben in Bezug auf die Zusammensetzung der darin vorhandenen Familien ab. Nur letztere Probenart enthält in diesem Vergleich deutlich mehr verschiedene Spezies als die Bodenprobe. Fast die Hälfte aller Myoviridae der Futterprobe konnte keiner Virenspezies genau zugeordnet werden und ein Großteil dieser Familie besteht wieder aus dem Virus Escherichia virus P1.



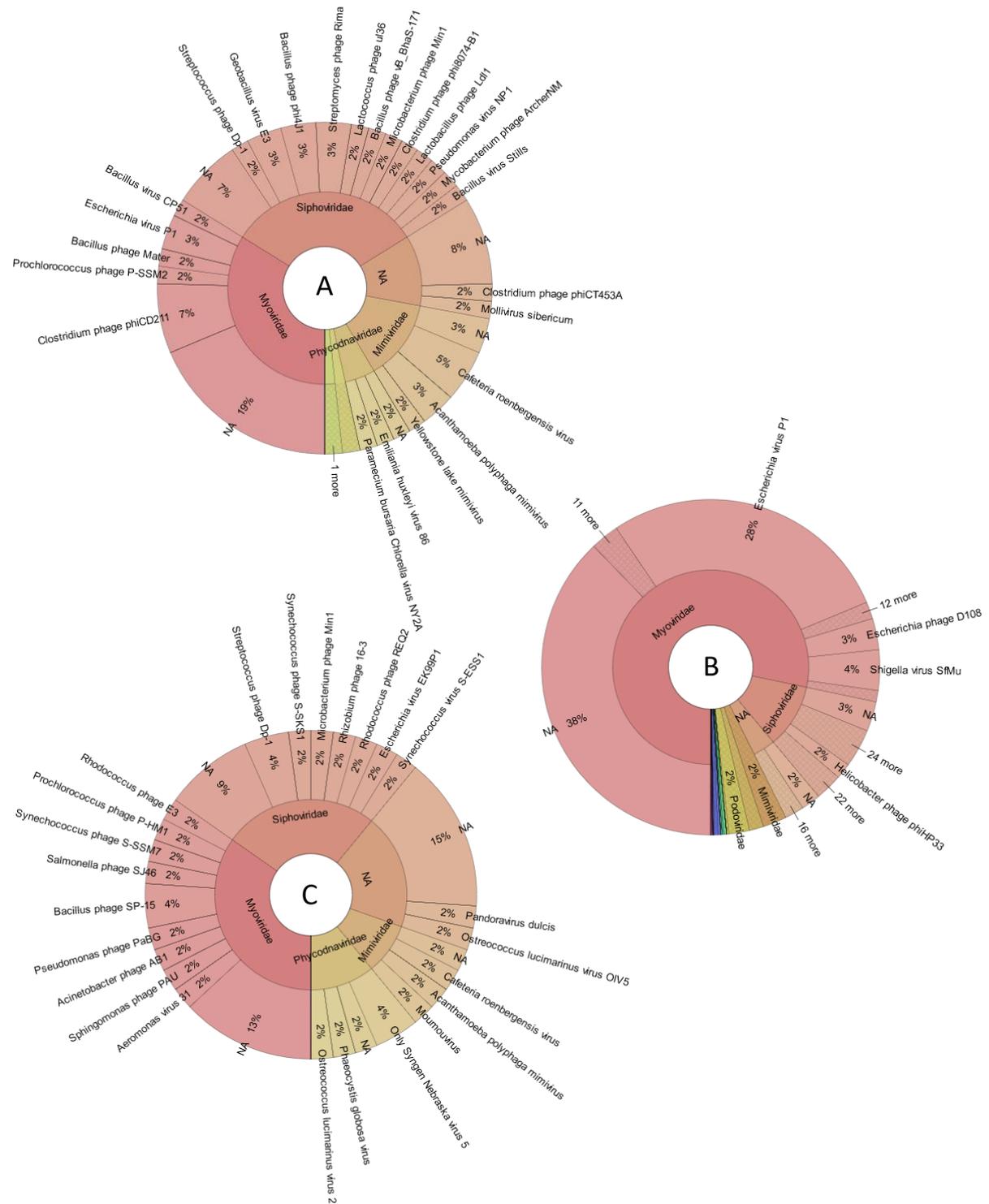


Abbildung 18: Gegenüberstellung der Kotproben (A), Futterproben (B) und Bodenproben (C) der Östlichen Grauen Riesenkängurus aus Neuwied. Futterproben (n = 3), Bodenprobe (n = 1), Kotproben (n = 4)

Die Boden- und Kotproben der Östlichen Grauen Riesenkängurus aus Schwerin (siehe Abbildung 19) gleichen sich ebenfalls bezüglich ihrer Virusfamilien. Diesmal enthalten die Kotproben jedoch deutlich mehr verschiedene Spezies als die Bodenprobe. Die Mehrheit aller Myoviridae der Futterprobe konnte keiner Virenspezies genau zugeordnet werden und ein Großteil dieser Familie besteht auch in diesem Vergleich aus dem Virus Escherichia virus P1.

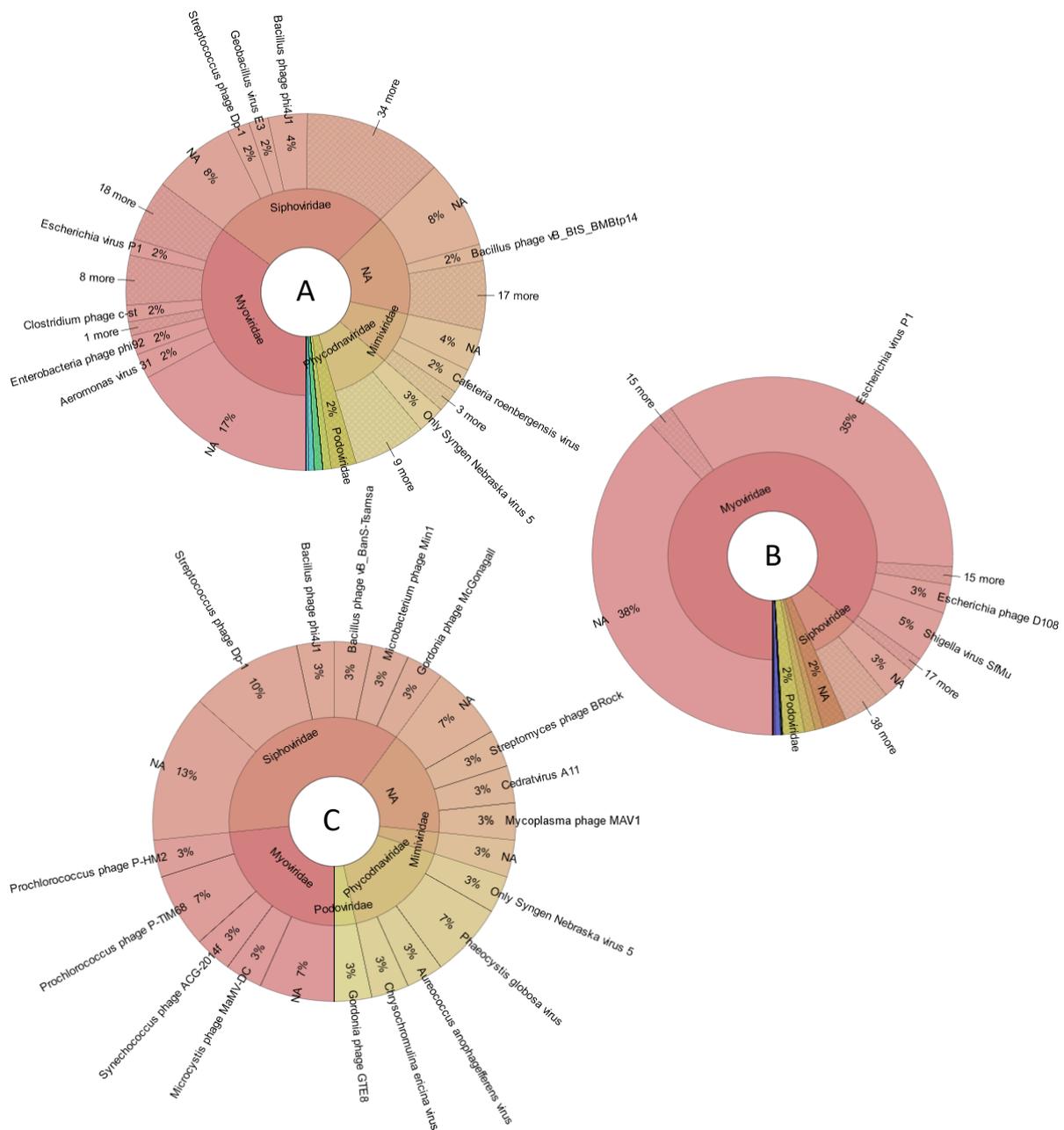


Abbildung 19: Gegenüberstellung Kotproben (A), Futterproben (B) und Bodenproben (C) der Östlichen Grauen Riesenkängurus aus Schwerin. Futterproben (n = 3), Bodenprobe (n = 1), Kotproben (n = 8)

Die Kotproben der Koalas aus Duisburg (Abbildung 20) ähneln den Kotproben der anderen Tiere in Bezug auf die Verteilung der Familien Myoviridae, Siphoviridae, Phycodnaviridae und Mimiviridae mit der Ausnahme, dass sich hier auch die Familie der Microviridae zu einem größeren Anteil findet. In diesem Vergleich fallen besonders die Futterproben auf, da sich diese am stärksten von jenen der bisherigen Viriommvergleichen unterscheiden. Mimiviridae machen zwar auch hier den größten Teil des Virioms aus aber zusätzlich sind hier auch Vertreter der Siphoviridae, Mimiviridae, Phycodnaviridae, Podoviridae, Poxviridae und Caulimoviridae in einem höheren Maß anzutreffen. Allerdings findet man

auch hier unter den Mimiviridae das Escherichia virus P1, wenn auch in einem deutlich geringeren Anteil.

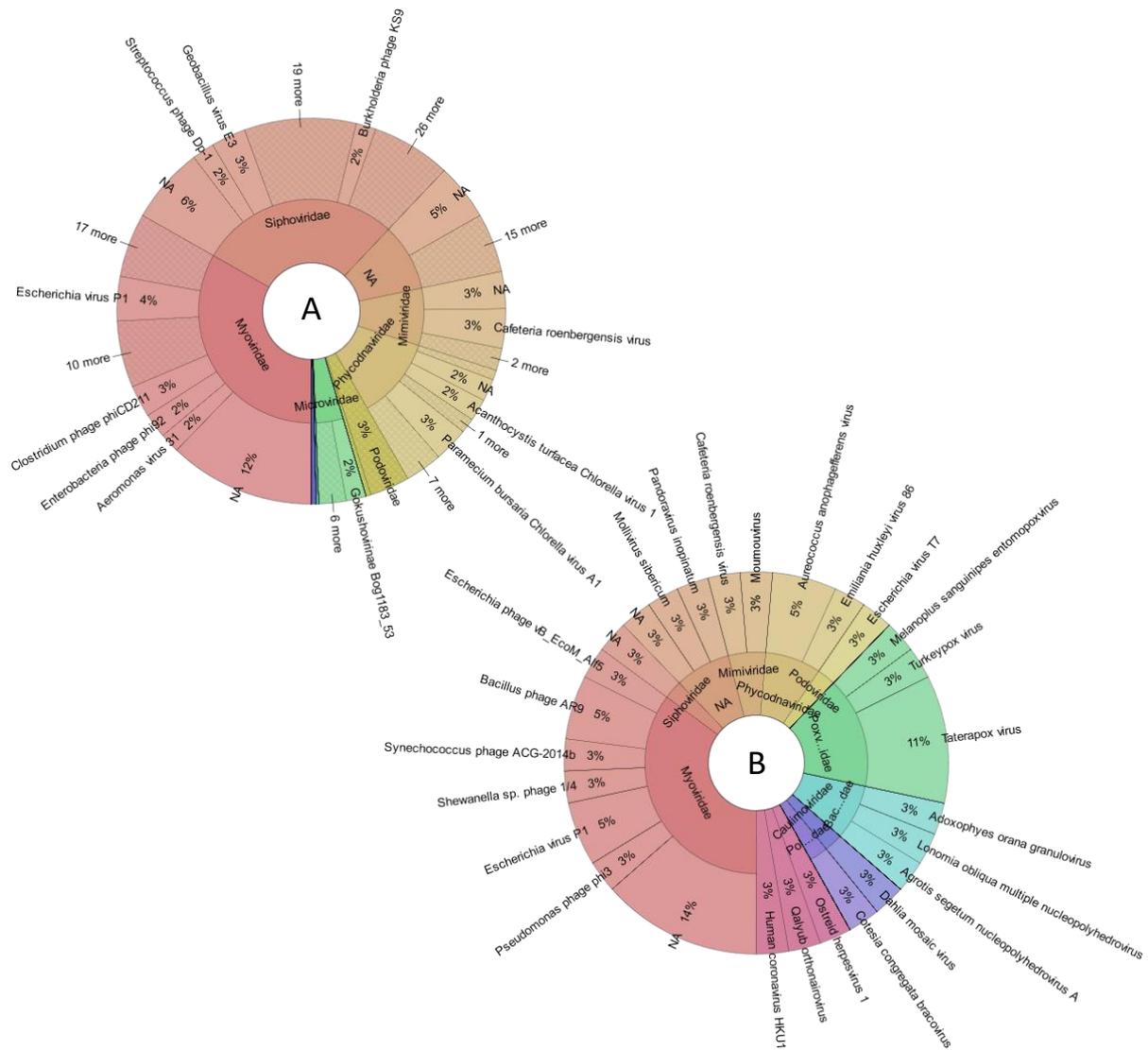


Abbildung 20: Gegenüberstellung der Kotproben (A) und Futterproben (B) der Koalas aus Duisburg. Futterproben (n = 2), Kotproben (n = 6)

Auch die Futterprobe der Bennettkängurus aus Neunkirchen (Abbildung 21) unterscheidet sich merklich von den Futterproben aus den anderen Vergleichen. Neben Vertretern der Myoviridae befindet sich hier auch ein erheblicher Anteil der Familien Siphoviridae, Mimiviridae, Phycodnaviridae und Podoviridae. Die Kotproben gleichen wiederum jenen der anderen Tiere aus den vorangegangenen Vergleichen der Kot-, Futter- und Bodenproben.

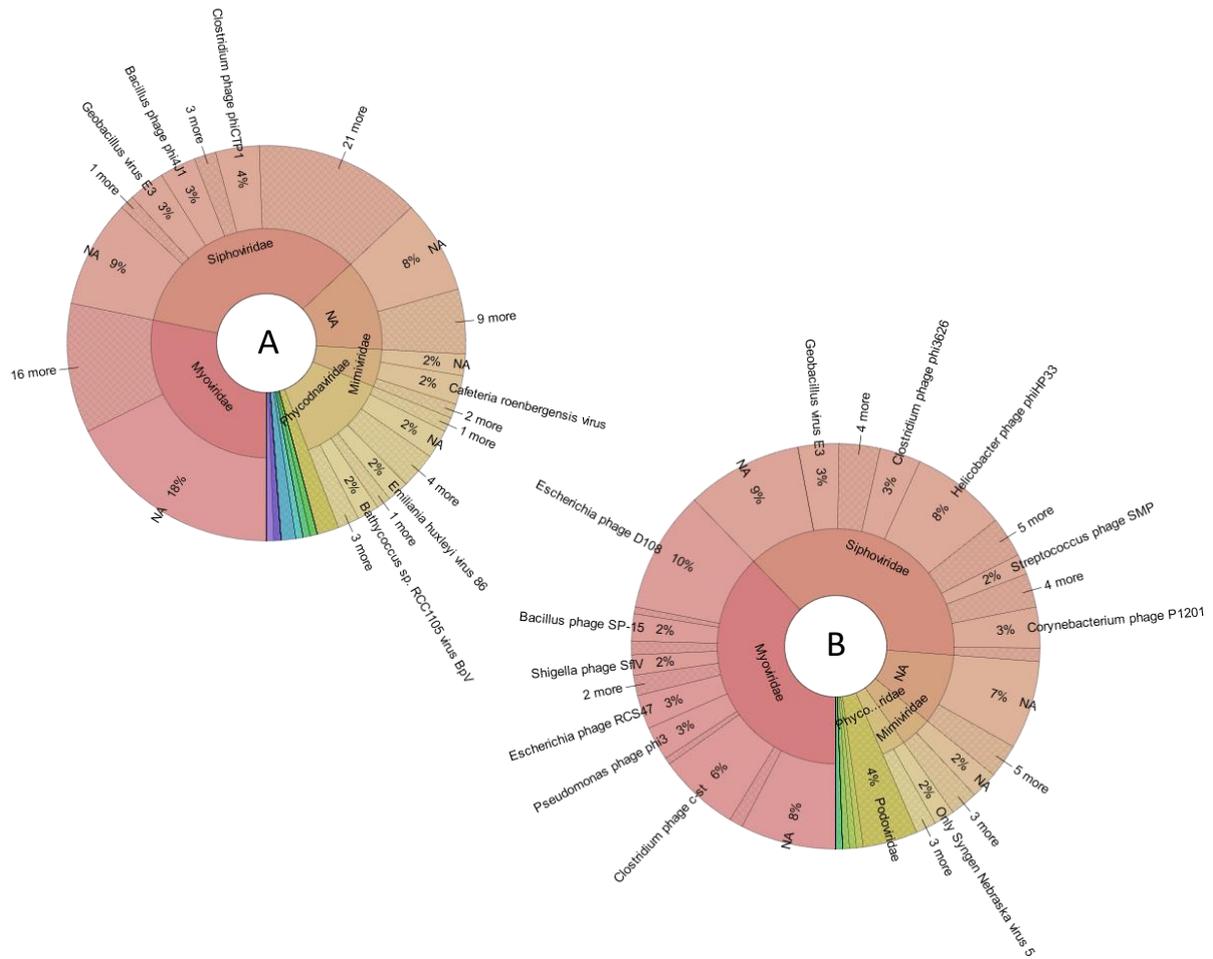


Abbildung 21: Gegenüberstellung der Kotproben (A) und Futterproben (B) der Bennettkängurus aus Neunkirchen. Futterproben (n = 1), Kotproben (n = 5)

Vergleiche Boden-, Futter- und Kotproben- Bakterien

Die Bakteriellen Mikrobiome der Bodenproben (Abbildung 22) sind sich untereinander sehr ähnlich. Die Bakterienfamilien Acidimicrobiaceae, Bacillaceae, Bradyrhizobiaceae, Burkholderiaceae, Chitinophagaceae, Comamonadaceae, Hyphomicrobiaceae, Intrasporangiaceae, Methylobacteriaceae, Microbacteriaceae, Micrococcaceae, Micromonosporaceae, Mycobacteriaceae, Nocardiaceae, Nocardioideaceae, Phyllobacteriaceae, Planctomycetaceae, Propionibacteriaceae, Pseudomonadaceae, Pseudonocardiaceae, Rhizobiaceae, Rhodobacteraceae, Rhodospirillaceae, Solirubrobacteraceae und Streptomycetaceae lassen sich in allen fünf Proben finden (25 Familien).

Die Familien Alcaligenaceae, Corynebacteriaceae, Flavobacteriaceae, Gemmataceae, Geodermatophilaceae, Nitrospiraceae, Oxalobacteraceae, Sphingomonadaceae, Streptosporangiaceae, Xanthobacteraceae und Xanthomonadaceae finden sich noch in vier der fünf Proben (11 Familien).

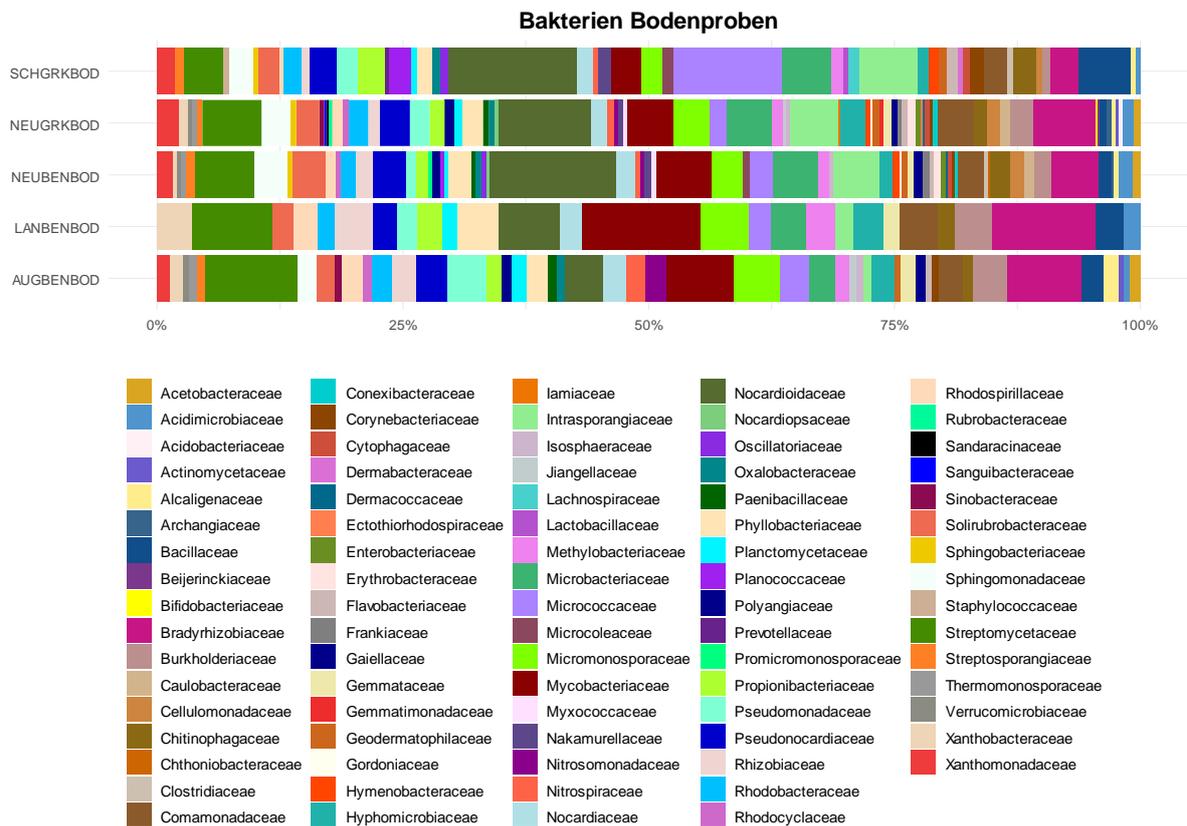


Abbildung 22: Zusammenfassung aller Bodenproben. SCHGRKBOD: Östl. Graue Riesenkängurus Schwerin (n = 1), NEUGRKBOD: Östl. Graue Riesenkängurus Neuwied (n = 1), NEUBENBOD: Bennettkängurus Neuwied (n = 1), LANBENBOD: Bennettkängurus Landau (n = 1), AUGBENBOD: Bennettkängurus Augsburg (n = 1)

Auch die bakteriellen Mikrobiome der Futterproben (siehe Abbildung 23) sind sich untereinander sehr ähnlich mit Ausnahme des Gemüses der Bennettkängurus aus Landau und der Eukalyptusblätter. Die Familien Bacillaceae, Clostridiaceae, Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae, Moraxellaceae, Staphylococcaceae und Streptococcaceae sind in allen 16 Proben nachzuweisen (7 Familien).

Die Bakterienfamilien Bacteroidaceae, Borreliaceae, Campylobacteraceae, Coriobacteriaceae, Eggerthellaceae, Enterococcaceae, Erwiniaceae, Erysipelotrichaceae, Eubacteriaceae, Flavobacteriaceae, Fusobacteriaceae, Lachnospiraceae, Micrococcaceae, Morganellaceae, Pasteurellaceae, Peptostreptococcaceae, Pseudomonadaceae, Ruminococcaceae, Selenomonadaceae, Spingobacteriaceae und Vibrionaceae sind immer noch in mehr als zehn der 16 Proben nachweisbar.

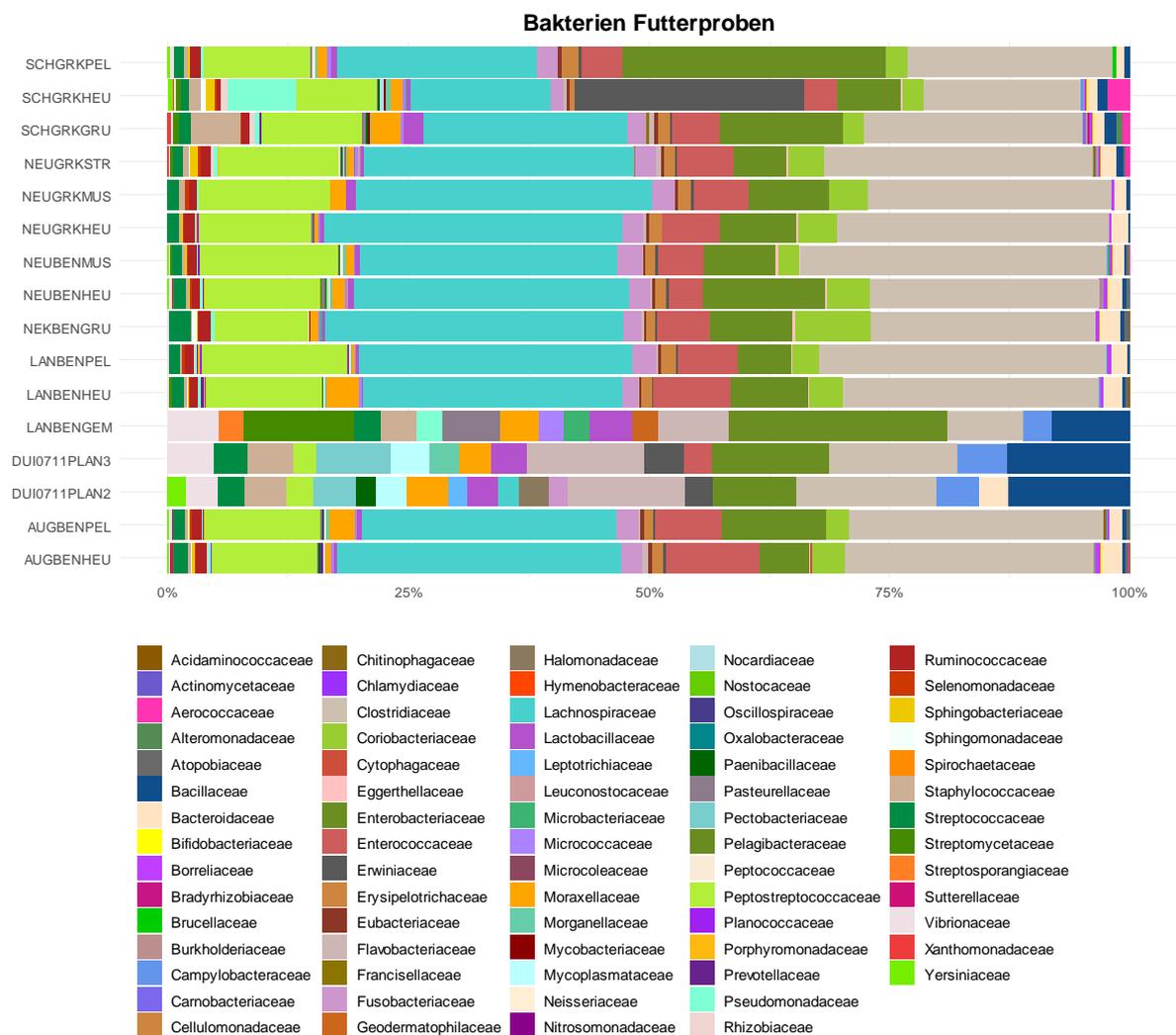


Abbildung 23: Zusammenfassung aller Futterproben. SCHGRKPEL: Östl. Graue Riesenkängurus Schwerin Pellets (n = 1), SCHGRKHEU: Östl. Graue Riesenkängurus Schwerin Heu (n = 1), SCHGRKGRU: Östl. Graue Riesenkängurus Schwerin Grünfutter (n = 1), NEUGRKSTR: Östl. Graue Riesenkängurus Neuwied Stroh (n = 1), NEUGRKMUS: Östl. Graue Riesenkängurus Neuwied Müsli (n = 1), NEUGRKHEU: Östl. Graue Riesenkängurus Neuwied Heu (n = 1), NEUBENMUS: Bennettkängurus Neuwied Müsli (n = 1), NEUBENHEU: Bennettkängurus Neuwied Heu (n = 1), NEUBENGRU: Bennettkängurus Landau Pellets (n = 1), LANBENPEL: Bennettkängurus Landau Pellets (n = 1), LANBENHEU: Bennettkängurus Landau Heu (n = 1), LANBENGEM: Bennettkängurus Landau Gemüse (n = 1), DUI0711PLAN3: Koalas

*Duisburg Eukalyptus (n = 1), DUI0711PLAN2: Koalas Duisburg Eukalyptus (n = 1), AUGBENPEL: Bennettkängurus Augsburg Pellets (n = 1), AUGBENHEU: Bennettkängurus Augsburg Heu (n = 1)*

Die bakteriellen Mikrobiome der Beuteltiere (siehe Abbildung 24) sind sich, abgesehen von jenen der Tasmanischen Teufel, auch sehr ähnlich. Die Bakterienfamilien Clostridiaceae und Lachnospiraceae kommen in allen elf Kotproben vor (2 Familien).

Die Familien Acidaminococcaceae, Akkermansiaceae, Atopobiaceae, Bacillaceae, Bacteroidaceae, Bifidobacteriaceae, Clostridiales Family XIII. inc. sed., Eggerthellaceae, Enterobacteriaceae, Enterococcaceae, Erysipelotrichaceae, Eubacteriaceae, Flavobacteriaceae, Odoribacteraceae, Oscillospiraceae, Paenibacillaceae, Peptostreptococcaceae, Porphyromonadaceae, Prevotellaceae, Rikenellaceae, Ruminococcaceae, Selenomonadaceae, Spirochaetaceae und Streptococcaceae sind noch in über acht der elf Proben zu finden (24 Familien).

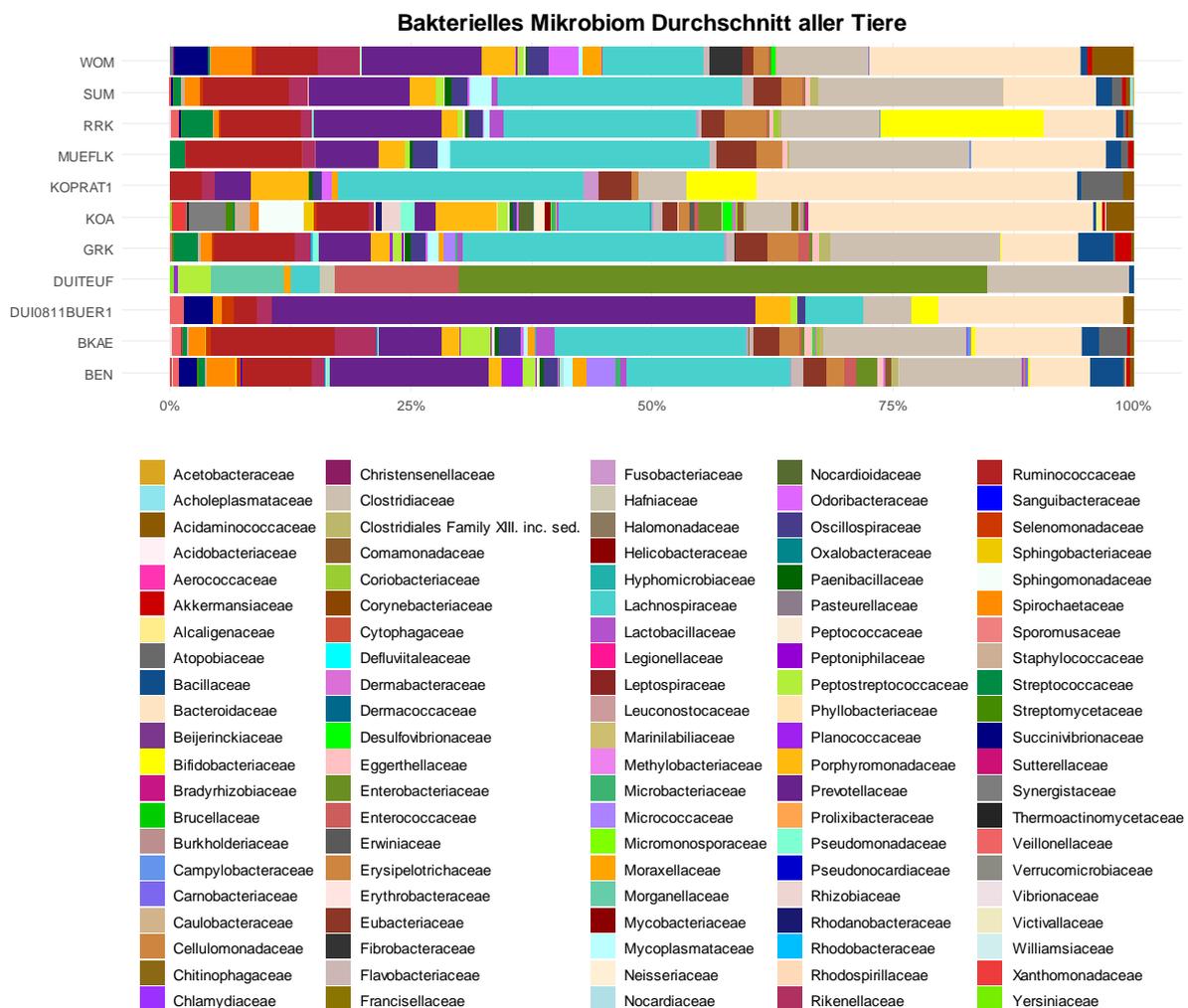


Abbildung 24: Zusammenfassung aller Kotproben. WOM: Wombats (n = 12), SUM: Sumpfwallabys (n = 6), RRK: Rote Riesenkängurus (n = 26), MUEFLK: Flinkwallabys (n = 9), KOPRAT1: Rattenkängurus (n = 1), KOA: Koalas (n = 9), GRK: Östl. Graue Riesenkängurus (n = 27), DUITEUF: Tasmanische Teufel (n = 2), DUI0811BUER1: Bürstenschwanzkängurus (n = 1), BKAE: Baumkängurus (n = 18), BEN: Bennettkängurus (n = 14)

Vergleiche Boden-, Futter- und Kotproben- Pilze

So wie die bakteriellen Mikrobiome sind sich auch die Mykobiome der Boden-, Futter- und Kotproben untereinander sehr ähnlich. Die Familien Aspergillaceae, Glomerellaceae, Herpotrichiellaceae, Nectriaceae, Saccharomycetaceae und Sordariaceae sind in allen vier Bodenproben (siehe Abbildung 25) vorhanden (6 Familien).

Die Pilzfamilien Chaetomiaceae, Glomeraceae, Kickxellaceae, Magnaporthaceae, Mortierellaceae, Powellomycetaceae, Synchytriaceae, Trichocomaceae, Trichosporonaceae und Ustilaginaceae sind noch in vier der fünf Proben vorhanden (10 Familien).

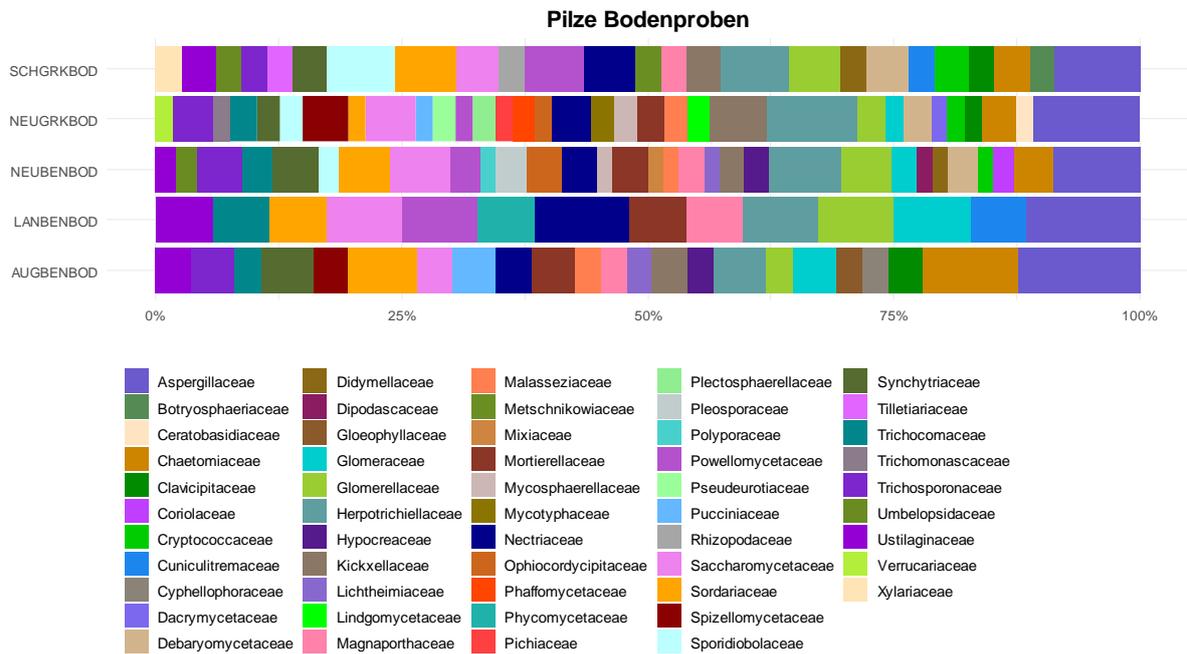


Abbildung 25: Zusammenfassung aller Bodenproben. SCHGRKBOD: Östl. Graue Riesenkängurus Schwerin (n = 1), NEUGRKBOD: Östl. Graue Riesenkängurus Neuwied (n = 1), NEUBENBOD: Bennettkängurus Neuwied (n = 1), LANBENBOD: Bennettkängurus Landau (n = 1), AUGBENBOD: Bennettkängurus Augsburg (n = 1)

Auch bei den Mykobiomen der Futterproben (siehe Abbildung 25) ist eine gewisse Ähnlichkeit klar ersichtlich. Die Familien Aspergillaceae, Debaryomycetaceae, Nectriaceae und Saccharomycetaceae sind in allen 16 Proben vorhanden (4 Familien).

Die Bakterienfamilien Botryosphaeriaceae, Cryptococcaceae, Glomerellaceae, Herpotrichiellaceae, Kickxellaceae, Magnaporthaceae, Morchellaceae, Mortierellaceae, Mucoraceae, Mycosphaerellaceae, Mycotyphaceae, Pichiaceae, Pucciniaceae, Schizosaccharomycetaceae, Sclerotiniaceae, Sordariaceae, Spizellomycetaceae, Synchytriaceae, Trichosporonaceae, Umbelopsidaceae und Ustilaginaceae sind noch in über zehn der 16 Proben vorhanden (21 Familien).

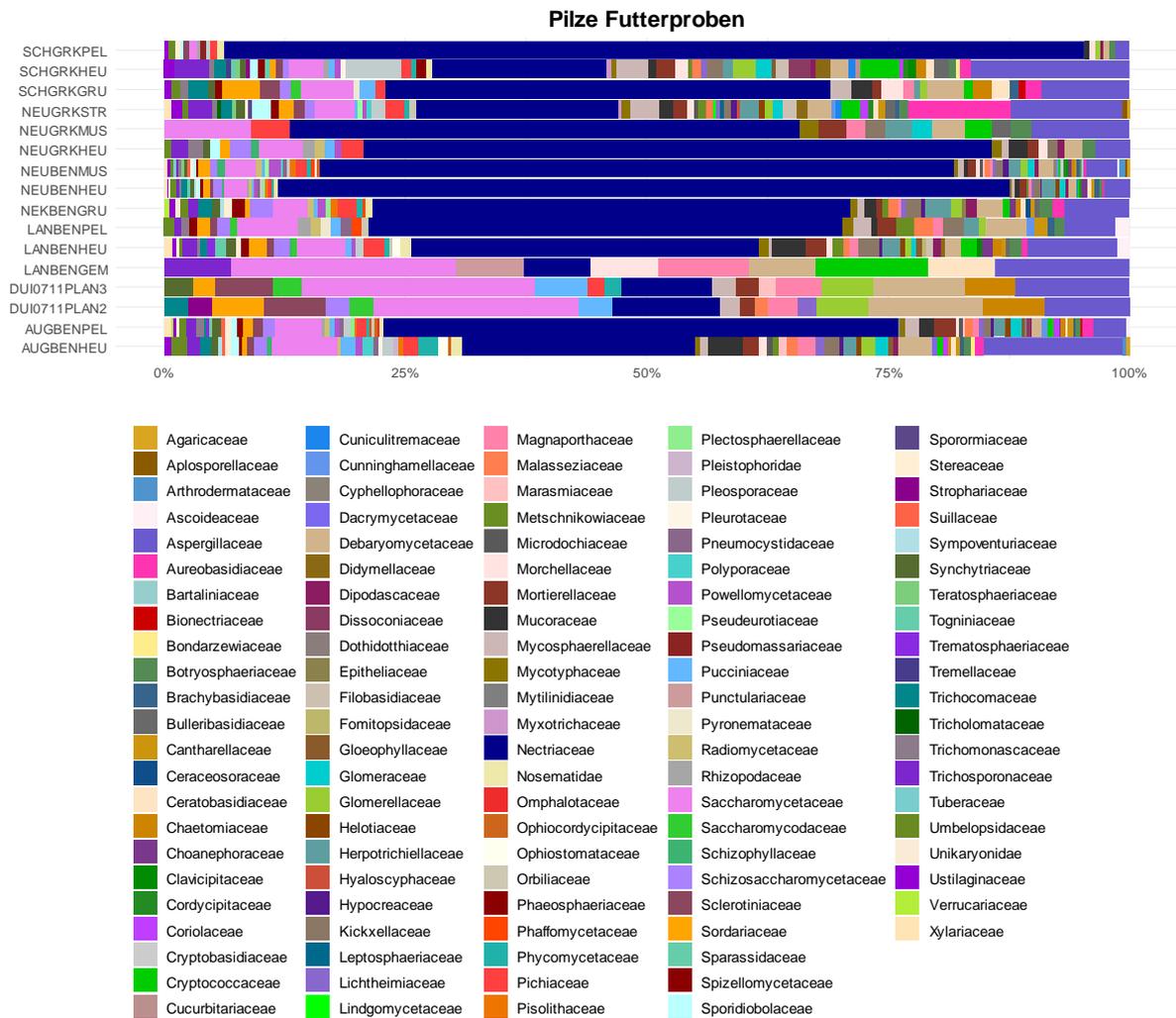


Abbildung 26: Zusammenfassung aller Futterproben. SCHGRKPEL: Östl. Graue Riesenkängurus Schwerin Pellets (n = 1), SCHGRKHEU: Östl. Graue Riesenkängurus Schwerin Heu (n = 1), SCHGRKGRU: Östl. Graue Riesenkängurus Schwerin Grünfutter (n = 1), NEUGRKSTR: Östl. Graue Riesenkängurus Neuwied Stroh (n = 1), NEUGRKMUS: Östl. Graue Riesenkängurus Neuwied Müsli (n = 1), NEUGRKHEU: Östl. Graue Riesenkängurus Neuwied Heu (n = 1), NEUBENMUS: Bennettkängurus Neuwied Müsli (n = 1), NEUBENHEU: Bennettkängurus Neuwied Heu (n = 1), NEUBENGRU: Bennettkängurus Neuwied Grünfutter (n = 1), LANBENPEL: Bennettkängurus Landau Pellets (n = 1), LANBENHEU: Bennettkängurus Landau Heu (n = 1), LANBENGEM: Bennettkängurus Landau Gemüse (n = 1), DUI0711PLAN3: Koalas Duisburg Eukalyptus (n = 1), DUI0711PLAN2: Koalas Duisburg Eukalyptus (n = 1), AUGBENPEL: Bennettkängurus Augsburg Pellets (n = 1), AUGBENHEU: Bennettkängurus Augsburg Heu (n = 1)

Ebenso, wie in den beiden vorangegangenen Vergleichen, sind sich auch die Mykobiome der Kotproben (siehe Abbildung 27) untereinander sehr ähnlich. Hier ist lediglich die Familie Saccharomycetaceae in allen elf Proben vorhanden (1 Familie).

Die Familien Aspergillaceae, Botryosphaeriaceae, Debaryomycetaceae, Glomeraceae, Glomerellaceae, Herpotrichiellaceae, Kickxellaceae, Mortierellaceae, Mycosphaerellaceae, Nectriaceae, Pichiaceae, Pucciniaceae, Sordariaceae, Synchytriaceae, Trichocomaceae, Trichomonascaceae und Umbelopsidaceae sind immer noch in mehr als acht der elf Familien anzutreffen (17 Familien).

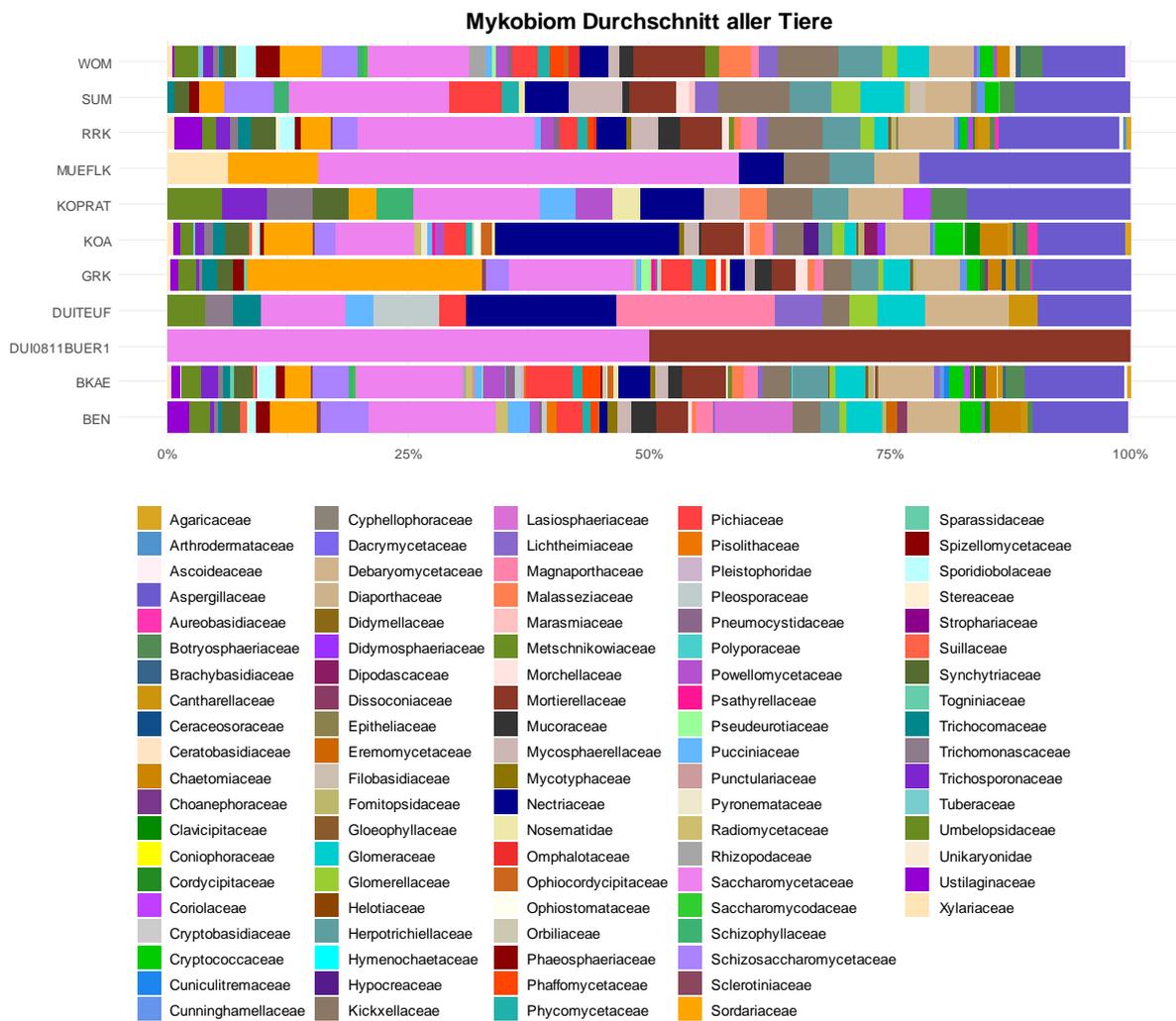


Abbildung 27: Zusammenfassung aller Kotproben. WOM: Wombats (n = 12), SUM: Sumpfwallabys (n = 6), RRK: Rote Riesenkängurus (n = 26), MUEFLK: Flinkwallabys (n = 9), KOPRAT1: Rattenkängurus (n = 1), KOA: Koalas (n = 9), GRK: Östl. Graue Riesenkängurus (n = 27), DUI TEUF: Tasmanische Teufel (n = 2), DUI&11BUER1: Bürstenschwanzkängurus (n = 1), BKAE: Baumkängurus (n = 18), BEN: Bennettkängurus (n = 14)

Vergleiche in Richness, Shannon-Index und ENS

Die nachfolgende Grafik (Abbildung 28) zeigt die Richness der Mikrobiome der untersuchten Kotproben von allen Beuteltieren zusammen. Signifikante Unterschiede bestehen bei den bakteriellen Mikrobiomen nur zwischen Baumkängurus und Flinkwallabys ( $p = 0,0204$ ) und zwischen Koalas und Flinkwallabys ( $p = 0,0184$ ). Die signifikanten Unterschiede im Mykobiom beschränken sich auf Baumkängurus und Flinkwallabys ( $p = 0,0029$ ), Baumkängurus und Östliche Graue Riesenkängurus ( $p = 0,0239$ ) und Flinkwallabys und Koalas ( $p = 0,0205$ ). Signifikante Unterschiede bestehen zwischen den Viriomen von Baumkängurus und Flinkwallabys ( $p = 0,0078$ ) und zwischen Baumkängurus und Östlichen Grauen Riesenkängurus ( $p = 0,0191$ ).

Abbildung 29 zeigt die Unterschiede zwischen den verschiedenen Beuteltieren, gemessen am Shannon-Index. Bezüglich des bakteriellen Mikrobioms unterscheiden sich hier Baumkängurus von Flinkwallabys ( $p = 0,0068$ ), Baumkängurus von Östlichen Grauen Riesenkängurus ( $p = 0,0044$ ), Baumkängurus von Roten Riesenkängurus ( $p = 0,0003$ ) und Baumkängurus von Tasmanischen Teufeln ( $p = 0,0161$ ) signifikant. Im Mykobiom zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen Baumkängurus und Flinkwallabys ( $p = 0,0031$ ) und zwischen Flinkwallabys und Wombats ( $p = 0,0194$ ). Baumkängurus und Flinkwallabys ( $p = 0,0177$ ) und Baumkängurus und Östliche Graue Riesenkängurus ( $p = 0,0176$ ) unterscheiden sich bezüglich ihres Virioms signifikant.

In Abbildung 30 werden die Unterschiede zwischen den verschiedenen Tierarten bezüglich der Effective Number of Species aufgeführt. In Bezug auf das bakterielle Mikrobiom unterscheiden sich Baumkängurus und Flinkwallabys ( $p = 0,0068$ ), Baumkängurus und Östliche Graue Riesenkängurus ( $p = 0,0044$ ), Baumkängurus und Rote Riesenkängurus ( $p = 0,0003$ ) und Baumkängurus und Tasmanische Teufel ( $p = 0,0161$ ) signifikant. Die signifikanten Unterschiede im Mykobiom bestehen zwischen Baumkängurus und Flinkwallabys ( $p = 0,0031$ ) und zwischen Flinkwallabys und Wombats ( $p = 0,0194$ ). Signifikante Unterschiede bestehen zwischen den Viriomen von Baumkängurus und Flinkwallabys ( $p = 0,0177$ ) und zwischen Baumkängurus und Östlichen Grauen Riesenkängurus ( $p = 0,0176$ ).

Die p-Werte wurden mittels Bonferroni-Korrektur ermittelt und die Maßzahlen zur Biodiversität, wie Richness, Shannon-Index und ENS beziehen sich bei dem bakteriellen Mikrobiom und dem Mykobiom auf die Familien der Mikroorganismen und beim Viriom auf die Virenspezies.

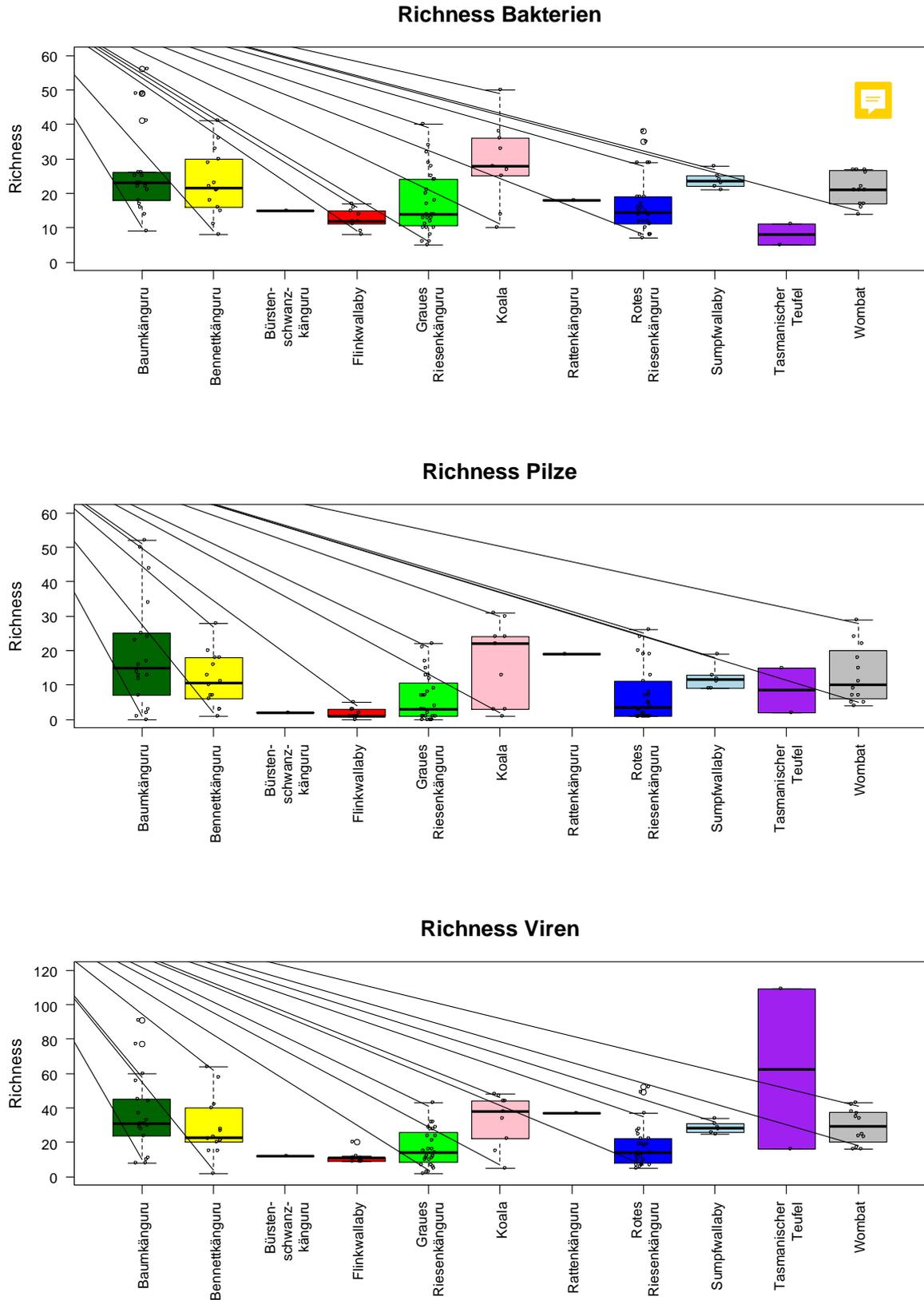


Abbildung 28: Vergleich Richness. Baumkänguru (n = 18), Bennettkänguru (n = 25), Bürstenschwanzkänguru (n = 1), Flinkwallaby (n = 9), Graues Riesenkänguru (n = 35), Koala (n = 9), Rattenkänguru (n = 1), Rotes Riesenkänguru (n = 26), Sumpfwallaby (n = 6), Tasmanischer Teufel (n = 2), Wombat (n = 12)

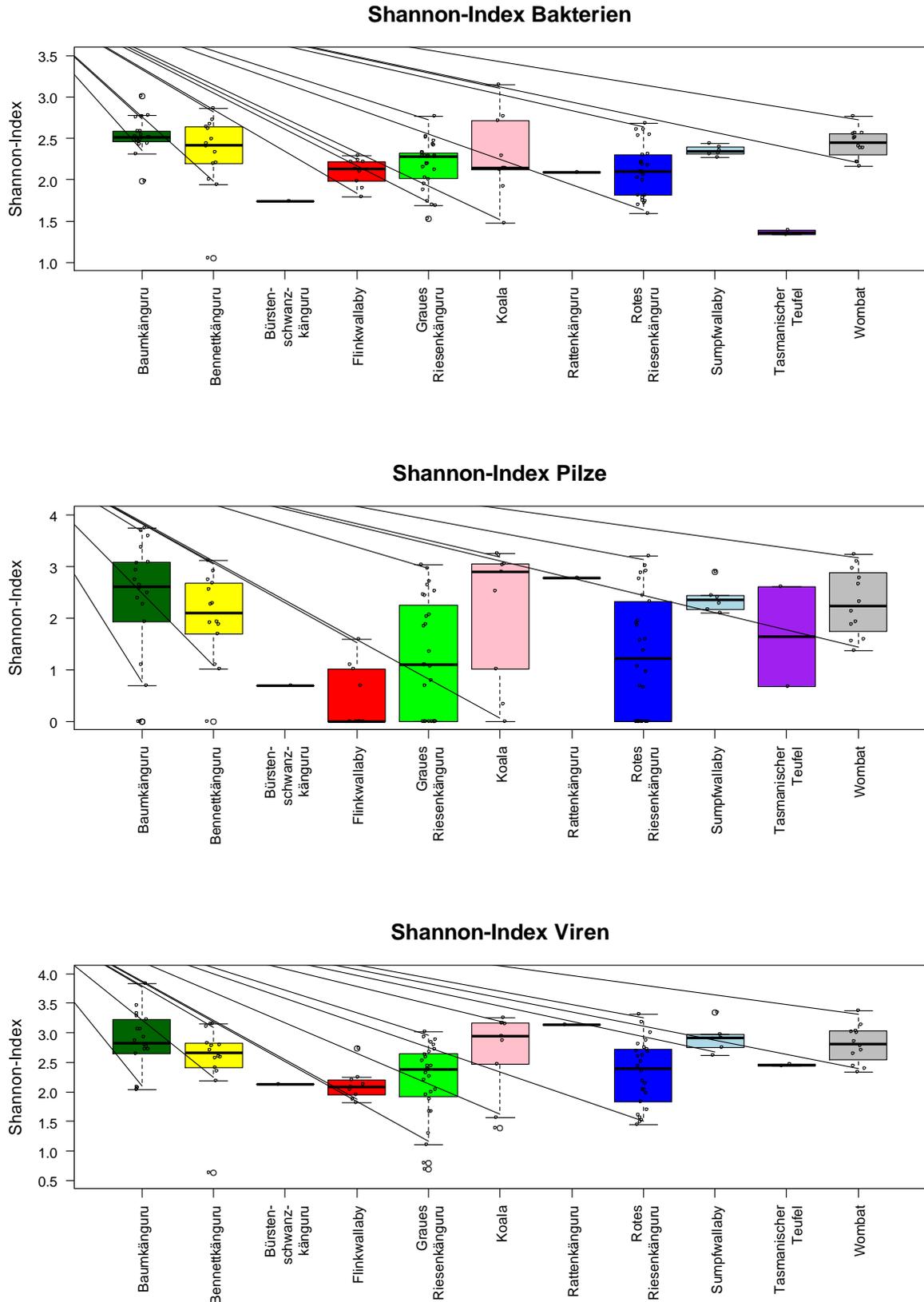


Abbildung 29: Vergleich Shannon-Index. Baumkänguru (n = 18), Bennettkänguru (n = 25), Bürstenschwanzkänguru (n = 1), Flinkwallaby (n = 9), Graues Riesenkänguru (n = 35), Koala (n = 9), Rattenkänguru (n = 1), Rotes Riesenkänguru (n = 26), Sumpfwallaby (n = 6), Tasmanischer Teufel (n = 2), Wombat (n = 12)

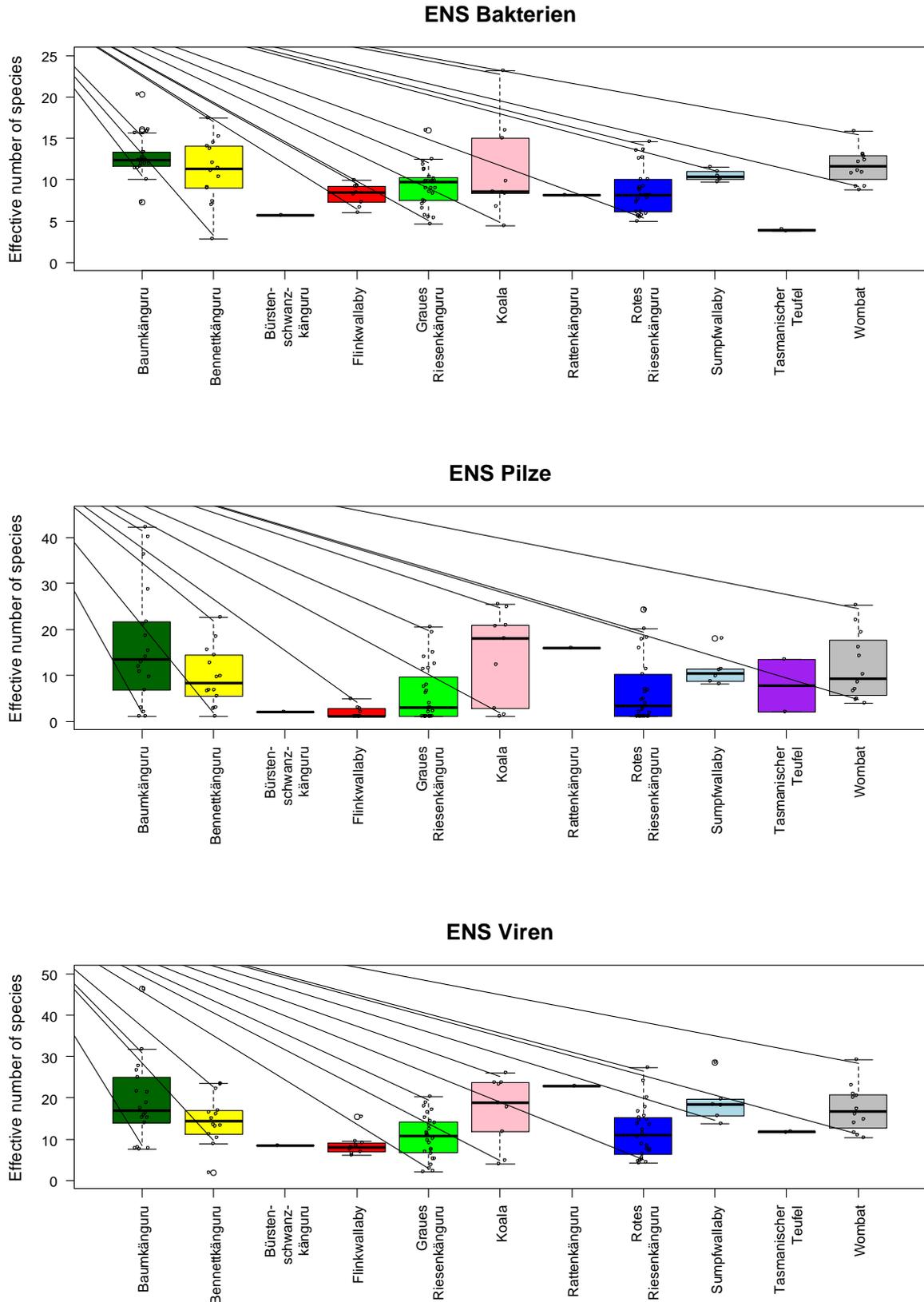


Abbildung 30: Vergleich ENS. Baumkänguru (n = 18), Bennettkänguru (n = 25), Bürstenschwanzkänguru (n = 1), Flinkwallaby (n = 9), Graues Riesenkänguru (n = 35), Koala (n = 9), Rattenkänguru (n = 1), Rotes Riesenkänguru (n = 26), Sumpfwallaby (n = 6), Tasmanischer Teufel (n = 2), Wombat (n = 12)

In Bezug auf die Richness (Abbildung 31) unterscheiden sich Boden- und Kotproben ( $p = 0,0006$ ) und Futter- und Kotproben ( $p = 0,0001$ ) signifikant bezüglich ihrer bakteriellen Zusammensetzung. Gemessen am Mykobiom unterscheiden sich nur Boden- und Kotproben ( $p = 0,0074$ ) signifikant. Futterproben und Kotproben unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,0000$ ) bezüglich ihrer viralen Zusammensetzung.

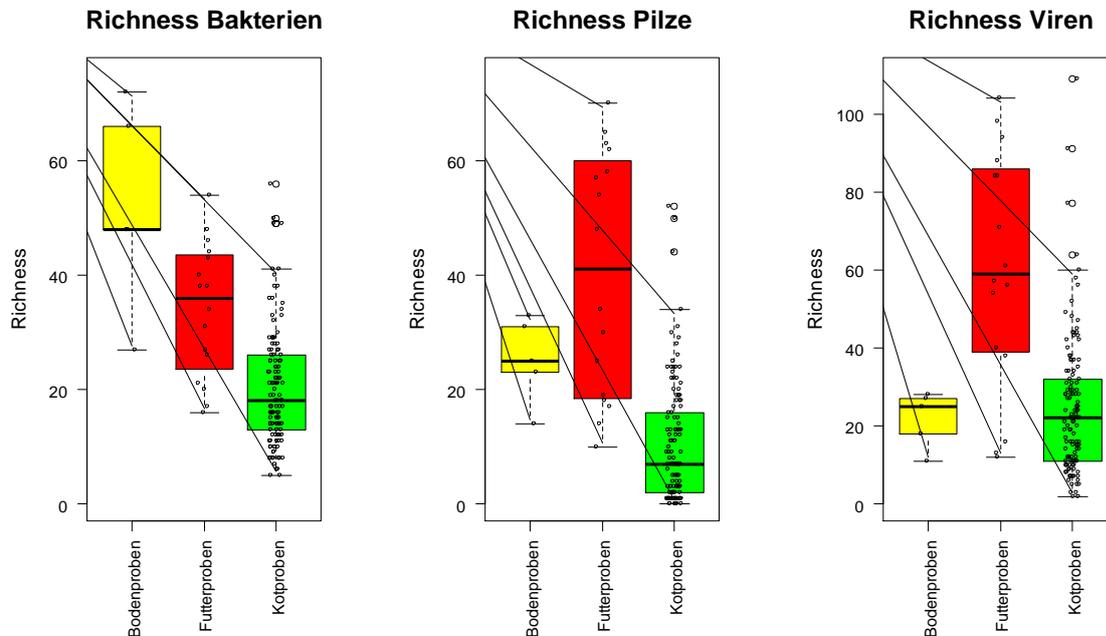


Abbildung 31: Richness Vergleich Boden-, Futter- und Kotproben. Bodenproben ( $n = 5$ ), Futterproben ( $n = 16$ ), Kotproben ( $n = 120$ )

Die nachfolgende Grafik (Abbildung 32) zeigt die Unterschiede der Mikrobiome von Futter-, Kot- und Bodenproben, gemessen am Shannon-Index. Die bakterielle Zusammensetzung von Boden- und Futterproben ( $p = 0,0009$ ) sowie von Boden- und Kotproben ( $p = 0,0002$ ) unterscheiden sich signifikant. Des Weiteren unterscheiden sich auch Boden- und Kotproben ( $p = 0,0031$ ) bezüglich ihres Mykobioms, sowie Futter- und Kotproben ( $p = 0,0010$ ) in Bezug auf ihr Viriom.

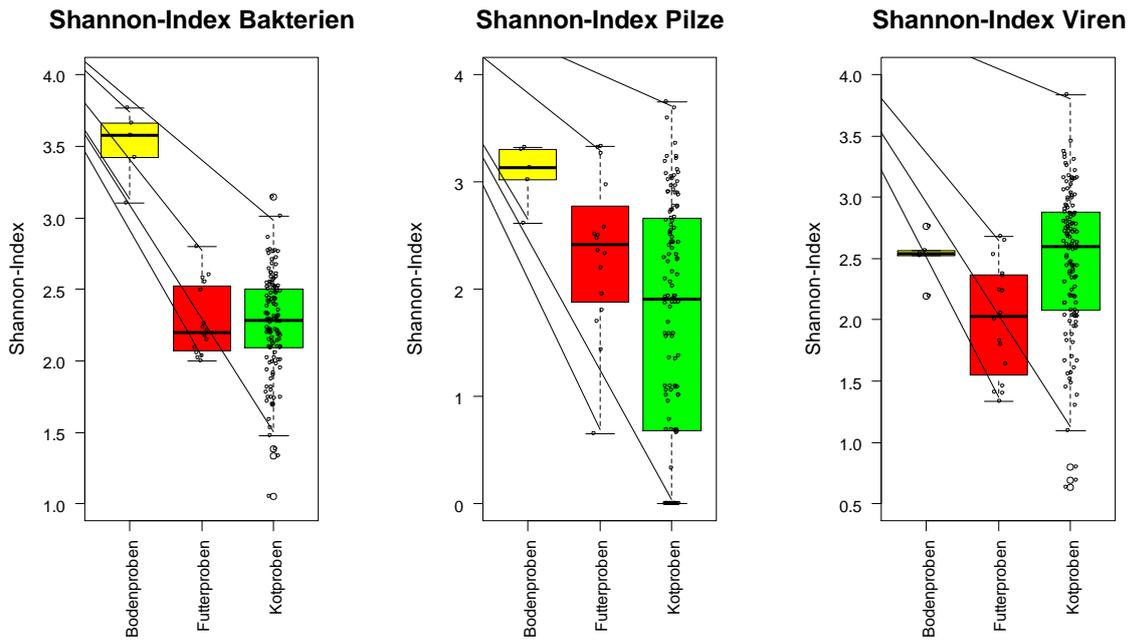


Abbildung 32: Shannon-Index Vergleich Boden-, Futter- und Kotproben. Bodenproben (n = 5), Futterproben (n = 16), Kotproben (n = 120)

Abbildung 33 zeigt, dass sich die bakterielle Zusammensetzung von Boden- und Futterproben ( $p = 0,0009$ ) und Boden- und Kotproben ( $p = 0,0002$ ) in Bezug auf die ENS signifikant unterscheidet. Außerdem unterscheiden sich auch Boden- und Kotproben ( $p = 0,0031$ ) gemessen am Mykobiom, sowie Futter- und Kotproben ( $p = 0,0010$ ) bezüglich ihres Virioms signifikant.

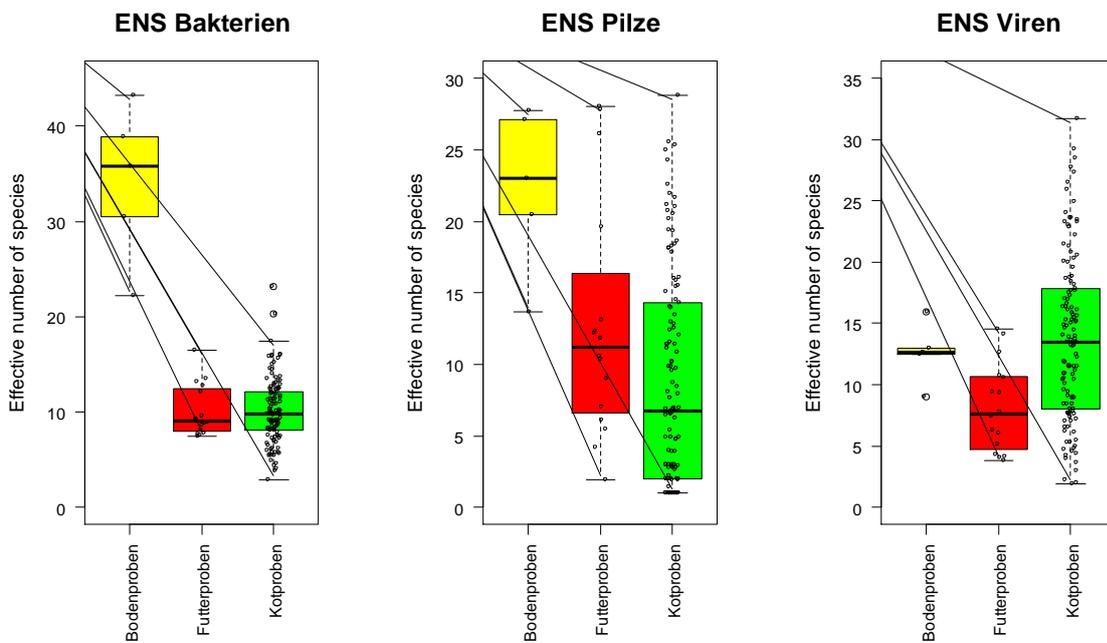


Abbildung 33: ENS Vergleich Boden-, Futter- und Kotproben. Bodenproben (n = 5), Futterproben (n = 16), Kotproben (n = 120)

## Beta-Diversität

Die Beta-Diversität wird in den nachfolgenden Abbildungen als Distanzmatrix dargestellt, welche mittels *Non-metric Multidimensional Scaling* (NMDS) berechnet wurde. Die Nähe der Punkte zueinander definiert sich durch das Maß der Ähnlichkeit derer jeweiligen Mikrobiome.

In Abbildung 34 werden die Ähnlichkeiten der bakteriellen Mikrobiome dargestellt. Die Proben des Baumkängurus sowie des Flinkwallabys, des Roten Riesenkängurus, des Sumpfwallabys und des Wombats sind in klaren Gruppen nahe beieinander. Die Mikrobiome der Bennettkängurus, Östlichen Grauen Riesenkängurus und der Koalas verteilen sich über einen größeren Raum in der Distanzmatrix, überlappen sich jedoch mit den bakteriellen Mikrobiomen aller anderer Tiere, abgesehen von jenen der Tasmanischen Teufeln. Diese gruppieren sich, wenn auch weit voneinander entfernt, am Unteren Rand der Matrix abseits der anderen Tiergruppen. Da es vom Bürstenschwanzkänguru und Rattenkänguru nur eine Probe gibt, lässt sich hier kein Cluster bestimmen. Allerdings sind die Proben dieser beiden Tiere nahe bei jenen der anderen pflanzenfressenden Beuteltiere.

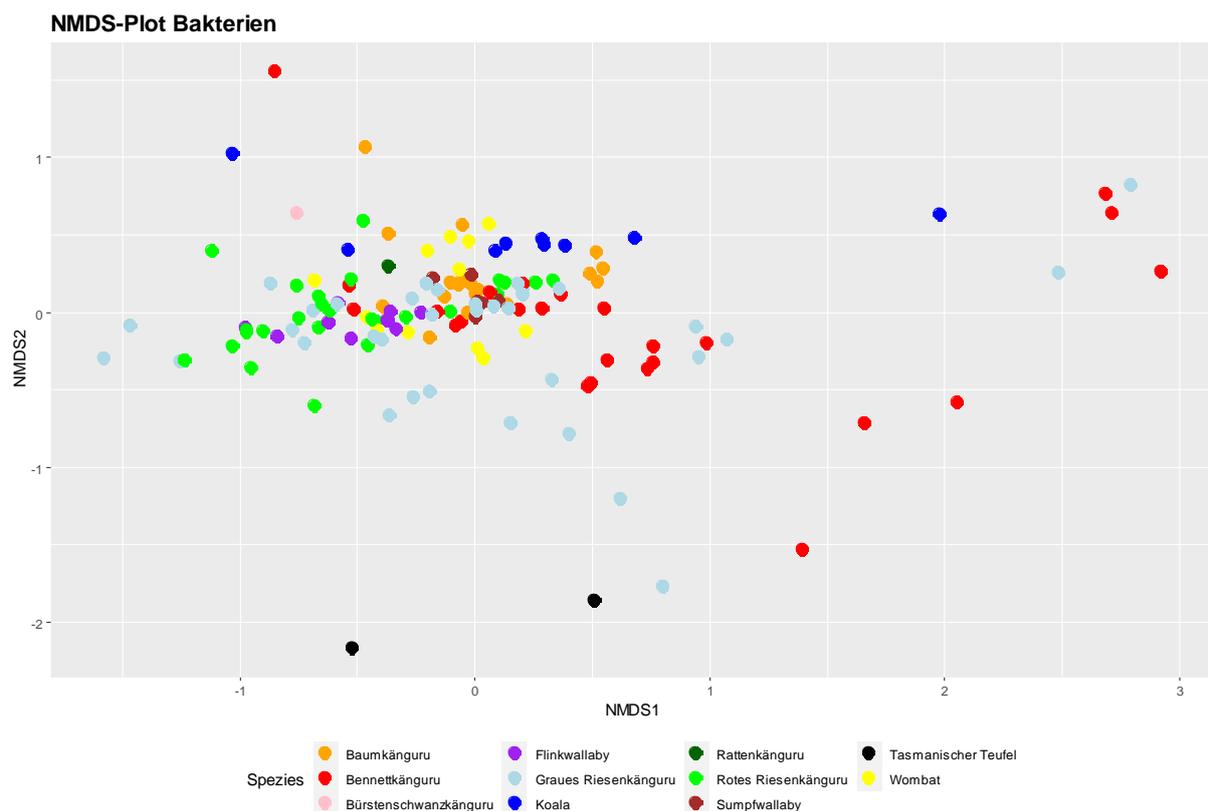


Abbildung 34: NMDS-Plot Bakterien. Baumkänguru ( $n=18$ ), Bennettkänguru ( $n=25$ ), Bürstenschwanzkänguru ( $n=1$ ), Flinkwallaby ( $n=9$ ), Graues Riesenkänguru ( $n=35$ ), Koala ( $n=9$ ), Rattenkänguru ( $n=1$ ), Rotes Riesenkänguru ( $n=26$ ), Sumpfwallaby ( $n=6$ ), Tasmanischer Teufel ( $n=2$ ), Wombat ( $n=12$ )

Im NMDS-Plot der Mykobiome (siehe Abbildung 35) stehen die Sumpfwallabys und Wombats, sowie ein Großteil der Baumkängurus wieder in besonderer Nähe zueinander. Die Flinkwallabys bilden abseits von diesen drei sich überlappenden Clustern ein eigenes. Die Mykobiome der Koalas und der Östlichen Grauen Riesenkängurus verteilen sich auf größeren Flächen, während sich die Abstände zwischen jenen der Roten Riesenkängurus am weitesten über den Plot erstrecken. Die Kotprobe des Bürstenschwanzkängurus verortet sich in der Nähe der Flinkwallabys und die des Rattenkängurus eher zentral bei den Clustern der anderen Tiere. Besonders auffallend ist hier, dass das Mykobiom des einen Tasmanischen Teufels eine große Ähnlichkeit mit jenen der anderen im Zentrum hat, während sich das des anderen Tasmanischen Teufels stärker von den anderen Tieren unterscheidet.

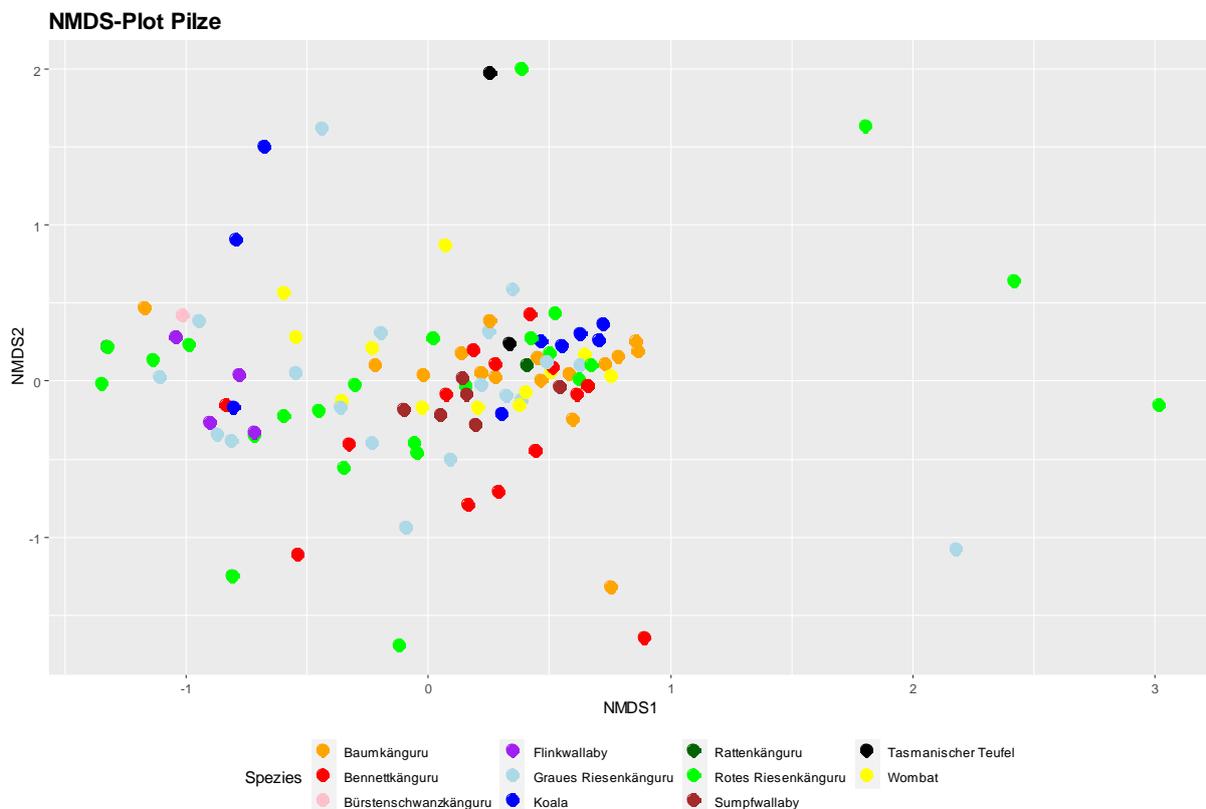


Abbildung 35: NMDS-Plot Pilze. Baumkänguru ( $n=17$ ), Bennettkänguru ( $n=25$ ), Bürstenschwanzkänguru ( $n=1$ ), Flinkwallaby ( $n=8$ ), Graues Riesenkänguru ( $n=31$ ), Koala ( $n=9$ ), Rattenkänguru ( $n=1$ ), Rotes Riesenkänguru ( $n=26$ ), Sumpfwallaby ( $n=6$ ), Tasmanischer Teufel ( $n=2$ ), Wombat ( $n=12$ )

In der Distanzmatrix der Viriome (Abbildung 36) lassen sich, abgesehen von den Gruppen der Sumpfwallabys, der Wombats und dem Großteil der Baumkängurus und Koalas, nur schwer andere Cluster genau eingrenzen. Die Kotproben der Flinkwallabys, der Roten Riesenkängurus, der Östlichen Grauen Riesenkängurus, der Bennettkängurus und der Tasmanischen Teufel sind über die gesamte Distanzmatrix verteilt. Jedoch ist auffällig, dass sich alle Cluster in gewissen Maßen überschneiden. Auch die Viriome des Bürstenschwanzkängurus und des Rattenkängurus befinden sich innerhalb dieser Cluster.

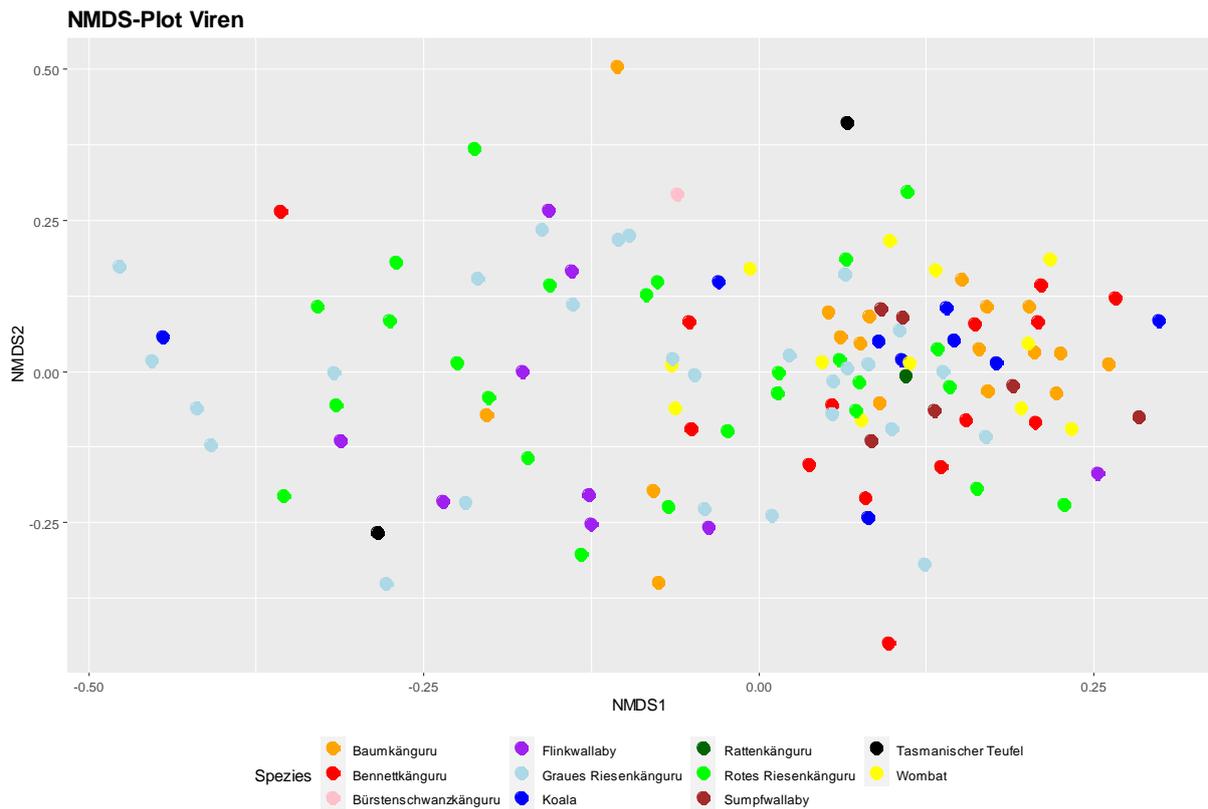


Abbildung 36: NMDS-Plot Viren. Baumkänguru (n= 18), Bennettkänguru (n =25), Bürstenschwanzkänguru (n = 1), Flinkwallaby (n = 9), Graues Riesenkänguru (n = 35), Koala (n = 9), Rattenkänguru (n = 1), Rotes Riesenkänguru (n = 26), Sumpfwallaby (n = 6), Tasmanischer Teufel (n = 2), Wombat (n = 12)

## Readzahl Vergleiche

In den nachfolgenden Grafiken (siehe Abbildung 37 - 39) werden die Maße der Biodiversität Richness, Shannon-Index und ENS den Readzahlen der jeweiligen Proben gegenübergestellt. Besonders in Bezug auf die Richness (Abbildung 37) lässt sich eine gewisse Korrelation zu der Anzahl der Reads in der jeweiligen Probe finden. In allen drei Mikrobiomen gibt es einen Aufwärtstrend gegenüber einer größeren Anzahl Reads.

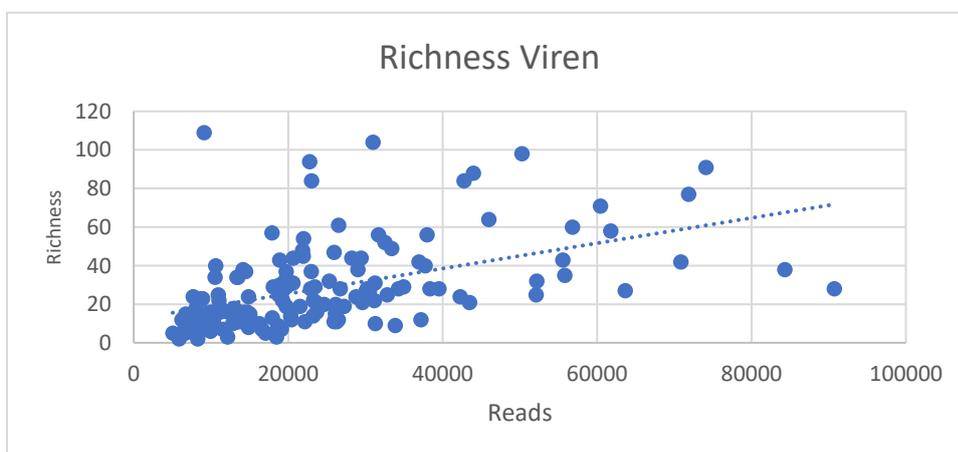
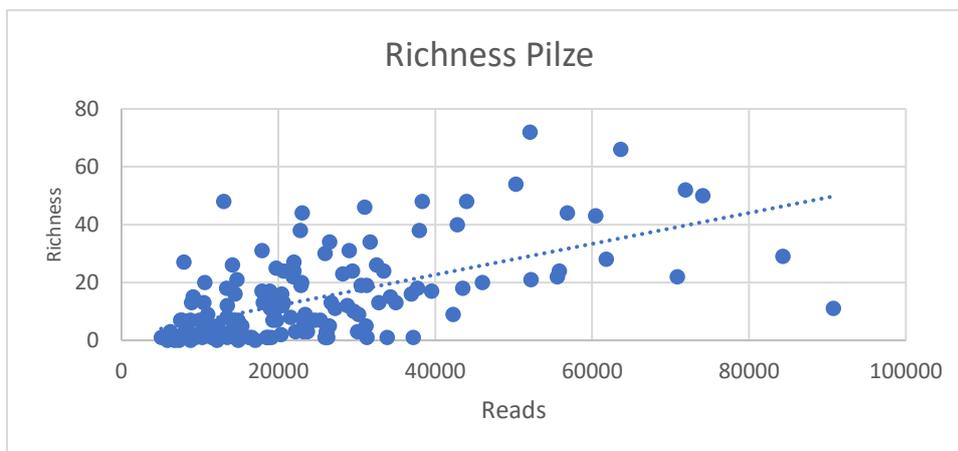
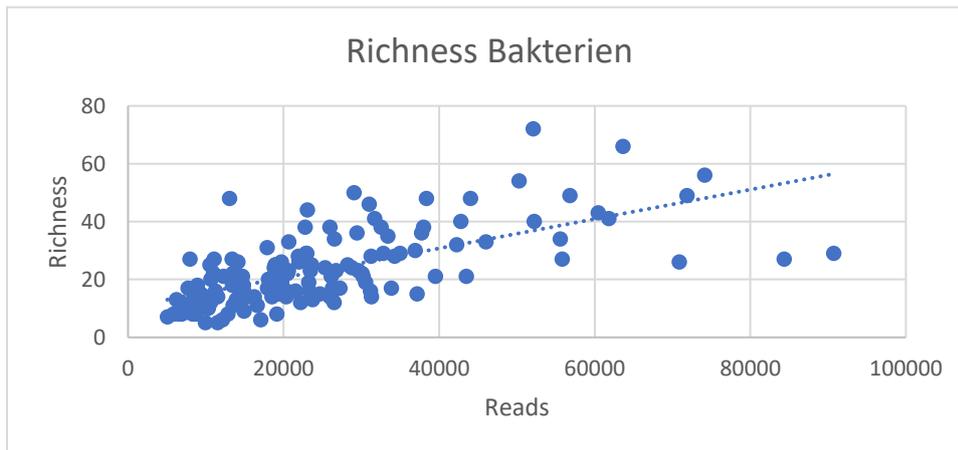


Abbildung 37: Vergleich der Richness aller Proben mit der Anzahl der Reads ( $n = 124$ ).

Auch im Vergleich des Shannon-Index mit der Readzahl (siehe Abbildung 38) lässt sich eine steigende Tendenz feststellen. Hier wird jedoch ein asymptotischer Charakter deutlich, da die Kurve spätestens ab etwa 20000 Reads abflacht. Die vielen Punkte im Mykobiom, die einen Shannon-Index von 0 haben, sind darauf zurückzuführen, dass in einigen Proben gar keine Pilze nachgewiesen werden konnten.

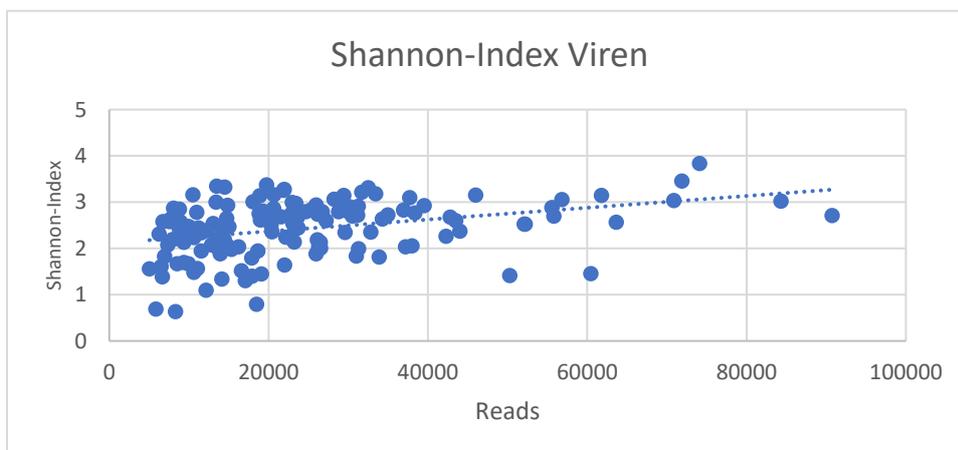
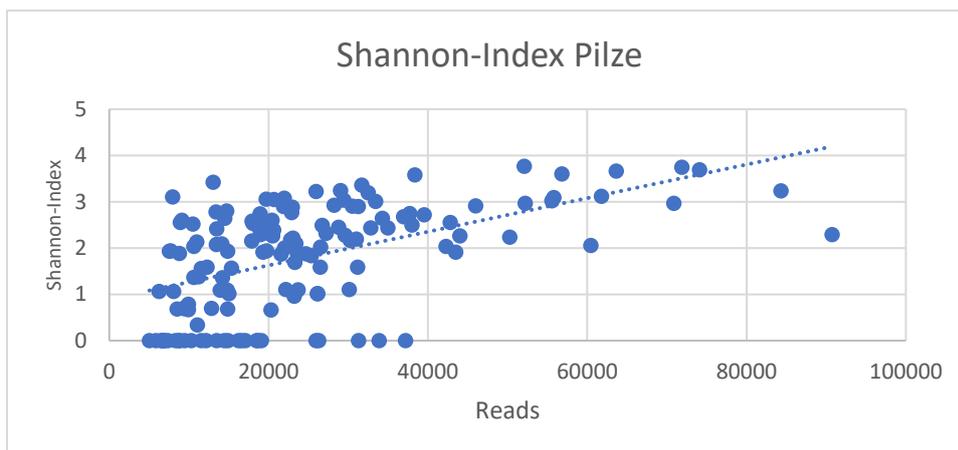
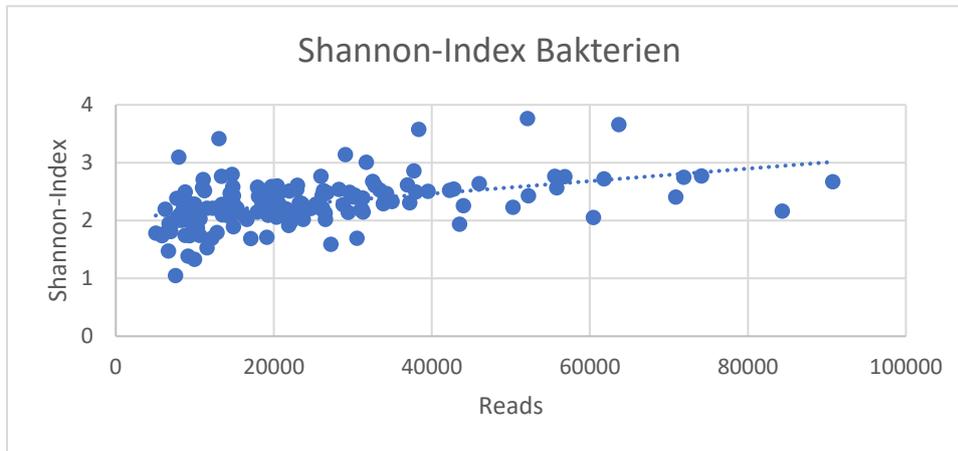


Abbildung 38: Vergleich des Shannon-Index aller Proben mit der Anzahl der Reads ( $n = 124$ ).

Abbildung 39 zeigt die Gegenüberstellung der ENS und der Readzahlen im Vergleich. Hier lässt sich ebenfalls ein leichter Aufwärtstrend mit steigender Anzahl der Reads feststellen. Vor allem bei den Mykobiomen herrscht eine stärkere Korrelation, so finden sich hier beispielsweise, im niedrigen Bereich der Readzahlen, deutlich mehr Proben, in denen keine Pilze nachgewiesen werden konnten.

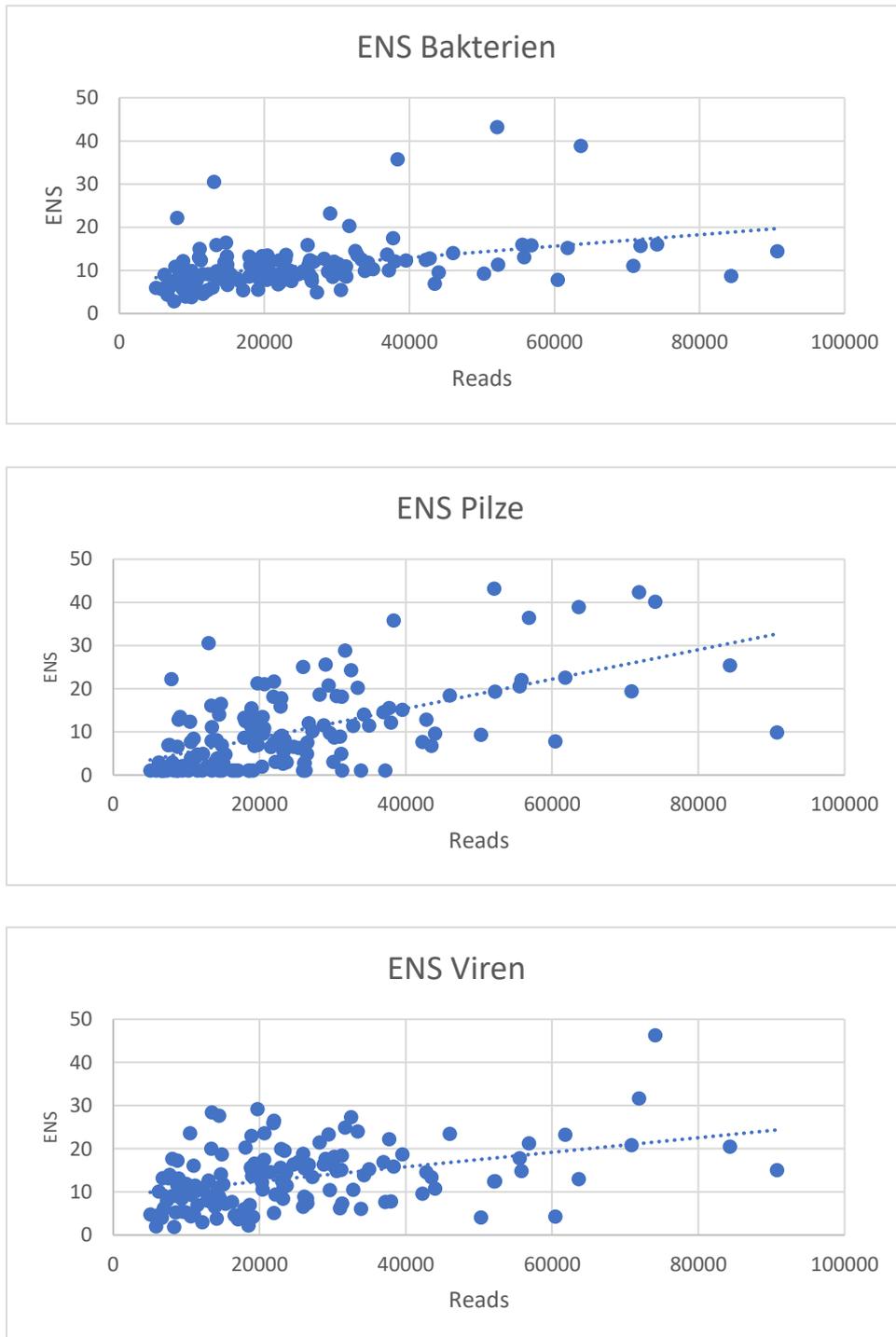


Abbildung 39: Vergleich der ENS aller Proben mit der Anzahl der Reads ( $n = 124$ ).

## Diskussion

### Alpha-Diversität Bakterien

Bei den Vergleichen der Futter-, Boden- und Kotproben in Bezug auf ihr bakterielles Mikrobiom zeigte sich, dass vor allem Clostridiaceae und Lachnospiraceae auffällig oft in einer hohen Anzahl sowohl im Futter als auch im Kot der jeweiligen Tiere zu finden waren. Im Vergleich dazu gab es nahezu keine Überschneidungen zwischen Bodenproben und Futter sowie Bodenproben und Tierkot. Dies zeigt, dass die Bakterien, die über die Nahrung aufgenommen wurden, durchaus das Mikrobiom des Tieres beeinflussen können. Eine Voraussetzung hierfür ist, dass sie sowohl auf den Pflanzen als auch im Verdauungstrakt der Tiere überleben können. So zeigen sich im Gegensatz dazu in den bakteriellen Mikrobiomen der Futterproben eine große Anzahl von Enterobacteriaceae und Enterococcaceae. Viele Angehörige dieser Familien sind typische Darmbakterien [21], allerdings ließen sich von diesen Familien nahezu keine Vertreter in den bakteriellen Mikrobiomen der untersuchten Tiere nachweisen. Dies könnte bedeuten, dass die oben genannten Bakterien zu Spezies dieser Familien gehören, die üblicherweise nicht den Verdauungstrakt von Tieren besiedeln, oder dass sie von den Organismen aus dem im Verdauungstrakt vorherrschenden Mikrobiom verdrängt werden. Eine andere Erklärung für die hohe Anzahl von Vertretern der Familien Clostridiaceae und Lachnospiraceae in Futter- und Kotproben könnte auch sein, dass sich diese in den beiden Mikrobiomen aufgrund der ähnlichen Nährstoffzusammensetzung von selbst anreichern. Um den genauen Einfluss der über die Nahrung aufgenommenen Bakterien zu untersuchen, müssten jedoch noch weitere Experimente mit unterschiedlichen Ernährungsformen durchgeführt werden. Dieser Versuch zeigt jedoch, dass sich der Kontakt zum Boden scheinbar wenig bis gar nicht auf die Futter- und Kotproben bezüglich der darin enthaltenen Bakterien auswirkte bis zum Zeitpunkt der Probenahme.

### Alpha-Diversität Pilze

Die Familien Aspergillaceae und Saccharomycetaceae sind in nahezu allen Kot-, Futter- und Bodenproben nachweisbar. Diese beiden Gruppen sind auch laut anderen Quellen oft im Mykobiom von Lebewesen anzutreffen, aber während Saccharomycetaceae als unbedenklich beschrieben werden, stehen Aspergillaceae eng im Zusammenhang mit Erkrankungen [22]. Da sich in allen drei Probenarten Vertreter der Aspergillaceae finden, besteht die Möglichkeit, dass es sich hierbei um Sporen dieser Pilze handeln könnte, die von ihnen kontinuierlich abgegeben werden und daher fast überall anzutreffen sind [23]. Die Tatsache, dass keines der Tiere Symptome einer Aspergillose zeigte, unterstützt die These, dass es sich bei dem Genetischen Material, das in den Kotproben gefunden wurde, um Sporen dieser Pilzfamilie handeln könnte, die den Verdauungstrakt des Tiers passiert haben,

ohne sich dort zu vermehren. Dies legt den Gedanken nahe, dass die Aspergillaceae aus den Kotproben der Tiere über die Nahrung aufgenommen wurden und diese somit einen direkten Einfluss auf das Mykobiom der Tiere haben kann. Genauso wie es sich bei den DNS-Fragmenten der Aspergillaceae um DNS aus deren Sporen handeln könnte, besteht ebenfalls die Möglichkeit bei den Saccharomycetaceae oder auch Nectriaceae, dass sich deren Population zumindest teilweise aus Sporen zusammensetzt, da auch Vertreter dieser Familien in der Lage sind, Sporen zu bilden [24,25]. Welche Pilze sich daher aktiv im Mikrobiom und somit an für den Wirtsorganismus relevante Prozesse beteiligen, ist deshalb mit dieser Datenlage schwer zu sagen. Dieselbe Problemstellung könnte sich auch auf einige sporenbildende Vertreter unter den Bakterien beziehen.

## Alpha-Diversität Viren

Im Vergleich der verschiedenen Viriome war das Virus *Escherichia virus P1* besonders auffällig. Diese Spezies kam in besonders großer Anzahl in den Futterproben vor. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass die Gattung *Escherichia*, welche der Wirtsorganismus für ebendieses Virus ist, zur Familie der Enterobacteriaceae zählt, die ebenfalls am häufigsten unter den Pflanzenproben anzutreffen ist. Des Weiteren ist auffällig, dass ein Großteil der Viren keiner Spezies zugeordnet werden konnte (NA). Gründe hierfür sind möglicherweise, dass die Datenbanken der Viren von Kaiju sowie von Kraken2 deutlich kleiner sind als die der Bakterien und Eukaryoten. Dieses Problem ist darauf zurückzuführen, dass bisher generell nur wenig Genomreferenzen zu Viren in sämtlichen Datenbanken zu finden sind [26]. Im Zuge dieser Arbeit fiel außerdem auf, dass viele Mikroorganismen, insbesondere Viren, im Laufe der Zeit oft verschiedenen Familien zugeordnet wurden, weshalb diese teilweise, je nach verwendeter Datenbank, anders eingeordnet werden. Bei näherer Betrachtung der verschiedenen Viren fällt außerdem auf, dass es sich bei sämtlichen gefundenen Spezies um DNS-Viren handelt. Grund hierfür ist möglicherweise methodischer Natur, da die verwendeten Extraktions-Kits nur zur Aufbereitung von DNS bestimmt sind und nicht für RNS. Zusätzlich wurde die DNS aller Futterproben mit dem DNeasy Plant Mini Kit extrahiert, das RNase A enthält. Die unterschiedliche Extraktionsmethode der Futterproben könnte außerdem der Grund dafür sein, warum sich deren Viriom so stark von jenen der Kot- und Bodenproben unterscheidet (siehe Abbildungen 15 – 21), obwohl sich Futter- und Kotproben bezüglich ihrer bakteriellen Zusammensetzung deutlich ähnlicher sind als Boden- und Kotproben. Unter den Viriomen der Futterproben stechen außerdem jene der Koalas heraus. Diese wurden, wie oben beschrieben, von einer externen Firma extrahiert und daher wahrscheinlich nicht mit dem DNeasy Plant Mini Kit, wie die anderen Futterproben. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Extraktionsmethode einen großen Einfluss auf die in den Proben gefundenen Virenspezies hat.

## Vergleiche Boden-, Futter- und Kotproben

Bei den Vergleichen der Futter-, Kot- und Bodenproben untereinander bezüglich ihrer bakteriellen Mikrobiome sowie deren Mykobiome zeichnet sich eine große Ähnlichkeit zwischen den Proben ab. Obwohl die Kotproben von unterschiedlichen Tieren aus verschiedenen Zoos kommen, sind sie sich in ihrem Mikrobiom doch sehr ähnlich. Besonders bei den Futter- und Bodenproben lassen sich in Bezug auf deren bakterielle Zusammensetzung, abgesehen von drei Ausnahmen, keine alleinstellenden Charakteristika identifizieren. Sofern man methodische Fehler ausschließt, könnte der Grund hierfür sein, dass sich immer ähnliche Bakterien- und Pilzfamilien aufgrund ähnlicher Bedingungen und Gegebenheiten in den von ihnen favorisierten Biomen anreichern. Um Genaueres über diesen Sachverhalt zu erfahren, müssten weitere Mikrobiomanalysen mit weiteren Boden- und Pflanzenproben von außerhalb der Zoos unternommen werden. Zu den oben erwähnten Ausnahmen bei den Futterproben, die sich von den anderen bezüglich ihres bakteriellen Mikrobioms unterscheiden, zählen wieder die extern extrahierten Eukalyptusproben der Koalas aus Duisburg. Die unterschiedliche Extraktionsart könnte ein Grund für deren Andersartigkeit sein. Betrachtet man jedoch das Mykobiom ebendieser Proben, so ähneln sie wieder stark den anderen Futterproben. Im Vergleich der bakteriellen Mikrobiome der Kotproben fallen besonders die Proben der Tasmanischen Teufel auf. Eine mögliche Ursache für deren Andersartigkeit ist, dass sie die einzigen Fleischfresser unter den hier untersuchten Beuteltieren sind. Das Mykobiom des Tasmanischen Teufels ähnelt hingegen wieder dem der anderen Tiere, was ein weiteres Indiz dafür sein könnte, dass die Pilzfamilien aus der Kotprobe größtenteils aus der Nahrung stammen und diese danach selektiert werden, ob sie den Verdauungstrakt unbeschadet überstehen können. Um diesem Umstand weiter auf den Grund zu gehen, müssten weitere Versuche mit Futterproben der Tasmanischen Teufel durchgeführt werden. Vergangene Studien am Menschen konnten zeigen, dass nach einer *Saccharomyces cerevisiae*-freien Ernährung auch kein *S. cerevisiae* mehr in der Stuhlprobe nachzuweisen war [27]. Im Umkehrschluss könnte dies aber bedeuten, dass Pilzfamilien, die in Kotproben gefunden werden, jedoch nicht in den zugehörigen Futterproben, den Verdauungstrakt besiedeln und zum Stoffwechsel des Wirtsorganismus beitragen. In den Vergleichen dieser Arbeit geschah dies allerdings so selten und in so geringem Ausmaß, dass diese Vermutung dadurch nicht belegt werden kann. Hierfür wären weitere Versuche mit speziell präparierten Futterproben vonnöten.

## Vergleiche von Richness, Shannon-Index und ENS

Im Vergleich der untersuchten Tierarten bezüglich der Biodiversität ihrer Mikrobiome zeigten sich nahezu keine Unterschiede. Grund hierfür ist wahrscheinlich ihre enge Verwandtschaft zueinander, da alle Arten zur Unterklasse der Beuteltiere gehören und abgesehen von den Koalas und den

Tasmanischen Teufeln eine ähnliche Ernährung haben. Vorangegangene Studien über einige fleisch- und pflanzenfressende Säugetiere zeigten, dass die Fleischfresser ein weniger diverses bakterielles Mikrobiom aufwiesen [28]. Dies deckt sich mit den hier gewonnenen Ergebnissen, da auch in diesen Vergleichen die Tasmanischen Teufel, als einzige Vertreter der Fleischfresser, die geringsten Werte in Richness, Shannon-Index und ENS bezüglich ihres bakteriellen Mikrobioms aufweisen. In Bezug auf die Biodiversität ihres Mykobioms unterscheiden sich die Tasmanischen Teufel wiederum kaum von jener der anderen Tiere, was ebenfalls die These stützt, dass ein Großteil der ausgeschiedenen Pilzfamilien aus der aufgenommenen Nahrung stammt und nur wenig an der Verdauung der Nahrung beteiligt ist. Im weiteren Vergleich der Tierarten fallen lediglich Baumkängurus, Koalas und Wombats mit ihrer stets hohen Biodiversität auf sowie Flinkwallabys, Östliche Graue Riesenköngurus und Rote Riesenköngurus, deren Biodiversität vergleichsweise eher gering ausfällt. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass es sich bei Koalas und Wombats um sogenannte *hindgut fermenter* handelt, die ihre Nahrung im hinteren Bereich ihres Verdauungstrakts verdauen, während Köngurus zu den *foregut fermenter* gehören, die ihre Nahrung im Magen verdauen [29,30]. Die jeweilige Art der Verdauung könnte einen Einfluss auf die Biodiversität haben, wobei dies nur die erhöhte Biodiversität von Koalas und Wombats erklären würde aber nicht jene der Baumköngurus, da diese zur Gruppe der *foregut fermenter* gehören. Um dies genauer zu untersuchen, wären weitere Mikrobiomanalysen der jeweiligen Tierarten und deren Futter nötig.

In der Gegenüberstellung aller Boden-, Futter- und Kotproben in Bezug auf deren Biodiversität, ähneln sich auch hier Futter- und Kotproben am meisten. Dies deckt sich mit den vorherigen Ergebnissen, in denen bereits gezeigt wurde, dass viele der im Futter nachgewiesenen Spezies ebenfalls in den Kotproben gefunden werden konnten. Man hätte erwarten können, dass sich die Mikrobiome von Tierkot und Boden durch häufigen Kontakt im Tiergehege aneinander angleichen, wie es neue Studien in bestimmten Fällen zeigen [31], allerdings deuten sowohl die Vergleiche der Biodiversitäten als auch die der Alpha-Diversitäten nicht auf eine solche Beziehung hin.

## Beta-Diversität

Auch in Bezug auf die Beta-Diversität zeichnete sich eine enge Verwandtschaft zwischen den Mikrobiomen der untersuchten Tierarten ab. Im Vergleich der bakteriellen Zusammensetzungen der Kotproben waren artspezifische Cluster erkennbar, auch wenn sich diese teilweise überlappten. Im Vergleich der Mykobiome ließen sich ebenfalls noch einige dieser Cluster unterscheiden, was jedoch bei den Viriomen kaum noch möglich war. Dies deutet darauf hin, dass jede Art ihr eigenes bakterielles Mikrobiom besitzt, auch wenn es sehr ähnlich zu jenen der anderen ist, jedoch kein artspezifisches Viriom. Auch in Bezug auf die Mykobiome scheint es keine feste Komposition aus Pilzfamilien zu geben, die man exakt einer Tierart zuordnen könnte, was ebenfalls darauf hindeutet, dass Pilze und

Wirtsorganismus weniger in einem symbiotischen Verhältnis zueinander stehen als Bakterien und Wirtsorganismus. Bezüglich des viralen Mikrobioms besteht zusätzlich die Möglichkeit, dass die Werte durch die oben bereits erwähnten Fehlerquellen bei der DNS-Extraktion verfälscht wurden und deshalb ein so ungleichmäßiges Bild darstellen.

Außerdem wurde für die Darstellung des Verwandtheitsgrads der verschiedenen Tierarten in Bezug auf ihre jeweiligen Biome das NMDS-Verfahren nach Bray-Curtis Dissimilarity anstelle der klassischen multidimensionalen Skalierungsmethode *Principal Coordinates Analysis* (PCoA) verwendet. Die PCoA-Methode führte in diesem Fall zu einer Bogenförmigen Anordnung der verschiedenen Tiere, dem sogenannten *Horseshoe effect* oder *Arch effect* (siehe Abbildung 73 – 75 (Anhang)). Dieses Phänomen tritt gelegentlich bei multi-dimensionalen Entfernungsdiagrammen der mikrobiellen Ökologie auf, wenn ein ökologischer Gradient zustande kommt, d.h. wenn die Proben einem Gradienten ähnlich, ihre Merkmale nur allmählich verändern. Dies kann vorkommen, wenn sich die Proben nur sehr wenig unterscheiden oder auch, wenn sie keine gemeinsamen Merkmale besitzen, was fälschlicherweise zu einer scheinbaren Nähe in der Distanzmatrix führt [32].

## Readzahl-Vergleiche

Während den Sequenzierungen zeigte sich, dass die Zahlen der Gesamtreads pro Flongle Flow Cell starken Schwankungen unterlagen (siehe Abbildung 76 (Anhang)). Es kann ausgeschlossen werden, dass die Anzahl der Gesamtreads von der DNS-Konzentration abhängt, da diese in allen Versuchen gleich war. Auch die Verwendung des PCR-Kits scheint diesbezüglich keine Rolle zu spielen. Bereits bei den zuvor durchgeführten Flow Cell-Checks, in denen die Computersoftware die zur Verfügung stehenden Poren prüfte, zeigte sich hier eine sehr inkonsistente Anzahl ebendieser Poren im Laufe der Versuche. Einige Flongle Flow Cells mussten sogar verworfen werden, da diese die werkseitig zugesagte 50-Poren-Grenze nicht überschritten. In der Regel erbrachten Flow Cells mit einer geringeren Porenzahl auch weniger Gesamtreads im Laufe ihrer Nutzung. Ein genaues Muster zeichnete sich diesbezüglich jedoch nicht ab, da vor allem Flow Cells mit einer besonders hohen initialen Porenzahl dazu neigten, bereits nach etwa drei Stunden nahezu alle aktiven Poren zu verlieren, was sich ebenfalls negativ auf die Zahl der Gesamtreads auswirkte. Wie nun in den Abbildungen 37, 38 und 39 zu sehen ist, herrscht eine gewisse Korrelation zwischen der Anzahl der Reads und dem Maß der Biodiversität. Dies legt nahe, dass sich die Qualität der Flongle Flow Cell auf die Ergebnisse auswirken kann. In den Abbildungen wird auch ersichtlich, dass sich der Verlauf der Punkte mit zunehmender Readzahl abflacht, was darauf zurückzuführen sein kann, dass ab einer gewissen Readzahl praktisch alle identifizierbaren Spezies bzw. Individuen in der Probe gefunden wurden. In den beiden Vergleichen mit der Richness bzw. dem Shannon-Index, lässt sich eine stärkere Korrelation zwischen Richness und Readzahl feststellen. Da sich die Richness nur aus der Anzahl der verschiedenen Spezies berechnet, während der Shannon-Index

auch deren Abundanz im Mikrobiom berücksichtigt, legt dies nahe, dass unter einer geringen Readzahl vor allem die Anzahl an identifizierten Spezies schrumpft.

## Ausblick

Um bessere Einblicke in das Mikrobiom der Beuteltiere zu erhalten, muss in zukünftigen Forschungsvorhaben eine deutlich größere Anzahl von Proben analysiert werden. Dazu gehören im Allgemeinen mehr Kotproben der einzelnen Spezies aber vor allem auch verschiedene Futterproben, um besser zu verstehen, welche Mikroorganismen tatsächlich Bestandteil der Darmflora sind und welche lediglich aus der Nahrung aufgenommen und wieder ausgeschieden werden. Diesbezüglich wäre es auch von Interesse zu erfahren, welche Einflüsse das Mykobiom der Darmflora, bzw. die durch die Nahrung aufgenommenen Pilze auf die Verdauung der Tiere haben. Des Weiteren sollte in Zukunft auch nach anderen Faktoren, die das Mikrobiom beeinflussen könnten, wie z.B. Krankheit, Temperatur oder auch Gesellschaft von anderen Tieren gesucht werden, um die Mikrobiomanalyse für ein breiteres Spektrum als diagnostisches Hilfsmittel in der Tiermedizin einsetzen zu können.

## Literaturverzeichnis

1. Peixoto RS, Harkins DM, Nelson KE. Advances in Microbiome Research for Animal Health. *Annu Rev Anim Biosci.* 2021 Feb 16;9:289-311
2. Aluai-Cunha CS, Pinto CA, Correia IADFL, Dos Reis Serra CA, Santos AAF. The animal's microbiome and cancer: A translational perspective. *Vet Comp Oncol.* 2023 Jun;21(2):166-183.
3. Dougherty MW, Jobin C. Intestinal bacteria and colorectal cancer: etiology and treatment. *Gut Microbes.* 2023 Jan-Dec;15(1):2185028.
4. McCoy KD, Mager LF. Impact of the microbiome on tumor immunity. *Curr Opin Immunol.* 2021 Apr;69:39-46.
5. Suchodolski JS. Analysis of the gut microbiome in dogs and cats. *Vet Clin Pathol.* 2022 Feb;50 Suppl 1(Suppl 1):6-17.
6. Barko PC, McMichael MA, Swanson KS, Williams DA. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *J Vet Intern Med.* 2018 Jan;32(1):9-25.
7. Ryu EP, Davenport ER. Host Genetic Determinants of the Microbiome Across Animals: From *Caenorhabditis elegans* to Cattle. *Annu Rev Anim Biosci.* 2022 Feb 15;10:203-226.
8. Petrullo, L., Ren, T., Wu, M. et al. Glucocorticoids coordinate changes in gut microbiome composition in wild North American red squirrels. *Sci Rep* 12, 2605 (2022).
9. Parkin K, Christophersen CT, Verhasselt V, Cooper MN, Martino D. Risk Factors for Gut Dysbiosis in Early Life. *Microorganisms.* 2021 Sep 30;9(10):2066.
10. Gagnière J, Raisch J, Veziat J, Barnich N, Bonnet R, Buc E, Bringer MA, Pezet D, Bonnet M. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2016 Jan 14;22(2):501-18.
11. McCombie WR, McPherson JD, Mardis ER. Next-Generation Sequencing Technologies. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2019 Nov 1;9(11):a036798.
12. <https://nanoporetech.com/platform/technology> (Zuletzt abgerufen am 03.12.2023)
13. Forcina G, Pérez-Pardal L, Carvalheira J, Beja-Pereira A. Gut Microbiome Studies in Livestock: Achievements, Challenges, and Perspectives. *Animals (Basel).* 2022 Nov 30;12(23):3375.
14. Belvoncikova P, Splichalova P, Videnska P, Gardlik R. The Human Mycobiome: Colonization, Composition and the Role in Health and Disease. *J Fungi (Basel).* 2022 Oct 4;8(10):1046.

15. Balderramo DC, Romagnoli PA, Granlund AVB, Catalan-Serra I. Fecal Fungal Microbiota (Mycobiome) Study as a Potential Tool for Precision Medicine in Inflammatory Bowel Disease. *Gut Liver*. 2023 Jul 15;17(4):505-515.
16. <https://www.zootierliste.de/> (Zuletzt abgerufen am 03.12.2023)
17. <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=8896817a-253f-4952-b845-0aab796813ce&lang=en> (Zuletzt abgerufen am 03.12.2023)
18. <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=6b9bcd96-d7d4-48a1-9838-58dbfb0e57d0&lang=en> (Zuletzt abgerufen am 03.12.2023)
19. [https://community.nanoporetech.com/docs/prepare/library\\_prep\\_protocols/rapid-barcoding-sequencing-sqk-rbk004/v/rbk\\_9054\\_v2\\_revaf\\_14aug2019/equipment-and-consumables?devices=minion](https://community.nanoporetech.com/docs/prepare/library_prep_protocols/rapid-barcoding-sequencing-sqk-rbk004/v/rbk_9054_v2_revaf_14aug2019/equipment-and-consumables?devices=minion) (Zuletzt abgerufen am 03.12.2023)
20. [https://community.nanoporetech.com/docs/prepare/library\\_prep\\_protocols/rapid-pcr-barcoding/v/rpb\\_9059\\_v1\\_revq\\_14aug2019/equipment-and-consumables?devices=minion](https://community.nanoporetech.com/docs/prepare/library_prep_protocols/rapid-pcr-barcoding/v/rpb_9059_v1_revq_14aug2019/equipment-and-consumables?devices=minion) (Zuletzt abgerufen am 03.12.2023)
21. Kang E, Crouse A, Chevallier L, Pontier SM, Alzahrani A, Silué N, Campbell-Valois FX, Montagutelli X, Gruenheid S, Malo D. Enterobacteria and host resistance to infection. *Mamm Genome*. 2018 Aug;29(7-8):558-576.
22. Zhang L, Zhan H, Xu W, Yan S, Ng SC. The role of gut mycobiome in health and diseases. *Therap Adv Gastroenterol*. 2021 Sep 23;14:17562848211047130.
23. Fang W, Latgé JP. Microbe Profile: *Aspergillus fumigatus*: a saprotrophic and opportunistic fungal pathogen. *Microbiology (Reading)*. 2018 Aug;164(8):1009-1011.
24. Wendland J. Sporulation in *Ashbya gossypii*. *J Fungi (Basel)*. 2020 Aug 29;6(3):157.
25. Döbbeler P. Ascospore diversity of bryophilous Hypocreales and two new hepaticolous *Nectria* species. *Mycologia*. 2005 Jul-Aug;97(4):924-34.
26. Rose R, Constantinides B, Tapinos A, Robertson DL, Prosperi M. Challenges in the analysis of viral metagenomes. *Virus Evol*. 2016 Aug 3;2(2):vew022.
27. Auchtung TA, Fofanova TY, Stewart CJ, Nash AK, Wong MC, Gesell JR, Auchtung JM, Ajami NJ, Petrosino JF. Investigating Colonization of the Healthy Adult Gastrointestinal Tract by Fungi. *mSphere*. 2018 Mar 28;3(2):e00092-18.

28. Zoelzer, F., Burger, A.L. & Dierkes, P.W. Unraveling differences in fecal microbiota stability in mammals: from high variable carnivores and consistently stable herbivores. *anim microbiome* 3, 77 (2021).
29. Shiffman ME, Soo RM, Dennis PG, Morrison M, Tyson GW, Hugenholtz P. Gene and genome-centric analyses of koala and wombat fecal microbiomes point to metabolic specialization for *Eucalyptus* digestion. *PeerJ*. 2017 Nov 16;5:e4075.
30. Hume, Ian D. Microbial Fermentation in Herbivorous Marsupials. *BioScience*, vol. 34, no. 7, 1984, pp. 435–40.
31. Dutton CL, Subalusky AL, Sanchez A, Estrela S, Lu N, Hamilton SK, Njoroge L, Rosi EJ, Post DM. The meta-gut: community coalescence of animal gut and environmental microbiomes. *Sci Rep*. 2021 Nov 30 und 348487, 11(1):23117.
32. Morton JT, Toran L, Edlund A, Metcalf JL, Lauber C, Knight R. Uncovering the Horseshoe Effect in Microbial Analyses. *mSystems*. 2017 Feb 21;2(1):e00166-16.

## Anhang

## Zootabelle mit Abkürzungen (Metadaten)

Tabelle 5: Metadaten mit allen Proben und deren IDs

ID	Spezies	Zoo	Reads	Probenart	PCR-Zyklen
AUGBEN1	Bennettkänguru	Augsburg	26087	Kotprobe	-
AUGBEN2	Bennettkänguru	Augsburg	30085	Kotprobe	-
BERBKAE01	Baumkänguru	Tierpark Berlin	71865	Kotprobe	-
BERBKAE10	Baumkänguru	Tierpark Berlin	20488	Kotprobe	-
BERBKAE11	Baumkänguru	Tierpark Berlin	20595	Kotprobe	-
BERBKAE02	Baumkänguru	Tierpark Berlin	56803	Kotprobe	-
BERBKAE03	Baumkänguru	Tierpark Berlin	74100	Kotprobe	-
BERBKAE04	Baumkänguru	Tierpark Berlin	19699	Kotprobe	-
BERBKAE05	Baumkänguru	Tierpark Berlin	21952	Kotprobe	-
BERBKAE06	Baumkänguru	Tierpark Berlin	31697	Kotprobe	-
BERBKAE07	Baumkänguru	Tierpark Berlin	28205	Kotprobe	-
BERBKAE08	Baumkänguru	Tierpark Berlin	18905	Kotprobe	-
BERBKAE09	Baumkänguru	Tierpark Berlin	14461	Kotprobe	-
DUI0811BENN1	Bennettkänguru	Duisburg	7525	Kotprobe	70
DUI0811BENN2	Bennettkänguru	Duisburg	24646	Kotprobe	-
DUI0811BUER1	Bürstenschwanzkänguru	Duisburg	9334	Kotprobe	-
DUI0811KOLA1	Koala	Duisburg	25951	Kotprobe	60
DUI0811KOLA2	Koala	Duisburg	6628	Kotprobe	-
DUI0811KOLA3	Koala	Duisburg	20662	Kotprobe	70
DUI0811KOLA4	Koala	Duisburg	10498	Kotprobe	60
DUI0811KOLA5	Koala	Duisburg	29423	Kotprobe	60
DUI0811KOLA6	Koala	Duisburg	21869	Kotprobe	60
DUI0811SUMF1	Sumpfwallaby	Duisburg	30210	Kotprobe	-
DUI0811SUMF2	Sumpfwallaby	Duisburg	23415	Kotprobe	-
DUI0811TEUF1	Tasmanischer Teufel	Duisburg	9928	Kotprobe	70
DUI0811TEUF2	Tasmanischer Teufel	Duisburg	9120	Kotprobe	60
DUI0811WOMB1	Wombat	Duisburg	84320	Kotprobe	-
DUI0811WOMB2	Wombat	Duisburg	55798	Kotprobe	-
DUI0811WOMB3	Wombat	Duisburg	12245	Kotprobe	-
DUI0811WOMB4	Wombat	Duisburg	70864	Kotprobe	-
HEIRRK1	Rotes Riesenkänguru	Heidelberg	19093	Kotprobe	-
HEIRRK2	Rotes Riesenkänguru	Heidelberg	8048	Kotprobe	-
HEIRRK3	Rotes Riesenkänguru	Heidelberg	21531	Kotprobe	-
HEIRRK4	Rotes Riesenkänguru	Heidelberg	20306	Kotprobe	-
HEIRRK5	Rotes Riesenkänguru	Heidelberg	23206	Kotprobe	-
HEIRRK6	Rotes Riesenkänguru	Heidelberg	8742	Kotprobe	-
KOPGRK1	Östl. Graues Riesenkänguru	Kopenhagen	55539	Kotprobe	-
KOPGRK2	Östl. Graues Riesenkänguru	Kopenhagen	39512	Kotprobe	-

KOPGRK3	Östl. Graues Riesenkänguru	Kopenhagen	18046	Kotprobe	-
KOPGRK4	Östl. Graues Riesenkänguru	Kopenhagen	14200	Kotprobe	-
KOPGRK5	Östl. Graues Riesenkänguru	Kopenhagen	9416	Kotprobe	-
KOPGRK6	Östl. Graues Riesenkänguru	Kopenhagen	8505	Kotprobe	-
KOPRAT1	Rattenkänguru	Kopenhagen	15901	Kotprobe	-
KOPWOM1	Wombat	Kopenhagen	19711	Kotprobe	-
KOPWOM2	Wombat	Kopenhagen	18873	Kotprobe	-
KOPWOM3	Wombat	Kopenhagen	10954	Kotprobe	-
KOPWOM4	Wombat	Kopenhagen	13372	Kotprobe	-
KOPWOM5	Wombat	Kopenhagen	11195	Kotprobe	-
KOPWOM6	Wombat	Kopenhagen	8762	Kotprobe	-
KOPWOM7	Wombat	Kopenhagen	11509	Kotprobe	-
KOPWOM8	Wombat	Kopenhagen	7689	Kotprobe	-
KREBKAEM1	Baumkänguru	Krefeld	26717	Kotprobe	-
KREBKAEM2	Baumkänguru	Krefeld	19769	Kotprobe	-
KREBKAEM3	Baumkänguru	Krefeld	14845	Kotprobe	-
KREBKAEW1	Baumkänguru	Krefeld	7310	Kotprobe	-
KREBKAEW2	Baumkänguru	Krefeld	14855	Kotprobe	-
KREBKAEW3	Baumkänguru	Krefeld	26265	Kotprobe	-
KREBKAEW4	Baumkänguru	Krefeld	14797	Kotprobe	-
KREGRK10	Graues Riesenkänguru	Krefeld	10292	Kotprobe	-
KREGRK02	Östl. Graues Riesenkänguru	Krefeld	31259	Kotprobe	-
KREGRK03	Östl. Graues Riesenkänguru	Krefeld	17060	Kotprobe	-
KREGRK04	Östl. Graues Riesenkänguru	Krefeld	12139	Kotprobe	-
KREGRK05	Östl. Graues Riesenkänguru	Krefeld	11515	Kotprobe	-
KREGRK06	Östl. Graues Riesenkänguru	Krefeld	5843	Kotprobe	-
KREGRK07	Östl. Graues Riesenkänguru	Krefeld	23704	Kotprobe	-
KREGRK08	Östl. Graues Riesenkänguru	Krefeld	18472	Kotprobe	-
KREGRK09	Östl. Graues Riesenkänguru	Krefeld	6730	Kotprobe	-
LANBEN	Bennettkänguru	Landau	37707	Kotprobe	-
MUEFLK01	Flinkwallaby	München	22162	Kotprobe	-
MUEFLK10	Flinkwallaby	München	26459	Kotprobe	-
MUEFLK02	Flinkwallaby	München	33841	Kotprobe	-
MUEFLK03	Flinkwallaby	München	13483	Kotprobe	-
MUEFLK04	Flinkwallaby	München	26151	Kotprobe	-
MUEFLK05	Flinkwallaby	München	12811	Kotprobe	-
MUEFLK06	Flinkwallaby	München	18654	Kotprobe	-
MUEFLK07	Flinkwallaby	München	25954	Kotprobe	-
MUEFLK08	Flinkwallaby	München	14885	Kotprobe	-
MUERRK01	Rotes Riesenkänguru	München	31149	Kotprobe	-
MUERRK10	Rotes Riesenkänguru	München	33401	Kotprobe	-
MUERRK02	Rotes Riesenkänguru	München	32803	Kotprobe	-
MUERRK03	Rotes Riesenkänguru	München	14455	Kotprobe	-
MUERRK04	Rotes Riesenkänguru	München	16226	Kotprobe	-
MUERRK05	Rotes Riesenkänguru	München	6925	Kotprobe	-

MUERRK06	Rotes Riesenkänguru	München	16587	Kotprobe	-
MUERRK07	Rotes Riesenkänguru	München	22960	Kotprobe	-
MUERRK08	Rotes Riesenkänguru	München	32506	Kotprobe	-
MUERRK09	Rotes Riesenkänguru	München	22882	Kotprobe	-
MUESUM1	Sumpfwallaby	München	18963	Kotprobe	-
MUESUM2	Sumpfwallaby	München	18787	Kotprobe	-
MUESUM3	Sumpfwallaby	München	31237	Kotprobe	-
MUESUM4	Sumpfwallaby	München	13461	Kotprobe	-
NEKBEN1	Bennettkänguru	Neunkirchen	90724	Kotprobe	-
NEKBEN2	Bennettkänguru	Neunkirchen	29580	Kotprobe	-
NEKBEN3	Bennettkänguru	Neunkirchen	8913	Kotprobe	-
NEKBEN4	Bennettkänguru	Neunkirchen	43473	Kotprobe	-
NEKBEN5	Bennettkänguru	Neunkirchen	8288	Kotprobe	-
NEUBEN1	Bennettkänguru	Neuwied	23283	Kotprobe	-
NEUBEN2	Bennettkänguru	Neuwied	36913	Kotprobe	-
NEUBEN3	Bennettkänguru	Neuwied	61779	Kotprobe	-
NEUBEN4	Bennettkänguru	Neuwied	45988	Kotprobe	-
NEUGRK1	Östl. Graues Riesenkänguru	Neuwied	13892	Kotprobe	-
NEUGRK2	Östl. Graues Riesenkänguru	Neuwied	13419	Kotprobe	-
NEUGRK3	Östl. Graues Riesenkänguru	Neuwied	8786	Kotprobe	-
NEUGRK4	Östl. Graues Riesenkänguru	Neuwied	9933	Kotprobe	-
NURRRK01	Rotes Riesenkänguru	Nürnberg	6485	Kotprobe	-
NURRRK10	Rotes Riesenkänguru	Nürnberg	9350	Kotprobe	-
NURRRK02	Rotes Riesenkänguru	Nürnberg	19730	Kotprobe	-
NURRRK03	Rotes Riesenkänguru	Nürnberg	5044	Kotprobe	-
NURRRK04	Rotes Riesenkänguru	Nürnberg	30515	Kotprobe	-
NURRRK05	Rotes Riesenkänguru	Nürnberg	15318	Kotprobe	-
NURRRK06	Rotes Riesenkänguru	Nürnberg	27216	Kotprobe	-
NURRRK07	Rotes Riesenkänguru	Nürnberg	37166	Kotprobe	-
NURRRK08	Rotes Riesenkänguru	Nürnberg	19282	Kotprobe	-
NURRRK09	Rotes Riesenkänguru	Nürnberg	10609	Kotprobe	-
SCHGRK1	Östl. Graues Riesenkänguru	Schwerin	23595	Kotprobe	-
SCHGRK2	Östl. Graues Riesenkänguru	Schwerin	28753	Kotprobe	-
SCHGRK3	Östl. Graues Riesenkänguru	Schwerin	42247	Kotprobe	-
SCHGRK4	Östl. Graues Riesenkänguru	Schwerin	34944	Kotprobe	-
SCHGRK5	Östl. Graues Riesenkänguru	Schwerin	6226	Kotprobe	-
SCHGRK6	Östl. Graues Riesenkänguru	Schwerin	34262	Kotprobe	-
SCHGRK7	Östl. Graues Riesenkänguru	Schwerin	25321	Kotprobe	-
SCHGRK8	Östl. Graues Riesenkänguru	Schwerin	52201	Kotprobe	-
ZUEKOA1	Koala	Zürich	15014	Kotprobe	-
ZUEKOA2	Koala	Zürich	29019	Kotprobe	-
ZUEKOA3	Koala	Zürich	11028	Kotprobe	70
AUGBENHEU	Bennettkänguru	Augsburg	23038	Futterprobe	60
AUGBENPEL	Bennettkänguru	Augsburg	30994	Futterprobe	70
DUI0711PLAN2	Plantage	Duisburg	14705	Futterprobe	70

DUI0711PLAN3	Plantage	Duisburg	20401	Futterprobe	60
LANBENGEM	Bennettkänguru	Landau	17914	Futterprobe	70
LANBENHEU	Bennettkänguru	Landau	22767	Futterprobe	60
LANBENPEL	Bennettkänguru	Landau	26514	Futterprobe	60
NEKBENGRU	Bennettkänguru	Neunkirchen	17881	Futterprobe	60
NEUBENHEU	Bennettkänguru	Neuwied	50272	Futterprobe	70
NEUBENMUS	Bennettkänguru	Neuwied	60434	Futterprobe	60
NEUGRKHEU	Östl. Graues Riesenkänguru	Neuwied	21970	Futterprobe	60
NEUGRKMUS	Östl. Graues Riesenkänguru	Neuwied	10614	Futterprobe	60
NEUGRKSTR	Östl. Graues Riesenkänguru	Neuwied	43991	Futterprobe	60
SCHGRKGRU	Östl. Graues Riesenkänguru	Schwerin	37971	Futterprobe	60
SCHGRKHEU	Östl. Graues Riesenkänguru	Schwerin	42780	Futterprobe	60
SCHGRKPEL	Östl. Graues Riesenkänguru	Schwerin	14129	Futterprobe	-
AUGBENBOD	Bennettkänguru	Augsburg	38340	Bodenprobe	-
LANBENBOD	Bennettkänguru	Landau	7954	Bodenprobe	-
NEUBENBOD	Bennettkänguru	Neuwied	63633	Bodenprobe	-
NEUGRKBOD	Östl. Graues Riesenkänguru	Neuwied	52080	Bodenprobe	-
SCHGRKBOD	Östl. Graues Riesenkänguru	Schwerin	13032	Bodenprobe	-

# Alpha-Diversität

## Mikrobiom Bakterien

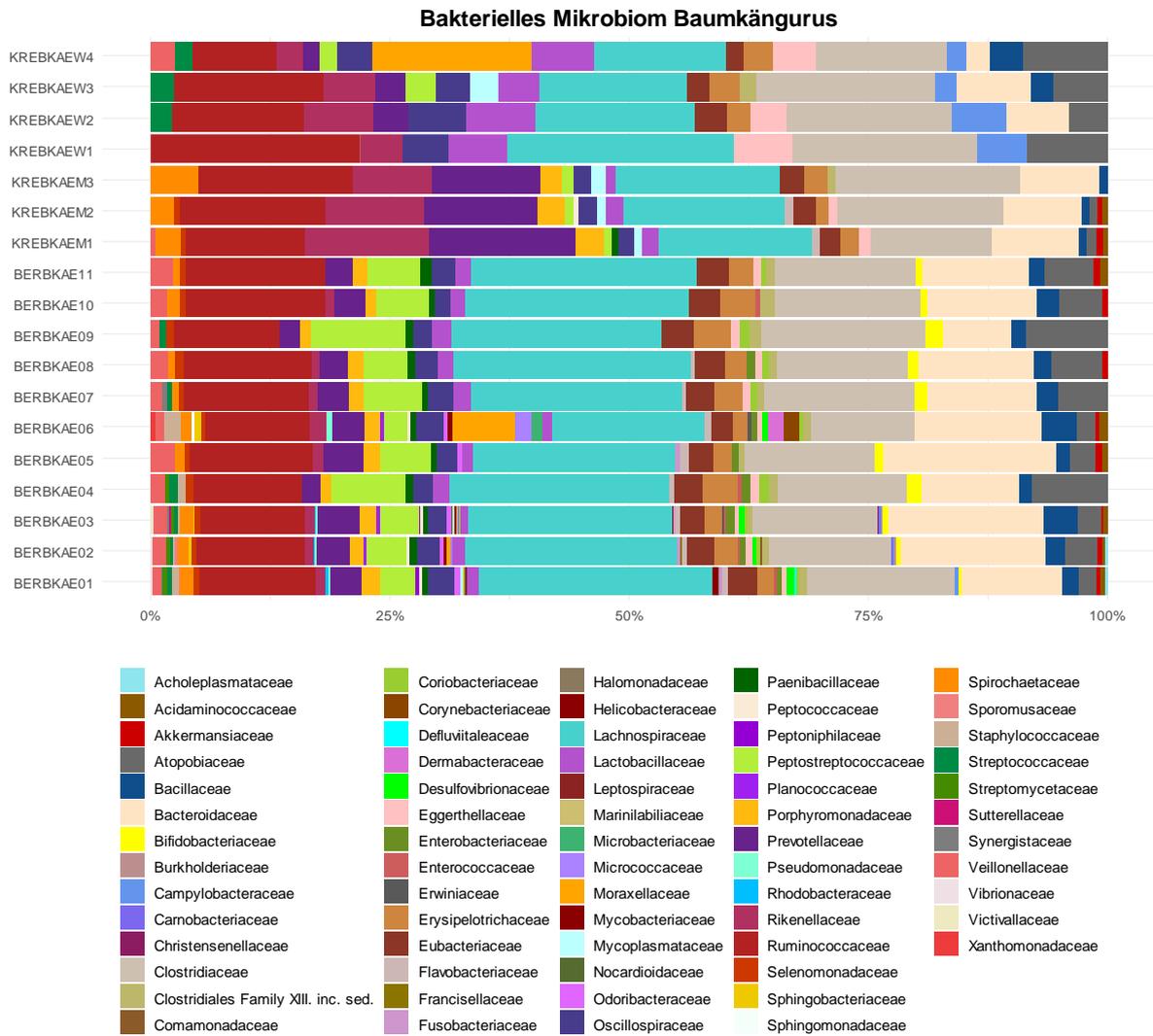


Abbildung 40: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Baumkängurus (Bakterien)

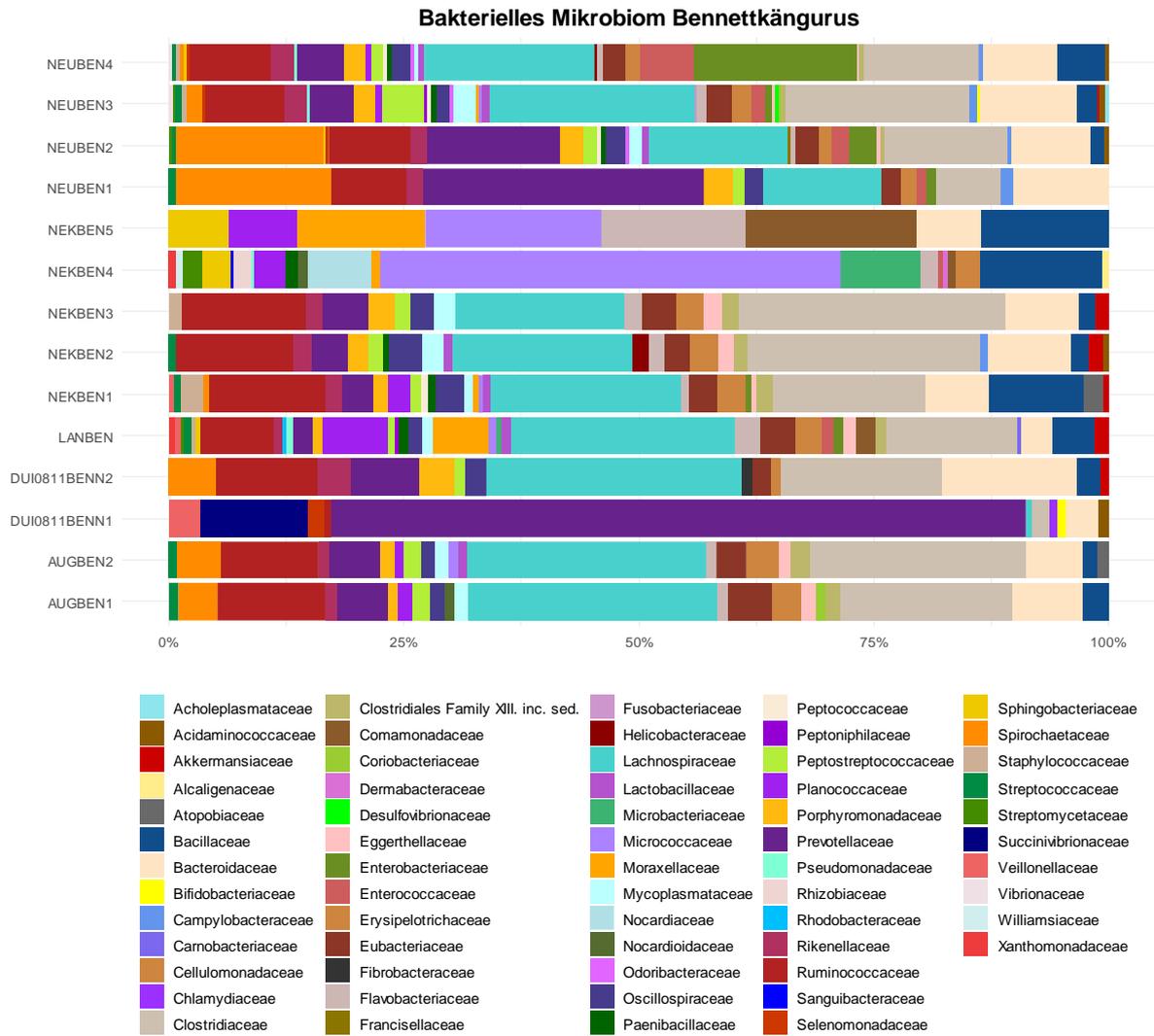


Abbildung 41: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Bennettkängurus (Bakterien)

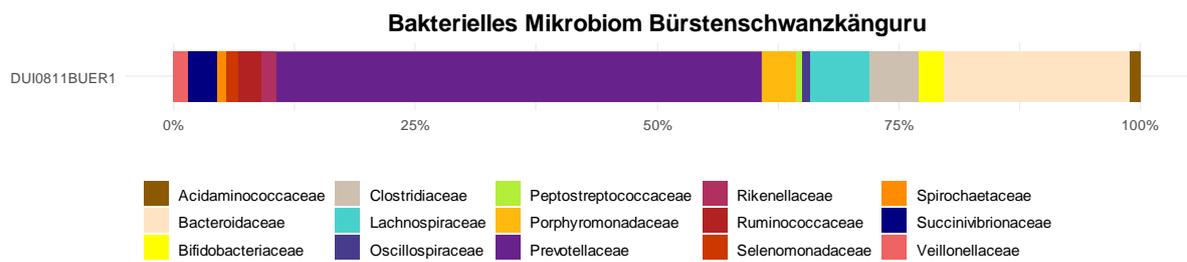


Abbildung 42: (Anhang) Kotprobe des Bürstenschwanzkängurus (Bakterien)

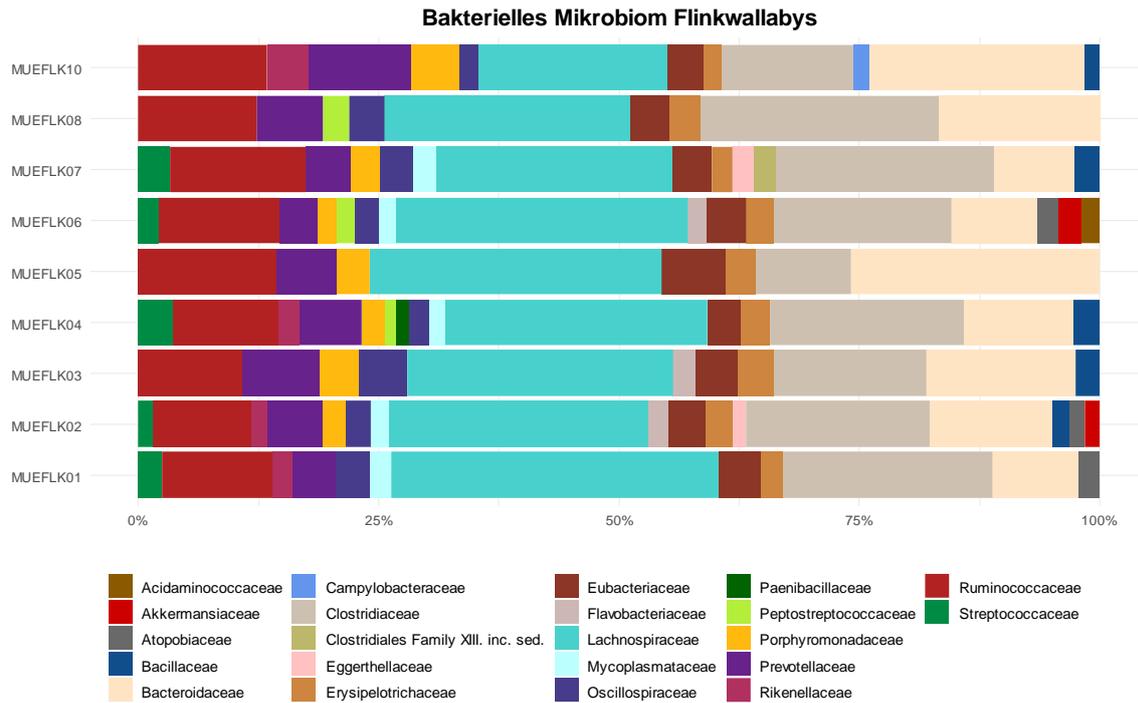


Abbildung 43: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Flinkwallabys (Bakterien)

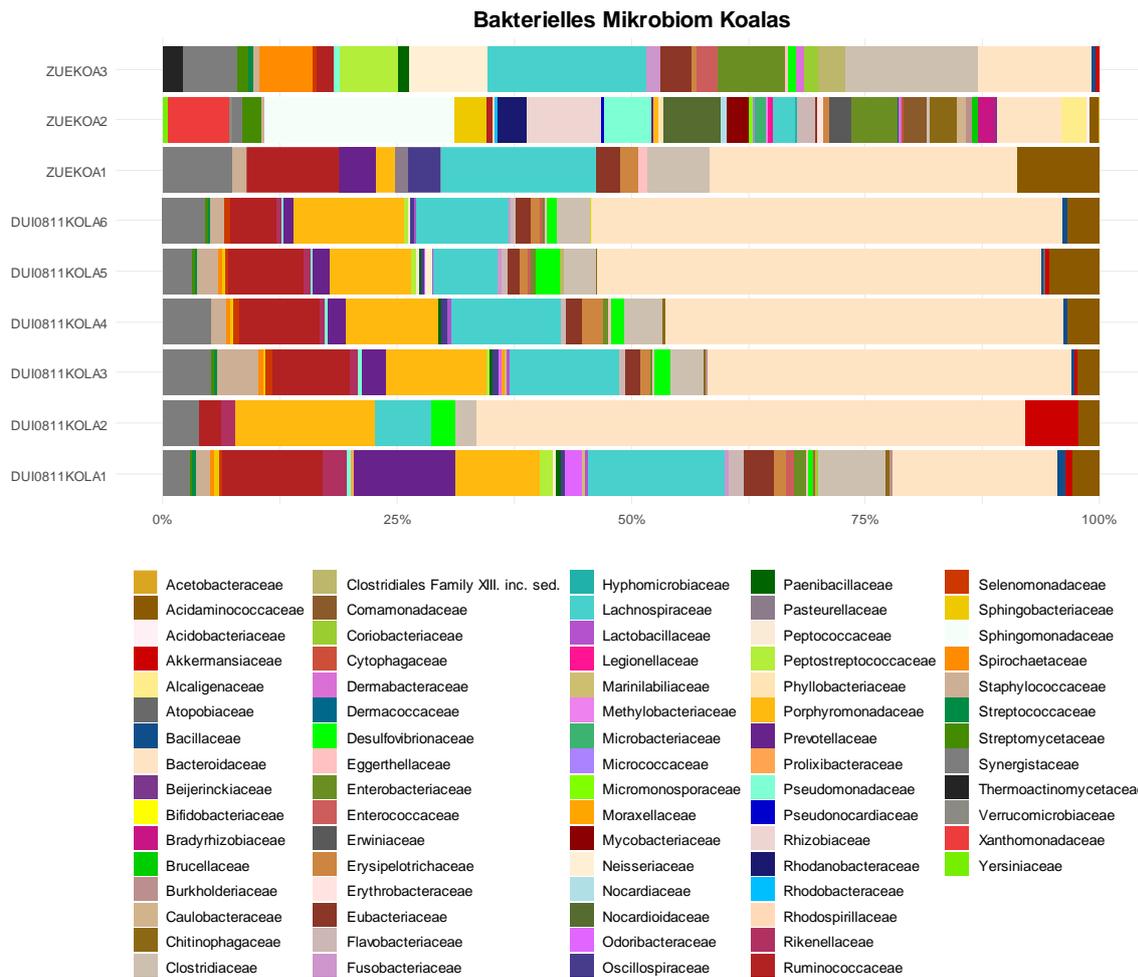


Abbildung 44: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Koalas (Bakterien)

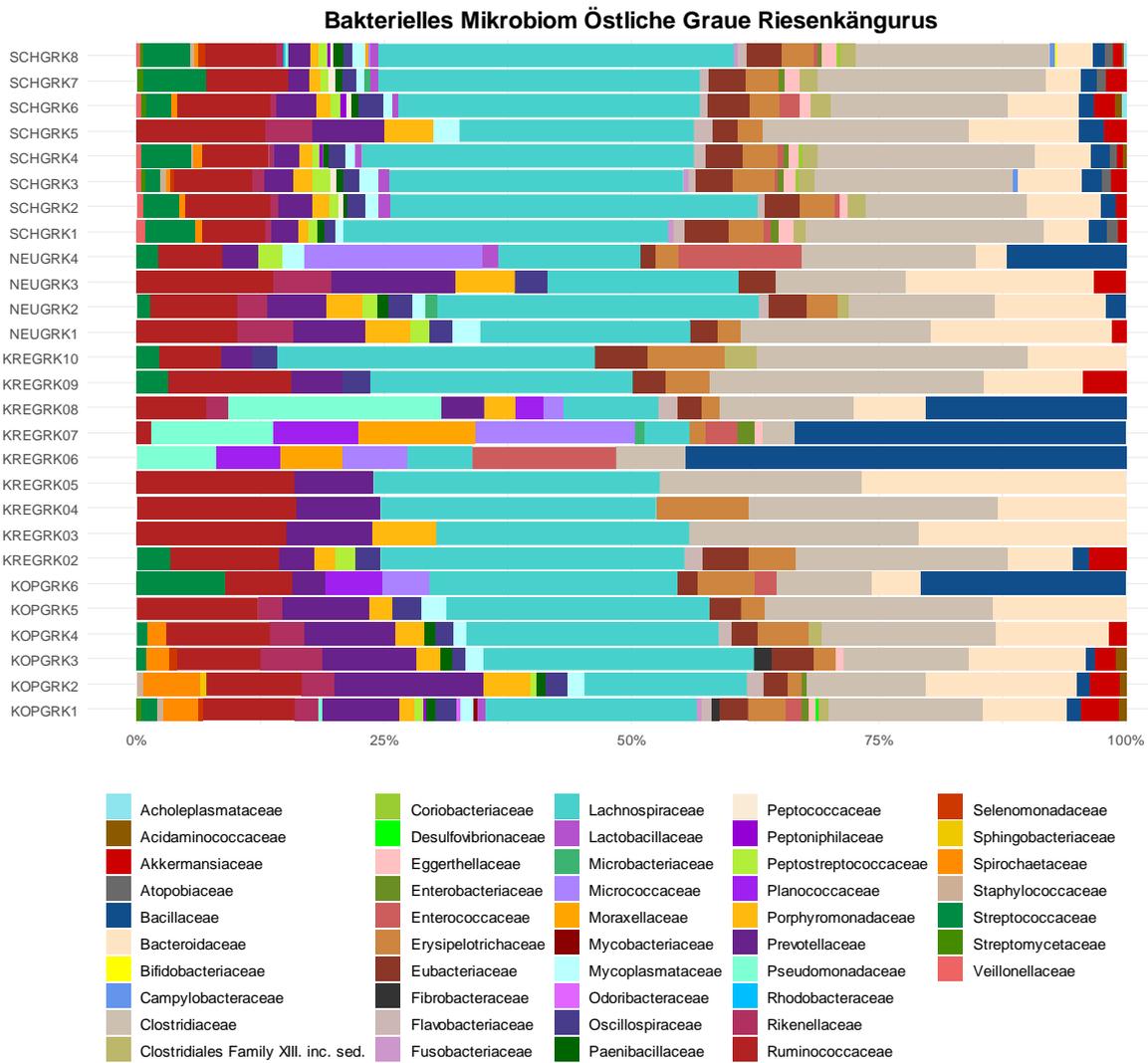


Abbildung 45: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Östlichen Grauen Riesenkängurus (Bakterien)

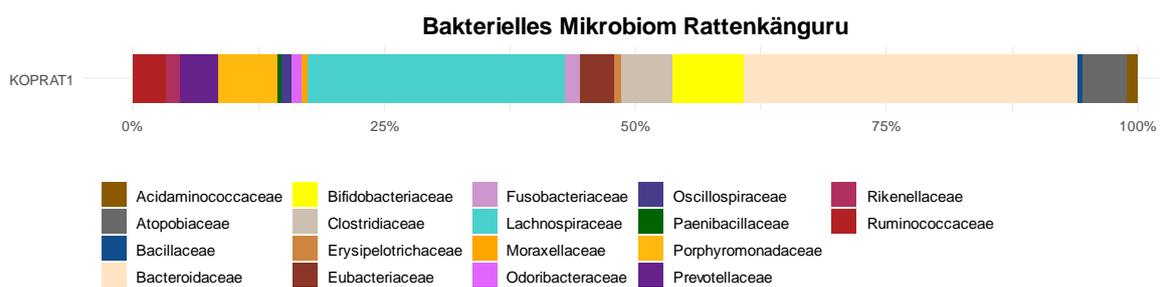


Abbildung 46: (Anhang) Kotprobe des Rattenschwanzkängurus (Bakterien)

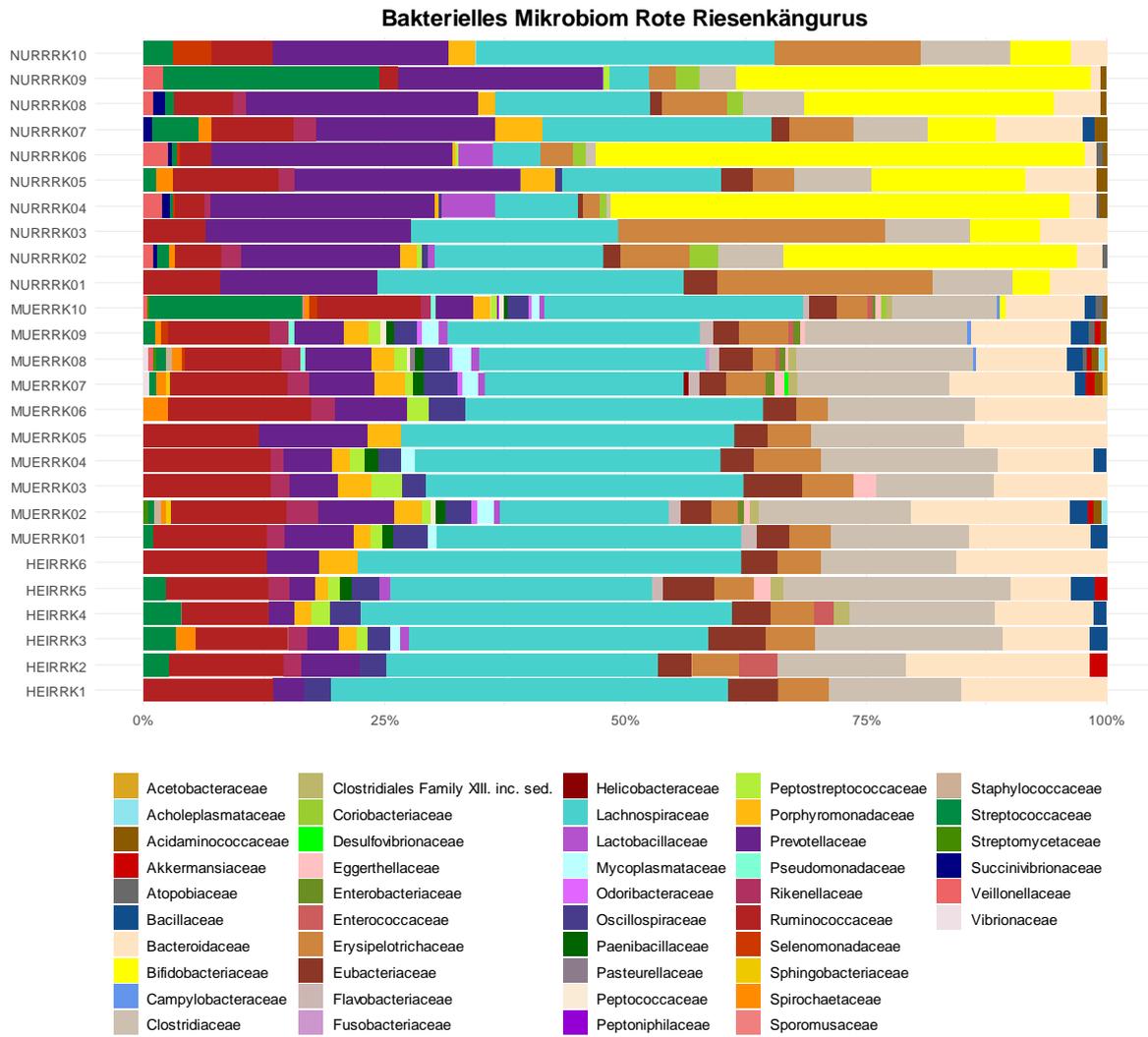


Abbildung 47: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Roten Riesenkängurus (Bakterien)

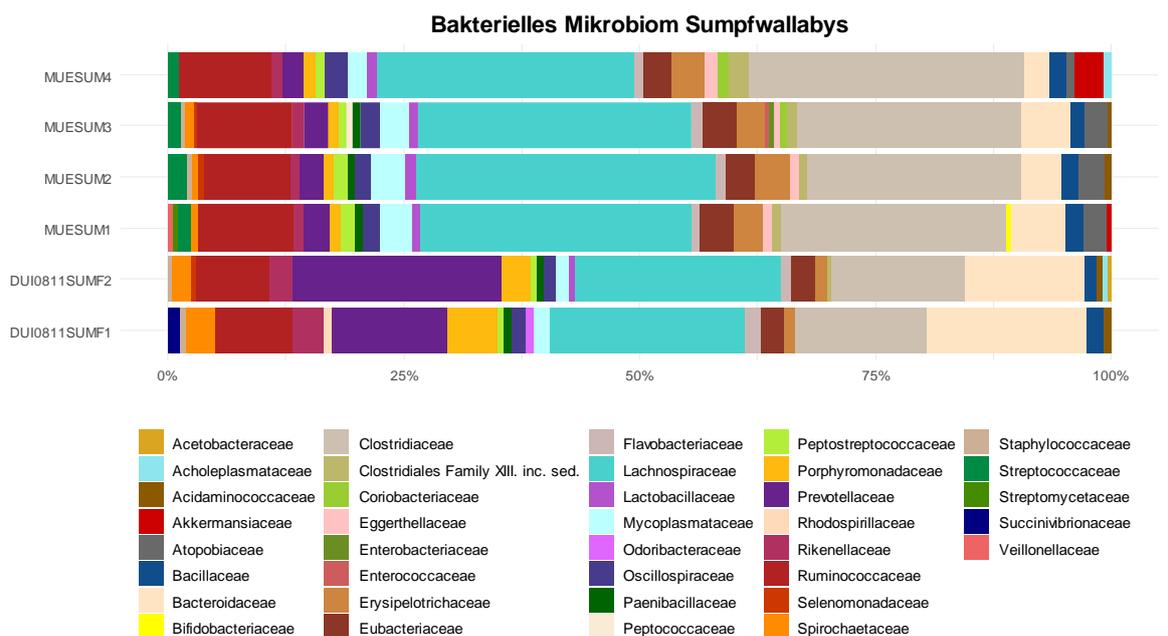


Abbildung 48: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Sumpfwallabys (Bakterien)



Mikrobiom Pilze

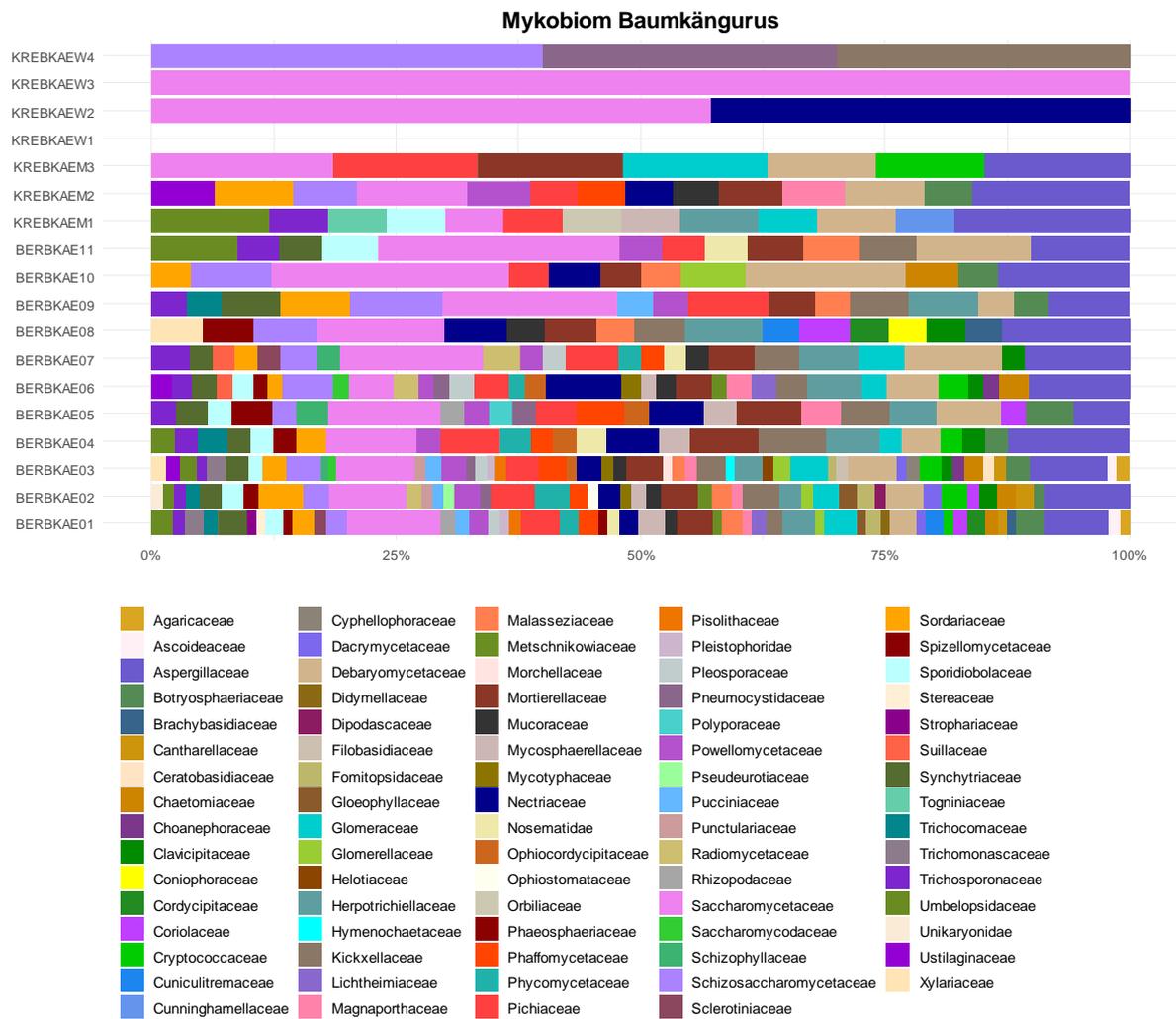


Abbildung 51: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Baumkängurus (Pilze)



Abbildung 52: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Bennettkängurus (Pilze)

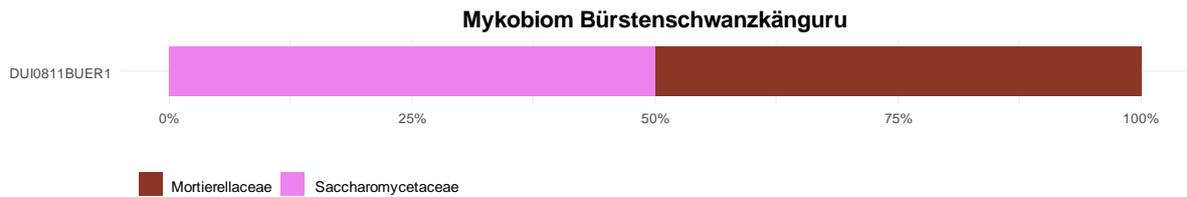


Abbildung 53: (Anhang) Kotprobe des Bürstenschwanzkängurus (Pilze)

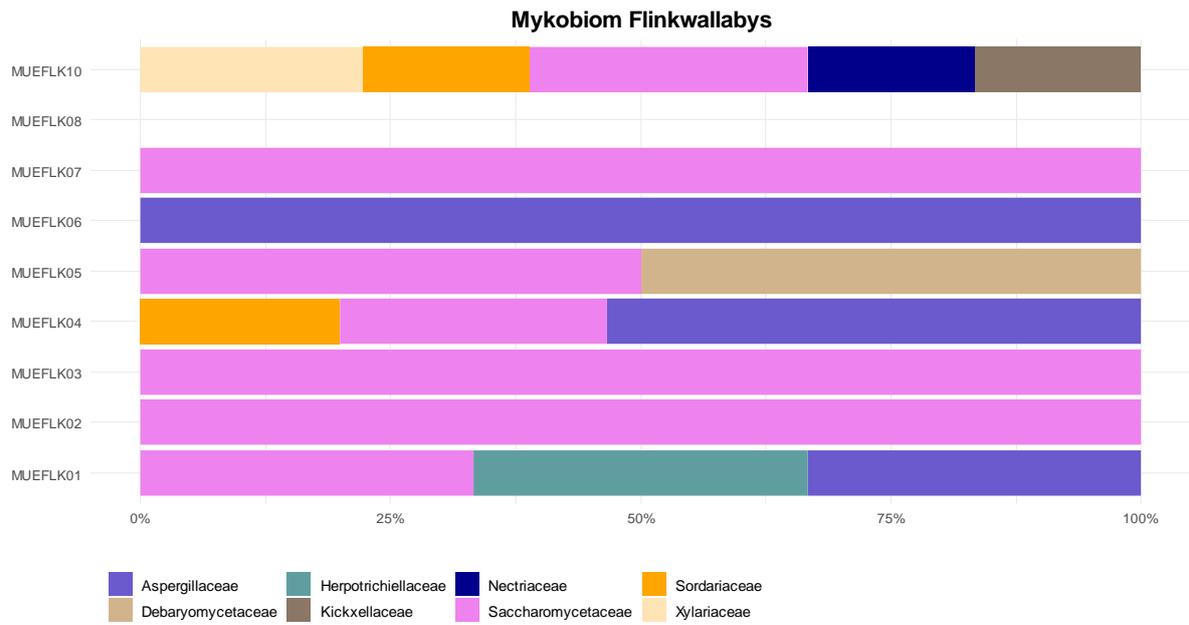


Abbildung 54: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Flinkwallabys (Pilze)

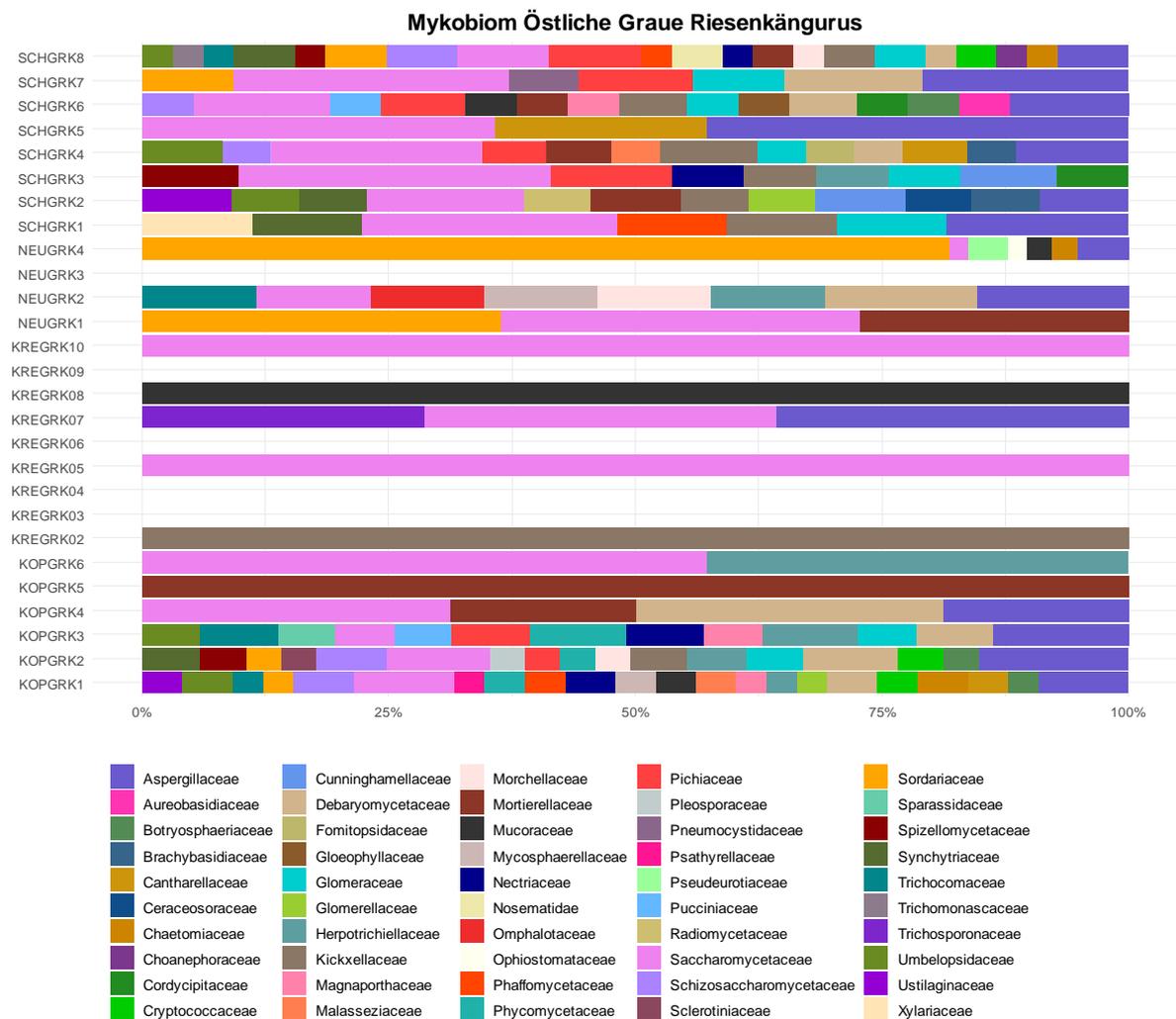


Abbildung 55: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Östlichen grauen Riesenkängurus (Pilze)

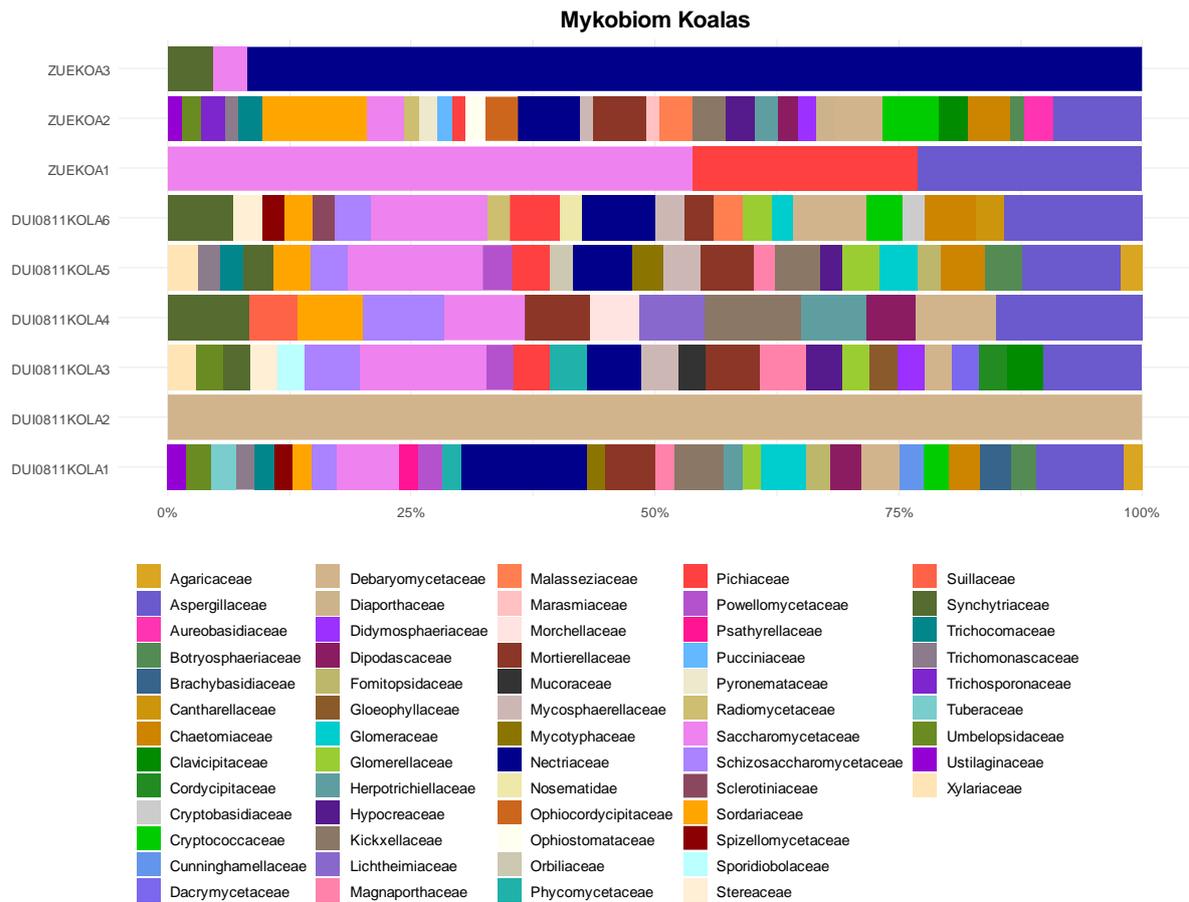


Abbildung 56: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Koalas (Pilze)

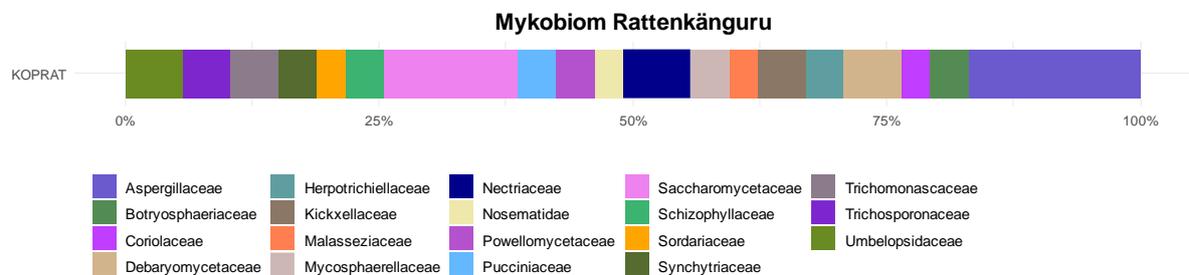


Abbildung 57: (Anhang) Kotprobe des Rattenkängurus (Pilze)

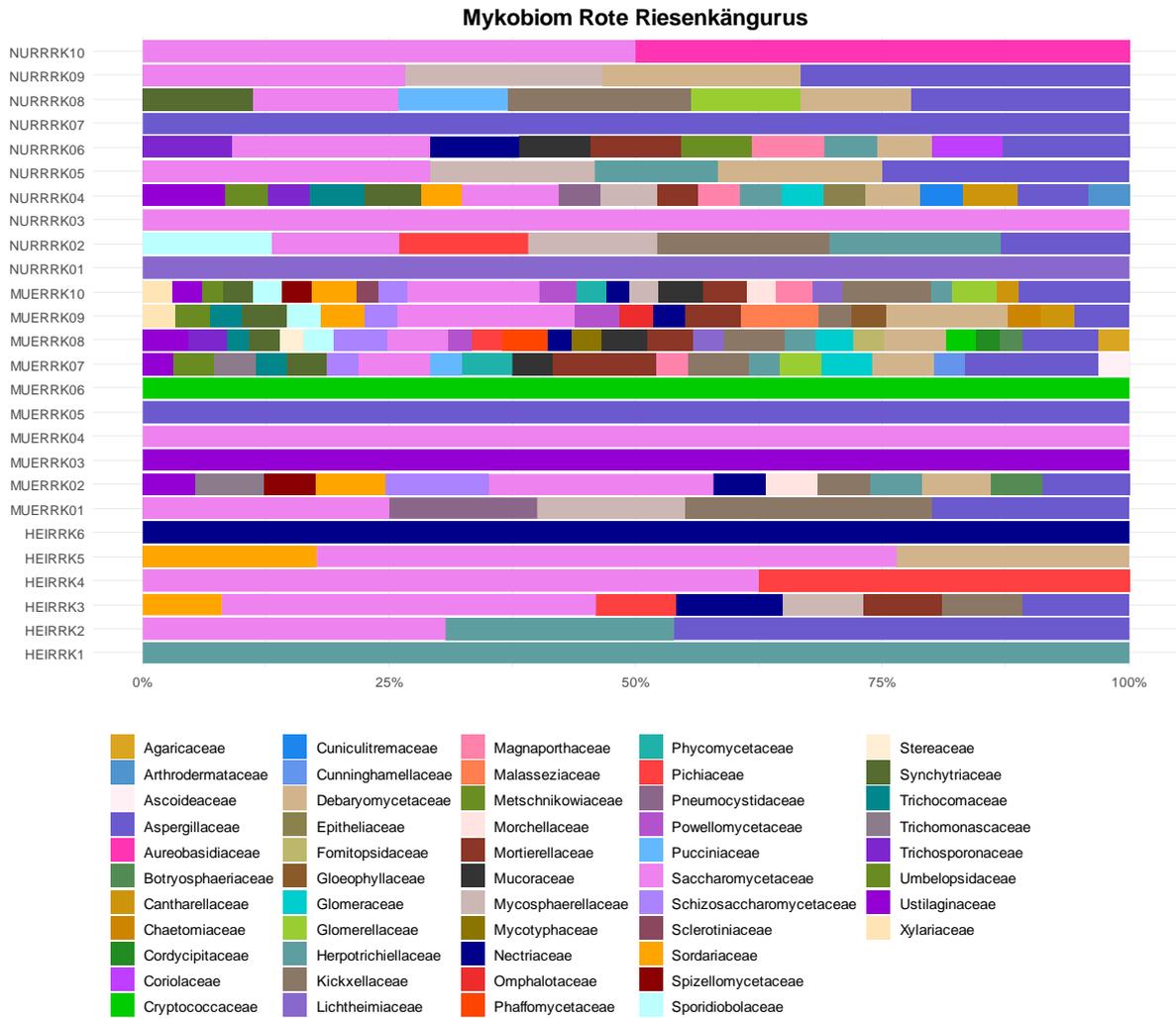


Abbildung 58: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Roten Riesenkängurus (Pilze)

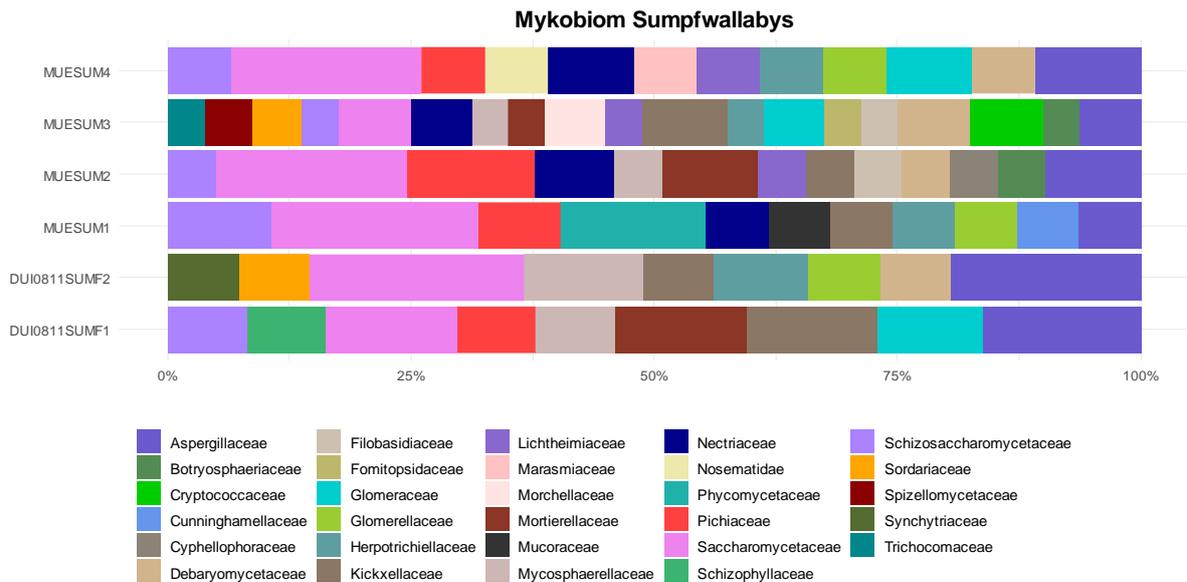


Abbildung 59: (Anhang) Gegenüberstellung aller Kotproben der Sumpfwallabys (Pilze)



Mikrobiom Viren

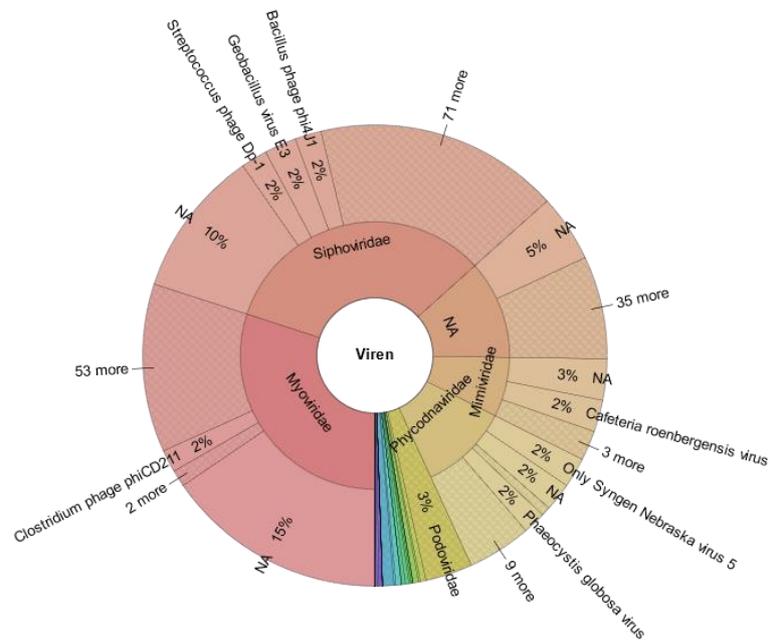


Abbildung 62: (Anhang) Alle Kotproben der Bennettkängurus zusammen (Viren)

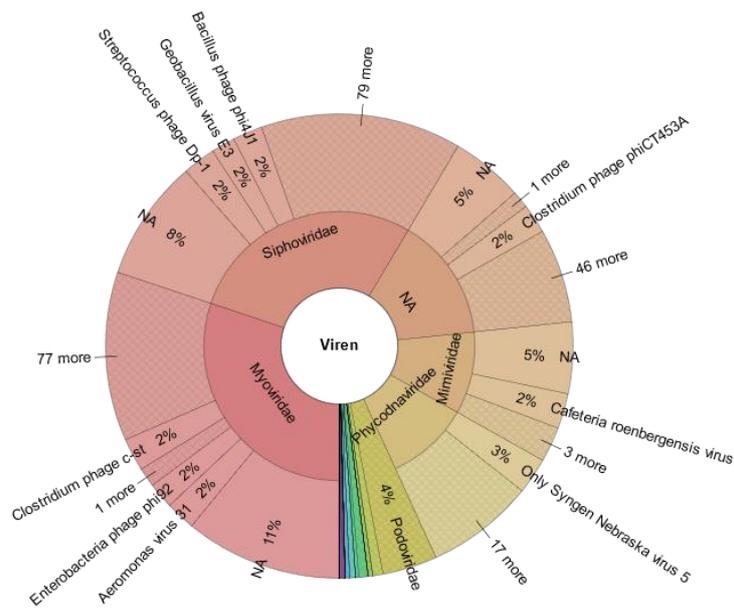


Abbildung 63: (Anhang) Alle Kotproben der Baumkängurus zusammen (Viren)

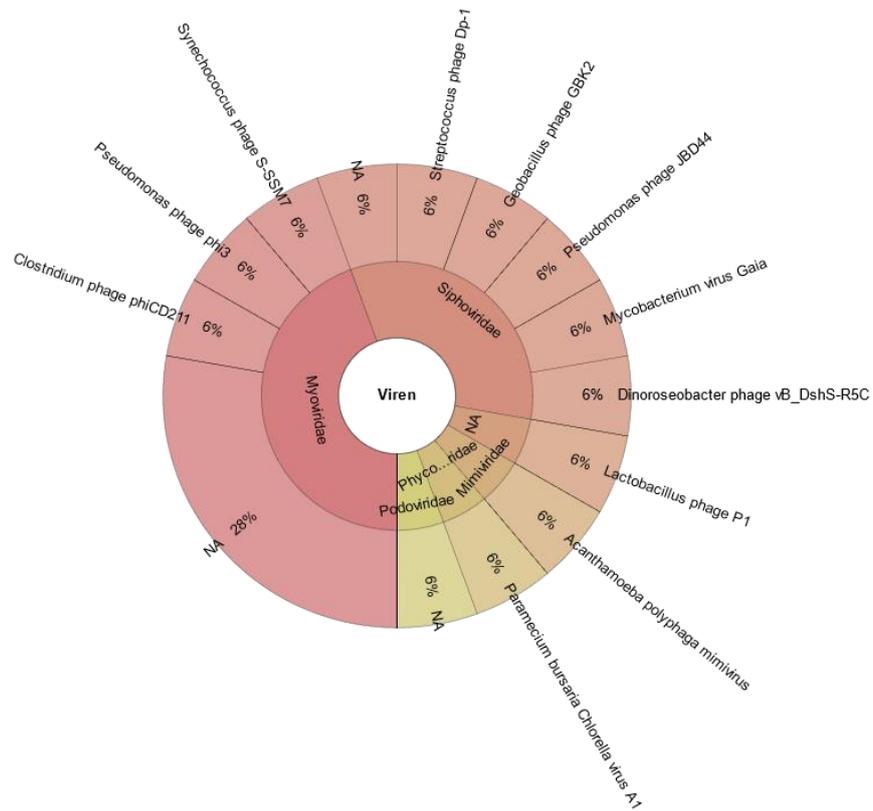


Abbildung 64: (Anhang) Kotprobe des Bürstenschwanzkängurus (Viren)

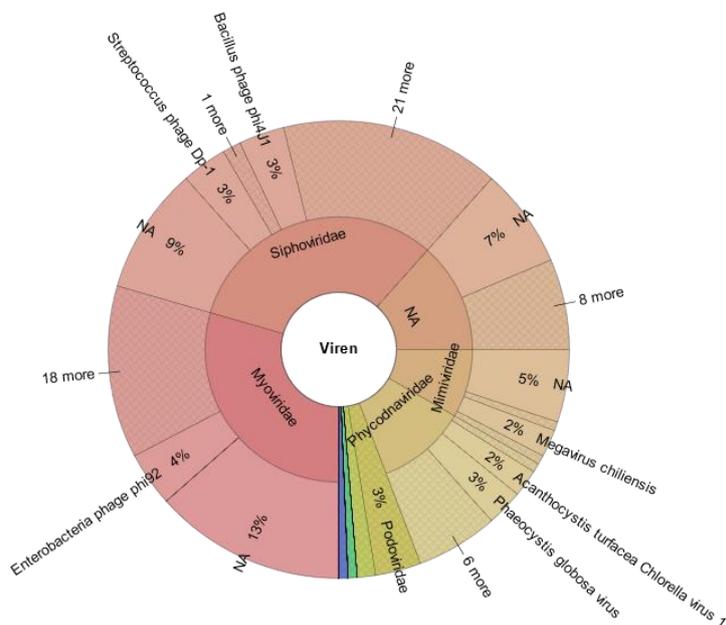


Abbildung 65: (Anhang) Alle Kotproben der Flankwallabys zusammen (Viren)

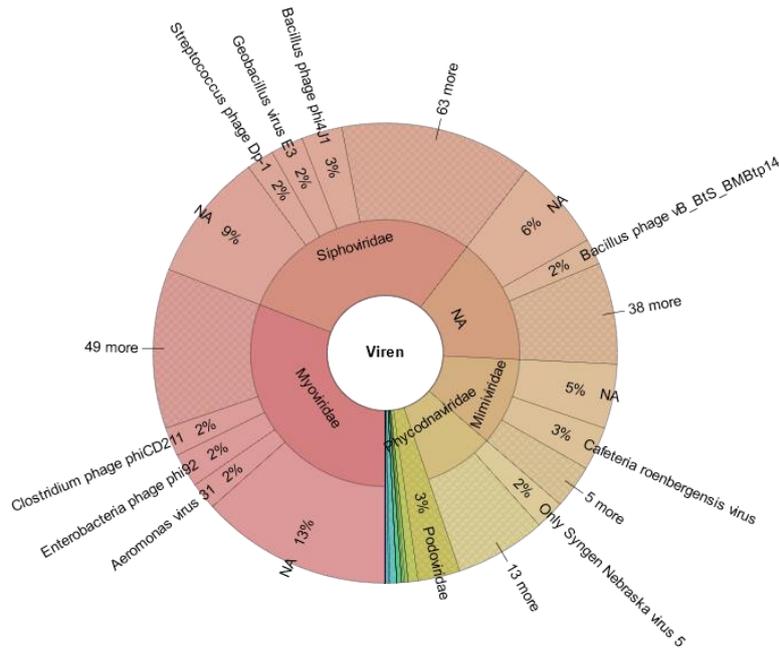


Abbildung 66: (Anhang) Alle Kotproben der Östlichen Grauen Riesenkängurus zusammen (Viren)

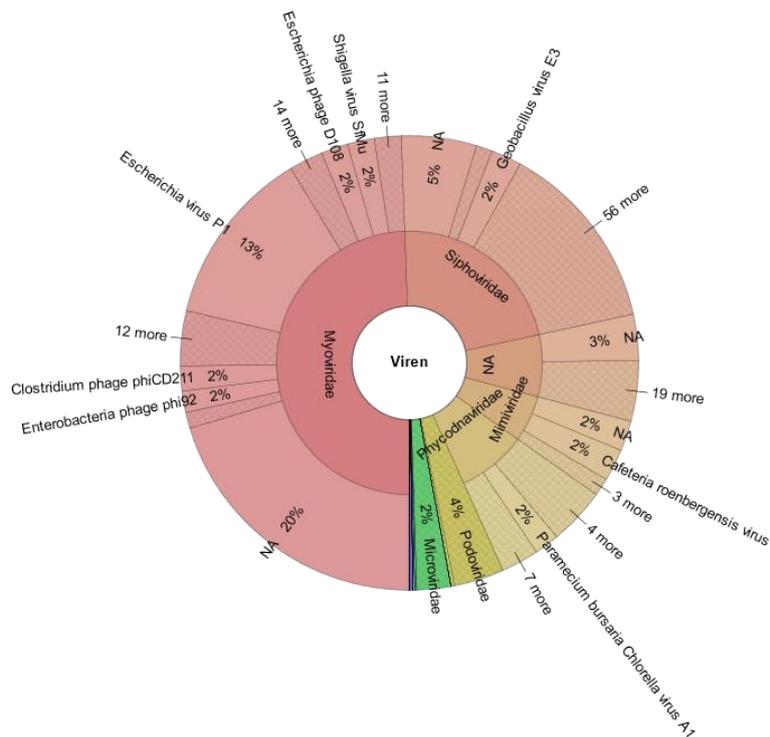


Abbildung 67: (Anhang) Alle Kotproben der Koalas zusammen (Viren)

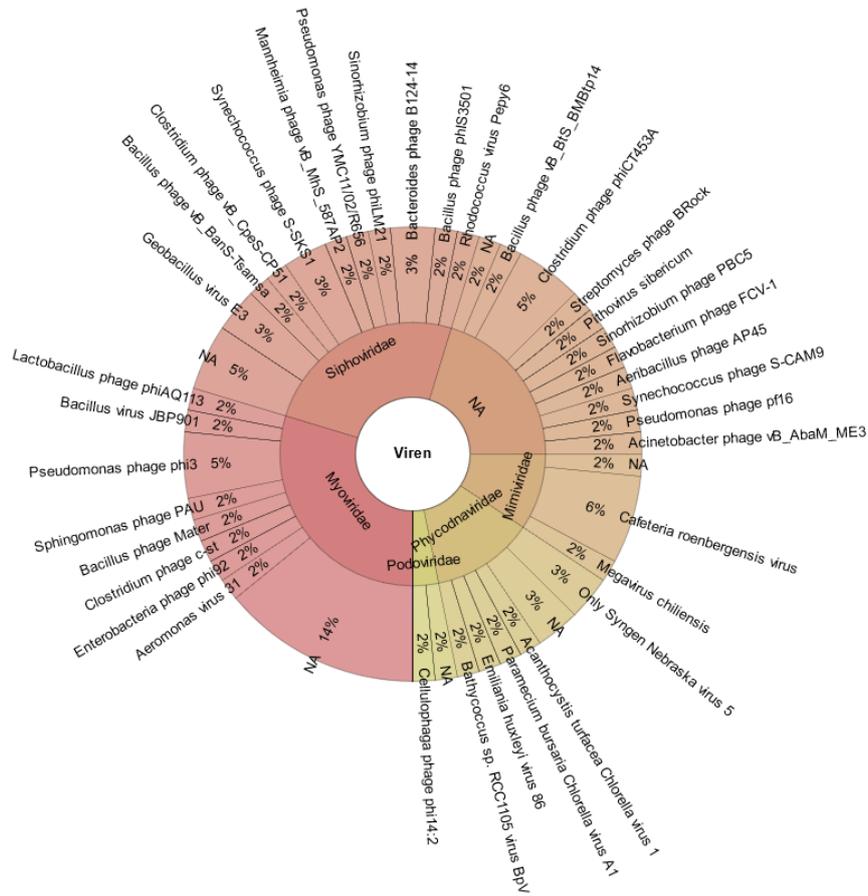


Abbildung 68: (Anhang) Kotprobe des Rattenkängurus (Viren)

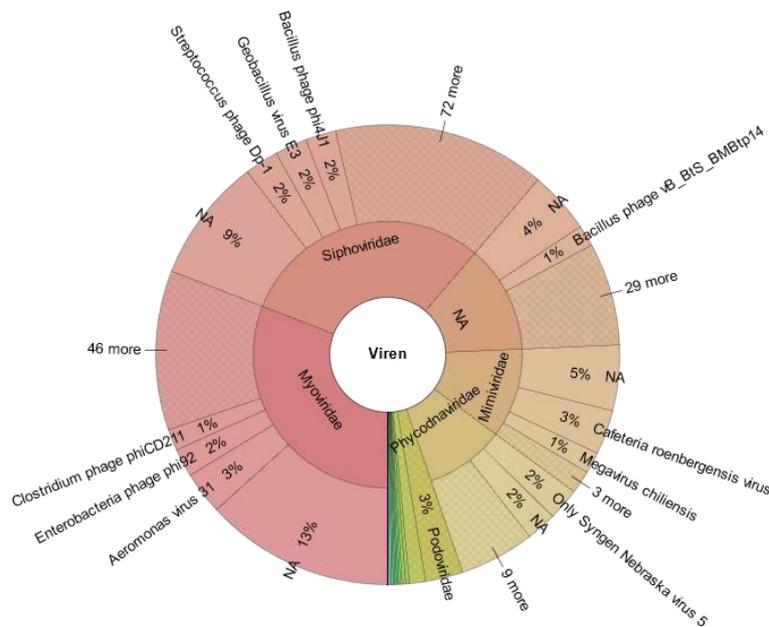


Abbildung 69: (Anhang) Alle Kotproben der Roten Riesenkängurus zusammen (Viren)

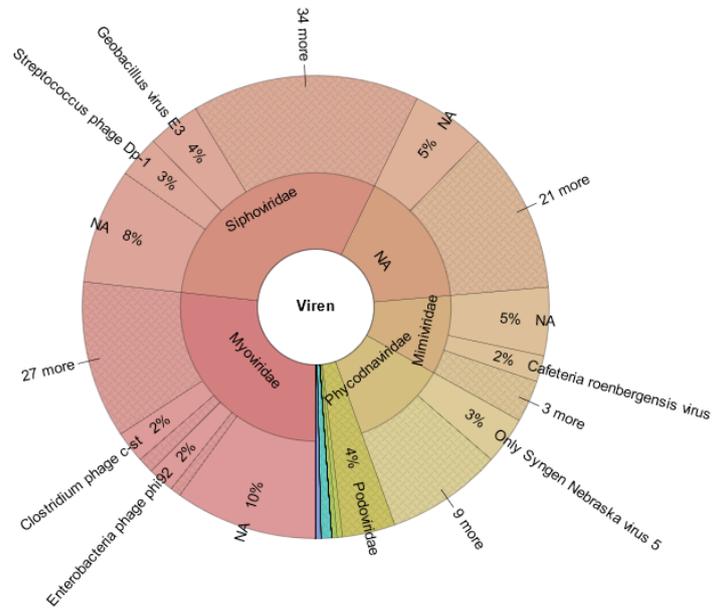


Abbildung 70: (Anhang) Alle Kotproben der Sumpfwallabys zusammen (Viren)

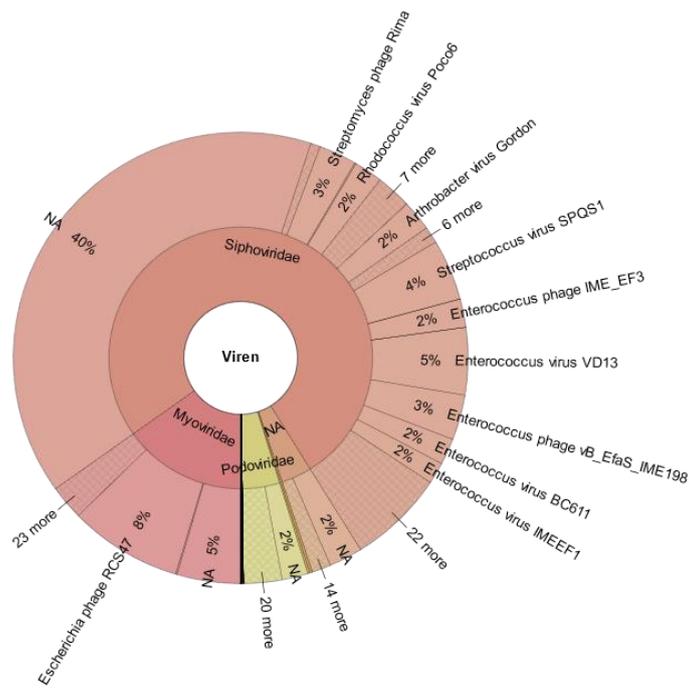


Abbildung 71: (Anhang) Alle Kotproben der Tasmanischen Teufel zusammen (Viren)

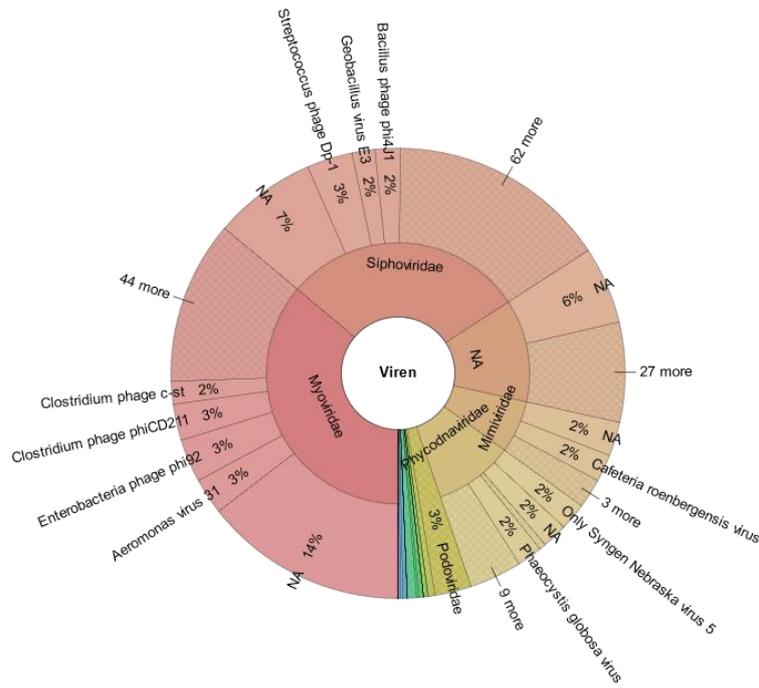


Abbildung 72: (Anhang) Alle Kotproben der Wombats zusammen (Viren)

## Beta-Diversität

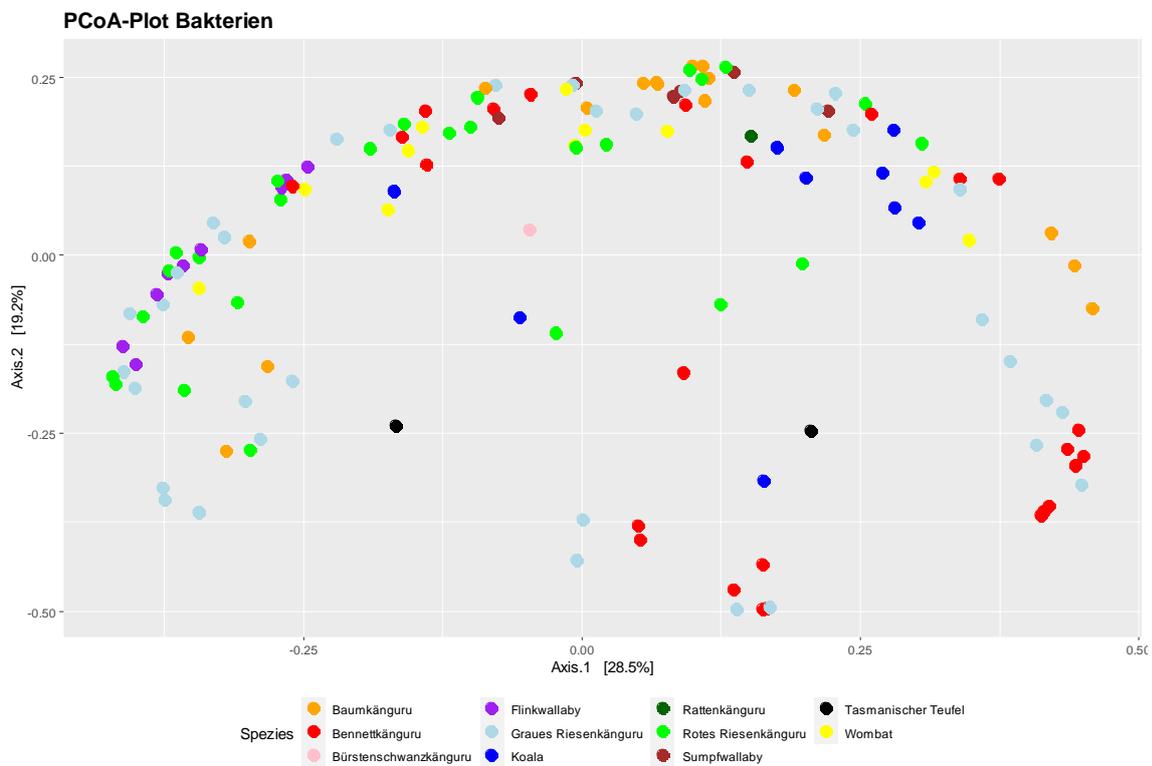


Abbildung 73: (Anhang) PCoA-Plot Bakterien. Baumkänguru (n= 18), Bennettkänguru (n =25), Bürstenschwanzkänguru (n = 1), Flinkwallaby (n = 9), Graues Riesenkänguru (n = 35), Koala (n = 9), Rattenkänguru (n = 1), Rotes Riesenkänguru (n = 26), Sumpfwallaby (n = 6), Tasmanischer Teufel (n = 2), Wombat (n = 12)

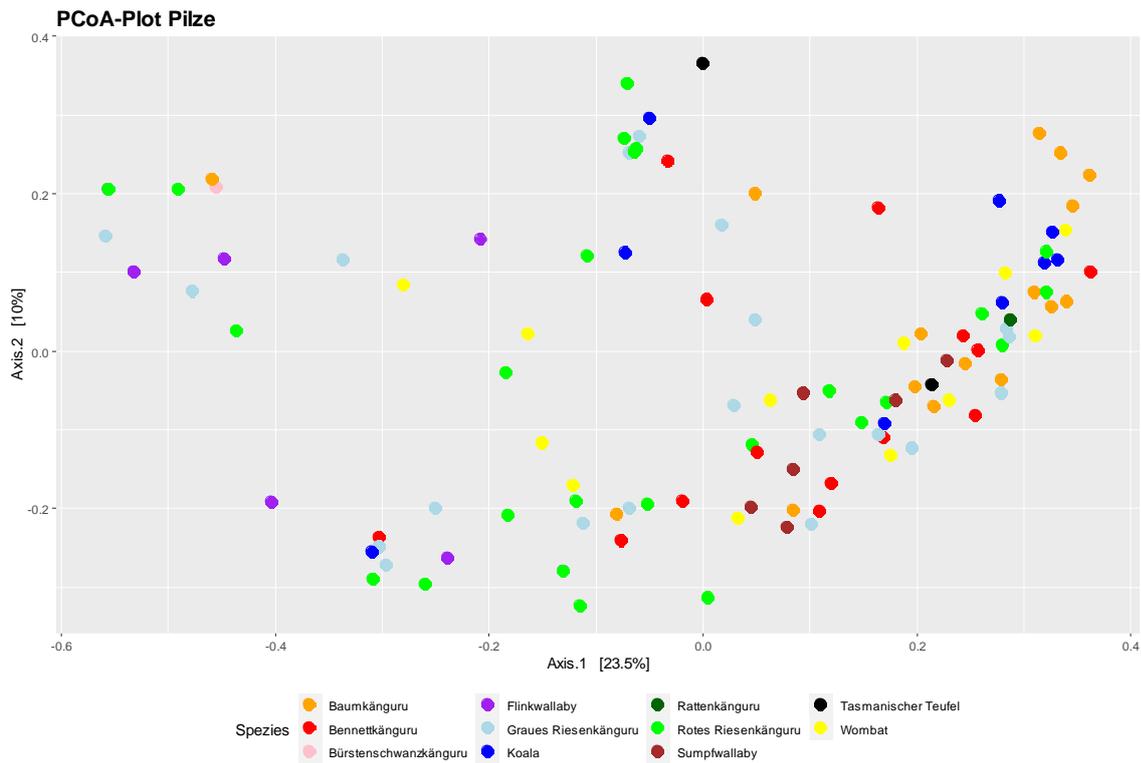


Abbildung 74: (Anhang) PCoA-Plot Pilze. Baumkänguru (n= 17), Bennettkänguru (n =25), Bürstenschwanzkänguru (n = 1), Flinkwallaby (n = 8), Graues Riesenkänguru (n = 31), Koala (n = 9), Rattenkänguru (n = 1), Rotes Riesenkänguru (n = 26), Sumpfwallaby (n = 6), Tasmanischer Teufel (n = 2), Wombat (n = 12)

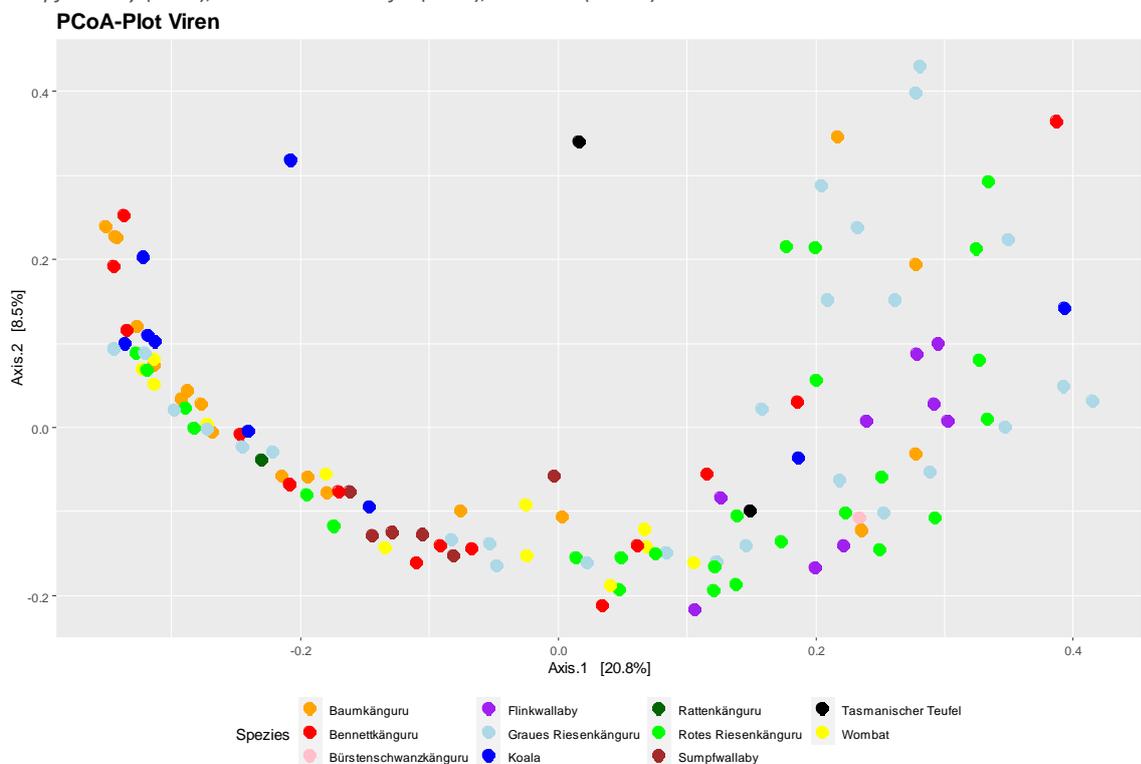


Abbildung 75: (Anhang) PCoA-Plot Viren. Baumkänguru (n= 18), Bennettkänguru (n =25), Bürstenschwanzkänguru (n = 1), Flinkwallaby (n = 9), Graues Riesenkänguru (n = 35), Koala (n = 9), Rattenkänguru (n = 1), Rotes Riesenkänguru (n = 26), Sumpfwallaby (n = 6), Tasmanischer Teufel (n = 2), Wombat (n = 12)

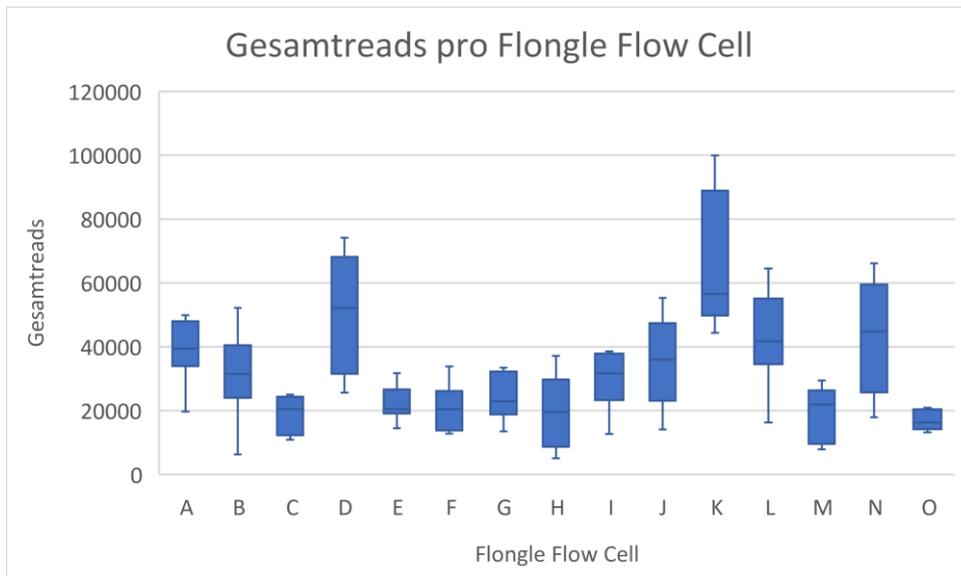


Abbildung 76: (Anhang) Gesamtreads pro Flongle Flow Cell. Pro Durchlauf jeweils 8 Proben mit mindestens 5000 Reads. Durchläufe M, N und O wurden mit dem PCR-Kit vorbereitet, während M und N 60 PCR-Zyklen und O 70 PCR-Zyklen durchlief.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen mitwirkenden Zoos und deren engagierten Mitarbeitern für die Bereitstellung der vielen Proben bedanken.

Mein Dank gilt außerdem allen Mitarbeitern des Arbeitskreises der Opel-Zoo-Stiftungsprofessur für Zootierbiologie, die mich in meiner Arbeit unterstützt haben und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

## Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung für Bachelor- und Masterarbeiten in den Biochemie-Studiengängen

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Masterarbeit mit dem Titel „Charakterisierung des Mikrobioms und des Virioms unterschiedlicher Marsupialia-Arten mit Next Generation Sequencing-Methoden unter Berücksichtigung verschiedener Umweltfaktoren“ selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erbracht habe. Alle beschriebenen Daten und Ergebnisse wurden von mir in dem für die Arbeit offiziell zur Verfügung stehenden Zeitraum erhalten und sind in Laborjournalen dokumentiert. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

 Buchen, 11.12.2023

Unterschrift, Ort, Datum