

Aus dem Institut für Tierernährung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zum Einfluss des Proteingehalts  
sowie der Proteinqualität im Futter  
auf die fäkale Mikrobiota von Katzen**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Louisa Verena Thies**  
Tierärztin aus Bremen

Berlin 2018  
Journal-Nr.: 4047







Aus dem Institut für Tierernährung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zum Einfluss des Proteingehalts sowie der Proteinqualität im Futter  
auf die fäkale Mikrobiota von Katzen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Louisa Verena Thies  
Tierärztin  
aus Bremen

Berlin 2018

Journal-Nr.: 4047

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Marcus Fulde  
Dritter Gutachter: PD Dr. Kerstin Müller

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

cats; animal feeding; composition; feeding formulation; proteins; cat faeces;  
faeces composition; ammonium; amines; lactic acid; short chain fatty acids;  
prevotella; clostridium; collinsella; fusobacterium; eubacterium; faecalibacterium;  
bacteroides; polymerase chain reaction

Tag der Promotion: 16.07.2018

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <https://dnb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-921-1

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2018**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2018

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de - [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

**Meiner Familie**



Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Literatur</b> .....	<b>2</b>
2.1 Verdauungsphysiologie der Katze.....	2
2.1.1 Aufbau des Gastrointestinaltrakts .....	2
2.1.2 Proteinmetabolismus und Proteinbedarf der Katze .....	3
2.2 Proteinquellen in der Katzenernährung .....	4
2.3 Die gastrointestinale Mikrobiota der Katze .....	8
2.3.1 Zusammensetzung bei gesunden Katzen .....	8
2.3.2 Altersassoziierte Veränderungen .....	10
2.3.3 Krankheitsassoziierte Veränderungen .....	11
2.3.4 Potenziell pathogene Bakterien im Gastrointestinaltrakt von Katzen .....	13
2.4 Untersuchungen zu ausgewählten bakteriellen Metaboliten bei der Katze und anderen Tierarten .....	15
2.5 Einfluss der Fütterung auf die bakterielle Gemeinschaft im Darm von Katzen.....	17
2.5.1 Einfluss präbiotisch wirksamer Faserstoffe im Futter auf die gastrointestinale Mikrobiota von Katzen .....	17
2.5.2 Einfluss des Proteingehalts im Futter auf die gastrointestinale Mikrobiota von Katzen .....	18
2.5.3 Einfluss der Proteinqualität im Futter auf die gastrointestinale Mikrobiota von Katzen .....	20
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
3.1 Versuchsaufbau .....	21
3.2 Futtermitteluntersuchung .....	23
3.3 Probenaufbereitung .....	23
3.3.1 Chemisch-analytische Methoden.....	23
3.3.1.1 Berechnung der scheinbaren Rohproteinverdaulichkeit .....	23
3.3.1.2 Messung der Ammoniumkonzentrationen im Kot .....	24
3.3.1.3 Bestimmung biogener Amine im Kot .....	24
3.3.1.4 Analyse kurzkettiger Fettsäuren im Kot .....	25
3.3.1.5 Bestimmung der Konzentrationen von D- und L-Laktat im Kot .....	25
3.3.2 Molekularbiologische Methoden .....	26

3.3.2.1 Extraktion bakterieller DNA aus den Kotproben .....	26
3.3.2.2 DNA-Konzentrationsbestimmung in den Kotproben .....	26
3.3.2.3 Quantitative Real-Time Test-PCR auf Inhibitoren in den DNA-Extrakten.....	27
3.3.2.4 Quantitative Real-Time PCR (qPCR) .....	28
3.3.2.5 Aufbereitung der DNA-Extrakte .....	29
3.3.2.6 DNA-Konzentrationsbestimmung .....	29
3.3.2.7 Multiplex-Polymerase-Ketten-Reaktion (MPCR).....	30
3.3.2.8 Qualitativer Nachweis der <i>E. coli</i> Pathogenitätsfaktoren mittels Agarose-Gelelektrophorese .....	30
3.3.2.9 Generierung von PCR-Produkten für das Next Generation Sequencing mittels Illumina® .....	31
3.3.2.10 Qualitätskontrolle der KAPA-PCR-Produkte .....	32
3.3.2.11 Illumina®-Sequenzierung .....	33
3.3.2.12 Auswertung der Illumina®-Sequenzen mittels MG-RAST (metagenomics analysis server).....	34
3.3.2.13 Methodische Überprüfung des Sequenzierungsverfahrens („Rarefaction curve“) .....	35
3.3.2.14 Ökologische Indizes .....	36
3.3.2.15 Auswertung der Illumina®-Sequenzen mittels RDP-Pipeline.....	38
3.4 Statistische Auswertung der Ergebnisse .....	39
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>40</b>
4.1 Futtermittelanalysen.....	40
4.2 Gesundheitszustand der Tiere .....	42
4.2.1 Futteraufnahme und Körpermasse der Katzen .....	42
4.2.2 Fäkale Rohproteinkonzentration und -exkretion sowie scheinbare Rohproteinverdaulichkeit.....	44
4.3 Quantitative Real-Time PCR (qPCR) .....	46
4.3.1 Vorkommen der mittels qPCR detektierten Bakteriengruppen und -spezies in den Kotproben der Katzen, unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration und -qualität im Futter .....	46
4.3.2 Einfluss der Proteinkonzentration und -qualität im Futter auf das Vorkommen der mittels qPCR detektierten Bakteriengruppen und -spezies in den Kotproben der Katzen .....	47
4.4 MPCR und Agarose-Gelelektrophorese .....	50
4.5 Next Generation Sequencing (Illumina®).....	53

4.5.1 Relatives Vorkommen bakterieller Phyla im Kot von Katzen, unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration und -qualität im Futter .....	53
4.5.2 Relatives Vorkommen bakterieller Familien sowie Genera im Kot von Katzen, unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration und -qualität im Futter .....	54
4.5.3 Einfluss der Proteinkonzentration und -qualität im Futter auf das Vorkommen bakterieller Phyla und Genera im Kot von Katzen.....	58
4.5.3.1 Bakterielle Phyla .....	58
4.5.3.2 Bakterielle Genera .....	61
4.5.4 Ökologische Indizes .....	69
4.6 Bakterielle Metaboliten.....	72
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>76</b>
5.1 Kritik der Methode.....	76
5.1.1 Versuchsbedingungen.....	76
5.1.2 Untersuchungsmethoden.....	78
5.1.2.1 DNA-Extraktion und quantitative Real-Time PCR.....	78
5.1.2.2 MPCR und Agarose-Gelelektrophorese .....	79
5.1.2.3 Illumina®-Sequenzierung.....	79
5.2 Einfluss einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität im Futter auf die Futterraufnahme, Körpermasse und scheinbare Rohproteinverdaulichkeit bei Katzen .....	81
5.3 Molekularbiologische Untersuchungen.....	82
5.3.1 Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota, unabhängig von der Fütterung .....	82
5.3.1.1 qPCR-Ergebnisse .....	82
5.3.1.2 Verteilung der Phyla (Illumina®-Sequenzierung).....	84
5.3.1.3 Verteilung der Genera (Illumina®-Sequenzierung).....	85
5.3.2 Qualitativer Nachweis pathogener <i>E. coli</i> im Katzenkot .....	88
5.3.3 Einfluss einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität im Futter auf die fäkale Mikrobiota von Katzen .....	90
5.3.3.1 qPCR .....	90
5.3.3.2 Illumina®-Sequenzierung.....	93
5.3.3.3 Bakterielle Diversität .....	101
5.4 Bakterielle Metaboliten.....	101
5.4.1 Ammonium .....	101
5.4.2 Biogene Amine .....	102
5.4.3 Kurzkettige Fettsäuren .....	104
5.4.4 D/L-Laktat.....	106
5.5 Schlussfolgerung .....	108

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>109</b>
<b>7 Summary.....</b>	<b>111</b>
<b>8 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>113</b>
<b>9 Anhang.....</b>	<b>154</b>
<b>10 Danksagung.....</b>	<b>178</b>
<b>11 Selbstständigkeitserklärung.....</b>	<b>179</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: „Rarefaction“ der untersuchten Proben; Artenanzahl („Species Count“) in Abhängigkeit von der Anzahl an Sequenzen („Number of Reads“) (Meyer et al., 2008) ..... 35

Abbildung 2: Aufnahme des Gels der Kotproben 1–32 zur Darstellung der untersuchten Pathogenitätsgene; L= DNA-Marker von 1000 Bp–100 Bp, K1–K6 = *E. coli* Stämme als Positiv- bzw. Negativkontrolle; K1 = Negativkontrolle (*E. coli*-Stamm DSM 2840); K2 = PS37, K3 = PS79; K4 = PS90, K5 = IMT203/7, K6 = O138:F18..... 51

Abbildung 3: Aufnahme des Gels der Kotproben 33–61 zur Darstellung der untersuchten Pathogenitätsgene; L= DNA-Marker von 1000 Bp–100 Bp, K1–K6 = *E. coli* Stämme als Positiv- bzw. Negativkontrolle; K1 = Negativkontrolle (*E. coli*-Stamm DSM 2840); K2 = PS37, K3 = PS79; K4 = PS90, K5 = IMT 203/7, K6 = O138:F18..... 52

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Alpha
AAFCO	Association of American Feed Control Officials
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CCD	Charge Coupled Density
<i>C. coccooides</i>	<i>Clostridium coccooides</i>
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
<i>C. leptum</i>	<i>Clostridium leptum</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
ct	cycle threshold
d	Tag
DAEC	Diffus-adhärenente <i>Escherichia coli</i>
DGGE	Denaturierende Gradientengelelektrophorese
DM	Dry Matter
DNA	Deoxyribonucleic Acid/ Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EaggEC	Enteraggregative <i>Escherichia coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>elt-IA</i>	Gen für das hitzelabile Enterotoxin A
<i>est-Ib</i>	Gen für das hitzestabile Enterotoxin I
<i>est-II</i>	Gen für das hitzestabile Enterotoxin II
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
et al.	<i>et alii</i>
ETEC	Enterotoxigene <i>Escherichia coli</i>
F	Fimbrienantigen
<i>fae G</i>	Gen für F4

## Abkürzungsverzeichnis

---

<i>fan</i>	Gen für F5
<i>fas A</i>	Gen für F6
<i>fed A</i>	major subunit des Gens für F107, F18ab
FEDIAF	Fédération européenne de l'industrie des aliments pour animaux familiers
<i>fimf41 a</i>	Gen für F41
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
<i>F. prausnitzii</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
FS	Frischsubstanz
F4	<i>Escherichia coli</i> Adhäsionsfaktor (K88)
F5	<i>Escherichia coli</i> Adhäsionsfaktor (K99)
F6	<i>Escherichia coli</i> Adhäsionsfaktor (987P)
F41	<i>Escherichia coli</i> Adhäsionsfaktor (Adhäsin)
F107	<i>Escherichia coli</i> Adhäsionsfaktor
H <sub>2</sub>	Wasserstoff
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Hydrogencarbonat
HCL	Salzsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatografie
IBD	Inflammatory Bowel Disease
K <sup>+</sup>	Kalium
KbE	Koloniebildende Einheiten
KM <sup>0,67</sup>	metabolische Körpermasse
log <sub>10</sub>	Logarithmus
LT	Hitzelabiles Enterotoxin
ME	Umsetzbare Energie
Min.	Minute
mM	Millimolar
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
MPCR	Multiplex Polymerase Chain Reaction/ Multiplex Polymerase-Ketten- Reaktion
Mw	Mittelwert
Na <sup>+</sup>	Natrium
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ammonium
nm	Nanometer
NRC	National Research Council

## Abkürzungsverzeichnis

---

OTU	Operational Taxonomic Unit
PCR	Polymerase Chain Reaction/ Polymerase-Ketten-Reaktion
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction/ Polymerase-Ketten-Reaktion
®	Eingetragenes Warenzeichen
Rfa	Rohfaser
RNA	Ribonucleic Acid/ Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonucleic Acid/ Ribonukleinsäure
Rp	Rohprotein
Rp-Gehalt	Rohproteingehalt
S	Svedberg
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SPF	spezifisch pathogenfrei
spp.	<i>species</i> (Plural)
StaP	hitze stabiles Enterotoxin I
Stb	hitze stabiles Enterotoxin II
STEC	Shigatoxin-bildende <i>Escherichia coli</i>
sV Rp	scheinbare Verdaulichkeit des Rohproteins
sV TS	scheinbare Verdaulichkeit der Trockensubstanz
TS	Trockensubstanz
uS	ursprüngliche Substanz
UV	Ultraviolett
VDLUFA	Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten
vgl.	vergleiche
vs.	<i>versus</i>
× <i>g</i>	Erdbeschleunigung ( $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ )

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Angaben zum Rohproteinbedarf von Katzen, bezogen auf die Trockensubstanz (TS), die umsetzbare Energie (ME) eines Alleinfutters bzw. auf die metabolische Körpermasse (kg $KM^{0,67}$ ) der Katze (National Research Council (NRC), Fédération européenne de l'industrie des aliments pour animaux familiers (FEDIAF), Association of American Feed Control Officials (AAFCO)) .....	4
Tabelle 2: Scheinbare Verdaulichkeit von pflanzlichen Proteinquellen bei der Katze (modifiziert und ergänzt nach Figge (1989) und Oldenhage (2003)).....	5
Tabelle 3: Scheinbare Verdaulichkeit tierischer Proteinquellen bei der Katze (modifiziert und ergänzt nach Figge (1989) und Oldenhage (2003)).....	6
Tabelle 4: In der vorliegenden Studie eingesetzte Versuchstiere.....	22
Tabelle 5: Proteinkonzentration und -qualität der verwendeten Versuchsfuttermittel .....	22
Tabelle 6: Studiendesign der vorliegenden Studie.....	23
Tabelle 7: DNA-Gehalte und Basenpaarlänge der untersuchten KAPA-PCR-Produkte (n = 60; Mittelwert (Mw) $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts (SEM)) .....	33
Tabelle 8: Analysierte Inhaltsstoffe der Versuchsfuttermittel (Paßlack et al., 2017; 2018) ...	40
Tabelle 9: Taurin- und Aminosäurenkonzentrationen in den Versuchsfuttermitteln (Paßlack et al., 2017; 2018) .....	41
Tabelle 10: Durchschnittliche Körpermasse und Futteraufnahme der Katzen (n = 10) bei Einsatz von Versuchsdäten mit einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität (Paßlack et al., 2018); Mittelwert; gruppenunabhängiger Standardfehler des Mittelwerts (SEM); die statistische Datenauswertung in Form von polynomialen Kontrasten wird in Tabelle 11 wiedergegeben. ....	42
Tabelle 11: Darstellung der ermittelten polynomialen Kontraste für die durchschnittliche Körpermasse und Futteraufnahme der Katzen (n = 10) bei Einsatz von Versuchsdäten mit einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität (Paßlack et al., 2018; vgl. Tabelle 10)	43

Tabelle 12: Rohproteinaufnahme, fäkale Rohproteinkonzentration und -exkretion sowie scheinbare Verdaulichkeit des Rohproteins bei Katzen (n = 10) bei einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität im Futter (Paßlack et al., 2018; Mittelwert; gruppenunabhängiger Standardfehler des Mittelwerts (SEM); die statistische Datenauswertung in Form von polynomialen Kontrasten wird in Tabelle 13 wiedergegeben. .... 44

Tabelle 13: Darstellung der ermittelten polynomialen Kontraste für die Rohproteinaufnahme, fäkale Rohproteinkonzentration und -exkretion sowie scheinbare Verdaulichkeit des Rohproteins im Kot von Katzen (n = 10) bei Einsatz von Versuchsdiäten mit einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität (Paßlack et al., 2018; vgl. Tabelle 12) ..... 45

Tabelle 14: Kopienzahl [ $\log_{10}/g$  FS] der mittels qPCR ermittelten Bakteriengruppen und -spezies im Kot von Katzen (n = 10), unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration und -qualität im Futter (Mittelwert (Mw)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM))..... 46

Tabelle 15: Kopienzahl [ $\log_{10}/g$  FS] der mittels qPCR ermittelten Bakteriengruppen und -spezies im Kot von Katzen (n = 10) bei Einsatz von Versuchsdiäten mit einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität (Mittelwert; gruppenunabhängiger Standardfehler des Mittelwerts (SEM); die statistische Datenauswertung in Form von polynomialen Kontrasten wird in Tabelle 16 wiedergegeben. .... 48

Tabelle 16: Darstellung der ermittelten polynomialen Kontraste für die detektierte Kopienzahl der Bakteriengruppen und -spezies im Kot von Katzen bei Einsatz von Versuchsdiäten mit einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität (vgl. Tabelle 15)..... 49

Tabelle 17: Vorkommen von *Escherichia coli*-Pathogenitätsgenen in den Kotproben (n = 60) der Katzen, unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration und -qualität im Futter 53

Tabelle 18: Vorkommen von *Escherichia coli*-Pathogenitätsgenen in den Kotproben (n = 10) der Katzen in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration und -qualität im Futter ..... 53

Tabelle 19: Relatives Vorkommen [%] bakterieller Phyla im Kot von Katzen (n = 10), unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration und -qualität im Futter (Mittelwert (Mw)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM)) ..... 54

Tabelle 20: Relatives Vorkommen [%] bakterieller Genera im Kot von Katzen (n = 10), unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration und -qualität im Futter (Mittelwert (Mw)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM)) ..... 55

Tabelle 21: Anteil bakterieller Phyla [%] im Kot von Katzen (n = 10) bei einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität im Futter (Mittelwert; gruppenunabhängiger Standardfehler des Mittelwerts (SEM)); die statistische Datenauswertung in Form von polynomialen Kontrasten wird in Tabelle 22 wiedergegeben. .... 59

Tabelle 22: Darstellung der ermittelten polynomialen Kontraste für den Anteil bakterieller Phyla [%] im Kot von Katzen bei Einsatz von Versuchsdiäten mit einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität (vgl. Tabelle 21)..... 60

Tabelle 23: Anteil bakterieller Genera [%] im Kot von Katzen (n = 10) bei einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität im Futter (Mittelwert; gruppenunabhängiger Standardfehler des Mittelwerts (SEM)); die statistische Datenauswertung in Form von polynomialen Kontrasten wird in Tabelle 24 wiedergegeben. .... 62

Tabelle 24: Darstellung der ermittelten polynomialen Kontraste für den relativen Anteil bakterieller Genera [%] im Kot von Katzen bei Einsatz von Versuchsdiäten mit einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität (vgl. Tabelle 23) ..... 66

Tabelle 25: Ökologische Indizes der fäkalen Mikrobiota von Katzen bei einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität im Futter (Mittelwert; gruppenunabhängiger Standardfehler des Mittelwerts (SEM)); die statistische Datenauswertung in Form von polynomialen Kontrasten wird in Tabelle 26 wiedergegeben. .... 70

Tabelle 26: Ökologische Indizes der fäkalen Mikrobiota von Katzen bei einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität im Futter (vgl. Tabelle 25)..... 71

Tabelle 27: Gehalt bakterieller Metaboliten im Kot von Katzen (n = 10) bei einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität im Futter (Mittelwert; gruppenunabhängiger Standardfehler des Mittelwerts (SEM)); die statistische Datenauswertung in Form von polynomialen Kontrasten wird in Tabelle 28 wiedergegeben. .... 73

Tabelle 28: Darstellung der ermittelten polynomialen Kontraste für den Gehalt bakterieller Metaboliten im Kot von Katzen bei Einsatz von Versuchsdiäten mit einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität (vgl. Tabelle 27)..... 74

Tabelle A 1: Übersicht der Geräte und Chemikalien für die Weender Analyse ..... 154

Tabelle A 2: Übersicht der Geräte und Chemikalien für die Mineralstoffbestimmung ..... 155

Tabelle A 3: Geräte zur Bestimmung der Ammoniumkonzentration..... 155

## Tabellenverzeichnis

---

Tabelle A 4: Geräte und Reagenzien zur Bestimmung biogener Amine .....	157
Tabelle A 5: Geräte zur Analyse kurzkettiger Fettsäuren.....	158
Tabelle A 6: Geräte und Reagenzien zur Analyse von D- und L-Laktat .....	159
Tabelle A 7: Geräte und Kits zur Extraktion bakterieller DNA aus Kotproben .....	160
Tabelle A 8: Geräte zur DNA-Konzentrationsbestimmung .....	161
Tabelle A 9: Geräte und Produkte für Test-qPCR.....	163
Tabelle A 10: Verwendete Primer für die Test-qPCR.....	164
Tabelle A 11: Temperaturprogramm der Test-PCR .....	164
Tabelle A 12: Verwendete Geräte und Produkte für die qPCR .....	165
Tabelle A 13: In dieser Arbeit verwendete Primer für die verschiedenen qPCRs .....	166
Tabelle A 14: Temperaturprogramm der Real-Time PCR.....	168
Tabelle A 15: Produkte und Geräte zur DNA-Aufbereitung.....	168
Tabelle A 16: Geräte und Reagenzien für Multiplex PCR und Agarose-Gelelektrophorese	169
Tabelle A 17: Verwendete Primersequenzen für Pathogenitätsfaktoren von <i>E. coli</i> nach Bosworth und Casey (1997).....	171
Tabelle A 18: Kontrollstämme (Negativ- und Positivkontrollen) für die MPCR und Gelelektrophorese mit bereits bekannten Pathogenitätsgenen .....	172
Tabelle A 19: Temperaturprogramm für „touch-down“ MPCR.....	172
Tabelle A 20: Geräte und Produkte für die Illumina®-Sequenzierung.....	173
Tabelle A 21: Primersequenzen der Firma LGC Genomics GmbH für die Markierung der verschiedenen Proben.....	174
Tabelle A 22: Temperaturprogramm für die qPCR zur Überprüfung der Eignung der Primer .....	176
Tabelle A 23: Temperaturprogramm für die PCR mit KAPA HiFi Ready Mix.....	176

## Tabellenverzeichnis

---

Tabelle A 24: Temperaturprogramm der qPCR zur Qualitätskontrolle der KAPA-PCR-Produkte..... 176

Tabelle A 25: Geräte und Produkte zur Kontrolle der Qualität der PCR-Produkte..... 177



### **1 Einleitung**

Die Proteinkonzentration und -qualität in Katzenfuttermitteln kann erheblich variieren. Bislang haben jedoch nur wenige Studien untersucht, inwiefern hiermit eine Beeinflussung der Zusammensetzung und Aktivität der intestinalen Mikrobiota bei der Katze assoziiert ist. Dieser Aspekt erscheint jedoch von ernährungsphysiologischer und klinischer Relevanz, da eine unterschiedliche Proteinbereitstellung aufgrund einer möglicherweise variierenden Proteinverdaulichkeit zu einer einseitigen Förderung proteolytischer Bakterien oder einem vermehrten Anfall von Metaboliten aus dem bakteriellen Eiweißabbau beitragen könnte. Verschiebungen in der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota sowie bestimmte bakterielle Metaboliten stellen eine Belastung für den Organismus dar und können somit die Gesundheit des Tieres beeinträchtigen. Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Arbeit einerseits die Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota bei adulten, gesunden Katzen charakterisiert und andererseits der mögliche Einfluss eines variierenden Proteingehalts sowie einer variierenden Proteinqualität in einem Alleinfutter untersucht werden. Daneben sollten in den Kotproben der Katzen ausgewählte bakterielle Metaboliten bestimmt werden, um Rückschlüsse auf die Aktivität der intestinalen Mikrobiota zu ermöglichen. Die gewonnenen Erkenntnisse können helfen, die Bedeutung der qualitativen und quantitativen Proteinbereitstellung bei der Katze im Kontext von verdauungsphysiologischen und metabolischen Prozessen besser zu verstehen und darauf basierende Fütterungsempfehlungen auszusprechen.

## 2 Literatur

### 2.1 Verdauungsphysiologie der Katze

#### 2.1.1 Aufbau des Gastrointestinaltrakts

Der Verdauungsapparat der Katze beginnt mit der Mundhöhle (Nickel et al., 1999; Thomé, 1999). Hier wird die Nahrung mit den Zähnen zerkleinert und zur Erleichterung des weiteren Transports mithilfe von Speichel gleitfähiger gemacht (Thomé, 1999; König et al., 2009). Die Nahrung wird über den Schlundkopf (*Pharynx*) und die Speiseröhre (*Oesophagus*) in den Magen (*Gaster*) transportiert (Thomé, 1999; Vollmerhaus und Roos, 1999). Dieser weist verschiedene Drüsenarten auf: die Kardiadrüsen (*Glandulae cardiacae*), die Fundusdrüsen (*Glandulae gastricae propriae*) und die Pylorusdrüsen (*Glandulae pyloricae*) (König et al., 2009; Wolffram, 2015a). Während die Zellen der Fundusdrüsen Pepsinogen, Salzsäure sowie Schleim sezernieren (König et al., 2009; Wolffram, 2015a), produzieren die Zellen der Kardial- und Pylorusdrüsen eine die Schleimhaut des Magens schützende Schleimschicht und sezernieren Hydrogencarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) (König et al., 2009; Wolffram, 2015a).

Im Magen wird die Nahrung vorübergehend gespeichert, zudem setzen erste Prozesse der Verdauung von Nahrungsfetten und -eiweißen ein (Wolffram, 2015a). Dem Magen folgen der Dünndarm (*Intestinum tenue*) und der Dickdarm (*Intestinum crassum*) (König et al., 2009). Die Angaben bezüglich der Gesamtlänge des Darms bei Katzen unterscheiden sich im Schrifttum. So geben König et al. (2009) das Drei- bis Vierfache der Körperlänge an, wohingegen Vollmerhaus und Roos (1999) die fünffache Körperlänge nennen. Der Dünndarm besteht aus dem Zwölffingerdarm (*Duodenum*), dem Leerdarm (*Jejunum*) und Hüftdarm (*Ileum*) und der Dickdarm aus Blinddarm (*Caecum*), Grimmdarm (*Colon*) und Mastdarm (*Rectum*) (Vollmerhaus und Roos, 1999). Während der Dünndarm den Hauptort der Nährstoffverdauung und -resorption darstellt (Wolffram, 2015b), werden im Dickdarm Wasser, Elektrolyte und Produkte des mikrobiellen Stoffwechsels resorbiert (Breves, 2015).

Neben den genannten Abschnitten des Gastrointestinaltrakts sind zudem die Leber (*Hepar*) und die Bauchspeicheldrüse (*Pankreas*) für die Verdauungsprozesse relevant (König et al., 2009). Die Leber produziert die Gallenflüssigkeit (König et al., 2009; Fuhrmann und Sallmann, 2015), welche in der Gallenblase gespeichert wird (Wolffram, 2015b). Als Bestandteil der Gallenflüssigkeit sind die Gallensäuren Chenodesoxycholsäure, Cholsäure, Glyko- und Taurochenodesoxycholsäure sowie Glyko- und Taurocholsäure (Wolffram, 2015b) aufgrund ihrer emulgierenden Eigenschaften für die Fettverdauung von wesentlicher Bedeutung (Fuhrmann und Sallmann, 2015). Neben den Gallensäuren enthält die Gallenflüssigkeit zudem Cholesterin, Gallenfarbstoffe (z. B. Bilirubinidglucuronat),

Phospholipide und Elektrolyte wie Chlorid ( $\text{Cl}^-$ ), Hydrogencarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ), Natrium ( $\text{Na}^+$ ), Kalium ( $\text{K}^+$ ) und Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Wolffram, 2015b).

Das Pankreas besitzt zum einen endokrines Gewebe, welches die Hormone Insulin, Glucagon und Amylin produziert (Langhans und Lutz, 2015). Zum anderen besteht das Pankreas aus einem exokrinen Teil, welcher aktive und inaktive Verdauungsenzyme in den Darm sezerniert (Wolffram, 2015b). Inaktive Verdauungsenzyme des Pankreas werden im Dünndarm durch Enzyme der Bürstensaummembran aktiviert (Wolffram, 2015b). Zu den inaktiven Enzymen des Pankreas gehören Peptidasen, wie Chymotrypsinogen, Procarboxypeptidase A, Procarboxypeptidase B, Proelastase und Trypsinogen sowie Lipasen, wie Pro-Colipase und Prophospholipase A<sub>2</sub> (Wolffram, 2015b). Zu den aktiven Enzymen zählen die  $\alpha$ -Amylase, Nucleasen, wie die Ribonuclease und die Desoxyribonuclease sowie die Cholesterinesterase und die Lipase (Wolffram, 2015b).

### **2.1.2 Proteinmetabolismus und Proteinbedarf der Katze**

Nahrungsprotein wird im Gastrointestinaltrakt durch verschiedene eiweißspaltende Enzyme zu Peptiden und Aminosäuren abgebaut (Wolffram, 2015b). Hierzu gehören das gastrale Pepsin, die pankreatischen Enzyme Chymotrypsin, Elastase und Trypsin sowie verschiedene Carboxypeptidasen (Wolffram, 2015b). Zudem sind weitere Peptidasen an der Bürstensaummembran des Dünndarms lokalisiert (Wolffram, 2015b).

Der niedrige pH-Wert (pH 1–4) im Magen führt zu einer Denaturierung von Nahrungsprotein sowie zu einer Aktivierung des von den Hauptzellen der Fundusdrüsen produzierten Pepsinogens zu Pepsin (Wolffram, 2015b). Das gastrale Pepsin sowie die Peptidasen des Dünndarms spalten Eiweiß zu Oligo-, Tri- und Dipeptiden beziehungsweise in Aminosäuren auf (Wolffram, 2015b). Diese werden, mit Ausnahme der Oligopeptide, welche zuvor weiteren Spaltungsvorgängen durch die Peptidasen der Bürstensaummembran unterzogen werden, über verschiedene Mechanismen in die Epithelzellen des Dünndarms transportiert (Wolffram, 2015b). Di- und Tripeptide werden intrazellulär durch zytoplasmatische Peptidasen zu Aminosäuren abgebaut (Wolffram, 2015b). Durch Diffusion oder über verschiedene Transportsysteme werden die Aminosäuren anschließend aus der Epithelzelle ins Blut abgegeben (Wolffram, 2015b).

Unverdautes Nahrungsprotein sowie endogene Proteine gelangen in den Dickdarm und unterliegen hier dem weiteren Abbau durch Mikroorganismen (Breves, 2015). Als Produkte des mikrobiellen Proteinabbaus entstehen Ammoniak, welches für die mikrobielle Proteinsynthese verwendet wird, Amine, Ketosäuren und Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ ) (Breves, 2015) sowie verzweigtkettige Fettsäuren (iso(i)-Valeriansäure und iso(i)-Buttersäure), Indole, Phenole und Wasserstoff ( $\text{H}_2$ ) (Mortensen und Clausen, 1996).

Die Katze besitzt einen verhältnismäßig hohen Proteinbedarf, welcher sich auf eine verstärkte Aktivität kataboler Enzyme zurückführen lässt (Legrand-Defretin, 1994). In Tabelle 1 finden sich Angaben zum Rohproteinbedarf (Rp-Bedarf) von Katzen im Erhaltungsstoffwechsel, während des Wachstums sowie während der Reproduktion (National Research Council (NRC), 2006; Fédération européenne de l'industrie des aliments pour animaux familiers (FEDIAF), 2016; Association of American Feed Control Officials (AAFCO), 2017). Zudem werden die folgenden Aminosäuren als essenziell für die Katze betrachtet: Arginin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan und Valin (NRC, 2006). Darüber hinaus ist die Aminosulfonsäure Taurin für die Katze ebenfalls essenziell (Knopf et al., 1978). Ein Taurinmangel äußert sich bei der Katze insbesondere in einer verminderten Fruchtbarkeit (Imaki et al., 1986; Sturman et al., 1986; 1987; Sturman, 1988; Sturman und Messing, 1991; 1992; Dieter et al., 1993; Sturman und Lu, 1997), einer dilatativen Kardiomyopathie (Pion et al., 1987) sowie in einer zentralen Retinadegeneration (Rubin, 1963; Scott, 1964; Morris, 1965; Rabin et al., 1973; Bellhorn et al., 1974; Hayes et al., 1975; Aguirre, 1978).

Tabelle 1: Angaben zum Rohproteinbedarf von Katzen, bezogen auf die Trockensubstanz (TS), die umsetzbare Energie (ME) eines Alleinfutters bzw. auf die metabolische Körpermasse (kg KM<sup>0,67</sup>) der Katze (National Research Council (NRC), Fédération européenne de l'industrie des aliments pour animaux familiers (FEDIAF), Association of American Feed Control Officials (AAFCO))

	NRC (2006) <sup>1</sup>			FEDIAF (2016) <sup>2</sup>		AAFCO (2017) <sup>2</sup>	
	g/kg TS	g/MJ ME	g/kg KM <sup>0,67</sup>	g/kg TS	g/MJ ME	g/kg TS	g/MJ ME
Erhaltung	160	9,6	3,97	250	14,9	260	16
Wachstum	180	10,8	9,40	280	16,7	300	18
Trächtigkeit	170	10,3	5,90	300	17,9	300	18
Laktation	240	14,3	12,9				

<sup>1</sup>Minimalbedarf <sup>2</sup>Mindestgehalt an Rohprotein (Rp) im Futter

## 2.2 Proteinquellen in der Katzenernährung

Neben tierischen Proteinlieferanten werden auch pflanzliche Proteinquellen in der Ernährung von Katzen eingesetzt (Case et al., 2011). Als pflanzliche Proteinlieferanten finden beispielsweise Maiskleber, Sojaextraktionsschrot, Sojamehl, Reisglutenmehl, Luzernegrünmehl und Weizenkeime in der Katzenernährung Anwendung (Cowell et al., 2002; Case et al., 2011).

Als tierische Proteinlieferanten in Futtermitteln für Katzen sind insbesondere Fleisch, Fleischmehl und Fleischnebenprodukte, Eier, Fisch und Fischmehl zu nennen (Case et al., 2011). In den Tabellen 2 und 3 werden Daten zur scheinbaren Verdaulichkeit des Rohproteins (sV Rp) von unterschiedlichen pflanzlichen und tierischen Proteinquellen bei der Katze zusammengefasst. Hierbei ist zu erkennen, dass vor allem Muskelfleisch eine hohe Verdaulichkeit von über 90 % aufweist (Tabelle 3). Deutlich geringere Werte wurden für Grieben-, Horn- und Federmehl festgestellt. Bei den pflanzlichen Proteinlieferanten besitzt insbesondere Sojaproteinisolat eine hohe scheinbare Verdaulichkeit von etwa 85–95 % (Tabelle 2).

Tabelle 2: Scheinbare Verdaulichkeit von pflanzlichen Proteinquellen bei der Katze (modifiziert und ergänzt nach Figge (1989) und Oldenhage (2003))

<b>Proteinquelle</b>	<b>Weitere Hauptkomponenten im Futter</b>	<b>Rp-Gehalt in der TS<sup>1</sup> (in %)</b>	<b>sV Rp<sup>2</sup> (in %)</b>	<b>Literaturquelle</b>
Sojaproteinisolat	Maisstärke	44,4	94,8	Kane et al. (1981)
	Rohrzucker, Stärke	22,8	85,1	Kendall et al. (1982a)
		22,4	95,5	
		16,4	86,0	Burger et al. (1984)
Herz und Sojaproteinisolat	-	60,7	89,9	Figge (1989)
Sojaproteinisolat	-	92,2	87,0	
Sojaproteinisolat	Reis	64,2	93,0	Oldenhage (2003)
		27,3	88,8	
Maisglutenmehl	Geflügelnebenproduktmehl,	29,1	84,0	Carciofi et al. (2009)
Sojabohnen (mikronisiert)	Mais und Maisstärke, Reis	30,0	84,0	

<sup>1</sup>Rohproteingehalt in der Trockensubstanz (TS) des Futters      <sup>2</sup>scheinbare Verdaulichkeit des Rohproteins

Literatur

Tabelle 3: Scheinbare Verdaulichkeit tierischer Proteinquellen bei der Katze (modifiziert und ergänzt nach Figge (1989) und Oldenhage (2003))

<b>Proteinquelle</b>	<b>Weitere Hauptkomponenten im Futter</b>	<b>Rp-Gehalt in der TS<sup>1</sup> (in %)</b>	<b>sV-Rp<sup>2</sup> (in %)</b>	<b>Literaturquelle</b>	
Hackfleisch (Rind)	-	53,9	95,7	Kendall et al. (1982a)	
Hackfleisch (Rind)	-	55,4	96,2	Schneider (1988)	
Hornmehl	-	78,7	45,9		
Federmehl	-	77,0	82,9		
Leber (Rind)	-	64,0	96,7	Figge (1989)	
Lunge (Rind)	-	51,1	94,8		
Herz (Rind)	-	42,9	93,9		
Pansen (Rind)	-	46,4	96,1		
Fischmehl	-	64,4	90,5		
Thunfisch	-	84,2	96,7		
Eier, gekocht	-	48,3	95,9		
Herz und Eier, gekocht	-	43,4	94,5		
Fleischmehl	Fischöl, Schmalz	57,5	90,7		Kienzle (1990)
Geflügelabfallmehl		40,8	86,9		
Schultermuskulatur (Rind)	-	55,4	96,2	Kienzle et al. (1991)	
	Weizenkleie	44,5	92,7		
	Zellulose	44,5	95,4		
	Hornmehl	61,6	78,0		
	Federmehl (hydrolysiert)	65,2	91,0		
	Panseninhalt (getrocknet)	40,4	87,0		
	Grasmehl (getrocknet)	45,7	90,0		

<sup>1</sup>Rohproteingehalt in der Trockensubstanz (TS) des Futters    <sup>2</sup> scheinbare Verdaulichkeit des Rohproteins

Literatur

Fortsetzung Tabelle 3: Scheinbare Verdaulichkeit tierischer Proteinquellen bei der Katze (modifiziert und ergänzt nach Figge (1989) und Oldenhage (2003))

<b>Proteinquelle</b>	<b>Weitere Hauptkomponenten im Futter</b>	<b>Rp-Gehalt in der TS<sup>1</sup> (in %)</b>	<b>sV-Rp<sup>2</sup> (in %)</b>	<b>Literaturquelle</b>
Herz (Rind)	Reis, Schmalz	15,1–55,8	79,2–95,2	Dekeyzer (1997)
Griebenmehl		16,2–60,7	78,4–89,1	
Geflügelfleischmehl		14,9–54,7	73,3–82,8	
Ratte (zermahlen)	-	55,1	85,5	Fekete et al. (2001)
	Apfeltrester: 10 % in der TS	51,5	79,1	
	20 % in der TS	44,4	75,9	
	40 % in der TS	36,7	68,5	
Griebenmehl	Reis	77,6	91,7	Oldenhage (2003)
		22,6	80,0	
Pferdefleisch		64,0	97,0	
		21,7	89,0	
Rindfleisch, Fleischnebenprodukte, Fischmehl, Sojamehl (Komponenten roh)	-	52,5	93,3	Kerr et al. (2012)
Rindfleisch, Fleischnebenprodukte, Fischmehl, Sojamehl (Komponenten gegart)	-	52,0	92,9	

<sup>1</sup>Rohproteingehalt in der Trockensubstanz (TS) des Futters

<sup>2</sup>scheinbare Verdaulichkeit des Rohproteins

Obgleich kommerzielle Katzenfuttermittel meist eine Kombination aus pflanzlichen und tierischen Proteinquellen aufweisen (Case et al., 2011), werden auch rein vegetarische oder vegane Diäten für Katzen angeboten. Bisherige Untersuchungen konnten in diesem Zusammenhang jedoch häufig eine unausgewogene Nährstoffzusammensetzung dieser Diäten aufzeigen. So lagen in einer Studie von Gray et al. (2004) die Gehalte an Arginin, Lysin, Methionin, Taurin, Rohprotein, Arachidonsäure, Kalzium, Phosphor und Vitamin A in zwei veganen Futtermitteln für Katzen unterhalb der empfohlenen Mindestgehalte laut AAFCO (2004). Ähnliche Ergebnisse wurden von Kanakubo et al. (2015) nach der Untersuchung von vier vegetarischen Trocken- und drei vegetarischen Feuchtfuttermitteln für Katzen beschrieben. Hier lagen die Gehalte an Leucin, Lysin, Methionin-Cystin, Methionin, Tryptophan und Taurin teilweise unter den nach AAFCO (2014) empfohlenen Mindestgehalten für ein Katzenalleinfutter (Kanakubo et al., 2015). Es sollte zudem erwähnt werden, dass in Pflanzen kein Taurin enthalten ist, sodass diese Aminosulfonsäure bei veganen Rationen für Katzen supplementiert werden muss (Kirk et al., 2002).

## **2.3 Die gastrointestinale Mikrobiota der Katze**

### **2.3.1 Zusammensetzung bei gesunden Katzen**

Die intestinale Mikrobiota umfasst die Gesamtheit aller im Darm vorkommenden Bakterien, Viren, Pilze, Protozoen und Archaeen (Suchodolski, 2011b; Minamoto et al., 2012). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit bezieht sich der Begriff „gastrointestinale Mikrobiota“ lediglich auf die bakterielle Besiedlung des Gastrointestinaltrakts.

Die Zusammensetzung der gastrointestinalen Mikrobiota der Katze weist individuelle Variationen auf (Ritchie et al., 2010; Suchodolski, 2011b; Grzeškowiak et al., 2015). Osbaldiston und Stowe (1971) konnten im Gastrointestinaltrakt von Katzen vornehmlich Enterokokken, Streptokokken, coliforme Bakterien und Laktobazillen kulturell nachweisen. Itoh et al. (1984) detektierten im Kot von spezifisch-pathogenfreien (SPF-)Katzen höhere Zahlen an *Enterobacteriaceae* und Clostridien sowie geringere Zahlen an *Bacteroidaceae*, *Eubacteria* und Laktobazillen als bei konventionell gehaltenen Katzen. Hierbei ist zu erwähnen, dass bei einer der drei untersuchten konventionellen Haltungen ein Trockenalleinfutter für Katzen eingesetzt wurde, während die Katzen der anderen zwei konventionellen Haltungen sowie der SPF-Haltung ein Trockenalleinfutter für Hunde sowie Dosenfisch erhielten (Itoh et al., 1984). Stöcker (1987) detektierte im Dickdarmchymus von Katzen vornehmlich *Bacteroides*, jedoch auch Bifidobakterien, Clostridien, Eubakterien, Laktobazillen, Propionibakterien und Streptokokken. In einer Studie von Papasouliotis et al. (1998) wurde die bakterielle Zusammensetzung im Duodenum von gesunden SPF-Katzen ebenfalls mittels kultureller Nachweismethoden untersucht. Es konnten in über 90 % der

unverdünnten Duodenalaspirate *Clostridium* spp., in 40 % *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Fusobacterium* spp. sowie in 44 % der Proben *Bacteroides* spp. nachgewiesen werden (Papasouliotis et al., 1998). Daneben wurde gezeigt, dass die endoskopische Gewinnung einer Spülprobe andere Ergebnisse liefert als ein Nadelaspirat von Duodenalinhalt bzw. als eine endoskopische Gewinnung eines unverdünnten Aspirats (Papasouliotis et al., 1998). Sparkes et al. (1998a) fanden im Duodenum von SPF-Katzen mit  $10^6$  koloniebildenden Einheiten (KbE)/ml vergleichbare Bakterienzahlen wie in der Arbeit von Papasouliotis et al. (1998) vor. In Anlehnung an Itoh et al. (1984) ergab der kulturelle Nachweis zudem höhere Zahlen aerober als anaerober Bakterien in den Proben (Sparkes et al., 1998a).

Ritchie et al. (2008) untersuchten anhand einer Sequenzanalyse des 16S rRNA-Gens die gastrointestinale Mikrobiota von fünf gesunden Katzen. Die Analysen ergaben hierbei das Vorkommen folgender Bakterienphyla im Dünndarm sowie im Kolon und Rektum der Tiere: *Firmicutes* (68 %), *Proteobacteria* (14 %), *Bacteroidetes* (10 %), *Fusobacteria* (5 %) und *Actinobacteria* (4 %) (Ritchie et al., 2008). Im Kolon wurden die höchsten Anteile der Clostridien-Cluster I und XIVa vorgefunden, während *Lactobacillales* überwiegend im Jejunum und Kolon sowie *Bacteroidales* und *Fusobacteriales* vornehmlich im Ileum und Kolon vorkamen (Ritchie et al., 2008). Dagegen wurde in keinem Abschnitt des Verdauungstrakts der Tiere das Genus *Bifidobacterium* spp. detektiert (Ritchie et al., 2008). Dieses Genus konnte allerdings in einer früheren Studie von Itoh et al. (1984) sowohl im Kot von konventionell gehaltenen Katzen ( $8,5 \log_{10}$  KbE/g) als auch bei SPF-Katzen ( $8,3 \log_{10}$  KbE/g) nachgewiesen werden. In einer Studie von Desai et al. (2009), in welcher das 60 kDa Chaperonin als Zielgen amplifiziert wurde, konnten in Kotproben von gesunden Katzen vor allem Laktobazillen (*Firmicutes*) und Bifidobakterien (*Actinobacteria*) vorgefunden werden. Ritchie et al. (2010) detektierten im Kot von gesunden Katzen mittels Sequenzanalyse des 16S rRNA-Gens hingegen vorrangig das Phylum *Firmicutes* (87,31 %), wohingegen *Actinobacteria* (2,25 %) sowie weitere Phyla (*Proteobacteria*: 7,88 %, *Bacteroidetes*: 2,35 % *Fusobacteria*: 0,20 %) nur zu geringen Anteilen vorkamen. Innerhalb des Phylums *Firmicutes* wurden überwiegend Vertreter der Clostridien-Cluster XI (34 %), I (25 %) und XIVa (24 %) detektiert (Ritchie et al., 2010). Zudem wurden mittels gruppenspezifischer Primer für Laktobazillen und Bifidobakterien *Lactobacillus aviarius* und *Lactobacillus paracollinoides* sowie *Bifidobacterium subtile* innerhalb dieser Gruppen am häufigsten nachgewiesen (Ritchie et al., 2010). Handl et al. (2011) stellten ebenfalls fest, dass der größte Anteil der vorgefundenen bakteriellen Sequenzen in Kotproben von Katzen dem Phylum der *Firmicutes* (92 %) zuzuordnen ist, gefolgt von den Phyla *Actinobacteria* (7,3 %), *Bacteroidetes* (0,45%) und *Fusobacteria* (0,04 %). Die höchsten Anteile in der Ordnung der *Clostridiales* wurden für die Clostridien-Cluster XIVa und XI mit rund 63 % bzw. 24 % nachgewiesen (Handl et al., 2011). Abweichende Ergebnisse lieferte die Studie von

Tun et al. (2012), in welcher die *Bacteroides/Chlorobi*-Gruppe mit rund 68 % als die in Kotproben von Katzen am häufigsten auftretende Bakteriengruppe identifiziert wurde. Für die Phyla *Firmicutes* (13 %), *Bacteroidetes* (9 %) und *Proteobacteria* (6 %) wurden hingegen deutlich geringere Anteile ermittelt (Tun et al., 2012).

In einer Untersuchung mit gesunden Katzen aus Privathaltungen konnte in über 90 % der Fälle *Helicobacter* spp. im Magen nachgewiesen werden (Neiger et al., 1998). *Helicobacter pylori* steht vor allem in der Humanmedizin im Zusammenhang mit Gastritiden und der Entstehung von Ulzera sowie Karzinomen des Magens (Warren und Marshall, 1983; Fox et al., 1989; Parsonnet et al., 1991; Wotherspoon et al., 1991; Sanders und Peura, 2002). Die klinische Relevanz von *Helicobacter* spp. bei Hunden und Katzen ist bislang nicht endgültig geklärt, jedoch scheint eine Beteiligung von *Helicobacter* spp. bei der Pathogenese von Gastritiden auch bei diesen Tierarten nicht ausgeschlossen (Neiger und Simpson, 2000).

### 2.3.2 Altersassoziierte Veränderungen

Einige Arbeiten haben mögliche altersassoziierte Einflüsse auf die Zusammensetzung der gastrointestinalen Mikrobiota von Katzen untersucht. Osbaldiston und Stowe (1971) konnten hierbei ein vergleichbares Vorkommen von Enterokokken, Streptokokken, coliformen Bakterien und Laktobazillen im Verdauungstrakt von 1–3 Wochen alten Katzenwelpen und ausgewachsenen Katzen aufzeigen. Auch Jia et al. (2011a; b) konnten in Kotproben von Katzenwelpen und adulten Katzen (8–14 Jahre) keine Unterschiede in der Bakteriengesamtzahl sowie in der Zahl an Bifidobakterien, *Coriobacteriaceae* und des Clostridien-Clusters XIV detektieren. Allerdings konnte mithilfe der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) festgestellt werden, dass die Katzenwelpen nach dem Absetzen eine geringere bakterielle Diversität im Kot aufwiesen (Jia et al., 2011b).

Patil et al. (2000) wiesen in Kotproben von älteren Katzen (9–14 Jahre) geringere Zahlen an Bifidobakterien (7,2 log<sub>10</sub> KbE/g Frischsubstanz (FS)) als bei jüngeren Katzen (1–9 Jahre; 8,3 log<sub>10</sub> KbE/g FS) nach. Bell et al. (2014) beschrieben im Kot von Katzen, die älter als zehn Jahre waren, geringere Zahlen an *Faecalibacterium* spp. im Vergleich zu jüngeren Tieren, wohingegen keine Altersunterschiede für die Genera *Bifidobacterium* und *Lactobacillus* festgestellt wurden.

Vester et al. (2009) untersuchten mittels quantitativer Polymerasen-Ketten-Reaktion (qPCR) und DGGE Kotproben von Katzenwelpen im Alter von 8, 12 und 16 Wochen. Hierbei wurden keine altersassoziierten Einflüsse auf das Vorkommen von *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* (*C.*) *perfringens* und *Lactobacillus* spp. festgestellt (Vester et al., 2009). Der Anteil an *E. coli* war hingegen bei 12 Wochen alten Katzenwelpen geringer als bei 8 bzw. 16 Wochen alten Tieren (Vester et al., 2009). In zwei nachfolgenden Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe

wurde die fäkale Mikrobiota von Katzenwelpen mit 8, 12 und 16 Wochen mittels 454-Pyrosequenzierung (Hooda et al., 2013) sowie Illumina®-Sequenzierung (Deusch et al., 2014) untersucht. Hooda et al. (2013) fanden einen Anstieg an *Bifidobacterium* und *Catenibacterium* sowie eine Abnahme an *Lactobacillus* und *Dialister* im Kot der Katzenwelpen mit zunehmendem Alter. Zudem war das Vorkommen von *Megasphaera* und *Ruminococcus* im Kot der 12 Wochen alten Katzen höher und das Vorkommen von *Subdoligranulum* geringer als bei den 8 und 16 Wochen alten Tieren (Hooda et al., 2013). Deusch et al. (2014) stellten in den mittels Illumina®-Sequenzierung analysierten Kotproben derselben Katzenwelpen bei 18 Genera einen Alterseffekt fest, jedoch lag der relative Anteil der Sequenzen dieser Genera im Kot der Katzen im Mittel lediglich bei 0,2 % (außer bei *Parabacteroides*: 2,1 %). Insbesondere nahm der relative Anteil an *Escherichia* spp. und *Parabacteroides* spp. mit dem Alter der Tiere ab (Deusch et al., 2014). Da allerdings kein altersassoziierter Einfluss auf die bakterielle Diversität im Kot der Tiere vorlag, wurde von den Autoren geschlussfolgert, dass die fäkale Mikrobiota bei Katzenwelpen in einem Alter von 8 bis 16 Wochen keinen größeren Veränderungen unterliegt (Deusch et al., 2014). In einer weiteren Studie von Deusch et al. (2015) wurden altersassozierte Veränderungen in der Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota von Katzen im Alter von 18, 30 und 42 Wochen untersucht. Hierbei wurde ein Anstieg der bakteriellen Diversität sowie der relativen Anteile der Genera *Bacteroides*, *Prevotella* und *Megasphaera* sowie eine Abnahme der relativen Anteile der Genera *Bifidobacterium* und *Lactobacillus* mit zunehmendem Alter der Katzenwelpen detektiert (Deusch et al., 2015). Daneben stellte Masuoka et al. (2017) ebenfalls altersassozierte Veränderungen der fäkalen Mikrobiota bei Katzen fest. Hierbei wurden im Kot von Katzen im Alter von rund 13 Tagen höhere Zahlen an *Enterobacteriaceae* beobachtet als bei Tieren im Alter von 8 Wochen, 3, 11 und 18 Jahren (Masuoka et al., 2017). Zudem wies der Kot der 13 Tage alten Katzen höhere Zahlen an *Enterococcus* auf als der Kot der Tiere im Alter von rund 17 Jahren (Masuoka et al., 2017).

### **2.3.3 Krankheitsassozierte Veränderungen**

Aus der Humanmedizin ist bekannt, dass bestimmte Erkrankungen mit Veränderungen in der Zusammensetzung der gastrointestinalen Mikrobiota assoziiert sein können. Untersuchungen liegen insbesondere im Zusammenhang mit dem Vorliegen von Darmerkrankungen, Diabetes mellitus oder Adipositas vor (Cani et al., 2008; DiBaise et al., 2008; Turnbaugh et al., 2009; Ley, 2010; DuPont, 2011; Esteve et al., 2011; Flint, 2011; Chen et al., 2012; Kallus und Brandt, 2012; da Silva et al., 2013; Fujimoto et al., 2013; Galecka et al., 2013; Caricilli und Saad, 2014; Moran und Shanahan, 2014).

Bislang haben jedoch nur wenige Studien überprüft, ob krankheitsassoziierte Veränderungen der bakteriellen Gemeinschaft auch im Darm von Katzen vorzufinden sind.

In einer Studie von Kieler et al. (2016) wurden im Kot adipöser Katzen im Vergleich zu normalgewichtigen Tieren höhere Werte für das *Clostridium* Cluster IV und *Enterobacteriaceae* sowie geringere Werte für *Bacteroidetes*, das *Clostridium* Cluster XIVa, *Epsilonproteobacteria* und *Fusobacteria* festgestellt.

In endoskopisch gewonnener Dünndarmdigesta von Katzen mit Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts konnten geringere Zahlen an mikroaerophilen Bakterien, *Bacteroides* spp., *Lactobacillus* spp. und *Pasteurella* spp. detektiert werden als bei gesunden Katzen (Johnston et al., 2001; Inness et al., 2007). Inness et al. (2007) konnten zeigen, dass Katzen mit Inflammatory Bowel Disease (IBD) im Vergleich zu gesunden Tieren im Kot geringere Bakteriengesamtzahlen sowie auf Genusebene geringere Keimzahlen von *Bacteroides* spp. und *Bifidobacterium* spp. sowie höhere Keimzahlen von *Desulfovibrio* spp. aufwiesen. Bei der Interpretation der Ergebnisse ist jedoch zu berücksichtigen, dass die erkrankten und gesunden Tiere Diäten erhielten, die im Rohproteingehalt (Rp-Gehalt: 36,5 % bzw. 33,6 %) sowie im Rohfasergehalt (Rfa: 1,6 % bzw. 1,0 %) variierten, sodass fütterungsassoziierte Effekte auf die intestinale Mikrobiota nicht ausgeschlossen werden konnten (Inness et al., 2007). In einer weiteren Studie wurden Duodenalbiopsien von Katzen mit Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts sowie von klinisch gesunden Katzen mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) untersucht (Janeczko et al., 2008). Hierbei konnten bei den erkrankten Tieren höhere Zahlen an Mukus-assoziierten *Enterobacteriaceae* nachgewiesen werden (Janeczko et al., 2008).

In einer Studie von Suchodolski et al. (2015) wiesen Katzen mit Durchfallerkrankungen im Vergleich zu gesunden Katzen höhere Zahlen an *Beta*- und *Gamma-Proteobacteria*, *Bacillus* sowie des Genus *Clostridium* spp. im Kot auf. Daneben wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Unterschiede in der Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota bei Katzen mit akuten und chronischen Durchfallerkrankungen bestehen. Hierbei ergab sich, dass bei chronischen Durchfallerkrankungen höhere Zahlen an *Erysipelotrichia* und *Lactobacillus* spp. sowie geringere Zahlen an *Bacteroidaceae* vorlagen (Suchodolski et al., 2015). Zudem wurden bei Katzen mit chronischen Durchfallerkrankungen im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren geringere Gehalte an *Faecalibacterium* spp. im Kot festgestellt (Suchodolski et al., 2015).

Schließlich wurde in einer Studie von Bell et al. (2014) bei Katzen mit Diabetes mellitus die fäkale Mikrobiota charakterisiert. Hierbei konnte kein Unterschied zu gesunden Katzen ermittelt werden (Bell et al., 2014).

### 2.3.4 Potenziell pathogene Bakterien im Gastrointestinaltrakt von Katzen

Das Vorkommen pathogener Bakterien im Gastrointestinaltrakt von Katzen ist sowohl für die Pathogenese von Durchfallerkrankungen (Weese et al., 2001; Marks et al., 2011; Queen et al., 2012; Cantas und Suer, 2014; Paris et al., 2014) als auch vor dem Hintergrund des zoonotischen Potenzials einiger Infektionserreger (Glaser et al., 1994; Angulo et al., 1995; Angulo und Swerdlow, 1995; Hill et al., 2000; Morato et al., 2009; Weese, 2011) von Bedeutung. Wichtige Vertreter, welche beim Menschen Durchfallerkrankungen verursachen können, sind *E. coli*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium (C.) difficile*, *C. perfringens* und *Salmonella* spp. (Glaser et al., 1994; Angulo und Swerdlow, 1995; Meer et al., 1997; Nataro und Kaper, 1998; Kuijper et al., 2007; Jhung et al., 2008; Dasti et al., 2010; Weese, 2011; Uzal et al., 2014; Bula-Rudas et al., 2015; Damborg et al., 2015; Lee et al., 2016).

Allerdings können potenziell pathogene Bakterien mitunter gleichermaßen bei gesunden und erkrankten Tieren identifiziert werden, sodass ihre Bedeutung für die Entwicklung von Durchfallerkrankungen oftmals unklar ist (Marks et al., 2011).

So konnte in einer frühen Studie von Shimi und Barin (1977) durch Rektalabstriche bei Katzen insgesamt eine Prävalenz für *Salmonella* von 13,6 % ermittelt werden. Zudem beschrieben die Autoren bei Katzen mit einer Gastroenteritis eine höhere Prävalenz (37,5 %) als bei gesunden Tieren (12,8 %) (Shimi und Barin, 1977). In einer weiteren Untersuchung wurde unabhängig vom Gesundheitszustand im Kot von Katzen für *Salmonella* eine Prävalenz von 10,6 % ermittelt (Fox und Beaucage, 1979). Anders als in diesen frühen Studien gaben Hill et al. (2000) jedoch für *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium sowie für *Campylobacter* spp. lediglich eine Prävalenz von 1 % in Kotproben von gesunden Katzen und Katzen mit Durchfallerkrankungen an. Ähnliche Prävalenzen für *Salmonella* sp. (0,8 %) und *Campylobacter jejuni* (0,8 %) konnten in Kotproben von Katzen in einem Alter von unter einem Jahr ermittelt werden (Spain et al., 2001). Auch Tun et al. (2012) beschreiben, dass bakterielle Infektionserreger mit zoonotischem Potenzial zu einem relativ geringen Prozentsatz im Kot von klinisch gesunden Katzen vorkommen. So lag die Mehrzahl der in diesem Kontext identifizierten Bakterienspezies von insgesamt 12 detektierten Genera bei etwa 0,2 % (Tun et al., 2012). Den höchsten Anteil nahm *C. difficile* mit 1,25 % ein (Tun et al., 2012). Höhere Prävalenzen für *C. difficile* im Kot von Katzen unabhängig vom Gesundheitszustand ermittelten hingegen Riley et al. (1991) (38 %), Borriello et al. (1983) (30 %) und Weber et al. (1989) (6,7–9 %). Weese et al. (2001) detektierten bei zwei Katzen mit Durchfallerkrankungen die Toxine A und B von *C. difficile* im Kot. Dennoch scheint die Bedeutung von *C. difficile* im Zusammenhang mit Durchfallerkrankungen bei der Katze bislang noch unklar (Weese et al., 2001; Clooten et al., 2008; Weese, 2011).

Ebenso ist die klinische Relevanz von *C. perfringens* für die Entstehung von Durchfallerkrankungen bei der Katze nicht abschließend geklärt (Marks et al., 2011). So wurde einerseits das Enterotoxin von *C. perfringens* bei Katzen mit Durchfallerkrankungen im Kot detektiert (Foley et al., 1996). Eine andere Studie zeigte hingegen, dass ähnlich hohe Prävalenzen von *C. perfringens* im Kot von Katzen mit (41 %) und ohne Durchfallerkrankungen (39 %) vorzufinden sind (Hill et al., 2000). Auch Suchodolski et al. (2015) konnten keine Unterschiede im Vorkommen von *C. perfringens* im Kot von gesunden Katzen und Katzen mit Durchfallerkrankungen feststellen. Queen et al. (2012) ermittelten für *C. perfringens* eine Prävalenz von 43 % im Kot von Katzen mit Durchfallerkrankungen. Das Enterotoxin von *C. perfringens* wurde bei 4,1 % der an Durchfall erkrankten Katzen im Kot nachgewiesen, wohingegen bei gesunden Tieren lediglich eine Prävalenz von 1,6 % vorlag (Queen et al., 2012).

*E. coli* ist ein im Darm kommensalisch vorkommendes Bakterium, welches jedoch auch ein relevanter Infektionserreger sein kann (Nataro und Kaper, 1998; Wieler und Ewers, 2011). Neben extraintestinal pathogenen Stämmen existieren darmpathogene Stämme (Wieler und Ewers, 2011), welche in enteropathogene (EPEC), enterotoxische (ETEC), enteroinvasive (EIEC), Shigatoxin-bildende (STEC), enteroaggregative (EaggEC) sowie diffus-adhärente (DAEC) *E. coli* unterteilt werden (Beutin, 1999; Puño-Sarmiento et al., 2013).

Bislang liegen wenige Studien über die Bedeutung von *E. coli* für die Entwicklung von Gastrointestinalerkrankungen bei der Katze vor, sodass die klinische Relevanz bei dieser Tierart nicht abschließend geklärt ist (Beutin, 1999). Jedoch ist die Katze als Reservoir für humanpathogene *E. coli* mitunter von Bedeutung (Krause et al., 2005; Morato et al., 2009; Puño-Sarmiento et al., 2013). Krause et al. (2005) wiesen im Kot von gesunden Katzen sogenannte „*attaching and effacing*“ *E. coli* (AEEC) mit einer Prävalenz von 6,5 % nach. AEEC besitzen das *eae*-Gen, welches auch bei EPEC sowie bei enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC; Untergruppe der STEC) vorhanden ist (Nataro und Kaper, 1998). Zudem konnte gezeigt werden, dass im Kot von Katzen, unabhängig des Vorliegens von Gastrointestinalerkrankungen, in 4,7 % der Fälle EPEC-Stämme nachweisbar waren, jedoch keine ETEC-Stämme (Morato et al., 2009). Puño-Sarmiento et al. (2013) konnten ebenfalls EPEC-Isolate im Kot von Katzen ohne (2,5 %) und mit Durchfallerkrankungen (1,2 %) detektieren.

## 2.4 Untersuchungen zu ausgewählten bakteriellen Metaboliten bei der Katze und anderen Tierarten

Die Zusammensetzung und metabolische Aktivität der gastrointestinalen Mikrobiota sind für die Tiergesundheit von großer Bedeutung (Tun et al., 2012). So wird durch das Vorkommen bestimmter Bakterienspezies sowie über die Freisetzung von mikrobiellen Stoffwechselprodukten die Pathogenabwehr, die Entwicklung des Immunsystems, die Darmgesundheit (Fung et al., 2012) sowie die Nährstoffversorgung des Wirtsorganismus beeinflusst (Inness et al., 2007; Bell et al., 2008; Janeczko et al., 2008; Xenoulis et al., 2008; Suchodolski et al., 2010; Suchodolski, 2011a). In diesem Zusammenhang wurde sowohl beim Menschen als auch bei Hunden und Katzen beschrieben, dass nutritive Faktoren sowie verschiedene gastrointestinale und extragastrointestinale Erkrankungen nicht nur Auswirkungen auf die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota haben (Cani et al., 2008; DiBaise et al., 2008; Turnbaugh et al., 2009; Ley, 2010; DuPont, 2011; Esteve et al., 2011; Flint, 2011; Chen et al., 2012; Kallus und Brandt, 2012; da Silva et al., 2013; Fujimoto et al., 2013; Galecka et al., 2013; Handl et al., 2013; Caricilli und Saad, 2014; Moran und Shanahan, 2014; Rochus et al., 2014; Aw und Fukuda, 2015; Park et al., 2015; Suchodolski, 2016), sondern auch die Stoffwechselaktivität der jeweiligen Bakterienspezies beeinflussen können (Terada et al., 1993; Suchodolski, 2011a; 2016; Rochus et al., 2013; 2014; Honneffer et al., 2014; Aw und Fukuda, 2015; Flint et al., 2015; Guard et al., 2015; Suchodolski et al., 2015; Zhang et al., 2015). Im Folgenden wird auf die Bedeutung einiger ausgewählter mikrobieller Metaboliten für den Organismus von Mensch und Tier eingegangen.

Kurzkettige Fettsäuren, zu denen unter anderem Azetat, Propionat und Butyrat gehören (Bugaut, 1987), dienen dem Darmepithel als Energielieferanten (Roediger, 1980; Cummings, 1995; Fung et al., 2012) oder werden im Darm absorbiert und in der Leber verstoffwechselt (Cummings et al., 1987; Russell et al., 2013). Zudem sind Azetat und Butyrat auch für die Abwehr von Pathogenen bedeutsam (Maslowski et al., 2009; Fukuda et al., 2011). Neben der Hemmung inflammatorischer Prozesse (Maslowski et al., 2009; Fung et al., 2012) wird schließlich die mögliche Bedeutung der kurzkettigen Fettsäuren als Inhibitoren bei der Entstehung von malignen, tumorösen Prozessen, insbesondere beim Menschen, diskutiert (Hinnebusch et al., 2002; Bindels et al., 2012; Fung et al., 2012). *In vitro*-Studien konnten zeigen, dass durch Butyrat die Apoptose von humanen Wirtszellen mit geschädigtem Genom eingeleitet und somit einer malignen Entartung dieser Zellen entgegengesteuert wird (Hinnebusch et al., 2002; Fung et al., 2012). Während die im Darm vorkommenden n-Butyrat-produzierenden Bakterien beim Menschen vor allem den Clostridien Clustern IV und XIVa angehören (Louis und Flint, 2009; Levine et al., 2013), wurden beim Schwein in diesem

Zusammenhang auch Vertreter der Clostridien Cluster XIII, IX und XI identifiziert (Levine et al., 2013). Daneben können einige Bakterien der Gruppe der *Firmicutes* Laktat als Substrat verwenden und daraus Butyrat bilden (Flint et al., 2015). Duncan et al. (2004) identifizierten hier unter anderem Bakterien, die verwandt sind mit *Eubacterium halii* und *Anaerostipes caccae*. Laktat kann beispielsweise von Laktobazillen und Bifidobakterien gebildet werden (Flint et al., 2015).

Neben den geschilderten potenziell positiven Effekten mikrobieller Metaboliten, gibt es auch bakterielle Stoffwechselprodukte, die den Organismus negativ beeinflussen können. So besitzt Ammoniak zytotoxische Wirkungen (Lin und Visek, 1991; Roediger et al., 1997). Schwefelwasserstoff kann beispielsweise die Epithelbarriere in der Mundschleimhaut schädigen (Ng und Tonzetich, 1984; Pitcher und Cummings, 1996) und spielt vermutlich eine Rolle bei ulzerativen Darmentzündungen (Pitcher und Cummings, 1996; Roediger et al., 1997). Polyamine, wie z. B. Spermidin, Putrescin oder Spermin, bzw. ihre Abbauprodukte sind einerseits wichtig für den Zellstoffwechsel (Pegg, 2013), auf der anderen Seite wurden jedoch auch toxische Effekte von Spermidin und Spermin nach Applikation bei Tieren beschrieben (Rosenthal et al., 1952; Tabor und Rosenthal, 1956). So wurden nach einmaliger intraperitonealer Applikation von Spermin respiratorische Symptome sowie eine Nierenschädigung bei Mäusen und Ratten beobachtet, während eine dreimalige intraperitoneale Applikation von Spermidin eine Proteinurie bei den Tieren verursachte (Rosenthal et al., 1952; Tabor und Rosenthal, 1956).

Indol entsteht durch den mikrobiellen Abbau von Tryptophan und wird zum Beispiel in der Leber zu Indikan (*Syn.* Indoxylsulfat) metabolisiert (Wikoff et al., 2009). Dieses wird über die Nieren ausgeschieden und kann sich bei Patienten mit einer chronischen Nierenerkrankung im Blut anreichern (Deguchi et al., 2002; Wikoff et al., 2009). Indikan gilt zudem als nephrotoxisch (Deguchi et al., 2002; Wikoff et al., 2009). Kynurensäure ist ebenfalls ein Metabolit von Tryptophan (Turski et al., 2013). Es konnte gezeigt werden, dass im Blut von nierenkranken Patienten hohe Kynurensäure- sowie geringe Tryptophankonzentrationen vorliegen (Saito et al., 2000; Pawlak et al., 2009a; b), sodass ein verändertes Plasmaverhältnis von Kynurensäure zu Tryptophan in der Humanmedizin als Indikator für eine Nierenerkrankung gilt (Zhao, 2013). Bei Ratten mit experimentell induzierter Kolitis konnten nach intravenöser Applikation von Kynurensäure reduzierte Entzündungsparameter sowie eine geringere Darmmotilität festgestellt werden (Varga et al., 2010).

Bislang sind die mikrobiellen Metaboliten bei Katzen noch nicht ausreichend erforscht, um fundierte Aussagen über Funktion, Wirkung oder Toxizität bei dieser Tierart treffen zu können. In einer Studie von Tun et al. (2012) wurde das fäkale mikrobielle Stoffwechselprofil von Katzen auf genomischer Ebene untersucht. Hierbei ergab sich unter anderem für Gensequenzen des mikrobiellen Proteinstoffwechsels ein Anteil von knapp 9 % am fäkalen

Metagenom der Katze, während die Gensequenzen des mikrobiellen Kohlenhydratstoffwechsels etwa 13 % ausmachten (Tun et al., 2012). Diese Ergebnisse sind in etwa mit dem von Swanson et al. (2011) beschriebenen mikrobiellen Stoffwechselprofil des fäkalen Metagenoms von Hunden vergleichbar (Tun et al., 2012).

## **2.5 Einfluss der Fütterung auf die bakterielle Gemeinschaft im Darm von Katzen**

Die Fütterung kann Einfluss auf die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota von Katzen nehmen. So konnte gezeigt werden, dass der Einsatz eines Trockenfutters im Vergleich zu einem Feuchtfutter zu einer geringeren bakteriellen Diversität, geringeren Anteilen an *Bacteroides* und *Blautia* sowie zu höheren Anteilen an *Lactobacillus*, *Megasphaera* und *Olsenella* in Kotproben von Katzen geführt hat (Bermingham et al., 2013b). In diesem Zusammenhang ist neben der Futterkonfektionierung allerdings auch die differierende Zusammensetzung der Diäten zu berücksichtigen. Daneben haben experimentelle Studien vornehmlich den Einfluss von präbiotisch wirksamen Faserstoffen sowie variierender Proteingehalte im Futter auf die gastrointestinale Mikrobiota von Katzen untersucht.

### **2.5.1 Einfluss präbiotisch wirksamer Faserstoffe im Futter auf die gastrointestinale Mikrobiota von Katzen**

Definiert wird ein Präbiotikum als ein „*unverdaulicher Nahrungsbestandteil, welcher einen positiven Einfluss auf den Wirt ausübt, indem er selektiv das Wachstum und/oder die Aktivität einer oder mehrerer ausgewählter Bakterienart(en) im Dickdarm fördert und somit zu einer Verbesserung der Gesundheit des Wirts beiträgt*“ (Gibson und Roberfroid, 1995). Als Präbiotika gelten insbesondere Fruktooligosaccharide, zu welchen Oligofruktose und Inulin gezählt werden (Gibson und Roberfroid, 1995). Daneben besitzen weitere Substanzen präbiotische Eigenschaften, wie Laktulose oder Galaktooligosaccharide (Díez-Municio et al., 2014).

Sparkes et al. (1998a) konnten keine Unterschiede in der Zusammensetzung der Mikrobiota des Dünndarms von Katzen feststellen, wenn diese eine Diät ohne oder mit Zusatz von 0,75 % Fruktooligosacchariden erhielten. Im Gegensatz dazu konnten Kanakupt et al. (2011) bei Zugabe von 0,5 % Fruktooligosacchariden bzw. 0,5 % Galaktooligosacchariden sowie bei dem Zusatz beider Substanzen zu je 0,5 % zu einem Futter einen Anstieg von Bifidobakterien im Kot von Katzen aufzeigen. In einer weiteren Studie hat die Gabe von Fruktooligosacchariden (4 %) zu einem Futter im Vergleich zu Diäten mit 4 % Zellulose bzw. 4 % Pektin ebenfalls zu höheren Zahlen an Bifidobakterien im Kot von Katzen geführt (Barry

et al., 2010). Dagegen konnten bei dem Einsatz von Pektin höhere Zahlen an *C. perfringens*, *E. coli* sowie Laktobazillen im Kot der Tiere festgestellt werden (Barry et al., 2010). Während die Autoren in dieser Studie qPCRs als Nachweismethode einsetzten (Barry et al., 2010), haben sie in einer weiteren Arbeit den Einfluss der gleichen Futtermittel auf die fäkale Mikrobiota von Katzen mittels 454-Pyrosequenzierung untersucht (Barry et al., 2012). Hierbei konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von 4 % Pektin zu einem Futter zu einem Anstieg der *Firmicutes* im Kot der Katzen geführt hat (Barry et al., 2012). Dagegen wurde bei dem Einsatz von Fruktooligosacchariden ein vermehrtes Vorkommen von *Actinobacteria* im Kot der Tiere beobachtet (Barry et al., 2012). Während in diesen Untersuchungen junge Katzen von durchschnittlich 1,7 Jahren eingesetzt wurden, hat eine weitere Studie den Einfluss von 1 % Oligofruktose bzw. von einer 1 %-igen Kombination aus Oligofruktose, Inulin und Chicoreé im Futter auf die fäkale Mikrobiota von älteren Katzen ( $\geq 9$  Jahre) untersucht (Barry et al., 2014). Hierbei konnte kein Einfluss auf die Zahl von *C. perfringens* und Laktobazillen festgestellt werden, jedoch führte die Kombination aus Oligofruktose, Inulin und Chicoreé zu einer Abnahme an Bifidobakterien im Kot der Tiere (Barry et al., 2014).

In einer Studie von Terada et al. (1993) führte die Zugabe von Lactosucrose zu einem Futter zu einer Abnahme an *Fusobacteria*, *Enterobacteriaceae*, *C. perfringens* und *Staphylococcus* sowie zu höheren Zahlen an *Bacteroides* und *Lactobacillus* im Kot von Katzen.

### **2.5.2 Einfluss des Proteingehalts im Futter auf die gastrointestinale Mikrobiota von Katzen**

Erste Studien haben bereits einen möglichen Einfluss des Proteingehalts im Futter auf die fäkale Mikrobiota von gesunden Katzen untersucht. So wiesen Herter und Kendall (1910) in einer sehr frühen Untersuchung im Kot von Katzen bei Einsatz einer proteinreichen Diät eine vorwiegend proteolytische Bakteriengemeinschaft nach. Des Weiteren stellte Smith (1965) im Dickdarm von Katzen und Hunden höhere Zahlen an *C. perfringens* im Vergleich zu anderen Tierarten fest und verwies in diesem Zusammenhang, insbesondere bei der Katze, auf eine proteinreichere Fütterung. In aktuellen Untersuchungen führte eine hohe Proteinaufnahme (52,9 % Rohprotein (Rp) in der Trockensubstanz (TS)) im Vergleich zu einer eher moderaten Proteinaufnahme (34,3 % Rp in der TS) ebenfalls zu höheren Gehalten an *C. perfringens* (12,39 vs. 10,83 log<sub>10</sub> KbE/g) sowie zu geringeren Gehalten an *Bifidobacterium* spp. (5,63 vs. 9,44 log<sub>10</sub> KbE/g) im Kot von Katzen (Lubbs et al., 2009). In einer weiteren Studie derselben Arbeitsgruppe wurden diese Futtermittel auch an abgesetzte Katzenwelpen verfüttert und Kotproben der Tiere im Alter von 8, 12 und 16 Wochen mittels qPCR untersucht (Vester et al., 2009). Hier konnten, unabhängig von dem Alter der Katzen, ebenfalls geringere Zahlen an *Bifidobacterium* sowie zusätzlich an *E. coli* und *Lactobacillus*

im Kot bei Einsatz des proteinreichen Futters festgestellt werden (Vester et al., 2009). Die Zahlen von *C. perfringens* im Kot wurden durch die Fütterung hingegen nicht beeinflusst (Vester et al., 2009). Hooda et al. (2013) nutzten die 454-Pyrosequenzierung, um ebenfalls Kotproben von Katzenwelpen im Alter von 8, 12 und 16 Wochen zu untersuchen. In dieser Studie wurden die gleichen Futtermittel wie bei Lubbs et al. (2009) und Vester et al. (2009) eingesetzt. Die Diversitätsanalyse ergab keine Unterschiede zwischen den Fütterungs- oder Altersgruppen (Hooda et al., 2013). Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Fütterung der proteinreichen Diät zu geringeren Anteilen an *Actinobacteria*, *Dialister*, *Catenibacterium*, *Acidaminococcus*, *Olsenella*, *Bifidobacterium*, *Megasphaera* und *Mitsuokella* sowie zu höheren Anteilen an *Proteobacteria*, *Clostridium*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Blautia*, *Eubacterium*, *Collinsella* und *Fusobacterium* im Kot geführt hat, unabhängig von dem Alter der Katzen (Hooda et al., 2013). Bei Einsatz des Futters mit dem eher moderaten Proteingehalt konnten im Kot von 8 Wochen alten Katzen höhere Werte für die Gruppe der *Firmicutes* als bei den Katzen derselben Fütterungsgruppe im Alter von 12 und 16 Wochen beobachtet werden (Hooda et al., 2013). Ebenso wurde bei diesen Tieren mit zunehmendem Alter ein Anstieg an *Bifidobacterium* im Kot detektiert (Hooda et al., 2013).

Die Katzenkotproben aus der Studie von Hooda et al. (2013) wurden zudem von Deusch et al. (2014) mittels Illumina®-Sequenzierung untersucht. Hierbei konnten sehr viel höhere Anteile von *Bacteroidetes* (17–36 %) als in der Untersuchung von Hooda et al. (2013) (0,16–0,65 %) ermittelt werden (Deusch et al., 2014). Dieses Ergebnis könnte nach Meinung der Autoren möglicherweise dem nicht optimalen Primer für *Bacteroidetes* in der Untersuchung von Hooda et al. (2013) geschuldet sein (Deusch et al., 2014).

Neben diesen *in vivo*-Studien wurde auch eine *in vitro*-Studie zum Einfluss des Proteingehalts im Futter auf die fäkale Mikrobiota von Katzen durchgeführt (Pinna et al., 2014). Hierfür wurden Sammelkotproben von Katzen mit *in vitro* vorverdauten Futtermitteln, welche einen geringen (135 g/kg) und einen hohen Proteingehalt (311 g/kg) aufwiesen, inkubiert (Pinna et al., 2014). Ein hoher Proteingehalt im Futter führte zu höheren Konzentrationen an Ammonium und biogenen Aminen in den Kotproben, geringeren Konzentrationen an kurzkettigen Fettsäuren, höheren Keimzahlen von *C. perfringens* (6,48 vs. 5,76 log<sub>10</sub> Zellen/ml) sowie einer geringeren Zahl an *Lactobacillus spp.* (3,51 vs. 4,22 log<sub>10</sub> Zellen/ml) und Enterokokken (Summe aus *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium*; 6,75 vs. 7,35 log<sub>10</sub> Zellen/ml) (Pinna et al., 2014).

### 2.5.3 Einfluss der Proteinqualität im Futter auf die gastrointestinale Mikrobiota von Katzen

In Abhängigkeit von der Verdaulichkeit der eingesetzten Proteinquellen im Futter gelangen variierende Konzentrationen an unverdaulichem Eiweiß in den Dickdarm und stehen dort den peptidolytischen Bakterien zur Fermentation zur Verfügung (Zentek, 1995a; b; Lubbs et al., 2009). Ein vermehrter Nährstoffeinfluss in den Dickdarm kann auf diese Weise Dysbiosen begünstigen und zu Verdauungsproblemen (Kamphues et al., 2014; Zentek, 2016) sowie zu einer Belastung des Organismus mit schädlichen mikrobiellen Stoffwechselprodukten (z. B. Ammoniak) führen (Lubbs et al., 2009). Inwiefern die Eiweißqualität im Futter einen Einfluss auf die Zusammensetzung sowie auf die Stoffwechselaktivität der intestinalen Mikrobiota bei Katzen ausübt, wurde bislang nur unzureichend untersucht. Bei Hunden führten Diäten auf Basis von Griebsmehl im Vergleich zu Diäten auf Basis von Soja oder Maiskleber zu höheren Zahlen an *C. perfringens* in der ilealen Digesta (8,7 vs. 7,1–7,2 log<sub>10</sub> Zellen/g) vs. 7,0 log<sub>10</sub> Zellen/g) (Zentek, 1995b). Ebenso konnten höhere Zahlen an *C. perfringens* im Kot von Hunden nach der Fütterung einer protein- und bindewebsreichen Diät, basierend auf Griebsmehl und Rinderlunge, als bei dem Einsatz von Trockenfuttermitteln mit einem moderaten Proteingehalt detektiert werden (Zentek et al., 2003).

In einer Studie von Kerr et al. (2014a) wurde die fäkale Mikrobiota von Katzen, die entweder ein kommerzielles Trockenfuttermittel auf Basis von Hühnerfleisch oder rohe Hühnerküken erhielten, miteinander verglichen. Die Analyse mittels 454-Pyrosequenzierung ergab, dass in den Kotproben der Katzen beider Fütterungsgruppen der Anteil der *Firmicutes* mit 62–88 % am größten war (Kerr et al., 2014a). Daneben wurde der Stamm der *Bacteroidetes* bei Einsatz des Trockenfutters (1,6 %) häufiger nachgewiesen als bei der Rohfütterung (0,2 %) (Kerr et al., 2014a). Bei Fütterung der Hühnerküken wurden höhere Anteile der Genera *Pseudobutyrvibrio* (4,0 vs. 1,0 %), *Peptococcus* (9,2 vs. 3,2 %) und nicht weiter identifizierter *Lachnospiraceae* (15,2 vs. 5,3 %) sowie geringere Anteile an *Succinivibrio* (< 0,1 vs. 1,2 %) und *Faecalibacterium* (0,2 vs. 1,0 %) als bei dem Einsatz des Trockenfutters detektiert (Kerr et al., 2014a).

Vor dem Hintergrund der einerseits geringen Datenlage und andererseits gegebenen praktischen Relevanz variierender Proteinkonzentrationen und -qualitäten in Katzenfuttermitteln sollte ein möglicher Einfluss der Proteinbereitstellung auf die Zusammensetzung und Aktivität der fäkalen Mikrobiota bei Katzen mit der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Versuchsaufbau

Der zugrundeliegende Tierversuch wurde durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo, Berlin G 0138/12) genehmigt. Die Versuchsplanung der vorliegenden Studie sowie die Durchführung des Fütterungsversuchs erfolgten durch das Institut für Tierernährung (Paßlack et al., 2017; 2018). Insgesamt wurden bei zehn adulten und klinisch gesunden Katzen der Rasse Europäisch Kurzhaar (Tabelle 4) sechs verschiedene Versuchsfuttermittel mit einem variierenden Eiweißgehalt und einer unterschiedlichen Eiweißqualität eingesetzt (Tabelle 5). Eine geringere Eiweißqualität wurde durch den Einsatz bindegewebsreicher Rohmaterialien erzielt und der Gehalt der Aminosäure Hydroxyprolin hierbei als quantitativer Parameter zur Evaluierung der Eiweißqualität (Colgrave et al., 2012; Messia und Marconi, 2012) in den Versuchsfuttermitteln herangezogen. Jedes Versuchsfuttermittel wurde insgesamt über einen Zeitraum von sechs Wochen verfüttert, welcher sich jeweils in eine 31-tägige Adaptationsphase und zweimal viertägige Stoffwechselphasen aufteilte. Zwischen den beiden viertägigen Stoffwechselphasen lag jeweils eine Ruhephase von drei Tagen. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kotproben wurden jeweils an den Tagen 41–42 einer Fütterungsperiode gesammelt und bis zur weiteren Analytik bei -80 °C gelagert. Der Tag der Kotsammlung richtete sich hierbei nach dem Kotabsatzverhalten der Tiere. Die Katzen wurden während der Adaptations- und Ruhephasen in Gruppen sowie während der Stoffwechselphasen einzeln in Stoffwechselkäfigen gehalten, um die individuellen Kotproben auffangen zu können. Von diesen Stoffwechselkäfigen hatten acht die Maße von 83 cm × 76,5 cm × 77 cm (Breite × Höhe × Tiefe) und zwei die Maße von 102 cm × 98 cm × 77 cm (Breite × Höhe × Tiefe). Diese enthielten spezielle Katzenthoiletten mit den Maßen 35,5 cm × 46,5 cm (Breite × Tiefe), welche mit einem Harnsammelbehälter verbunden waren, um eine Trennung von Harn und Kot zu gewährleisten.

Die Raumtemperatur in der Katzenhaltung betrug durchschnittlich 21 °C, das Lichtregime wurde auf einen jeweils 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus eingestellt. Um einen möglichen Einfluss von weiteren Umweltfaktoren auf die Untersuchungsparameter auszuschließen, wurde für die vorliegende Fütterungsstudie ein randomisiertes Cross-over-Design im Sinne eines lateinischen Quadrats gewählt (Tabelle 6).

Die Katzen wurden während des gesamten Versuchszeitraums einzeln gefüttert, wobei jeder Katze eine individuelle Futtermenge, berechnet nach den Empfehlungen des NRC (2006), zugeteilt wurde. Die Futterraufnahme wurde täglich durch Rückwaage protokolliert. Wasser

stand den Katzen jederzeit zur freien Verfügung. Die Körpermasse der Tiere wurde einmal wöchentlich ermittelt.

Tabelle 4: In der vorliegenden Studie eingesetzte Versuchstiere

<b>Katze</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>kastriert</b>	<b>Alter in Monaten zu Versuchsbeginn</b>	<b>Körpermasse zu Versuchsbeginn (in kg)</b>
1	männlich	Ja	86	6,37
2	weiblich	Nein	87	3,72
3	männlich	Ja	98	4,82
4	weiblich	Nein	59	3,51
5	männlich	Ja	87	4,67
6	weiblich	Nein	59	3,30
7	männlich	Ja	87	4,89
8	weiblich	Nein	87	3,11
9	männlich	Ja	110	4,43
10	weiblich	Nein	59	2,26
11 <sup>1</sup>	weiblich	Nein	42	3,86

<sup>1</sup>Ersatztier für Katze Nr. 3

Tabelle 5: Proteinkonzentration und -qualität der verwendeten Versuchsfuttermittel

<b>Versuchsfuttermittel</b>	<b>Rohprotein (g/kg TS)</b>	<b>Hydroxyprolinegehalt (g/kg TS)</b>	<b>Proteinqualität</b>
A	367	3,76	Gering
B	450	8,45	
C	561	9,44	
D	362	2,56	Hoch
E	433	3,76	
F	549	4,45	

Tabelle 6: Studiendesign der vorliegenden Studie

Durchgang	Versuchsfuttermittel					
	A	B	C	D	E	F
1	Tier 1+2	Tier 3+4	Tier 5+6	Tier 7+8	Tier 9	Tier 10
2	Tier 10	Tier 1	Tier 2+3	Tier 4+5	Tier 6+7	Tier 8+9
3	Tier 6+9	Tier 8+10	Tier 1	Tier 3	Tier 2+5	Tier 4+7
4	Tier 7	Tier 2+9	Tier 4+10	Tier 1+6	Tier 3+8	Tier 5
5	Tier 5+8	Tier 7	Tier 9	Tier 2+10	Tier 1+4	Tier 3+6
6	Tier 3+4	Tier 5+6	Tier 7+8	Tier 9	Tier 10	Tier 1+2

### 3.2 Futtermitteluntersuchung

Die Futtermittelanalyse erfolgte am Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin (Paßlack et al., 2017; 2018). Der Gehalt an Rohnährstoffen und Mineralstoffen in den Versuchsfuttermitteln erfolgte, entsprechend den amtlichen Methoden der VDLUFA (Naumann et al., 2012), separat für jedes Versuchsfuttermittel sowie anhand von Doppelbestimmungen. Im Anhang A 1 werden alle für die Weender Analyse verwendeten Geräte und Chemikalien aufgeführt. Des Weiteren sind alle Geräte und Chemikalien, die für die Bestimmung der Mineralstoffkonzentrationen in den Versuchsdiäten verwendet wurden, in Anhang A 2 zu finden. Die Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen in den Versuchsfuttermitteln erfolgte mittels eines ionenaustauscherchromatografischen Verfahrens (Paßlack et al., 2017; 2018).

### 3.3 Probenaufbereitung

#### 3.3.1 Chemisch-analytische Methoden

Die Bestimmung der Trockensubstanz sowie des Gehalts an Rohprotein in den Kotproben erfolgte durch das Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin (Paßlack et al., 2018) anhand der Methoden zur Futtermitteluntersuchung (Naumann et al., 2012).

##### 3.3.1.1 Berechnung der scheinbaren Rohproteinverdaulichkeit

Die Ermittlung der scheinbaren Rohproteinverdaulichkeit (sV Rp) erfolgte anhand einer quantitativen Erfassung des Rohproteingehalts im Futter und Kot (Kamphues et al., 2014).

Hierfür ergab sich folgende Formel (Kamphues et al., 2014):

$$1. \quad sV \text{ Rp (\%)} = \frac{\text{Rohproteinaufnahme} \left( \frac{\text{mg}}{\text{Tag}} \right) - \text{Rohproteinexkretion} \left( \frac{\text{mg}}{\text{Tag}} \right)}{\text{Rohproteinaufnahme} \left( \frac{\text{mg}}{\text{Tag}} \right)} \times 100$$

### 3.3.1.2 Messung der Ammoniumkonzentrationen im Kot

Der Ammoniumgehalt in den Kotproben wurde mit der Methode nach Berthelot bestimmt. Bei diesem Verfahren erfolgt ein quantitativer Nachweis von Ammonium, welches über mehrere Reaktionsschritte in einem alkalischen Milieu zum blaugefärbten Indolphenol reagiert. Die Bestimmung der Konzentration an Indolphenol kann im Anschluss mittels Photometrie bei einer Wellenlänge von 620 nm und unter Verwendung einer Standardreihe erfolgen.

Als Vorbereitung für die beschriebene photometrische Bestimmung der Ammoniumkonzentrationen wurde jeweils 500 mg einer Kotprobe mit 1 ml 3-N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS; 100 mM; pH 7,0) gemischt und nach einer 10-minütigen Inkubationszeit auf Eis bei 4 °C und 17.000 × g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in 2 ml-Eppendorfgefäße überführt und der pH-Wert der Extrakte mittels Salzsäure (HCL; 1 M) auf einen Wert unter 7 eingestellt. Die Probenextrakte wurden anschließend mit MOPS (100 mM; pH 7,0) 1:200 verdünnt. Ergänzend wurden Verdünnungen von 1:250 und 1:300 hergestellt, sofern die 1:200-Verdünnungen zu hohe Extinktionswerte aufwiesen. Zur Bestimmung der Extinktion wurden jeweils 20 µl einer probenspezifischen Verdünnungslösung zusammen mit 100 µl Phenolnitroprussid und 100 µl 0,2 %ige Natriumhypochloridlösung auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte aufgetragen und nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur bei einer Wellenlänge von 620 nm zweimal im Abstand von 5 Minuten gegen eine Standardreihe mit bekannten Ammoniumkonzentrationen gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels der i-control™ Microplate Reader Software 1.7. Dem Anhang A 3 sind die Geräte und Chemikalien, welche zur Bestimmung des Ammoniumgehalts in den Kotproben verwendet wurden, zu entnehmen.

### 3.3.1.3 Bestimmung biogener Amine im Kot

Die Messung der Konzentrationen an biogenen Aminen im Kot der Katzen erfolgte mittels Ionenchromatografie und einer nachfolgenden Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung durch das Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin. Für dieses Verfahren wurden ein Aminosäureanalysator sowie eine Polyamin-Ionenaustauschersäule eingesetzt. Für die Probenvorbereitung wurden jeweils 500 mg einer Kotprobe in 2 ml-Eppendorfgefäße eingewogen. Anschließend wurde zu der Probe 1 ml einer Extraktionslösung, bestehend aus wässriger Trichloressigsäure (10 %) und 0,2 % Thiodipropionsäure (interner Standard), gegeben. Darauf folgte eine Inkubationszeit von 30 Minuten auf einem Schüttler. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte eine Zentrifugation der Proben für 10 Minuten mit

13.000 × g. Der Überstand wurde mit der Extraktionslösung im Verhältnis 1:2 verdünnt und über einen Spritzenvorsatzfilter filtriert. Je Probe wurden 25 µl automatisch durch den Probengeber auf die Polyamin-Ionenaustauschersäule aufgebracht. Für die Elution wurde Citratpuffer (pH-Wert 6,45) verwendet. Die Reinigung der Säule erfolgte mit einer Natriumhydroxid-Lösung (0,4 mol/l NaOH). Eine Übersicht der Geräte und Reagenzien, welche für die Bestimmung der biogenen Amine im Kot der Katzen genutzt wurden, liefert Anhang A 4.

### **3.3.1.4 Analyse kurzkettiger Fettsäuren im Kot**

Die Konzentrationen an kurzkettigen Fettsäuren in den Kotproben der Katzen wurden gaschromatografisch durch das Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin ermittelt. Hierfür wurde zunächst zu je 300 mg einer Kotprobe 1 ml einer Verdünnungslösung (0,5 mM Capronsäure; interner Standard) gegeben. Nach einer 60-minütigen Inkubation auf einem Rüttler erfolgte eine Zentrifugation der Proben bei 14.800 × g und Raumtemperatur für 8 Minuten. Anschließend wurden zu jeweils 100 µl des Probenüberstands 900 µl der Verdünnungslösung gegeben. Die so aufbereiteten Proben wurden anschließend in einen Gaschromatografen überführt. Für die chromatografische Trennung der einzelnen Fettsäuren wurde die HP INNOWAX Säule verwendet. Das hierfür benötigte Trägergas (Wasserstoff) wurde über einen Gasgenerator erzeugt. Als Detektor diente ein Flammenionisationsdetektor. Mithilfe einer Injektionsspritze wurde 1 µl der jeweiligen Probe mit einer Flussrate von 30 ml pro Minute auf die Säule aufgetragen. Die Ermittlung der Konzentrationen an kurzkettigen Fettsäuren in den Proben erfolgte mittels der HP ChemStation Software und anhand einer Flächenintegration der einzelnen Peaks. Die Geräte und Reagenzien, welche zur Messung der kurzkettigen Fettsäuren im Kot der Katzen verwendet wurden, sind dem Anhang A 5 zu entnehmen.

### **3.3.1.5 Bestimmung der Konzentrationen von D- und L-Laktat im Kot**

Eine Übersicht über die Geräte und Reagenzien, welche zur Konzentrationsbestimmung von D- und L-Laktat im Kot der Katzen verwendet wurden, liefert der Anhang A 6. Die Analyse der Gehalte an D- und L-Laktat im Kot erfolgte durch das Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin. Zunächst wurde zu je 500 mg einer Probe 1 ml Kupfer-II-Sulfat-Lösung (0,5 mM) hinzugegeben, die Probe homogenisiert und für 10 Minuten auf einem Rüttler inkubiert. Im Anschluss wurden die Extrakte zunächst mit 100 µl Carrez-I-Lösung versetzt, gemischt und für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 100 µl Carrez-II-Lösung zu den Extrakten pipettiert, die Proben gemischt und erneut für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Extrakte für 10 Minuten bei 14.000 × g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Cellulose-Acetat-

Spritzenvorsatzfilter (0,45 µm) filtriert. In diesen Extrakten konnten anschließend die Konzentrationen an D- und L-Laktat mittels Hochdruckflüssigkeitschromatografie (HPLC) gemessen werden. Hierfür wurde der HPLC Agilent 1100, bestehend aus einer Vorsäule und einer chiralen Hauptsäule (Säulenofentemperatur 35 °C), eingesetzt. Die Flussrate der Kupfer-II-Sulfat-Lösungen (2,5 mM und 0,5 mM; Elutionsmittel) durch die Säule betrug 1 ml pro Minute. Über einen UV-Detektor wurde jede Probe bei einer Wellenlänge von 253 nm und über einen Zeitraum von 24 Minuten gemessen. Die Datenauswertung erfolgte mithilfe der Chromeleon®-Software.

### **3.3.2 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.3.2.1 Extraktion bakterieller DNA aus den Kotproben**

Für die Extraktion bakterieller DNA aus den Kotproben der Katzen wurde das QIAamp® DNA Stool Mini Kit verwendet. Hierfür wurden je 200 mg Kot in FastPrep24 Lysing Matrix E-Röhrchen eingewogen und mit 1 ml ASL-Puffer gemischt. Die Röhrchen wurden anschließend siebenmal für je 30 Sekunden mit dem FastPrep-24 5 G mit einer Beschleunigung von 6 m/s pro Sekunde homogenisiert. Die weitere Aufarbeitung der Proben wurde laut Herstellerangaben (QIAGEN®, 2012) durchgeführt. Abweichend hiervon wurde lediglich die Lysetemperatur von 70 °C auf 90 °C erhöht. Hierdurch wird das Lyseergebnis von grampositiven Bakterien verbessert (Vodde, 2014). Nach der erfolgten Extraktion von bakterieller DNA aus den Kotproben der Katzen lag eine sichtbare Trübung der DNA-Extrakte vor. Dies ließ vermuten, dass die in den Extrakten verbliebenen Substanzen als Inhibitoren bei den folgenden PCRs fungieren könnten. Aus diesem Grund wurden im Laufe der vorliegenden Studie die DNA-Extrakte weiteren Aufbereitungsprozessen (siehe 3.3.2.5) unterzogen. Die DNA-Extrakte wurden bis zur weiteren Analytik bei -30 °C gelagert. Eine Auflistung der für den beschriebenen Extraktionsschritt verwendeten Geräte und Materialien findet sich in Anhang A 7.

#### **3.3.2.2 DNA-Konzentrationsbestimmung in den Kotproben**

Zur Bestimmung des Gesamtgehalts an DNA in den Kotproben wurde das NanoDrop™ 3300 Fluorospektrometer verwendet. Das Protokoll wurde laut Herstellerangaben durchgeführt (Thermo Scientific, 2010). Hierfür wurde zunächst aus den DNA-Probenextrakten mit Nuklease-freiem Wasser (siehe Anhang A 8) eine 1:10-Verdünnung hergestellt. Für die Kalibrierreihe wurde Kalbsthymus-DNA genutzt, welche folgende DNA-Konzentrationen aufwies: 1500 ng/ml, 1000 ng/ml, 750 ng/ml, 500 ng/ml, 250 ng/ml, 100 ng/ml und 75 ng/ml. Als Negativkontrolle mit einem Wert von 0 ng/ml wurde TNE-Puffer (einfach konzentriert (1 ×)) verwendet. Nachdem je 5 µl Probenlösung mit 5 µl Arbeitslösung für mindestens

5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden, erfolgte die Messung der jeweiligen Probe. Hierfür wurden jeweils 2 µl dieser 1:2-Verdünnung aus Proben- und Arbeitslösung auf die Plattform des Nano-Drop™-Geräts gegeben und dreimal gemessen. Dieser Vorgang wurde für jede Probe insgesamt dreimal durchgeführt, um ein möglichst genaues Ergebnis zu erhalten. Gegebenenfalls musste bei einer sehr hohen gemessenen DNA-Konzentration die Probenlösung zunächst mit TNE-Puffer (1 ×) vorverdünnt (1:25 bzw. 1:50), dann mit der Arbeitslösung 1:2 versetzt und anschließend erneut gemessen werden. Die Reinigung der Plattform erfolgte vor den Messungen mit 2–5 µl Nuklease-freiem Wasser sowie zwischen den Messungen der einzelnen Proben mit TNE-Puffer (1 ×). Anhand der Ergebnisse erfolgte eine äquimolare Einstellung der DNA-Gehalte der 1:10 verdünnten DNA-Probenextrakte mit Nuklease-freiem Wasser auf einen Gehalt von 3,6 µg DNA/ml in jeder Probe. Dieser Gehalt stellte die geringste ermittelte Konzentration an DNA in einer Probe dar, sodass alle übrigen Proben ebenfalls auf diesen Gehalt eingestellt wurden. Durchschnittlich enthielten die Kotproben der Katzen (n = 60)  $10,1 \pm 0,85$  µg bakterielle DNA/g FS (arithmetischer Mittelwert (Mw) ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM)). Eine Übersicht zu den für die DNA-Konzentrationsbestimmung benötigten Geräten und Reagenzien findet sich in Anhang A 8.

### **3.3.2.3 Quantitative Real-Time Test-PCR auf Inhibitoren in den DNA-Extrakten**

Aufgrund der sichtbaren Trübung in den DNA-Extrakten (3.3.2.1) wurde eine quantitative Real-Time Test-PCR (Test-qPCR) durchgeführt. Dies ermöglichte eine Untersuchung der DNA-Extrakte auf mögliche PCR-Inhibitoren. Das Prinzip einer qPCR ist der quantitative Nachweis eines DNA-Abschnitts unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR®Green (Brilliant II SYBR® Green Low ROX QPCR Master Mix). Durch die Einlagerung dieses Farbstoffs in den synthetisierten DNA-Doppelstrang des nachzuweisenden DNA-Abschnitts, welcher mithilfe spezifischer Primer während der qPCR vervielfältigt wurde, kann ein Lichtsignal detektiert werden. Die Stärke dieses Lichtsignals korreliert positiv mit der enthaltenen Menge des nachzuweisenden DNA-Abschnitts der Probe, welcher spezifisch für eine Bakteriengruppe ist. Mithilfe von Kalibrierreihen der jeweiligen Bakteriengruppe, welche eine bekannte DNA-Konzentration sowie Kopienzahl dieser DNA aufweist, ist eine Ermittlung der Kopienzahl der entsprechenden Bakteriengruppe in den untersuchten DNA-Extrakten und somit pro Gramm Kot möglich. Diese PCR-Produkte wurden am Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin hergestellt. Eine Schmelzkurvenanalyse, welche im Temperaturprogramm der qPCR enthalten ist, diente dem Ziel der Überprüfung der entstandenen PCR-Produkte auf deren korrekte Größe im Vergleich zu programmierten Standardproben. Für die Durchführung der Test-PCR wurden die Proben unverdünnt sowie in den Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000, welche mit Nuklease-freiem Wasser (siehe Anhang A 9) hergestellt wurden, auf PCR-Inhibitoren untersucht. Als Kalibrierreihe wurde

das PCR-Produkt des *Clostridium (C.) coccooides*-Clusters XIVa mit einer bekannten DNA-Konzentration (6,32 ng/μl) und Kopienzahl ( $1,33 \times 10^{10}/\mu\text{l}$ ) in einer aufsteigenden Verdünnungsreihe ( $10^{-3}$ – $10^{-9}$ ) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente Nuklease-freies Wasser. Die Sequenzen der Primer, das Temperaturprogramm der Test-PCR sowie die für die qPCR benötigten Reagenzien sind in Anhang A 9 zu finden. Die Auswertung der Amplifikationskurven zeigte, dass eine Verdünnung der Original-DNA-Extrakte zu einer höheren mittleren Kopienzahl [ $\log_{10}/\text{g FS}$ ] in der Test-PCR führte. Anhand dieser Feststellung in Verbindung mit der sichtbaren Trübung der DNA-Extrakte ist die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren in den DNA-Extrakten höchstwahrscheinlich. Anhand der oben beschriebenen Steigerung der Effizienz der PCR unter Verwendung der 1:10-Verdünnung im Vergleich zu den unverdünnten DNA-Extrakten wurde für die Durchführung der quantitativen Real-Time PCR unter den bei 3.3.2.4 genannten Bedingungen die 1:10-Verdünnung ausgewählt.

#### **3.3.2.4 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)**

Die quantitative Bestimmung ausgewählter Bakteriengruppen im Kot der Katzen erfolgte anhand der qPCR unter Verwendung der äquimolar eingestellten DNA-Probenlösungen (3.3.2.2). Hierfür wurden Primer für folgende Bakteriengruppen verwendet: *Bacteroides/Prevotella/Porphyromonas*, *Bifidobacterium* spp., Clostridien Cluster I, *Clostridium (C.) leptum*-Cluster IV (Cluster nach Collins et al. (1994)), *C. coccooides*-Cluster XIVa, *Enterobacteriaceae*, *E. coli/Hafnia/Shigella*, *Lactobacillus* spp. und *Salmonella* spp.. Zudem wurden Primer für die Bakterienspezies *C. perfringens* und *C. difficile* verwendet. Nähere Informationen zu diesen Primern sind in Tabelle A 13 im Anhang A 10 zu finden. Die Primer wurden von der Firma Eurofins Genomics hergestellt. Als Farbstoff wurde der Brilliant II SYBR® Green Low ROX QPCR Master Mix verwendet. Je Probe wurden insgesamt 25 μl Realtime-PCR-Reaktionslösung hergestellt. Die verwendeten Geräte, die Berechnung der Formel für die Reaktionsansätze, die verwendeten Primer sowie das Temperaturprogramm für die qPCR finden sich in Anhang A 10.

Mithilfe von PCR-Produkten, welche eine bekannte DNA-Konzentration sowie Kopienzahl aufwiesen, wurden Kalibrierreihen inklusive einer Negativkontrolle aus Brilliant II SYBR® Green Low ROX QPCR Master Mix und Nuklease-freiem Wasser erstellt. Anschließend wurden die probenspezifischen Reaktionsansätze sowie die Ansätze der Kalibrierreihe zu je 25 μl in PCR-Strips pipettiert. Die Auswertungen der qPCRs wurden mit der MxPro QPCR Software durchgeführt. Die Software ermöglicht es, anhand des ct-Werts (cycle threshold = Beginn der Amplifikationskurve) einer jeden probenspezifischen Amplifikationskurve die Ausgangskonzentration an DNA der jeweiligen Bakteriengruppe in jeder Probe zu bestimmen. So wurde zunächst mithilfe der jeweiligen Kalibrierreihen der

PCR-Produkte die Kopienzahl der entsprechenden Bakteriengruppe pro 1 µl des verwendeten DNA-Extrakts ermittelt. Die Berechnung der Kopienzahl pro 1 Gramm Kot erfolgte dann anschließend mittels unten aufgeführter Formel. Unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren wurde die Kopienzahl pro 1 µl mit dem gesamten DNA-Gehalt der Probe multipliziert und anschließend durch die Probeneinwaage dividiert.

$$2. \text{ Kopienzahl pro g Kot} = \left[ \frac{P}{(D1 \times F1 \times F2)} \right] \times \frac{D2}{E}$$

$P$  = PCR-Ergebnis in Kopienzahl/µl

$D1$  = DNA-Gehalt der jeweiligen Probe, ermittelt durch DNA-Konzentrationsbestimmung, in ng/µl

$F1$  = Verdünnungsfaktor der ursprünglichen DNA-Probenextrakte (hier: 0,1)

$F2$  = Verdünnungsfaktor aufgrund der äquimolaren Einstellung der jeweiligen 1:10-Verdünnung der DNA-Probenextrakte

$D2$  = DNA-Gehalt des gesamten Probenextrakts

$E$  = Koteinwaage in g

Die Ergebnisse der ermittelten Kopienzahl einer Bakteriengruppe pro 1 Gramm Kot wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit anschließend logarithmiert.

### 3.3.2.5 Aufbereitung der DNA-Extrakte

Wie zuvor dargestellt, lag nach der erfolgten Extraktion (3.3.2.1) eine sichtbare Trübung der DNA-Extrakte vor. Zudem wurde anhand einer Test-PCR eine PCR-Inhibition beobachtet (3.3.2.3). Für die weitere molekularbiologische Analyse der DNA-Proben wurde jedoch eine möglichst reine DNA-Lösung benötigt, sodass die DNA-Extrakte einer weiteren Aufbereitung mithilfe des MOBIO® PowerSoil DNA Isolation Kits unterzogen wurden. Hierdurch sollten die verbliebenen Schwebstoffe (z.B. Rfa), welche eine PCR-Inhibition verursachen können, entfernt werden.

Hierfür wurden 180 µl des ursprünglichen DNA-Extrakts in ein PowerSoil-Röhrchen pipettiert, mit 60 µl der Lösung C1 vermischt und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte laut Herstellerangaben (MOBIO Laboratories Inc., 2014). Eine Auflistung der verwendeten Geräte und Materialien erfolgt im Anhang A 11.

### 3.3.2.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

Eine erneute Bestimmung des Gesamtgehalts an DNA in den aufbereiteten Proben erfolgte wie unter 3.3.2.2 beschrieben mittels des NanoDrop™ 3300 Fluorospektrometers von

Thermo Fisher Scientific (siehe Anhang A 8). Anhand dieser Ergebnisse erfolgte eine äquimolare Einstellung der DNA-Gehalte der aufbereiteten DNA-Probenextrakte mit Nuklease-freiem Wasser auf einen Gehalt von 0,5 µg DNA/ml in jeder Probe. Dieser DNA-Gehalt stellte die geringste ermittelte Konzentration an DNA in einer Probe dar, sodass alle übrigen Proben ebenfalls auf diesen DNA-Gehalt eingestellt wurden. Durchschnittlich enthielten die aufbereiteten DNA-Extrakte der Kotproben der Katzen (n = 60)  $5,68 \pm 0,76$  µg bakterielle DNA/g FS (arithmetischer Mw  $\pm$  SEM).

### **3.3.2.7 Multiplex-Polymerase-Ketten-Reaktion (MPCR)**

Um den Kot der Katzen auf das Vorhandensein von pathogenen *E. coli* zu untersuchen, wurde eine „touch-down“ MPCR mittels einer von Göbel (2003) entwickelten Methode durchgeführt. Hierfür wurden die zuvor aufbereiteten DNA-Extrakte (3.3.2.5) verwendet sowie das Qiagen® Multiplex PCR Kit. Für die Durchführung der MPCR wurden zunächst zwei Primerlösungen (10 µM) hergestellt. Hierbei enthielt eine Primerlösung die Primer für die jeweiligen Vorwärtsstränge der Pathogenitätsfaktoren, während in der zweiten Lösung die Primer für die Rückwärtsstränge der Pathogenitätsfaktoren enthalten waren (Tabelle A 17). Anschließend wurden die einzelnen Reaktionsansätze für jeden aufbereiteten DNA-Extrakt, welcher jeweils einer Kotprobe entsprach, hergestellt. Dem Anhang A 12 sind die für die MPCR verwendeten Geräte und Reagenzien sowie die Zusammensetzung der Reaktionsansätze zu entnehmen. Die Tabelle A 17 listet die für die jeweiligen Pathogenitätsfaktoren verwendeten Primersequenzen auf. In der Tabelle A 19 ist das Temperaturprogramm der MPCR aufgeführt. Als Positivkontrolle wurden insgesamt 5 *E. coli*-Stämme genutzt (Tabelle A 18), als Negativkontrolle diente der *E. coli* DSM Stamm 2840 (DSMZ GmbH).

### **3.3.2.8 Qualitativer Nachweis der *E. coli* Pathogenitätsfaktoren mittels Agarose-Gelelektrophorese**

Im Anschluss an die MPCR wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierdurch konnten die während der MPCR vervielfältigten Pathogenitätsfaktoren von *E. coli* nach der Größe aufgetrennt und mithilfe von UV-Licht sichtbar gemacht werden. Dies ermöglichte einen qualitativen Nachweis ausgewählter Pathogenitätsfaktoren von *E. coli* im Kot der Katzen. Eine Aufstellung der für die Agarose-Gelelektrophorese benötigten Materialien und Geräte ist dem Anhang A 12 zu entnehmen. Zur Herstellung der 2,5 %igen Agarosegele wurden je 6,25 g Agarose (50–1500 Basenpaar (Bp)-Auflösung) in 250 ml TAE-Puffer (1 ×) (Zusammensetzung siehe Anhang A 12) durch viermaliges 5-minütiges Erhitzen in der Mikrowelle (320 Watt) vollständig gelöst. Die Gele wurden zunächst in die jeweiligen Elektrophorese-Kammern gegossen und nach erfolgter Aushärtung mit TAE-Puffer (1 ×)

vollständig bedeckt. Anschließend wurden die probenspezifischen Reaktionsansätze, die Kontrollansätze sowie die DNA-Leiter hergestellt und auf das Gel aufgetragen. Das Pipettierschema dieser Ansätze findet sich in Anhang A 12. Die DNA-Leiter dienen hierbei als Marker (1000–100 Bp) für die Fragmentlänge der zu identifizierenden Pathogenitätsgene in den Kotproben. Daneben wurden als Positivkontrollen 5 *E. coli*-Stämme mit bekannten Pathogenitätsgenen genutzt sowie ein *E. coli*-Stamm ohne Pathogenitätsgene als Negativkontrolle eingesetzt. Nach einer Laufzeit von ca. 2,5 bis 3 Stunden erfolgte die Dokumentation der Ergebnisse mittels eines UV-Durchlichttisches (Wellenlänge 312 nm) und einer charge coupled density (CCD)-Kamera.

### **3.3.2.9 Generierung von PCR-Produkten für das Next Generation Sequencing mittels Illumina®**

Ziel der Sequenzierung mittels Illumina® war die Vervielfältigung und anschließende Identifizierung der Bakteriengenera im Katzenkot anhand der V3-V4-Region des 16S rRNA-Gens. Die hierfür benötigten probenspezifischen Primersequenzabfolgen wurden von der Firma LGC Genomics GmbH bereitgestellt. Anschließend wurden diese von der Firma Eurofins Genomics synthetisiert. Die für die Generierung von probenspezifischen PCR-Produkten benötigten Geräte und Materialien sind in Anhang A 13 aufgeführt. In Tabelle A 21 sind die Sequenzen der einzelnen Primer aufgelistet.

Um die Eignung der probenspezifischen Primer für die jeweiligen Probenextrakte zu überprüfen, wurde eine qPCR mit den DNA-Extrakten (3.3.2.6) durchgeführt. Hierfür wurde der Brilliant II SYBR® Green Low ROX QPCR Master Mix, wie unter 3.3.2.4 beschrieben, eingesetzt. Die Tabelle A 22 zeigt das Programm, welches für diese Test-qPCR verwendet wurde. Mithilfe der MxPro QPCR-Software wurde jede Probe auf eine vorhandene Amplifikationskurve mit einem jeweiligen probenspezifischen ct-Wert hin überprüft. Auf diese Weise konnte nachvollzogen werden, ob die ausgewählten probenspezifischen Primer die V3-V4-Region der in den Proben enthaltenen 16 S rDNA vollständig amplifizierten. Nachdem die korrekte Amplifikation für alle Proben gezeigt wurde, wurde eine PCR mit dem KAPA HiFi HotStart Ready Mix PCR Kit von der Firma Kapa Biosystems, Inc. durchgeführt. Hierfür wurden 25 µl des KAPA HiFi Ready Mix (2 ×), 17 µl Nuklease-freies Wasser, 1,5 µl der entsprechenden probenspezifischen Primer und 5 µl DNA-Extrakt einer jeden Probe (0,5 ng DNA/µl) in PCR-Reaktionsgefäße pipettiert. Tabelle A 23 zeigt das für diese PCR verwendete Temperaturprogramm. Die probenspezifischen PCR-Produkte, welche hierbei entstanden, wurden bis zur weiteren Analyse bei -30° C gelagert. Da der verwendete KAPA HiFi Ready Mix keinen Fluoreszenzfarbstoff enthielt, musste eine Überprüfung der erzeugten PCR-Produkte auf eine vorhandene Amplifikation und damit verbundene ct-Werte mittels einer weiteren qPCR unter Verwendung des Brilliant II SYBR® Green Low ROX QPCR

Master Mix erfolgen, welcher einen entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff aufwies. Hierfür wurden aus 16,5 µl des Brilliant II SYBR® Green Low ROX QPCR Master Mix, 13,5 µl Nuklease-freies Wasser, je 1 µl der entsprechenden probenspezifischen Primer sowie 1 µl des PCR-Produkts Reaktionsansätze pipettiert. Das gewählte Temperaturprogramm ist in Tabelle A 24 aufgeführt. Bei der Auswertung dieser qPCR mithilfe der MxPro QPCR-Software konnten für 15 Proben keine ct-Werte ermittelt werden, sodass die qPCR mit dem Brilliant II SYBR® Green Low ROX QPCR Master Mix für diese Proben wiederholt wurde. Hierbei ergab die Auswertung erneut keine ct-Werte, sodass eine Überprüfung dieser Proben auf das erzeugte KAPA-PCR-Produkt mittels des Agilent 2100 Bioanalyzers unter Verwendung des Agilent DNA 1000 Kit der Firma Agilent Technologies, Inc. erfolgte. Diese sensitivere Nachweismethode ermöglichte es, die Länge sowie die Konzentration der jeweiligen KAPA-PCR-Produkte in den Proben zu detektieren. Das Protokoll wurde laut Herstellerangaben durchgeführt (Agilent Technologies, 2016). Die hierfür benötigten Geräte und Materialien sind in Anhang A 14 (Tabelle A 25) aufgelistet. Nachdem für alle Proben das vorhandene KAPA-PCR-Produkt nachgewiesen werden konnte, wurde anschließend an diese Qualitätskontrolle eine weitere PCR mit den DNA-Extrakten (3.3.2.6) durchgeführt. Diese PCR erfolgte erneut mit dem KAPA HiFi HotStart Ready Mix PCR Kit und hatte das Ziel, ausreichend PCR-Produkt für die nachfolgende Illumina®-Sequenzierung zu generieren. Die so gewonnenen PCR-Produkte wurden mit dem jeweiligen PCR-Produkt der ersten KAPA-PCR vereinigt.

### **3.3.2.10 Qualitätskontrolle der KAPA-PCR-Produkte**

Nachdem die jeweiligen KAPA-PCR-Produkte einer Probe vereinigt wurden (3.3.2.9), wurde überprüft, ob die erzeugten DNA-Abschnitte eine Länge von 400-500 Bp aufwiesen, da die V3-V4-Region in etwa diese Basenpaarlänge aufweist (Yarza et al., 2014). Zudem wurde die Konzentration des DNA-Gehalts in den einzelnen Probenlösungen bestimmt. Hierfür erfolgte eine weitere Qualitätsüberprüfung der KAPA-PCR-Produkte einer jeden Probe mittels des Agilent 2100 Bioanalyzers unter Verwendung des Agilent DNA 1000 Kit der Firma Agilent Technologies, Inc.. Das Protokoll wurde laut Herstellerangaben durchgeführt (Agilent Technologies, 2016). Die hierfür eingesetzten Geräte und Materialien sind in Anhang A 14 (Tabelle A 25) aufgeführt. In Tabelle 7 werden der DNA-Gehalt sowie die durchschnittliche Länge (arithmetischer  $M_w \pm SEM$ ) der generierten KAPA-PCR-Produkte dargestellt.

Tabelle 7: DNA-Gehalte und Basenpaarlänge der untersuchten KAPA-PCR-Produkte (n = 60; Mittelwert (Mw) ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM))

	<b>Mw</b>	<b>SEM</b>
DNA-Gehalt (µg/g FS <sup>1</sup> )	11,1	± 0,97
Länge (Bp <sup>2</sup> )	467	± 4,12

<sup>1</sup>Frischsubstanz      <sup>2</sup>Basenpaare

Im Anschluss an diese Überprüfung wurden äquimolare Verdünnungen der Proben zu zwei Masterproben I und II vereinigt. Die Verwendung probenspezifischer Primer ermöglichte die Identifizierung der jeweiligen Proben 1–30 bzw. 31–60 in den Masterproben I und II. Hierfür wurden zunächst die höchste Konzentration der KAPA-PCR-Probenlösungen 1–30 sowie der Proben 31–60 ausgewählt (42,4 ng/µl bzw. 25,2 ng/µl). Anschließend wurden die Probenlösungen 1–30 bzw. 31–60 auf die Konzentration 42,4 ng/µl bzw. 25,2 ng/µl äquimolar eingestellt. Hierdurch ergab sich in den beiden Masterproben I (Proben 1–30) und II (Proben 21–60) ein errechneter DNA-Gehalt von 6,20 ng/µl und 7,82 ng/µl.

Mithilfe des QIAquick PCR Purification Kits der Firma QIAGEN GmbH (siehe Anhang A 14) wurden verbliebene Nukleotide, Enzyme und Primer aus diesen Masterproben entfernt, um ausschließlich die erzeugten probenspezifischen DNA-Abschnitte der V3-V4-Region des 16S rRNA-Gens in den Masterproben zu erhalten. Hierfür wurden zu je 50 µl einer Masterprobe 250 µl PB-Puffer des Kits sowie 5 µl Na-Acetat (3 M, pH 5) hinzugefügt. Die folgenden Reinigungsschritte zur Aufbereitung der Masterproben wurden laut Herstellerangaben durchgeführt (QIAGEN®, 2010). Die gereinigten Masterproben wurden in 1,5 ml-Eppendorfgläsern bis zur weiteren Analyse bei -30° C gelagert.

Vor der Illumina®-Sequenzierung wurden die Masterproben erneut hinsichtlich des DNA-Gehalts und der DNA-Qualität überprüft. Diese Quantitäts- und Qualitätskontrolle erfolgte wiederum mittels des Agilent 2100 Bioanalyzers und des Agilent DNA 1000 Kits der Firma Agilent Technologies, Inc. (Anhang A 14). Hierfür wurden die Masterproben unverdünnt sowie in den Verdünnungen 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 und 1:1000 geprüft.

### 3.3.2.11 Illumina®-Sequenzierung

Die zwei Masterproben (3.3.2.10) wurden von der Firma LGC Genomics GmbH (Berlin, Deutschland) sequenziert. Das Prinzip der Illumina®-Sequenzierung (Next Generation Sequencing-Technologie) beruht auf einer sogenannten *de-novo*-Synthese, bei welcher zweimal 300 Bp lange „Reads“ sequenziert werden (LGC Inc., 2017). Hierfür wurde ein MiSeq-Gerät der Firma Illumina, Inc. (San Diego, Kalifornien, USA) verwendet, welches die Technologie „Sequencing by Synthesis“ nutzt (Schmitt, 2014).

Für die in der vorliegenden Arbeit verwendete Bridge-Amplification-Technik wurden Glas-Objektträger („Flow Cell“) verwendet, auf deren Oberfläche Oligonukleotide befestigt sind (Schmitt, 2014). Die einzelsträngige DNA geht mit diesen über Adaptoren, welche zuvor an beiden Enden der DNA befestigt wurden, eine Bindung ein (Schmitt, 2014). Darauf folgt die Synthese des komplementären DNA-Strangs mit anschließender Denaturierung sowie Entfernung des anfangs eingesetzten DNA-Einzelstrangs (Schmitt, 2014). Anschließend folgt eine Hybridisierung des freien Adaptors des verbliebenen DNA-Einzelstrangs mit einem weiteren Oligonukleotid des Glas-Objektträgers, wodurch dieser einen Bogen auf dem Glas-Objektträger formt und an diesem die Synthese des komplementären DNA-Strangs erfolgt, sodass eine Brückenstruktur gebildet wird (Schmitt, 2014). Eine weitere Denaturierung dieses DNA-Doppelstrangs führt zu zwei DNA-Einzelsträngen, welche jeweils an einem Ende mit dem Objektträger verbunden bleiben (Schmitt, 2014). Viele Wiederholungen der beschriebenen Vorgänge führen schließlich zu einer vollständigen Bedeckung des Objektträgers mit DNA-Einzelsträngen (*Templates*) (Schmitt, 2014). Bevor die Primer für die eigentliche Sequenzierung am 3'-Ende der Vorwärtsstränge binden können, werden die Stränge mit dem freien 5'-Ende entfernt (Schmitt, 2014). Ein sogenanntes „Blocking“ der hierbei freiwerdenden Oligonukleotide des Objektträgers sowie der komplementären Oligonukleotide an den freien 3'-Enden der zu sequenzierenden DNA-Einzelstränge verhindert die versehentliche Sequenzierung dieser Oligonukleotide (Schmitt, 2014). Für die Sequenzierung werden Desoxyribonukleosidtriphosphat-Moleküle (dNTPs) mit verschiedenen, fluoreszenzmarkierten Terminatoren verwendet, welche durch Abspaltung beim Einbau eine Detektion ermöglichen (Schmitt, 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde neben dem Vorwärtsstrang auch der Rückwärtsstrang sequenziert. Diese Methode wird als sogenannte „paired-end-Sequenzierung“ bezeichnet (Schmitt, 2014).

Die Illumina®-Sequenzbibliotheken wurden aus je 100 ng Masterprobe mittels Ovation® Rapid DR Multiplex System 1–96 der Firma NuGEN Technologies, Inc. (San Carlos, Kalifornien, USA) hergestellt. Die Qualitätskontrolle der Illumina®-Sequenzen erfolgte anhand der Quality Control Software v2.5 (Illumina, Inc., San Diego, Kalifornien, USA). Die Sequenzdateien wurden anschließend als komprimierte FASTA-Dateien übermittelt.

### **3.3.2.12 Auswertung der Illumina®-Sequenzen mittels MG-RAST (metagenomics analysis server)**

Für die Auswertung der FASTA-Dateien wurden diese auf die Datenbank MG-RAST (Meyer et al., 2008) hochgeladen. Die Datenbank erstellte anhand der 16 S rRNA-Gensequenzen probenspezifische Metagenome. Da diese Metagenome auf Genusebene analysiert werden sollten, wurde der prozentuale Anteil der einzelnen Genera pro Metagenom und Probe berechnet. Hierbei wurden lediglich jene Genera berücksichtigt, deren Sequenzen häufiger

als fünfmal in einer Probe vorkamen. Die relativen Anteile der einzelnen Genera in einer Probe wurden mithilfe der folgenden Formel ermittelt:

$$3. \text{ Relativer Anteil eines Genus (\%)} = \frac{\text{Anzahl an Sequenzen des Genus}}{\text{Gesamtzahl an Sequenzen des Metagenoms}} \times 100$$

### 3.3.2.13 Methodische Überprüfung des Sequenzierungsverfahrens („Rarefaction curve“)

Im Anschluss an die Illumina®-Sequenzierung wurde überprüft, ob die detektierte Anzahl an Sequenzen einer jeweiligen Probe genügt, um eine ausreichende und repräsentative Analyse dieser Probe vornehmen zu können (sogenannte „Rarefaction“). Die Abbildung 1 zeigt ein Diagramm, welches zu diesem Zweck mithilfe der MG-Rast Datenbank (Meyer et al., 2008) erstellt wurde. In diesem entspricht ein Graph einer sequenzierten Kotprobe. Die Graphen zeigen die bakterielle Artenanzahl in einer Probe in Abhängigkeit von der Anzahl an Sequenzen auf und lassen einen nahezu asymptotischen Verlauf erkennen. Dies bedeutet, dass die Anzahl der in den Kotproben der Katzen detektierten DNA-Sequenzen ausreicht, um eine repräsentative Beschreibung der einzelnen Kotproben vornehmen zu können und Vergleiche zwischen den Proben zu erlauben (Heck et al., 1975).

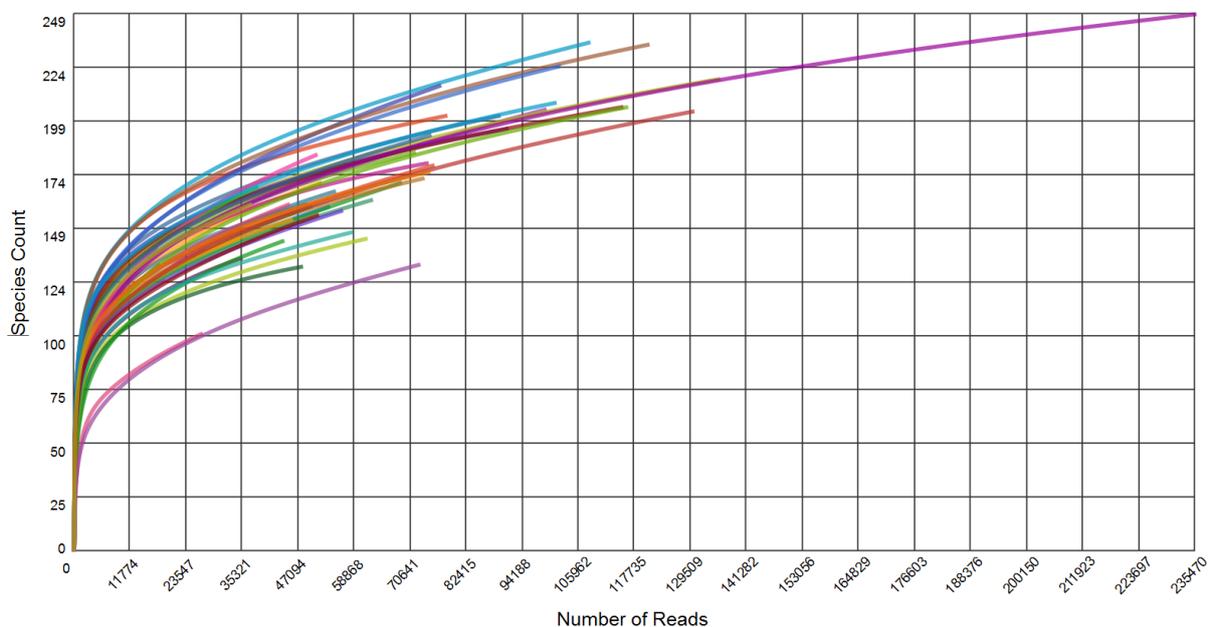


Abbildung 1: „Rarefaction“ der untersuchten Proben; Artenanzahl („Species Count“) in Abhängigkeit von der Anzahl an Sequenzen („Number of Reads“) (Meyer et al., 2008)

### 3.3.2.14 Ökologische Indizes

Die probenspezifischen Metagenome (3.3.2.12) wurden zudem mithilfe einer weiteren Datenbank, der RDP-Pipeline (Cole et al., 2014), anhand der folgenden ökologischen Indizes näher charakterisiert: Shannon-Weaver Index, Evenness und CHAO1-Index.

Es existieren unterschiedliche mathematische Methoden, um die Biodiversität bzw. die Artenvielfalt in Ökosystemen zu beschreiben. Eine allumfassende Methodik, welche alle Gesichtspunkte dieser Artenvielfalt mit einbezieht, existiert bislang allerdings noch nicht (Lévêque und Mounolou, 2003). Einige Biodiversitätsmaße sind in der Lage, die Artenvielfalt in einem Ökosystem mittels einer Zahl (Index) zu beschreiben.

Der Shannon-Weaver-Index ( $H'$ ) ermittelt die mikrobielle Vielfalt in einem ökologischen System. Hierbei werden die Artenanzahl ( $s$ ) sowie der Anteil jeder Art an der Artengemeinschaft mit einbezogen (Kwak und Peterson, 2007).

Die Formel hierzu lautet (Kwak und Peterson, 2007):

$$4. \quad H' = - \sum_{i=1}^s p_i \cdot \ln p_i$$

$H'$  = Shannon-Weaver-Index

$s$  = Gesamtzahl der Arten

$p_i$  = Wahrscheinlichkeit des Auftretens der Art  $i$  oder relative Häufigkeit der  $i$ -ten Art in der Gesamtindividuenzahl, gemessen von 0,0 bis 1,0

*„Eine maximale Diversität nach dem Shannon-Index wäre gegeben, wenn in einer  $s$  Arten enthaltenden Gemeinschaft alle Arten im gleichen quantitativen Verhältnis vorhanden sind.“* (Untersteiner, 2005)

Ein weiterer ökologischer Index, welcher in der vorliegenden Arbeit ermittelt wurde, ist die Evenness ( $E$ ): dies ist die *„Relation des Shannon-Index zu dem maximal möglichen Diversitätswert, der sich bei gleicher Artenzahl, aber unter größtmöglicher Gleichverteilung der Individuen auf die bestehenden Arten ergeben würde“* (Untersteiner, 2005).

Die Formel hierzu lautet (Untersteiner, 2005; Kwak und Peterson, 2007):

$$5. \quad E = \frac{H'}{H_{max}} = \frac{H'}{\ln S}$$

$H'$  = Shannon-Weaver Index

$H_{max}$  = Maximaler Diversitätswert

$S$  = Gesamtzahl der Arten

$E$  kann Werte zwischen 0,0 und 1,0 annehmen.

Ein kleiner  $E$ -Wert ist gleichbedeutend mit einer inhomogenen Verteilung der Bakterienarten bzw. -spezies innerhalb der bakteriellen Gemeinschaft und einer ungleichmäßigen Struktur des zu untersuchenden Systems (Klär, 2008; Kirsch, 2010).

Der CHAO1-Index nach Chao (1984) gibt die Zahl aller Spezies in einer Probe an, wobei als Berechnungsgrundlage die jeweiligen Spezies mit dem geringsten Vorkommen gewählt werden (Colwell und Coddington, 1994).

Die Formel hierzu lautet (Gotelli und Colwell, 2011):

$$6. \quad S_{Chao1} = S_{obs} + \frac{f_1^2}{2 f_2}$$

$S_{Chao1}$  = CHAO1-Index

$S_{obs}$  = Anzahl ermittelter Spezies in einer Probe oder in der Gesamtheit aller Proben

$f_1$  = Anzahl der Spezies, welche einmal in einer Probe detektiert wurden („singleton species“)

$f_2$  = Anzahl der Spezies, welche zweimal in einer Probe detektiert wurden („doubleton species“)

Diese Formel kann jedoch nicht angewendet werden, wenn  $f_2 = 0$ , daher lautet die korrigierte Formel in diesem Fall (Gotelli und Colwell, 2011):

$$7. S_{Chao1} = S_{obs} + \frac{f_1 (f_1 - 1)}{2 (f_2 + 1)}$$

$S_{Chao1}$  = CHAO1-Index

$S_{obs}$  = Anzahl ermittelter Spezies in einer Probe oder in der Gesamtheit aller Proben

$f_1$  = Anzahl der Spezies, welche einmal in einer Probe detektiert wurden („singleton species“)

$f_2$  = Anzahl der Spezies, welche zweimal in einer Probe detektiert wurden („doubleton species“)

### 3.3.2.15 Auswertung der Illumina®-Sequenzen mittels RDP-Pipeline

Zur Ermittlung der erläuterten ökologischen Indizes wurde die Datenbank „RDP-Pipeline“ (Cole et al., 2014) genutzt. Zunächst wurde für jede der komprimierten FASTA-Dateien eine Anpassung („Alignment“) der Sequenzen durchgeführt. Dies bedeutet, dass die in den Proben enthaltenen Sequenzen an das 16S rRNA-Gen von *E. coli* als Referenz angeglichen wurden. Hierdurch wurde gewährleistet, dass alle Sequenzen an eine Referenzsequenz angepasst sind. Im Anschluss wurde mit diesen angeglichenen Dateien eine Gesamtgruppierung der Ähnlichkeiten zwischen den Sequenzen („complete linkage clustering“) durchgeführt. Hierbei standen zu Beginn alle Sequenzen in einer eigenen Gruppierung. Die zwei ähnlichsten Sequenzen wurden dann zu einer neuen Gruppierung formiert. Im Verlauf der Anwendung der mathematischen Funktion wurden homogene Gruppierungen weiter zusammengefasst, sodass am Ende eine Verteilung von Ähnlichkeiten aller Sequenzen zur Verfügung stand. Details dieser Methode werden bei Sipos et al. (2010) beschrieben. Mit diesen so erzeugten Dateien wurden anschließend die ökologischen Indizes der einzelnen Probenmetagenome mittels der RDP-Pipeline (Cole et al., 2014) ermittelt.

### **3.4 Statistische Auswertung der Ergebnisse**

Die statistische Datenauswertung erfolgte mithilfe der Software SPSS Statistics® (Version 22) von IBM® (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Zunächst wurde mittels des Shapiro-Wilk-Tests auf eine Normalverteilung der Daten geprüft. Die Darstellung der überwiegend normalverteilten Daten erfolgte anschließend in Form des arithmetischen Mittelwerts (Mw) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Hierbei wurde zum Teil, aufgrund der Übersichtlichkeit in den Tabellen, ein gruppenunabhängiger SEM dargestellt. Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen wurden einerseits gesamthaft ( $n = 60$ ), d.h., unabhängig von den Fütterungsgruppen der Katzen, dargestellt. Daneben wurde mithilfe von polynomialen Kontrastberechnungen der Einfluss der Proteinkonzentration und -qualität im Futter auf die fäkale Mikrobiota sowie auf ausgewählte bakterielle Metaboliten im Kot der Katzen untersucht. In diesen Darstellungen wird unter „n“ die jeweilige Anzahl gültiger Fälle, welche für die Berechnung der polynomialen Kontraste einbezogen werden konnten, aufgeführt. Hierbei wurde auch eine mögliche Interaktion zwischen der Qualität und der Konzentration des Futterproteins mittels des Greenhouse-Geisser-Tests überprüft. Als Signifikanzniveau wurde  $P \leq 0,05$  festgesetzt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Futtermittelanalysen

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Versuchsfuttermittel wiesen eine variierende Proteinkonzentration und -qualität auf. Die Tabellen 8 und 9 zeigen die analysierten Inhaltsstoffe der Futtermittel auf. In den Versuchsfuttermitteln mit einer geringen Proteinqualität wurden folgende Rohmaterialien in absteigender Reihenfolge verwendet: Leber, Trachea, Weizenmehl, Fleisch, Sonnenblumenöl, Griebenmehl, Blutmehl, Mineralstoffe, Gelier- und Verdickungsmittel und Vitamine (Paßlack et al., 2017; 2018). Die Versuchsfuttermittel mit einer hohen Proteinqualität wiesen die folgende Zusammensetzung in absteigender Reihenfolge auf: Leber, Fleisch, Weizenmehl, Sonnenblumenöl, Blutmehl, Griebenmehl, Mineralstoffe, Gelier- und Verdickungsmittel und Vitamine (Paßlack et al., 2017; 2018).

Tabelle 8: Analytierte Inhaltsstoffe der Versuchsfuttermittel (Paßlack et al., 2017; 2018)

		Versuchsfuttermittel					
		Geringe Proteinqualität			Hohe Proteinqualität		
		36,7 % <sup>1</sup>	45,0 %	56,1 %	36,2 %	43,3 %	54,9 %
Trockensubstanz (TS)	g/kg uS <sup>2</sup>	200	189	204	216	203	193
Rohprotein	g/kg TS	367	450	561	362	433	549
Rohfett	g/kg TS	284	296	271	294	318	262
Rohfaser	g/kg TS	3,14	7,05	10,5	6,75	4,46	6,78
Rohasche	g/kg TS	77,2	73,8	83,4	68,3	68,9	75,2
Kalzium	g/kg TS	11,2	11,4	12,6	10,7	11,2	11,8
Phosphor	g/kg TS	8,79	8,34	8,88	7,73	8,23	8,71
Natrium	g/kg TS	5,83	5,75	8,20	4,88	5,78	6,74
Kalium	g/kg TS	11,1	9,35	12,4	8,75	8,58	8,67
Magnesium	g/kg TS	0,48	0,48	0,47	0,45	0,47	0,49
Eisen	mg/kg TS	137	174	220	137	104	159
Zink	mg/kg TS	90,5	90,5	94,7	93,5	118	109
Mangan	mg/kg TS	16,4	13,2	9,27	16,1	12,5	9,75
Kupfer	mg/kg TS	10,7	9,80	11,2	10,8	8,98	8,88
Gehalt an ME <sup>3</sup>	MJ/kg TS	20,4	20,8	20,4	20,6	21,3	20,4

<sup>1</sup>Proteingehalt der Versuchsfuttermittel <sup>2</sup>uS = ursprüngliche Substanz <sup>3</sup>ME = umsetzbare Energie, berechnet nach National Research Council (2006)

## Ergebnisse

Tabelle 9: Taurin- und Aminosäurenkonzentrationen in den Versuchsfuttermitteln (Paßlack et al., 2017; 2018)

		<b>Versuchsfuttermittel</b>					
		<b>Geringe Proteinqualität</b>			<b>Hohe Proteinqualität</b>		
		<b>36,7 %<sup>1</sup></b>	<b>45,0 %</b>	<b>56,1 %</b>	<b>36,2 %</b>	<b>43,3 %</b>	<b>54,9 %</b>
Taurin	g/kg TS <sup>2</sup>	5,32	4,36	3,90	4,13	3,81	3,85
Asparaginsäure	g/kg TS	26,5	33,3	38,7	25,1	33,8	42,9
Threonin	g/kg TS	14,2	17,8	20,2	14,1	18,3	23,6
Serin	g/kg TS	14,6	18,9	21,9	14,8	18,5	23,2
Glutaminsäure	g/kg TS	35,9	40,0	49,0	35,7	38,9	44,1
Glycin	g/kg TS	36,0	39,1	52,6	28,0	23,8	36,6
Alanin	g/kg TS	18,9	26,6	32,9	17,6	23,1	30,3
Valin	g/kg TS	18,0	22,4	25,9	12,2	22,4	27,0
Isoleucin	g/kg TS	12,8	16,1	17,8	9,2	17,2	21,2
Leucin	g/kg TS	24,7	31,4	37,6	24,4	32,4	39,3
Tyrosin	g/kg TS	10,4	13,8	16,1	10,6	14,9	18,7
Phenylalanin	g/kg TS	13,9	18,3	21,6	14,1	18,8	24,1
Histidin	g/kg TS	12,0	15,4	15,5	10,9	17,1	20,8
Lysin	g/kg TS	21,6	28,3	33,6	20,9	29,6	36,5
Arginin	g/kg TS	17,3	24,9	30,5	15,4	23,6	31,2
Prolin	g/kg TS	16,1	25,0	30,3	15,9	17,3	23,4
Methionin	g/kg TS	6,29	8,77	10,1	5,74	9,86	11,6
Cystein	g/kg TS	6,47	7,67	8,93	6,63	8,75	10,4
Hydroxyprolin	g/kg TS	3,76	8,45	9,44	2,56	3,76	4,45

<sup>1</sup>Proteingehalt der Versuchsfuttermittel <sup>2</sup>Trockensubstanz

## 4.2 Gesundheitszustand der Tiere

Eine Katze musste während der ersten Versuchshälfte krankheitsbedingt gegen ein anderes Tier ausgetauscht werden (Paßlack et al., 2017; 2018). Die Erkrankung war nicht auf die Studie oder die eingesetzten Versuchsfuttermittel zurückzuführen (Paßlack et al., 2017; 2018). Der Gesundheitszustand der anderen Katzen war während des gesamten Versuchszeitraums gut und ohne klinische Auffälligkeiten.

### 4.2.1 Futteraufnahme und Körpermasse der Katzen

In Tabelle 10 sind die durchschnittliche Futteraufnahme und Körpermasse der Katzen während der Stoffwechselphasen aufgeführt (Paßlack et al., 2018). Der Einfluss der Proteinkonzentration und -qualität im Futter auf diese Parameter wird in Tabelle 11 dargestellt (Paßlack et al., 2018). Es konnte für die durchschnittliche Körpermasse eine geringgradige Zunahme mit steigenden Proteinkonzentrationen im Futter detektiert werden ( $P = 0,003$ ; Paßlack et al., 2018). Die Futteraufnahme der Tiere war höher, wenn die Futtermittel mit der geringeren Eiweißqualität eingesetzt wurden ( $P = 0,026$ ; Paßlack et al., 2018).

Tabelle 10: Durchschnittliche Körpermasse und Futteraufnahme der Katzen ( $n = 10$ ) bei Einsatz von Versuchsdiäten mit einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität (Paßlack et al., 2018); Mittelwert; gruppenunabhängiger Standardfehler des Mittelwerts (SEM); die statistische Datenauswertung in Form von polynomialen Kontrasten wird in Tabelle 11 wiedergegeben.

	Geringe Proteinqualität			Hohe Proteinqualität			SEM
	36,7 % <sup>1</sup>	45,0 %	56,1 %	36,2 %	43,3 %	54,9 %	
Körpermasse [kg]	4,05	4,30	4,34	4,15	4,19	4,24	0,16
Futteraufnahme [g/kg KM <sup>2</sup> /d <sup>3</sup> ]	55,3	58,1	54,2	48,1	50,4	56,7	1,53

<sup>1</sup>Proteingehalt der Versuchsfuttermittel <sup>2</sup>Körpermasse <sup>3</sup>Tag

## Ergebnisse

Tabelle 11: Darstellung der ermittelten polynomialen Kontraste für die durchschnittliche Körpermasse und Futtermittelaufnahme der Katzen (n = 10) bei Einsatz von Versuchsdieten mit einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität (Paßlack et al., 2018; vgl. Tabelle 10)

<b>P-Werte (polynomiale Kontraste)</b>								
	Interaktion	Geringe Proteinqualität		Hohe Proteinqualität		Protein-konzentration		Protein-qualität
		Linear	Quadratisch	Linear	Quadratisch	Linear	Quadratisch	
Körpermasse [kg]	0,873	-	-	-	-	<b>0,003</b>	0,442	0,783
Futtermittelaufnahme [g/kg KM <sup>1</sup> /d <sup>2</sup> ]	0,152	-	-	-	-	0,110	0,953	<b>0,026</b>

Darstellung der polynomialen Kontraste: Bei einer nicht signifikanten Interaktion zwischen der Proteinkonzentration und -qualität im Futter werden die linearen und quadratischen Kontraste für die Proteinkonzentration (Gruppeneffekte für beide Eiweißqualitäten) sowie der *P*-Wert für die Proteinqualität im Futter aufgeführt. Bei einer signifikanten Interaktion zwischen der Proteinkonzentration und -qualität im Futter werden die linearen und quadratischen Effekte der Proteinkonzentration einzeln für die hohe und geringere Eiweißqualität im Futter angegeben. <sup>1</sup>Körpermasse <sup>2</sup>Tag

#### 4.2.2 Fäkale Rohproteinkonzentration und -exkretion sowie scheinbare Rohproteinverdaulichkeit

Der Einfluss der Rohproteinkonzentration und -qualität im Futter auf die fäkale Rohproteinkonzentration und -exkretion sowie die scheinbare Rohproteinverdaulichkeit bei Katzen wird in den Tabellen 12 und 13 dargestellt (Paßlack et al., 2018). Eine ansteigende Proteinkonzentration im Futter resultierte in einer höheren Proteinaufnahme der Katzen pro Tag ( $P < 0,001$ ; Tabelle 13). Zudem fiel die Rohproteinaufnahme der Katzen pro Tag bei den Versuchsfuttermitteln mit einer hohen Proteinqualität vergleichsweise geringer aus als bei den Versuchsdiäten mit einer geringen Proteinqualität ( $P = 0,044$ ; Tabelle 13). Ein steigender Rohproteingehalt im Futter führte zu einer Zunahme der Rohproteinkonzentration im Kot der Katzen ( $P = 0,001$ ) sowie der fäkalen Rohproteinexkretion bezogen auf die Körpermasse und Tag ( $P = 0,004$ ; Paßlack et al., 2018). Die scheinbare Verdaulichkeit des Rohproteins wurde weder durch die Proteinqualität noch durch die Proteinkonzentration im Futter beeinflusst (Paßlack et al., 2018).

Tabelle 12: Rohproteinaufnahme, fäkale Rohproteinkonzentration und -exkretion sowie scheinbare Verdaulichkeit des Rohproteins bei Katzen ( $n = 10$ ) bei einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität im Futter (Paßlack et al., 2018; Mittelwert; gruppenunabhängiger Standardfehler des Mittelwerts (SEM); die statistische Datenauswertung in Form von polynomialen Kontrasten wird in Tabelle 13 wiedergegeben.

		Geringe Proteinqualität			Hohe Proteinqualität			SEM
		36,7 % <sup>1</sup>	45,0 %	56,1 %	36,2 %	43,3 %	54,9 %	
Rp <sup>2</sup> -Aufnahme	[mg/d <sup>3</sup> ]	15.871	20.219	25.723	14.731	17.786	24.244	716
Fäkale Rp-Konzentration	[mg/g TS <sup>4</sup> ]	453	495	460	407	445	480	6,27
Fäkale Rp-Ausscheidung	[mg/d]	1.617	2.467	2.442	1.623	1.850	2.532	94,5
Fäkale Rp-Ausscheidung	[mg/kg KM <sup>5</sup> /d]	423	600	553	418	458	625	20,9
sV Rp <sup>6</sup>	[%]	89,7	87,7	90,7	89,0	89,7	89,5	0,30

<sup>1</sup>Proteingehalt der Versuchsfuttermittel <sup>2</sup>Rohprotein <sup>3</sup>Tag <sup>4</sup>Trockensubstanz <sup>5</sup>Körpermasse

<sup>6</sup>scheinbare Verdaulichkeit des Rohproteins

## Ergebnisse

Tabelle 13: Darstellung der ermittelten polynomialen Kontraste für die Rohproteinaufnahme, fäkale Rohproteinkonzentration und -exkretion sowie scheinbare Verdaulichkeit des Rohproteins im Kot von Katzen (n = 10) bei Einsatz von Versuchsdiäten mit einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität (Paßlack et al., 2018; vgl. Tabelle 12)

		<b>P-Werte (polynomiale Kontraste)</b>							
		<b>Interaktion</b>	<b>Geringe Proteinqualität</b>		<b>Hohe Proteinqualität</b>		<b>Proteinkonzentration</b>		<b>Protein- qualität</b>
			<b>Linear</b>	<b>Quadratisch</b>	<b>Linear</b>	<b>Quadratisch</b>	<b>Linear</b>	<b>Quadratisch</b>	
Rp <sup>1</sup> -Aufnahme	[mg/d <sup>2</sup> ]	0,574	-	-	-	-	<b>&lt; 0,001</b>	0,116	<b>0,044</b>
Fäkale Rp- Konzentration	[mg/g TS <sup>3</sup> ]	-	-	-	-	-	<b>0,001</b>	0,407	0,084
Fäkale Rp- Ausscheidung	[mg/d]	<b>0,032</b>	<b>0,015</b>	<b>0,029</b>	<b>0,002</b>	0,209	-	-	-
Fäkale Rp- Ausscheidung	[mg/kg KM <sup>4</sup> /d]	0,076	-	-	-	-	<b>0,004</b>	0,524	0,609
sV Rp <sup>5</sup>	[%]	0,133	-	-	-	-	0,376	0,117	0,943

Darstellung der polynomialen Kontraste: Bei einer nicht signifikanten Interaktion zwischen der Proteinkonzentration und -qualität im Futter werden die linearen und quadratischen Kontraste für die Proteinkonzentration (Gruppeneffekte für beide Eiweißqualitäten) sowie der P-Wert für die Proteinqualität im Futter aufgeführt. Bei einer signifikanten Interaktion zwischen der Proteinkonzentration und -qualität im Futter werden die linearen und quadratischen Effekte der Proteinkonzentration einzeln für die hohe und geringere Eiweißqualität im Futter angegeben. <sup>1</sup>Rohprotein <sup>2</sup>Tag <sup>3</sup>Trockensubstanz <sup>4</sup>Körpermasse <sup>5</sup>scheinbare Verdaulichkeit des Rohproteins

### 4.3 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

#### 4.3.1 Vorkommen der mittels qPCR detektierten Bakteriengruppen und -spezies in den Kotproben der Katzen, unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration und -qualität im Futter

Das Vorkommen ausgewählter Bakteriengruppen und -spezies (3.3.2.4) in den Kotproben der Katzen, unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration und -qualität im Futter, wird in Tabelle 14 dargestellt. Die Bakteriengruppen *Bacteroides/Prevotella/Porphyromonas* sowie das *C. coccoides*-Cluster XIVa erreichten Mittelwerte von 10,3 und 9,91 log<sub>10</sub> Kopienzahl/g FS und konnten im Kot von allen Tieren nachgewiesen werden. Ebenfalls hohe Mittelwerte, zwischen 9,11–9,57 log<sub>10</sub> Kopienzahl/g FS, wurden für die Bakteriengruppen Clostridien Cluster I und *C. leptum*-Cluster IV sowie für die Spezies *C. perfringens* ermittelt. Zudem wurden das *Clostridium* Cluster I, das *C. leptum*-Cluster IV sowie *C. perfringens* in allen Kotproben (n = 60) der Katzen identifiziert. Weniger häufig wurden die Bakteriengruppen und -spezies *Enterobacteriaceae* (n = 53), *E. coli/Hafnia/Shigella* (n = 34), *C. difficile* (n = 56) und *Lactobacillus* spp. (n = 51), mit Mittelwerten zwischen 5,31–7,61 log<sub>10</sub> Kopienzahl/g FS, detektiert. *Bifidobacterium* spp. sowie *Salmonella* spp. wurden in lediglich 23 bzw. 13 der 60 untersuchten Kotproben festgestellt.

Tabelle 14: Kopienzahl [log<sub>10</sub>/g FS] der mittels qPCR ermittelten Bakteriengruppen und -spezies im Kot von Katzen (n = 10), unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration und -qualität im Futter (Mittelwert (Mw) ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM))

Bakteriengruppe	Mw	SEM	Anzahl positiver Proben <sup>1</sup>
<i>Bacteroides/Prevotella/Porphyromonas</i>	10,3	± 0,08	60
<i>Clostridium coccoides</i> -Cluster XIVa	9,91	± 0,08	60
Clostridien Cluster I	9,57	± 0,06	60
<i>Clostridium perfringens</i>	9,31	± 0,05	60
<i>Clostridium leptum</i> -Cluster IV	9,11	± 0,08	60
<i>Enterobacteriaceae</i>	7,56	± 0,06	53
<i>Escherichia coli/Hafnia/Shigella</i>	7,61	± 0,13	34
<i>Lactobacillus</i> spp.	7,14	± 0,17	51
<i>Bifidobacterium</i> spp.	7,00	± 0,10	23
<i>Clostridium difficile</i>	5,31	± 0,11	56
<i>Salmonella</i> spp.	4,85	± 0,11	13

<sup>1</sup>Gesamtanzahl der untersuchten Proben: 60

#### **4.3.2 Einfluss der Proteinkonzentration und -qualität im Futter auf das Vorkommen der mittels qPCR detektierten Bakteriengruppen und -spezies in den Kotproben der Katzen**

Der Einfluss der Proteinkonzentration und -qualität im Futter auf das Vorkommen ausgewählter Bakteriengruppen und -spezies (3.3.2.4) in den Kotproben der Katzen wird in den Tabellen 15 und 16 dargestellt. Eine geringere Eiweißqualität im Futter führte zu insgesamt höheren Kopienzahlen [ $\log_{10}/g$  FS] des *C. coccoides*-Clusters XIVa ( $P = 0,011$ ). Für *C. difficile* konnte ein quadratischer Effekt bei Einsatz der Versuchsdäten mit der geringeren Proteinqualität nachgewiesen werden, wobei die höchste Kopienzahl bei der mittleren Proteinkonzentration im Futter vorlag ( $P = 0,005$ ). Dieser Effekt konnte bei einer höheren Proteinqualität in den Versuchsdäten nicht beobachtet werden ( $P = 0,435$ ).

Wie in Tabelle 15 deutlich wird, wurden einige Bakteriengruppen nicht in allen Kotproben der Katzen detektiert. Zudem war die Anzahl positiver Proben für die *E. coli/Hafnia/Shigella*-Gruppe sowie für *Bifidobacterium* spp. und *Salmonella* spp. zu gering, um eine statistische Datenauswertung durchführen zu können.

## Ergebnisse

Tabelle 15: Kopienzahl [ $\log_{10}$ /g FS] der mittels qPCR ermittelten Bakteriengruppen und -spezies im Kot von Katzen (n = 10) bei Einsatz von Versuchsdiäten mit einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität (Mittelwert; gruppenunabhängiger Standardfehler des Mittelwerts (SEM)); die statistische Datenauswertung in Form von polynomialen Kontrasten wird in Tabelle 16 wiedergegeben.

	Geringe Proteinqualität						Hohe Proteinqualität						SEM
	36,7 % <sup>1</sup>		45,0 %		56,1 %		36,2 %		43,3 %		54,9 %		
<i>Bacteroides/Prevotella/Porphyromonas</i>	10,5	(10) <sup>2</sup>	10,8	(10)	10,2	(10)	10,2	(10)	9,83	(10)	10,1	(10)	0,08
<i>Clostridium coccooides</i> -Cluster XIVa	10,0	(10)	10,4	(10)	9,91	(10)	9,68	(10)	9,61	(10)	9,86	(10)	0,08
Clostridien Cluster I	9,51	(10)	9,95	(10)	9,57	(10)	9,35	(10)	9,48	(10)	9,55	(10)	0,06
<i>Clostridium perfringens</i>	9,25	(10)	9,54	(10)	9,32	(10)	9,15	(10)	9,33	(10)	9,28	(10)	0,05
<i>Clostridium leptum</i> -Cluster IV	9,36	(10)	9,60	(10)	9,10	(10)	8,97	(10)	8,71	(10)	8,93	(10)	0,08
<i>Enterobacteriaceae</i>	7,74	(10)	7,84	(10)	7,31	(8)	7,36	(8)	7,50	(8)	7,52	(9)	0,06
<i>Escherichia coli/Hafnia/Shigella</i>	8,16	(8)	8,15	(5)	6,91	(3)	7,24	(8)	7,61	(4)	7,24	(6)	0,13
<i>Lactobacillus</i> spp.	7,98	(8)	6,76	(9)	6,47	(9)	7,35	(8)	7,31	(10)	7,07	(7)	0,17
<i>Bifidobacterium</i> spp.	7,63	(3)	7,21	(5)	6,72	(6)	6,90	(4)	6,82	(2)	6,84	(3)	0,10
<i>Clostridium difficile</i>	4,62	(9)	5,75	(10)	5,36	(8)	5,64	(10)	5,17	(9)	5,27	(10)	0,11
<i>Salmonella</i> spp.	-	(1)	5,04	(6)	4,74	(2)	-	(1)	-	(1)	4,66	(2)	0,11

<sup>1</sup>Proteingehalt der Versuchsfuttermittel <sup>2</sup>Anzahl positiver Proben

## Ergebnisse

Tabelle 16: Darstellung der ermittelten polynomialen Kontraste für die detektierte Kopienzahl der Bakteriengruppen und -spezies im Kot von Katzen bei Einsatz von Versuchsdiäten mit einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität (vgl. Tabelle 15)

	<b>P-Werte (polynomiale Kontraste)</b>								<b>n<sup>1</sup></b>
	<b>Interaktion</b>	<b>Geringe Proteinqualität</b>		<b>Hohe Proteinqualität</b>		<b>Proteinkonzentration</b>		<b>Protein-qualität</b>	
		<b>Linear</b>	<b>Quadratisch</b>	<b>Linear</b>	<b>Quadratisch</b>	<b>Linear</b>	<b>Quadratisch</b>		
<i>Bacteroides/Prevotella/</i> <i>Porphyromonas</i>	<b>0,016</b>	0,114	0,119	0,829	0,174	-	-	-	10
<i>Clostridium coccooides-</i> Cluster XIVa	0,105	-	-	-	-	0,801	0,488	<b>0,011</b>	10
Clostridien Cluster I	0,217	-	-	-	-	0,266	0,104	0,068	10
<i>Clostridium perfringens</i>	0,605	-	-	-	-	0,308	0,079	0,215	10
<i>Clostridium leptum-</i> Cluster IV	<b>0,032</b>	0,166	0,111	0,842	0,317	-	-	-	10
<i>Enterobacteriaceae</i>	0,151	-	-	-	-	0,776	0,113	0,112	6
<i>Escherichia coli/</i> <i>Hafnia/Shigella</i> <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus</i> spp.	0,394	-	-	-	-	0,429	0,849	0,509	3
<i>Bifidobacterium</i> spp. <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium difficile</i>	<b>0,010</b>	0,209	<b>0,005</b>	0,357	0,435	-	-	-	7/8/9 <sup>3</sup>
<i>Salmonella</i> spp. <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Darstellung der polynomialen Kontraste: Bei einer nicht signifikanten Interaktion zwischen der Proteinkonzentration und -qualität im Futter werden die linearen und quadratischen Kontraste für die Proteinkonzentration (Gruppeneffekte für beide Eiweißqualitäten) sowie der *P*-Wert für die Proteinqualität im Futter aufgeführt. Bei einer signifikanten Interaktion zwischen der Proteinkonzentration und -qualität im Futter werden die linearen und quadratischen Effekte der Proteinkonzentration einzeln für die hohe und geringere Eiweißqualität im Futter angegeben. <sup>1</sup>Anzahl gültiger Fälle <sup>2</sup>Berechnung polynomialer Kontraste nicht möglich. <sup>3</sup>Für die Berechnung der Interaktion ergaben sich 7 gültige Fälle, für die Berechnung des linearen und quadratischen Effekts der geringen Proteinqualität ergaben sich 8 und für den linearen und quadratischen Effekt der hohen Proteinqualität ergaben sich 9 gültige Fälle.

#### **4.4 MPCR und Agarose-Gelelektrophorese**

Die qualitative Analyse der in der MPCR generierten PCR-Produkte zeigen die Agarosegele in den Abbildungen 2 und 3. In Tabelle 17 werden die unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration und -qualität im Futter vorgefundenen Pathogenitätsgene in den Kotproben der Katzen aufgeführt. Hierbei traten das Pathogenitätsgen *fas A* mit etwa 52 % sowie das *fed A*-Gen mit ca. 38 % am häufigsten auf. Das *est-II*-Gen konnte in ca. 32 % der Proben nachgewiesen werden, wohingegen das *est-Ib*-Gen mit einer Häufigkeit von lediglich 17 % auftrat. Zu etwa 5 % trat das Gen *fan* in den untersuchten Kotproben auf. Das Pathogenitätsgen *elt-IA* sowie die Pathogenitätsgene *fae G* und *fimf41a* konnten im Kot der Katzen qualitativ nicht nachgewiesen werden. Die Tabelle 18 zeigt die detektierten Pathogenitätsgene im Kot der Katzen in Abhängigkeit von den eingesetzten Versuchsfuttermitteln.

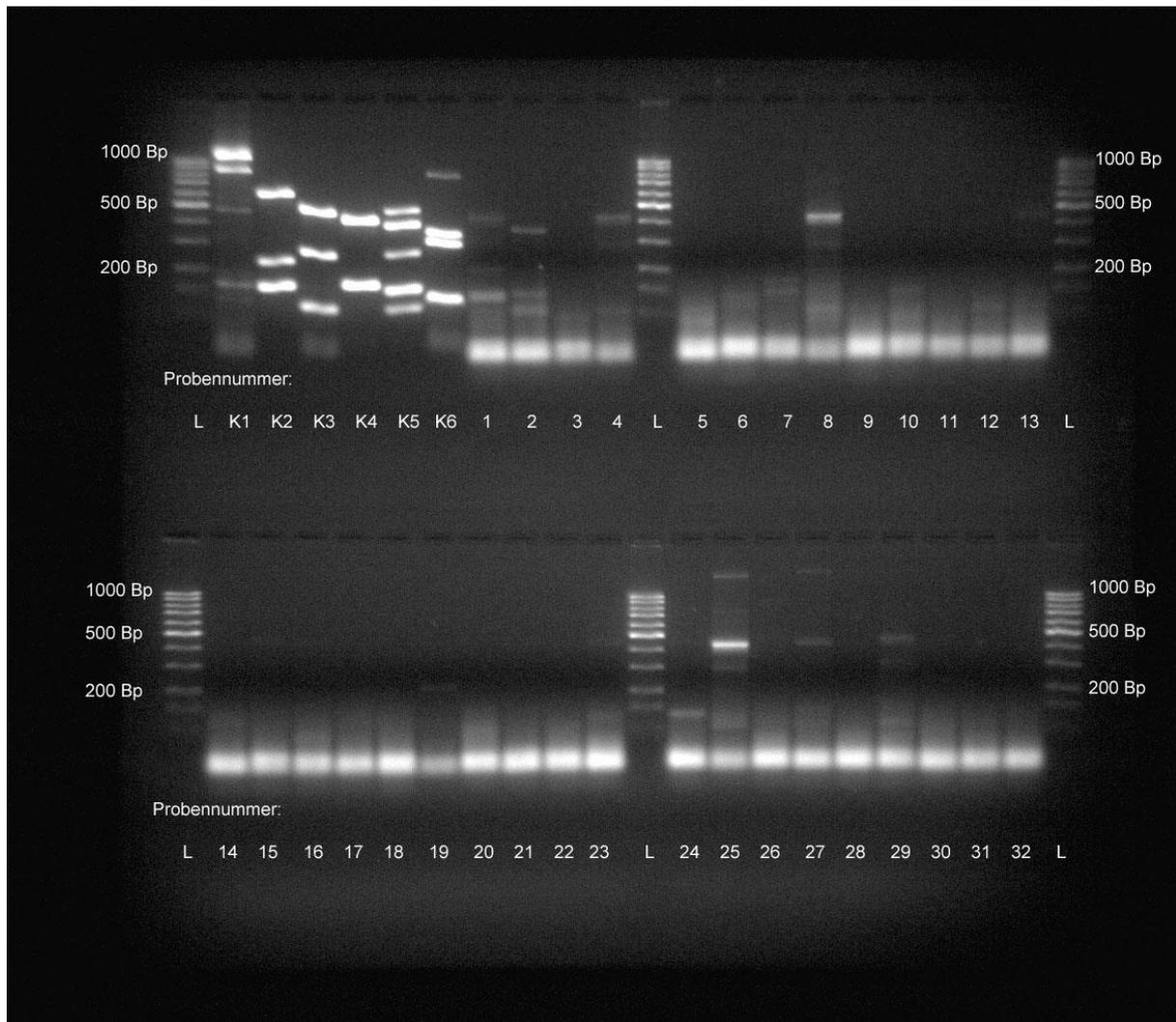


Abbildung 2: Aufnahme des Gels der Kotproben 1–32 zur Darstellung der untersuchten Pathogenitätsgene; L= DNA-Marker von 1000 Bp–100 Bp, K1–K6 = *E. coli* Stämme als Positiv- bzw. Negativkontrolle; K1 = Negativkontrolle (*E. coli*-Stamm DSM 2840); K2 = PS37, K3 = PS79; K4 = PS90, K5 = IMT203/7, K6 = O138:F18

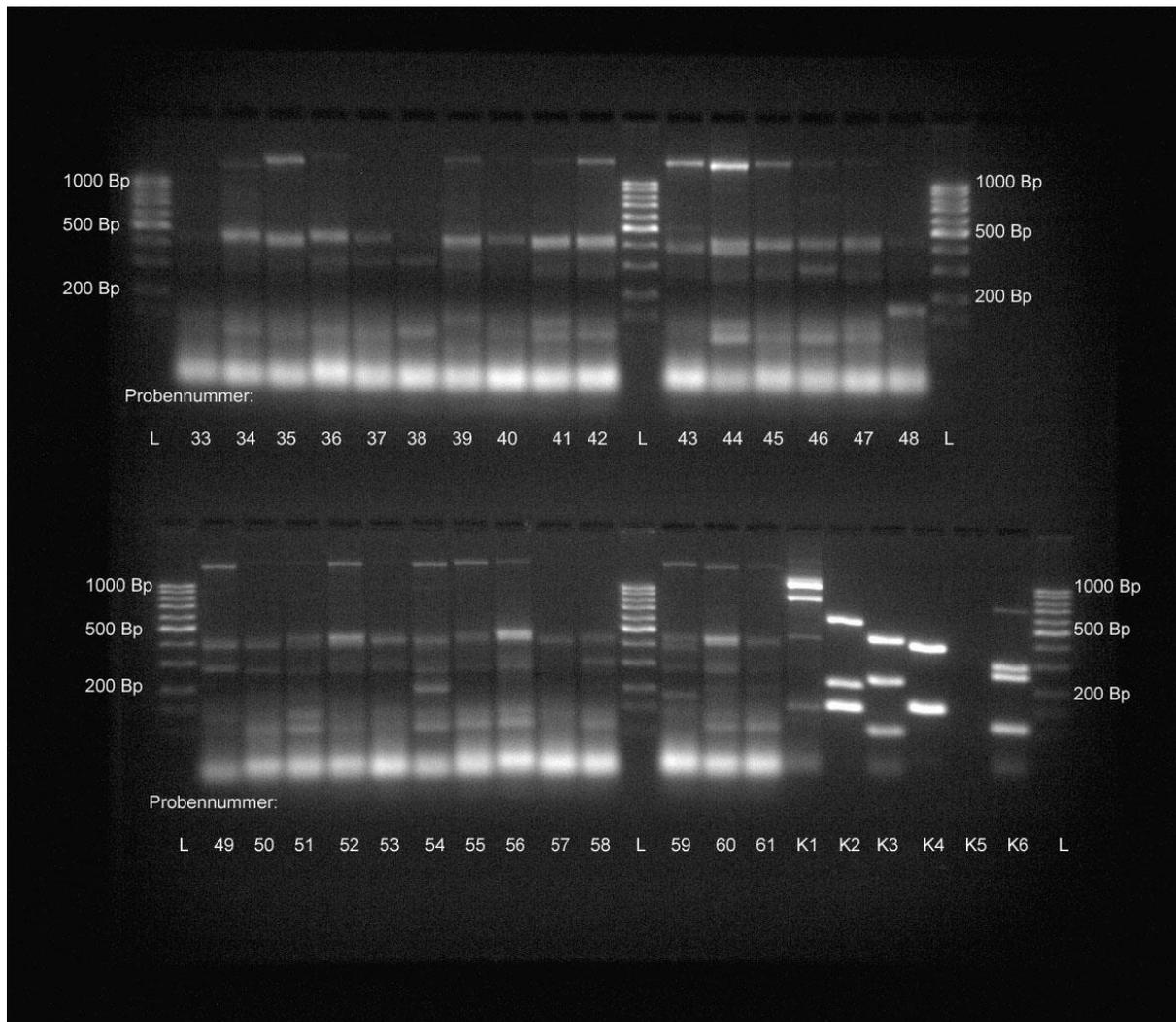


Abbildung 3: Aufnahme des Gels der Kotproben 33–61 zur Darstellung der untersuchten Pathogenitätsgene; L= DNA-Marker von 1000 Bp–100 Bp, K1–K6 = *E. coli* Stämme als Positiv- bzw. Negativkontrolle; K1 = Negativkontrolle (*E. coli*-Stamm DSM 2840); K2 = PS37, K3 = PS79; K4 = PS90, K5 = IMT 203/7, K6 = O138:F18

## Ergebnisse

Tabelle 17: Vorkommen von *Escherichia coli*-Pathogenitätsgenen in den Kotproben (n = 60) der Katzen, unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration und -qualität im Futter

Pathogenitätsgen	Vorkommen in % (Anzahl positiver Proben)
<i>fas A</i>	51,7 (31)
<i>fed A</i>	38,3 (23)
<i>est-II</i>	31,7 (16)
<i>est-Ib</i>	16,7 (10)
<i>fan</i>	5,00 (3)
<i>elt-IA</i>	0 (0)
<i>fae G</i>	0 (0)
<i>fimf41a</i>	0 (0)

Tabelle 18: Vorkommen von *Escherichia coli*-Pathogenitätsgenen in den Kotproben (n = 10) der Katzen in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration und -qualität im Futter

Pathogenitätsgen	Geringe Proteinqualität			Hohe Proteinqualität		
	36,7 % <sup>1</sup>	45,0 %	56,1 %	36,2 %	43,3 %	54,9 %
Pathogenitätsgen	Vorkommen in % (Anzahl positiver Proben)					
<i>fas A</i>	50 (5)	70 (7)	50 (5)	60 (6)	40 (4)	40 (4)
<i>fed A</i>	40 (4)	60 (6)	50 (5)	20 (2)	20 (2)	40 (4)
<i>est-II</i>	10 (1)	50 (5)	50 (5)	40 (4)	10 (1)	30 (3)
<i>est-Ib</i>	10 (1)	40 (4)	20 (2)	20 (2)	0 (0)	10 (1)
<i>fan</i>	10 (1)	10 (1)	0 (0)	0 (0)	10 (1)	0 (0)
<i>elt-IA</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>fae G</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>fimf41 a</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

<sup>1</sup>Proteingehalt der Versuchsfuttermittel

## 4.5 Next Generation Sequencing (Illumina®)

### 4.5.1 Relatives Vorkommen bakterieller Phyla im Kot von Katzen, unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration und -qualität im Futter

Die unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration und -qualität im Futter vorgefundenen bakteriellen Phyla in den Kotproben der Katzen werden in Tabelle 19 aufgeführt. Den größten relativen Anteil nahm das Phylum *Firmicutes* mit rund 79 % ein. Es folgten die Phyla *Bacteroidetes* (7,63 %), *Actinobacteria* (6,55 %) sowie *Fusobacteria* (4,46 %). Das Vorkommen weiterer detektierter Phyla in den Kotproben der Katzen war mit Werten unter 1 % gering. In den 60 untersuchten Kotproben der Katzen konnten stets die

Phyla *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria* und *Proteobacteria* identifiziert werden. Dagegen wurde lediglich in 13 Kotproben das Phylum *Synergistetes* sowie nur in 2 Kotproben das Phylum *Chlamydiae* detektiert.

Tabelle 19: Relatives Vorkommen [%] bakterieller Phyla im Kot von Katzen (n = 10), unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration und -qualität im Futter (Mittelwert (Mw) ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM))

Phylum	Mw	SEM	Anzahl positiver Proben <sup>1</sup>
<i>Firmicutes</i>	78,7	± 1,12	60
<i>Bacteroidetes</i>	7,63	± 0,79	60
<i>Actinobacteria</i>	6,55	± 0,50	60
<i>Fusobacteria</i>	4,46	± 0,62	60
<i>Bacteria</i> <sup>2</sup>	1,79	± 0,33	60
<i>Proteobacteria</i>	0,89	± 0,16	60
<i>Chlamydiae</i>	0,04	± 0,03	2
Nicht zugeordnete Sequenzen	0,02	± 0,00	17
<i>Synergistetes</i>	0,01	± 0,00	13

<sup>1</sup>Gesamtanzahl der untersuchten Proben: 60 (= 6 Kotproben pro Katze) <sup>2</sup>nicht weiter klassifizierte Domäne

#### 4.5.2 Relatives Vorkommen bakterieller Familien sowie Genera im Kot von Katzen, unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration und -qualität im Futter

Eine Darstellung der Bakteriengenera im Kot der Katzen, welche unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration und -qualität im Futter vorgefunden wurden, liefert Tabelle 20. Dabei nahmen die Bakteriengenera *Clostridium* (20,3 %) und *Blautia* (17,4 %) sowie die Familie der *Peptostreptococcaceae* (12,5 %) den größten Anteil ein. Die Mehrzahl der Bakteriengenera, welche in den Kotproben der Katzen mittels der Illumina®-Sequenzierung identifiziert wurden, lag unter 1 %.

## Ergebnisse

Tabelle 20: Relatives Vorkommen [%] bakterieller Genera im Kot von Katzen (n = 10), unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration und -qualität im Futter (Mittelwert (Mw) ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM))

Bakteriengruppe	Mw	SEM	Anzahl positiver Proben <sup>1</sup>
<i>Clostridium</i>	20,3	± 1,22	60
<i>Blautia</i>	17,4	± 1,10	60
<i>Peptostreptococcaceae</i> <sup>2</sup>	12,5	± 0,86	60
<i>Prevotella</i>	4,60	± 0,62	60
<i>Collinsella</i>	4,54	± 0,37	60
<i>Fusobacterium</i>	4,46	± 0,62	60
<i>Eubacterium</i>	3,82	± 0,34	60
<i>Robinsoniella</i>	3,22	± 0,36	60
<i>Roseburia</i>	3,00	± 0,36	59
<i>Selenomonas</i>	2,70	± 0,22	55
<i>Erysipelotrichaceae</i> <sup>2</sup>	2,66	± 0,36	60
<i>Bacteroides</i>	2,41	± 0,29	58
<i>Atopobium</i>	2,23	± 0,28	20
<i>Bacteria</i> <sup>2</sup>	1,79	± 0,33	60
<i>Ruminococcus</i>	1,60	± 0,16	59
<i>Faecalibacterium</i>	1,32	± 0,15	60
<i>Alkaliphilus</i>	1,26	± 0,34	59
<i>Lactococcus</i>	1,09	± 0,25	45
<i>Butyricoccus</i>	1,06	± 0,10	58
<i>Gordonibacter</i>	1,01	± 0,21	60

<sup>1</sup>Gesamtanzahl der untersuchten Proben: 60 (= 6 Kotproben pro Katze) <sup>2</sup>nicht weiter klassifizierte Bakterienklasse, -ordnung oder -familie

## Ergebnisse

Fortsetzung Tabelle 20: Relatives Vorkommen [%] bakterieller Genera im Kot von Katzen (n = 10), unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration und -qualität im Futter (Mittelwert (Mw) ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM))

Bakteriengruppe	Mw	SEM	Anzahl positiver Proben <sup>1</sup>
<i>Peptococcus</i>	0,99	± 0,14	48
<i>Ethanoligenens</i>	0,94	± 0,10	60
<i>Erysipelothrix</i>	0,91	± 0,14	33
<i>Vagococcus</i>	0,87	± 0,74	32
<i>Hespiella</i>	0,86	± 0,20	46
<i>Leuconostoc</i>	0,76	± 0,30	25
<i>Clostridiales</i> <sup>2</sup>	0,76	± 0,12	59
<i>Peptostreptococcus</i>	0,67	± 0,43	39
<i>Anaerobiospirillum</i>	0,59	± 0,13	49
<i>Butyrivibrio</i>	0,58	± 0,09	58
<i>Raoultella</i>	0,57	± 0,33	10
<i>Lachnospiraceae</i> <sup>2</sup>	0,48	± 0,11	39
<i>Phascolarctobacterium</i>	0,43	± 0,07	60
<i>Bacillus</i>	0,32	± 0,17	41
<i>Oxobacter</i>	0,28	± 0,15	12
<i>Megamonas</i>	0,27	± 0,12	35
<i>Enterococcus</i>	0,27	± 0,07	54
<i>Campylobacter</i>	0,25	± 0,20	16
<i>Parabacteroides</i>	0,22	± 0,04	55
<i>Porphyromonas</i>	0,22	± 0,02	56

<sup>1</sup>Gesamtanzahl der untersuchten Proben: 60 (= 6 Kotproben pro Katze) <sup>2</sup>nicht weiter klassifizierte Bakterienklasse, -ordnung oder -familie

## Ergebnisse

Fortsetzung Tabelle 20: Relatives Vorkommen [%] bakterieller Genera im Kot von Katzen (n = 10), unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration und -qualität im Futter (Mittelwert (Mw) ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM))

Bakteriengruppe	Mw	SEM	Anzahl positiver Proben <sup>1</sup>
<i>Alistipes</i>	0,21	± 0,11	37
<i>Anaerostipes</i>	0,20	± 0,08	14
<i>Helicobacter</i>	0,20	± 0,05	32
<i>Cellulosilyticum</i>	0,19	± 0,05	31
<i>Odoribacter</i>	0,16	± 0,02	54
<i>Desulfovibrio</i>	0,15	± 0,03	12
<i>Slackia</i>	0,14	± 0,06	49
<i>Ureibacillus</i>	0,13	± 0,08	20
<i>Ruminococcaceae</i> <sup>2</sup>	0,12	± 0,02	56
<i>Propionibacterium</i>	0,11	± 0,05	12
<i>Corynebacterium</i>	0,11	± 0,09	23
<i>Dialister</i>	0,10	± 0,02	47
<i>Cryptobacterium</i>	0,05	± 0,01	14
<i>Veillonella</i>	0,05	± 0,01	17
<i>Carnobacterium</i>	0,04	± 0,01	10
<i>Arthrobacter</i>	0,04	± 0,01	20
<i>Paraprevotella</i>	0,04	± 0,01	33
<i>Betaproteobacteria</i> <sup>2</sup>	0,02	± 0,00	26
<i>Anaplasma</i>	0,02	± 0,00	33
Nicht zugeordnete Sequenzen	0,02	± 0,00	18
<i>Pyramidobacter</i>	0,01	± 0,00	12

<sup>1</sup>Gesamtanzahl der untersuchten Proben: 60 (= 6 Kotproben pro Katze)

<sup>2</sup>nicht weiter klassifizierte Bakterienklasse, -ordnung oder -familie

### **4.5.3 Einfluss der Proteinkonzentration und -qualität im Futter auf das Vorkommen bakterieller Phyla und Genera im Kot von Katzen**

#### **4.5.3.1 Bakterielle Phyla**

Die Untersuchung von fütterungsabhängigen Effekten (Tabellen 21 und 22) auf das Vorkommen bakterieller Phyla im Kot der Katzen konnte einen höheren Anteil an *Firmicutes* ( $P < 0,001$ ) sowie einen geringeren Anteil an *Bacteroidetes* ( $P = 0,008$ ) bei Einsatz der Versuchsdiäten mit einer hohen Eiweißqualität aufzeigen (Tabelle 22). Für das Phylum *Fusobacteria* konnte sowohl ein linearer Effekt der Proteinkonzentration ( $P = 0,006$ ) als auch ein Einfluss der Proteinqualität ( $P = 0,040$ ) im Futter festgestellt werden. So führten steigende Proteingehalte in den Versuchsdiäten zu einem Anstieg des relativen Anteils an *Fusobacteria* im Kot der Katzen. Zudem wurden höhere Anteile an *Fusobacteria* im Kot der Katzen bei Einsatz der Futtermittel mit einer geringeren Proteinqualität nachgewiesen. Eine Interaktion zwischen der Proteinkonzentration und -qualität im Futter wurde für das Vorkommen von *Proteobacteria* im Kot der Katzen vorgefunden ( $P = 0,039$ ). So wurden bei Einsatz der Versuchsfuttermittel mit der geringeren Eiweißqualität die höchsten Anteile sowie bei Fütterung der Versuchsdiäten mit der höheren Eiweißqualität die geringsten Anteile an *Proteobacteria* im Kot ermittelt, wenn gleichzeitig eine mittlere Proteinkonzentration im Futter vorlag (quadratischer Effekt;  $P = 0,032$  und  $P = 0,022$ ). Kein fütterungsassoziierter Einfluss konnte für das Phylum *Actinobacteria* sowie für nicht weiter klassifizierte *Bacteria* ermittelt werden. Aufgrund einer zu geringen Detektionsfrequenz konnte für das Phylum *Synergistetes* keine fütterungsabhängige Auswertung vorgenommen werden.

## Ergebnisse

Tabelle 21: Anteil bakterieller Phyla [%] im Kot von Katzen (n = 10) bei einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität im Futter (Mittelwert; gruppenunabhängiger Standardfehler des Mittelwerts (SEM)); die statistische Datenauswertung in Form von polynomialen Kontrasten wird in Tabelle 22 wiedergegeben.

	Geringe Proteinqualität						Hohe Proteinqualität						SEM
	36,7 % <sup>1</sup>		45,0 %		56,1 %		36,2 %		43,3 %		54,9 %		
<i>Firmicutes</i>	79,8	(10) <sup>2</sup>	71,1	(10)	75,1	(10)	82,5	(10)	84,3	(10)	79,2	(10)	1,12
<i>Bacteroidetes</i>	8,47	(10)	13,9	(10)	6,80	(10)	6,46	(10)	4,83	(10)	5,34	(10)	0,79
<i>Actinobacteria</i>	7,68	(10)	3,87	(10)	8,15	(10)	5,75	(10)	6,94	(10)	6,93	(10)	0,50
<i>Fusobacteria</i>	2,22	(10)	5,96	(10)	7,96	(10)	2,09	(10)	2,65	(10)	5,90	(10)	0,62
<i>Bacteria</i> <sup>3</sup>	1,27	(10)	3,49	(10)	1,57	(10)	2,09	(10)	0,91	(10)	1,41	(10)	0,33
<i>Proteobacteria</i>	0,57	(10)	1,67	(10)	0,38	(10)	1,14	(10)	0,33	(10)	1,23	(10)	0,16
<i>Synergistetes</i>	-	(1)	0,01	(2)	0,01	(2)	0,01	(3)	-	(1)	0,01	(4)	0,00

<sup>1</sup>Proteingehalt der Versuchsfuttermittel <sup>2</sup>Anzahl positiver Proben

<sup>3</sup>nicht weiter klassifizierte Domäne

## Ergebnisse

Tabelle 22: Darstellung der ermittelten polynomialen Kontraste für den Anteil bakterieller Phyla [%] im Kot von Katzen bei Einsatz von Versuchsdieten mit einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität (vgl. Tabelle 21)

	<b>P-Werte (polynomiale Kontraste)</b>								n <sup>1</sup>
	Interaktion	Geringe Proteinqualität		Hohe Proteinqualität		Proteinkonzentration		Proteinqualität	
		Linear	Quadratisch	Linear	Quadratisch	Linear	Quadratisch		
<i>Firmicutes</i>	0,102	-	-	-	-	0,092	0,633	<b>0,000</b>	10
<i>Bacteroidetes</i>	0,169	-	-	-	-	0,205	0,104	<b>0,008</b>	10
<i>Actinobacteria</i>	0,138	-	-	-	-	0,429	0,168	0,979	10
<i>Fusobacteria</i>	0,422	-	-	-	-	<b>0,006</b>	0,881	<b>0,040</b>	10
<i>Bacteria</i> <sup>2</sup>	0,064	-	-	-	-	0,800	0,497	0,366	10
<i>Proteobacteria</i>	<b>0,039</b>	0,540	<b>0,032</b>	0,913	<b>0,022</b>	-	-	-	10
<i>Synergistetes</i> <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Darstellung der polynomialen Kontraste: Bei einer nicht signifikanten Interaktion zwischen der Proteinkonzentration und -qualität im Futter werden die linearen und quadratischen Kontraste für die Proteinkonzentration (Gruppeneffekte für beide Eiweißqualitäten) sowie der *P*-Wert für die Proteinqualität im Futter aufgeführt. Bei einer signifikanten Interaktion zwischen der Proteinkonzentration und -qualität im Futter werden die linearen und quadratischen Effekte der Proteinkonzentration einzeln für die hohe und geringere Eiweißqualität im Futter angegeben. <sup>1</sup>Anzahl gültiger Fälle <sup>2</sup>nicht weiter klassifizierte Domäne

<sup>3</sup>Berechnung polynomialer Kontraste nicht möglich.

#### 4.5.3.2 Bakterielle Genera

Für das Vorkommen bakterieller Genera im Kot der Katzen wurde ebenfalls ein Einfluss der Proteinkonzentration und -qualität im Futter nachgewiesen (Tabellen 23 und 24). So nahmen die relativen Anteile von *Prevotella* im Kot mit steigenden Proteingehalten im Futter ab ( $P = 0,011$ ) und waren zudem bei einer geringeren Eiweißqualität in den Versuchsdiäten höher als bei einer hohen Eiweißqualität im Futter ( $P = 0,011$ ). Auch für das Genus *Fusobacterium* wurden höhere Anteile im Kot der Katzen nachgewiesen, wenn die Versuchsfuttermittel mit der geringeren Proteinqualität eingesetzt wurden ( $P = 0,039$ ). Im Gegensatz zu den beobachteten Effekten bei *Prevotella* nahm der prozentuale Anteil an *Fusobacterium* im Kot bei steigenden Proteingehalten im Futter allerdings zu ( $P = 0,006$ ).

Für das Genus *Robinsoniella* konnte eine Interaktion zwischen der Proteinkonzentration und -qualität im Futter ermittelt werden ( $P = 0,031$ ). Während bei Einsatz der Versuchsdiäten mit der geringeren Proteinqualität ein linearer Anstieg an *Robinsoniella* im Kot der Katzen mit steigenden Proteingehalten im Futter detektiert wurde ( $P = 0,003$ ), lagen bei Fütterung der Diäten mit der hohen Proteinqualität die geringsten Anteile an *Robinsoniella* im Kot vor, wenn das Futter mit der höchsten Proteinkonzentration bei den Katzen eingesetzt wurde ( $P = 0,044$ ).

Steigende Proteingehalte im Futter führten zu insgesamt höheren Anteilen an *Bacteroides* ( $P = 0,020$ ) und *Parabacteroides* ( $P = 0,029$ ) sowie zu geringeren Anteilen an *Faecalibacterium* ( $P = 0,001$ ) und *Phascolarctobacterium* ( $P = 0,004$ ) im Kot der Katzen. Für *Ethanoligenens* wurden bei Einsatz der Versuchsdiäten mit der geringeren Proteinqualität höhere Anteile im Kot der Katzen als bei der Fütterung der Diäten mit der hohen Proteinqualität nachgewiesen ( $P = 0,015$ ).

Wie in Tabelle 23 dargestellt, konnten einige Bakteriengenera nicht in allen Kotproben der Katzen nachgewiesen werden. Zudem war eine statistische Datenauswertung für die Bakteriengenera *Atopobium*, *Leuconostoc*, *Desulfovibrio*, *Megamonas*, *Anaerostipes*, *Raoultella*, *Bacillus*, *Cryptobacterium*, *Propionibacterium*, *Ureibacillus*, *Veillonella*, *Arthrobacter*, *Carnobacterium*, *Oxobacter*, *Alistipes*, *Peptostreptococcus*, *Vagococcus*, *Campylobacter*, *Anaplasma*, *Corynebacterium* und *Pyramidobacter* sowie für die Bakterienfamilie der *Lachnospiraceae* und für die Klasse der *Betaproteobacteria* aufgrund eines zu geringen Vorkommens dieser Bakteriengruppen in den Kotproben der Katzen nicht möglich.

## Ergebnisse

Tabelle 23: Anteil bakterieller Genera [%] im Kot von Katzen (n = 10) bei einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität im Futter (Mittelwert; gruppenunabhängiger Standardfehler des Mittelwerts (SEM)); die statistische Datenauswertung in Form von polynomialen Kontrasten wird in Tabelle 24 wiedergegeben.

	Geringe Proteinqualität						Hohe Proteinqualität						SEM
	36,7 % <sup>1</sup>		45,0 %		56,1 %		36,2 %		43,3 %		54,9 %		
<i>Clostridium</i>	17,6	(10) <sup>2</sup>	21,6	(10)	16,2	(10)	21,2	(10)	25,3	(10)	19,7	(10)	1,22
<i>Blautia</i>	20,7	(10)	14,8	(10)	13,0	(10)	19,1	(10)	19,0	(10)	17,4	(10)	1,10
<i>Peptostreptococcaceae</i> <sup>3</sup>	10,0	(10)	9,30	(10)	13,8	(10)	12,5	(10)	14,2	(10)	15,4	(10)	0,86
<i>Prevotella</i>	6,99	(10)	9,36	(10)	2,87	(10)	3,81	(10)	2,91	(10)	1,63	(10)	0,62
<i>Collinsella</i>	5,32	(10)	2,64	(10)	5,05	(10)	4,45	(10)	4,59	(10)	5,21	(10)	0,37
<i>Fusobacterium</i>	2,22	(10)	5,96	(10)	7,96	(10)	2,09	(10)	2,65	(10)	5,90	(10)	0,62
<i>Eubacterium</i>	3,95	(10)	4,10	(10)	5,11	(10)	2,66	(10)	2,75	(10)	4,36	(10)	0,34
<i>Robinsoniella</i>	1,98	(10)	2,50	(10)	5,12	(10)	3,64	(10)	4,11	(10)	1,96	(10)	0,36
<i>Roseburia</i>	2,30	(10)	3,19	(10)	3,66	(10)	2,98	(10)	2,75	(9)	3,10	(10)	0,36
<i>Selemonas</i>	2,82	(8)	2,46	(10)	2,91	(9)	2,39	(10)	2,62	(8)	3,04	(10)	0,22
<i>Erysipelothrichaceae</i> <sup>3</sup>	6,09	(10)	1,86	(10)	1,73	(10)	3,16	(10)	1,57	(10)	1,56	(10)	0,36
<i>Bacteroides</i>	1,10	(10)	3,49	(10)	3,18	(10)	2,13	(10)	1,76	(8)	2,67	(10)	0,29
<i>Atopobium</i>	3,29	(3)	1,29	(3)	3,23	(5)	1,67	(3)	1,76	(3)	1,45	(3)	0,28
<i>Bacteria</i> <sup>3</sup>	1,27	(10)	3,49	(10)	1,57	(10)	2,09	(10)	0,91	(10)	1,41	(10)	0,33
<i>Ruminococcus</i>	1,61	(10)	1,48	(10)	1,75	(10)	1,13	(10)	1,84	(9)	1,79	(10)	0,16
<i>Faecalibacterium</i>	2,44	(10)	1,18	(10)	0,95	(10)	2,00	(10)	0,82	(10)	0,53	(10)	0,15
<i>Alkaliphilus</i>	1,52	(10)	0,97	(10)	1,15	(10)	0,42	(9)	2,76	(10)	0,69	(10)	0,34
<i>Lactococcus</i>	0,61	(6)	0,19	(7)	1,17	(7)	1,23	(8)	2,39	(8)	0,75	(9)	0,25

<sup>1</sup>Proteingehalt der Versuchsfuttermittel <sup>2</sup>Anzahl positiver Proben <sup>3</sup>nicht weiter klassifizierte Domäne, Bakterienklasse, -ordnung oder -familie

## Ergebnisse

Fortsetzung Tabelle 23: Anteil bakterieller Genera [%] im Kot von Katzen (n = 10) bei einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität im Futter (Mittelwert; gruppenunabhängiger Standardfehler des Mittelwerts (SEM)); die statistische Datenauswertung in Form von polynomialen Kontrasten wird in Tabelle 24 wiedergegeben.

	Geringe Proteinqualität						Hohe Proteinqualität						SEM
	36,7 % <sup>1</sup>		45,0 %		56,1 %		36,2 %		43,3 %		54,9 %		
<i>Butyricococcus</i>	1,12	(10) <sup>2</sup>	1,08	(9)	1,59	(10)	0,78	(9)	0,88	(10)	0,89	(10)	0,10
<i>Gordonibacter</i>	1,18	(10)	0,70	(10)	1,16	(10)	0,43	(10)	1,71	(10)	0,86	(10)	0,21
<i>Peptococcus</i>	0,49	(6)	0,77	(6)	1,17	(9)	1,22	(9)	0,94	(10)	1,15	(8)	0,14
<i>Ethanoligenens</i>	0,96	(10)	1,19	(10)	1,63	(10)	0,56	(10)	0,34	(10)	0,93	(10)	0,10
<i>Erysipelothrix</i>	1,35	(6)	0,83	(4)	0,87	(7)	0,66	(6)	1,23	(5)	0,46	(5)	0,14
<i>Vagococcus</i>	0,03	(6)	0,19	(2)	0,73	(3)	0,07	(7)	0,05	(8)	4,04	(6)	0,74
<i>Hespellia</i>	0,61	(7)	0,87	(6)	1,35	(10)	1,53	(8)	0,16	(8)	0,46	(7)	0,20
<i>Leuconostoc</i>	0,88	(6)	-	(1)	0,05	(3)	0,53	(6)	0,68	(6)	2,08	(3)	0,30
<i>Clostridiales</i> <sup>3</sup>	1,00	(9)	0,95	(10)	0,69	(10)	0,76	(10)	0,56	(10)	0,64	(10)	0,12
<i>Peptostreptococcus</i>	1,53	(5)	0,23	(8)	0,13	(6)	2,19	(7)	0,03	(7)	0,09	(6)	0,43
<i>Anaerobiospirillum</i>	0,46	(8)	1,12	(10)	0,30	(9)	0,70	(8)	0,27	(6)	0,53	(8)	0,13
<i>Butyrivibrio</i>	0,51	(10)	0,55	(10)	0,48	(10)	0,88	(9)	0,72	(9)	0,36	(10)	0,09
<i>Raoultella</i>	-	(1)	-	(1)	-	(1)	1,62	(2)	0,15	(4)	-	(1)	0,33
<i>Lachnospiraceae</i> <sup>3</sup>	0,17	(6)	0,96	(7)	0,34	(8)	0,71	(5)	0,29	(8)	0,48	(5)	0,11
<i>Phascolarctobacterium</i>	0,68	(10)	0,60	(10)	0,33	(10)	0,54	(10)	0,20	(10)	0,24	(10)	0,07
<i>Bacillus</i>	0,40	(6)	0,23	(5)	0,05	(7)	0,88	(8)	0,05	(9)	0,27	(6)	0,17
<i>Oxobacter</i>	-	(0)	-	(1)	0,02	(2)	0,06	(5)	0,11	(2)	0,69	(2)	0,15
<i>Megamonas</i>	0,76	(7)	0,29	(8)	0,11	(6)	0,06	(6)	0,10	(4)	0,10	(4)	0,12

<sup>1</sup>Proteingehalt der Versuchsfuttermittel <sup>2</sup>Anzahl positiver Proben <sup>3</sup>nicht weiter klassifizierte Domäne, Bakterienklasse, -ordnung oder -familie

## Ergebnisse

Fortsetzung Tabelle 23: Anteil bakterieller Genera [%] im Kot von Katzen (n = 10) bei einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität im Futter (Mittelwert; gruppenunabhängiger Standardfehler des Mittelwerts (SEM)); die statistische Datenauswertung in Form von polynomialen Kontrasten wird in Tabelle 24 wiedergegeben.

	Geringe Proteinqualität						Hohe Proteinqualität						SEM
	36,7 % <sup>1</sup>		45,0 %		56,1 %		36,2 %		43,3 %		54,9 %		
<i>Enterococcus</i>	0,19	(9) <sup>2</sup>	0,28	(10)	0,14	(10)	0,40	(10)	0,10	(9)	0,61	(6)	0,07
<i>Campylobacter</i>	0,02	(2)	0,68	(5)	0,13	(3)	0,05	(3)	0,01	(2)	-	(1)	0,20
<i>Parabacteroides</i>	0,11	(10)	0,32	(10)	0,19	(10)	0,22	(9)	0,21	(7)	0,28	(9)	0,04
<i>Porphyromonas</i>	0,15	(10)	0,24	(10)	0,25	(10)	0,16	(10)	0,24	(7)	0,28	(9)	0,02
<i>Alistipes</i>	0,04	(5)	0,23	(7)	0,13	(9)	0,03	(5)	0,03	(5)	0,72	(6)	0,11
<i>Anaerostipes</i>	0,05	(2)	0,07	(2)	0,48	(3)	0,06	(4)	0,27	(3)	-	(0)	0,08
<i>Helicobacter</i>	0,15	(6)	0,31	(6)	0,14	(4)	0,31	(6)	0,16	(4)	0,08	(6)	0,05
<i>Cellulosilyticum</i>	0,07	(5)	0,14	(4)	0,09	(7)	0,44	(5)	0,16	(4)	0,24	(6)	0,05
<i>Odoribacter</i>	0,07	(10)	0,25	(10)	0,17	(10)	0,13	(9)	0,19	(9)	0,15	(6)	0,02
<i>Desulfovibrio</i>	0,16	(3)	-	(0)	0,11	(3)	0,08	(2)	-	(1)	0,24	(3)	0,03
<i>Slackia</i>	0,05	(8)	0,03	(8)	0,23	(10)	0,38	(8)	0,04	(7)	0,10	(8)	0,06
<i>Ureibacillus</i>	0,09	(3)	0,06	(5)	0,05	(3)	0,43	(4)	0,02	(4)	-	(1)	0,08
<i>Ruminococcaceae</i> <sup>3</sup>	0,09	(10)	0,13	(10)	0,12	(10)	0,12	(10)	0,10	(7)	0,17	(9)	0,02
<i>Propionibacterium</i>	0,05	(2)	0,22	(2)	0,04	(3)	-	(1)	0,04	(3)	-	(1)	0,05
<i>Corynebacterium</i>	0,02	(3)	-	(1)	0,01	(3)	0,01	(6)	0,01	(4)	0,37	(6)	0,09
<i>Dialister</i>	0,20	(8)	0,09	(9)	0,07	(10)	0,06	(10)	0,05	(7)	0,16	(3)	0,02
<i>Cryptobacterium</i>	0,04	(4)	-	(1)	0,08	(4)	-	(1)	0,03	(2)	0,02	(2)	0,01

<sup>1</sup>Proteingehalt der Versuchsfuttermittel <sup>2</sup>Anzahl positiver Proben <sup>3</sup>nicht weiter klassifizierte Domäne, Bakterienklasse, -ordnung oder -familie

## Ergebnisse

Fortsetzung Tabelle 23: Anteil bakterieller Genera [%] im Kot von Katzen (n = 10) bei einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität im Futter (Mittelwert; gruppenunabhängiger Standardfehler des Mittelwerts (SEM)); die statistische Datenauswertung in Form von polynomialen Kontrasten wird in Tabelle 24 wiedergegeben.

	Geringe Proteinqualität						Hohe Proteinqualität						SEM
	36,7 % <sup>1</sup>		45,0 %		56,1 %		36,2 %		43,3 %		54,9 %		
<i>Veillonella</i>	0,06	(4) <sup>2</sup>	0,04	(3)	0,05	(4)	0,06	(2)	0,03	(2)	0,02	(2)	0,01
<i>Carnobacterium</i>	0,05	(3)	-	(1)	-	(1)	-	(1)	0,04	(2)	0,03	(2)	0,01
<i>Arthrobacter</i>	0,07	(2)	0,05	(4)	-	(1)	0,03	(5)	0,03	(5)	0,05	(4)	0,01
<i>Paraprevotella</i>	0,06	(5)	0,04	(7)	0,02	(6)	0,04	(6)	0,03	(5)	0,03	(4)	0,01
<i>Betaproteobacteria</i> <sup>3</sup>	0,05	(5)	0,02	(2)	0,03	(3)	0,01	(6)	0,04	(5)	0,02	(5)	0,00
<i>Anaplasma</i>	0,02	(7)	0,02	(7)	0,01	(4)	0,04	(6)	0,01	(4)	0,02	(5)	0,00
<i>Nicht zugeordnet</i>	0,01	(4)	0,04	(3)	-	(1)	-	(1)	0,01	(6)	0,02	(3)	0,00
<i>Pyramidobacter</i>	-	(0)	0,01	(2)	0,01	(2)	0,01	(3)	-	(1)	0,01	(4)	0,00

<sup>1</sup>Proteingehalt der Versuchsfuttermittel <sup>2</sup>Anzahl positiver Proben <sup>3</sup>nicht weiter klassifizierte Domäne, Bakterienklasse, -ordnung oder -familie

## Ergebnisse

Tabelle 24: Darstellung der ermittelten polynomialen Kontraste für den relativen Anteil bakterieller Genera [%] im Kot von Katzen bei Einsatz von Versuchsdiäten mit einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität (vgl. Tabelle 23)

	<b>P-Werte (polynomiale Kontraste)</b>								n <sup>1</sup>
	Interaktion	Geringe Proteinqualität		Hohe Proteinqualität		Proteinkonzentration		Proteinqualität	
		Linear	Quadratisch	Linear	Quadratisch	Linear	Quadratisch		
<i>Clostridium</i>	0,988	-	-	-	-	0,587	0,133	0,142	10
<i>Blautia</i>	0,489	-	-	-	-	0,070	0,704	0,247	10
<i>Peptostreptococcaceae</i> <sup>2</sup>	0,647	-	-	-	-	0,097	0,555	0,089	10
<i>Collinsella</i>	0,277	-	-	-	-	0,788	0,165	0,513	10
<i>Prevotella</i>	0,160	-	-	-	-	<b>0,011</b>	0,064	<b>0,011</b>	10
<i>Eubacterium</i>	0,855	-	-	-	-	0,138	0,447	0,119	10
<i>Fusobacterium</i>	0,422	-	-	-	-	<b>0,006</b>	0,881	<b>0,039</b>	10
<i>Selenomonas</i>	0,454	-	-	-	-	0,746	0,434	0,979	5
<i>Robinsoniella</i>	<b>0,031</b>	<b>0,003</b>	0,240	<b>0,044</b>	0,368	-	-	-	10
<i>Roseburia</i>	0,738	-	-	-	-	0,463	0,863	0,570	9
<i>Bacteroides</i>	0,289	-	-	-	-	<b>0,020</b>	0,320	0,475	8
<i>Erysipelothrichaceae</i> <sup>2</sup>	0,178	-	-	-	-	<b>0,002</b>	<b>0,011</b>	0,111	10

Darstellung der polynomialen Kontraste: Bei einer nicht signifikanten Interaktion zwischen der Proteinkonzentration und -qualität im Futter werden die linearen und quadratischen Kontraste für die Proteinkonzentration (Gruppeneffekte für beide Eiweißqualitäten) sowie der P-Wert für die Proteinqualität im Futter aufgeführt. Bei einer signifikanten Interaktion zwischen der Proteinkonzentration und -qualität im Futter werden die linearen und quadratischen Effekte der Proteinkonzentration einzeln für die hohe und geringere Eiweißqualität im Futter angegeben. <sup>1</sup>Anzahl gültiger Fälle <sup>2</sup>nicht weiter klassifizierte Domäne, Bakterienklasse, -ordnung oder -familie

## Ergebnisse

Fortsetzung Tabelle 24: Darstellung der ermittelten polynomialen Kontraste für den relativen Anteil bakterieller Genera [%] im Kot von Katzen bei Einsatz von Versuchsdieten mit einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität (vgl. Tabelle 23)

	<b>P-Werte (polynomiale Kontraste)</b>								n <sup>1</sup>
	Interaktion	Geringe Proteinqualität		Hohe Proteinqualität		Proteinkonzentration		Proteinqualität	
		Linear	Quadratisch	Linear	Quadratisch	Linear	Quadratisch		
<i>Ruminococcus</i>	0,584	-	-	-	-	0,355	0,720	0,679	9
<i>Faecalibacterium</i>	0,960	-	-	-	-	<b>0,001</b>	0,119	0,166	10
<i>Bacteria</i> <sup>2</sup>	0,064	-	-	-	-	0,800	0,497	0,366	10
<i>Butyricicoccus</i>	0,071	-	-	-	-	0,110	0,539	0,099	8
<i>Peptococcus</i>	0,910	-	-	-	-	0,702	0,759	0,443	2
<i>Ethanoligenens</i>	0,434	-	-	-	-	0,056	0,087	<b>0,015</b>	10
<i>Erysipelothrix</i>	0,388	-	-	-	-	0,966	0,925	0,334	2
<i>Alkaliphilus</i>	0,285	-	-	-	-	0,900	0,495	0,904	9
<i>Clostridiales</i> <sup>2</sup>	0,770	-	-	-	-	0,660	0,978	0,224	9
<i>Butyrivibrio</i>	0,611	-	-	-	-	0,258	0,704	0,507	9
<i>Gordonibacter</i>	0,263	-	-	-	-	0,711	0,516	0,965	10
<i>Hespiella</i>	0,147	-	-	-	-	0,808	0,107	0,634	4
<i>Anaerobiospirillum</i>	0,264	-	-	-	-	0,181	0,380	0,135	5

Darstellung der polynomialen Kontraste: Bei einer nicht signifikanten Interaktion zwischen der Proteinkonzentration und -qualität im Futter werden die linearen und quadratischen Kontraste für die Proteinkonzentration (Gruppeneffekte für beide Eiweißqualitäten) sowie der P-Wert für die Proteinqualität im Futter aufgeführt. Bei einer signifikanten Interaktion zwischen der Proteinkonzentration und -qualität im Futter werden die linearen und quadratischen Effekte der Proteinkonzentration einzeln für die hohe und geringere Eiweißqualität im Futter angegeben. <sup>1</sup>Anzahl gültiger Fälle <sup>2</sup>nicht weiter klassifizierte Domäne, Bakterienklasse, -ordnung oder -familie

## Ergebnisse

Fortsetzung Tabelle 24: Darstellung der ermittelten polynomialen Kontraste für den relativen Anteil bakterieller Genera [%] im Kot von Katzen bei Einsatz von Versuchsdieten mit einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität (vgl. Tabelle 23)

	<b>P-Werte (polynomiale Kontraste)</b>								n <sup>1</sup>
	Interaktion	Geringe Proteinqualität		Hohe Proteinqualität		Proteinkonzentration		Proteinqualität	
		Linear	Quadratisch	Linear	Quadratisch	Linear	Quadratisch		
<i>Lactococcus</i>	0,554	-	-	-	-	0,231	0,143	0,908	2
<i>Phascolarctobacterium</i>	0,513	-	-	-	-	<b>0,004</b>	0,767	0,183	10
<i>Porphyromonas</i>	0,928	-	-	-	-	0,128	0,692	0,716	6
<i>Parabacteroides</i>	0,649	-	-	-	-	<b>0,029</b>	0,167	0,537	5
<i>Odoribacter</i>	0,630	-	-	-	-	0,365	0,282	0,984	6
<i>Enterococcus</i>	0,389	-	-	-	-	0,719	0,524	0,559	5
<i>Helicobacter</i>	0,774	-	-	-	-	0,704	0,098	0,275	2
<i>Cellulosilyticum</i>	0,706	-	-	-	-	0,926	0,656	0,266	2
<i>Ruminococcaceae</i> <sup>2</sup>	0,506	-	-	-	-	0,164	0,644	0,752	6
<i>Dialister</i>	0,739	-	-	-	-	0,505	0,591	0,754	2
<i>Slackia</i>	0,380	-	-	-	-	0,413	0,369	0,408	3
<i>Paraprevotella</i>	0,314					0,264	0,531	0,378	2

Darstellung der polynomialen Kontraste: Bei einer nicht signifikanten Interaktion zwischen der Proteinkonzentration und -qualität im Futter werden die linearen und quadratischen Kontraste für die Proteinkonzentration (Gruppeneffekte für beide Eiweißqualitäten) sowie der *P*-Wert für die Proteinqualität im Futter aufgeführt. Bei einer signifikanten Interaktion zwischen der Proteinkonzentration und -qualität im Futter werden die linearen und quadratischen Effekte der Proteinkonzentration einzeln für die hohe und geringere Eiweißqualität im Futter angegeben. <sup>1</sup>Anzahl gültiger Fälle <sup>2</sup>nicht weiter klassifizierte Domäne, Bakterienklasse, -ordnung oder -familie

#### **4.5.4 Ökologische Indizes**

Die Betrachtung der ökologischen Indizes der fäkalen Mikrobiota der Katzen ergab für den *CHAO1*- und *Shannon-Weaver-Index* keine Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen (Tabellen 25 und 26). Die *Evenness* war bei Einsatz der Versuchsdäten mit der hohen Eiweißqualität geringer als bei der Fütterung der Diäten mit der geringeren Eiweißqualität ( $P = 0,015$ ).

## Ergebnisse

Tabelle 25: Ökologische Indizes der fäkalen Mikrobiota von Katzen bei einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität im Futter (Mittelwert; gruppenunabhängiger Standardfehler des Mittelwerts (SEM)); die statistische Datenauswertung in Form von polynomialen Kontrasten wird in Tabelle 26 wiedergegeben.

	Geringe Proteinqualität						Hohe Proteinqualität						SEM
	36,7 % <sup>1</sup>		45,0 %		56,1 %		36,2 %		43,3 %		54,9 %		
<i>CHA01-Index</i>	21.022	(10) <sup>2</sup>	26.030	(10)	24.986	(10)	30.118	(10)	23.655	(9)	26.396	(10)	1.396
<i>Shannon-Weaver-Index</i>	4,68	(10)	4,81	(10)	4,79	(10)	4,80	(10)	4,55	(9)	4,72	(10)	0,04
<i>Evenness</i>	0,56	(10)	0,56	(10)	0,55	(10)	0,54	(10)	0,53	(9)	0,55	(10)	0,00

<sup>1</sup>Proteingehalt der Versuchsfuttermittel <sup>2</sup>Anzahl gültiger Fälle

Ergebnisse

Tabelle 26: Ökologische Indizes der fäkalen Mikrobiota von Katzen bei einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität im Futter (vgl. Tabelle 25)

<b>P-Werte (polynomiale Kontraste)</b>									
	<b>Interaktion</b>	<b>Geringe Proteinqualität</b>		<b>Hohe Proteinqualität</b>		<b>Proteinkonzentration</b>		<b>Proteinqualität</b>	<b>n<sup>2</sup></b>
		<b>Linear</b>	<b>Quadratisch</b>	<b>Linear</b>	<b>Quadratisch</b>	<b>Linear</b>	<b>Quadratisch</b>		
<i>CHAO1-Index</i>	0,091	-	-	-	-	0,805	0,801	0,197	9
<i>Shannon-Weaver-Index</i>	0,179	-	-	-	-	0,993	0,433	0,526	9
<i>Evenness</i>	0,597	-	-	-	-	0,707	0,401	<b>0,015</b>	9

Darstellung der polynomialen Kontraste: Bei einer nicht signifikanten Interaktion zwischen der Proteinkonzentration und -qualität im Futter werden die linearen und quadratischen Kontraste für die Proteinkonzentration (Gruppeneffekte für beide Eiweißqualitäten) sowie der *P*-Wert für die Proteinqualität im Futter aufgeführt. Bei einer signifikanten Interaktion zwischen der Proteinkonzentration und -qualität im Futter werden die linearen und quadratischen Effekte der Proteinkonzentration einzeln für die hohe und geringere Eiweißqualität im Futter angegeben. <sup>1</sup>Proteingehalt der Versuchsfuttermittel <sup>2</sup>Anzahl gültiger Fälle

#### **4.6 Bakterielle Metaboliten**

Die Bestimmung bakterieller Metaboliten im Kot der Katzen ergab einige Unterschiede in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration, nicht jedoch von der Proteinqualität im Futter (Tabellen 27 und 28). So konnte eine Zunahme der Konzentrationen an Ammonium ( $P = 0,030$ ), i-Valeriansäure ( $P = 0,043$ ) und n-Valeriansäure ( $P = 0,020$ ) im Kot mit steigenden Proteingehalten im Futter beobachtet werden. Bezogen auf den Gesamtgehalt der kurzkettigen Fettsäuren konnte eine Abnahme an Propionsäure (%) ( $P < 0,001$ ) sowie eine Zunahme an n-Valeriansäure (%) ( $P = 0,033$ ) im Kot der Katzen mit steigenden Proteinkonzentrationen in den Versuchsdiäten aufgezeigt werden (Tabellen 27 und 28).

Die Konzentrationen an Histamin ( $P = 0,024$ ) und Cadaverin ( $P = 0,025$ ) sowie der Gesamtgehalt an biogenen Aminen im Kot ( $P = 0,017$ ) nahmen mit steigenden Proteingehalten im Futter ab.

## Ergebnisse

Tabelle 27: Gehalt bakterieller Metaboliten im Kot von Katzen (n = 10) bei einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität im Futter (Mittelwert; gruppenunabhängiger Standardfehler des Mittelwerts (SEM)); die statistische Datenauswertung in Form von polynomialen Kontrasten wird in Tabelle 28 wiedergegeben.

	Einheit	Geringe Proteinqualität			Hohe Proteinqualität			SEM
		36,7 % <sup>1</sup>	45,0 %	56,1 %	36,2 %	43,3 %	54,9 %	
Ammonium	[ $\mu\text{mol/g uS}^2$ ]	48,3	54,1	75,3	47,7	52,5	75,2	3,64
L-Laktat	[ $\mu\text{mol/g uS}$ ]	0,25	0,17	0,13	0,12	0,12	0,20	0,02
D-Laktat	[ $\mu\text{mol/g uS}$ ]	0,03	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,00
Essigsäure	[ $\mu\text{mol/g uS}$ ]	54,9	60,6	77,3	59,7	60,3	71,5	4,45
Propionsäure	[ $\mu\text{mol/g uS}$ ]	21,3	21,5	23,2	24,3	20,9	23,0	1,26
i-Buttersäure	[ $\mu\text{mol/g uS}$ ]	3,63	4,06	4,28	3,66	3,84	5,01	0,21
n-Buttersäure	[ $\mu\text{mol/g uS}$ ]	13,3	14,5	15,0	13,6	12,8	15,2	0,71
i-Valeriansäure	[ $\mu\text{mol/g uS}$ ]	6,62	7,35	8,43	6,62	6,94	9,12	0,35
n-Valeriansäure	[ $\mu\text{mol/g uS}$ ]	5,14	6,23	6,80	4,86	5,33	6,83	0,28
Gesamtfettsäuren	[ $\mu\text{mol/g uS}$ ]	105	114	135	113	110	131	6,74
Putrescin	[ $\mu\text{mol/g uS}$ ]	0,34	0,19	0,34	0,96	0,19	0,11	0,08
Histamin	[ $\mu\text{mol/g uS}$ ]	0,53	0,25	0,08	0,24	0,18	0,12	0,04
Cadaverin	[ $\mu\text{mol/g uS}$ ]	2,17	2,12	1,41	2,48	1,80	0,93	0,20
Spermidin	[ $\mu\text{mol/g uS}$ ]	0,36	0,33	0,33	0,45	0,39	0,32	0,02
Tyramin	[ $\mu\text{mol/g uS}$ ]	0,08	0,15	0,06	0,08	0,08	0,11	0,02
Spermin	[ $\mu\text{mol/g uS}$ ]	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
Gesamtamine	[ $\mu\text{mol/g uS}$ ]	3,50	3,06	2,23	4,22	2,66	1,60	0,30
Essigsäure	[relativer Anteil in %]	49,7	52,1	54,7	51,1	53,1	52,8	1,08
Propionsäure	[relativer Anteil in %]	20,3	19,0	17,5	21,4	18,7	17,6	0,29
i-Buttersäure	[relativer Anteil in %]	3,65	3,64	3,37	3,46	3,75	4,02	0,12
n-Buttersäure	[relativer Anteil in %]	14,1	13,0	11,9	12,9	12,3	12,5	0,56
i-Valeriansäure	[relativer Anteil in %]	6,91	6,65	6,84	6,45	6,87	7,50	0,27
n-Valeriansäure	[relativer Anteil in %]	5,30	5,67	5,69	4,66	5,29	5,65	0,23

<sup>1</sup>Proteingehalt der Versuchsfuttermittel <sup>2</sup>ursprüngliche Substanz

## Ergebnisse

Tabelle 28: Darstellung der ermittelten polynomialen Kontraste für den Gehalt bakterieller Metaboliten im Kot von Katzen bei Einsatz von Versuchsdieten mit einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität (vgl. Tabelle 27)

		<b>P-Werte (polynomiale Kontraste)</b>								
	Einheit	Interaktion	Geringe Proteinqualität		Hohe Proteinqualität		Proteinkonzentration		Proteinqualität	n <sup>1</sup>
			Linear	Quadratisch	Linear	Quadratisch	Linear	Quadratisch		
Ammonium	[µmol/g uS <sup>2</sup> ]	0,972	-	-	-	-	<b>0,030</b>	0,086	0,906	10
L-Laktat	[µmol/g uS]	0,334	-	-	-	-	0,719	0,316	0,382	10
D-Laktat	[µmol/g uS]	0,536	-	-	-	-	0,691	0,732	0,415	10
Essigsäure	[µmol/g uS]	0,809	-	-	-	-	0,086	0,335	0,971	10
Propionsäure	[µmol/g uS]	0,674	-	-	-	-	0,909	0,309	0,843	10
i-Buttersäure	[µmol/g uS]	0,485	-	-	-	-	0,089	0,522	0,674	10
n-Buttersäure	[µmol/g uS]	0,679	-	-	-	-	0,249	0,675	0,844	10
i-Valeriansäure	[µmol/g uS]	0,630	-	-	-	-	<b>0,043</b>	0,242	0,869	10
n-Valeriansäure	[µmol/g uS]	0,656	-	-	-	-	<b>0,020</b>	0,777	0,602	10
Gesamtfettsäuren	[µmol/g uS]	0,831	-	-	-	-	0,108	0,329	0,992	10
Putrescin	[µmol/g uS]	0,145	-	-	-	-	0,056	0,098	0,258	10
Histamin	[µmol/g uS]	0,088	-	-	-	-	<b>0,024</b>	0,367	0,118	10

Darstellung der polynomialen Kontraste: Bei einer nicht signifikanten Interaktion zwischen der Proteinkonzentration und -qualität im Futter werden die linearen und quadratischen Kontraste für die Proteinkonzentration (Gruppeneffekte für beide Eiweißqualitäten) sowie der *P*-Wert für die Proteinqualität im Futter aufgeführt. Bei einer signifikanten Interaktion zwischen der Proteinkonzentration und -qualität im Futter werden die linearen und quadratischen Effekte der Proteinkonzentration einzeln für die hohe und geringere Eiweißqualität im Futter angegeben. <sup>1</sup>Anzahl gültiger Fälle <sup>2</sup>ursprüngliche Substanz

## Ergebnisse

Fortsetzung Tabelle 28: Darstellung der ermittelten polynomialen Kontraste für den Gehalt bakterieller Metaboliten im Kot von Katzen bei Einsatz von Versuchsdieten mit einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität (vgl. Tabelle 27)

		<b>P-Werte (polynomiale Kontraste)</b>								
	Einheit	Interaktion	Geringe Proteinqualität		Hohe Proteinqualität		Proteinkonzentration		Proteinqualität	n <sup>1</sup>
			Linear	Quadratisch	Linear	Quadratisch	Linear	Quadratisch		
Cadaverin	[µmol/g uS <sup>2</sup> ]	0,619	-	-	-	-	<b>0,025</b>	0,471	0,529	10
Spermidin	[µmol/g uS]	0,605	-	-	-	-	0,165	0,997	0,345	10
Tyramin	[µmol/g uS]	0,523	-	-	-	-	0,871	0,565	0,955	10
Spermin	[µmol/g uS]	0,985	-	-	-	-	0,558	0,426	0,181	10
Gesamtamine	[µmol/g uS]	0,512	-	-	-	-	<b>0,017</b>	0,945	0,768	10
Essigsäure	[relativer Anteil in %]	0,765	-	-	-	-	0,143	0,726	0,917	10
Propionsäure	[relativer Anteil in %]	0,378	-	-	-	-	<b>&lt; 0,001</b>	0,319	0,391	10
i-Buttersäure	[relativer Anteil in %]	0,149	-	-	-	-	0,572	0,685	0,422	10
n-Buttersäure	[relativer Anteil in %]	0,838	-	-	-	-	0,322	0,817	0,473	10
i-Valeriansäure	[relativer Anteil in %]	0,520	-	-	-	-	0,287	0,637	0,801	10
n-Valeriansäure	[relativer Anteil in %]	0,850	-	-	-	-	<b>0,033</b>	0,601	0,126	10

Darstellung der polynomialen Kontraste: Bei einer nicht signifikanten Interaktion zwischen der Proteinkonzentration und -qualität im Futter werden die linearen und quadratischen Kontraste für die Proteinkonzentration (Gruppeneffekte für beide Eiweißqualitäten) sowie der *P*-Wert für die Proteinqualität im Futter aufgeführt. Bei einer signifikanten Interaktion zwischen der Proteinkonzentration und -qualität im Futter werden die linearen und quadratischen Effekte der Proteinkonzentration einzeln für die hohe und geringere Eiweißqualität im Futter angegeben. <sup>1</sup>Anzahl gültiger Fälle <sup>2</sup>ursprüngliche Substanz

## 5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss des Proteingehalts sowie der Proteinqualität im Futter auf die Zusammensetzung und Stoffwechselaktivität der Mikrobiota im Kot von Katzen zu untersuchen. Hintergrund dieser Untersuchung war die Hypothese, dass insbesondere peptidolytische Bakterien im Dickdarm von Katzen durch einen hohen Proteingehalt sowie eine geringere Proteinqualität im Futter gefördert werden und auf diese Weise möglicherweise ein Ungleichgewicht in der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota hervorgerufen wird. Die bakterielle Gemeinschaft im Kot der Tiere wurde anhand molekularbiologischer Methoden untersucht, welche qualitative und auch quantitative Angaben zum Vorhandensein ausgewählter Bakteriengruppen erlaubten. Dazu wurde die Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota von Katzen fütterungsunabhängig und in Abhängigkeit von diätetischen Effekten betrachtet. In diesem Zusammenhang erfolgte zudem aufgrund des zoonotischen Potenzials die Untersuchung des Katzenkots auf das Vorkommen pathogener *E. coli* mithilfe eines qualitativen Nachweises von Pathogenitätsfaktoren bzw. Pathogenitätsgenen dieses Bakteriums. Die Bestimmung ausgewählter bakterieller Metaboliten in den Kotproben der Katzen ermöglichte schließlich eine Einschätzung der Stoffwechselaktivität der intestinalen Mikrobiota. Hierfür wurden vor allem die Konzentrationen an Ammonium sowie an kurzkettigen Fettsäuren in Kot der Katzen ermittelt, da insbesondere die verzweigtkettigen Fettsäuren Rückschlüsse auf die peptidolytische Aktivität der intestinalen Mikrobiota zulassen (Macfarlane et al., 1986; Blachier et al., 2007; Macfarlane und Macfarlane, 2012; Scott et al., 2015).

### 5.1 Kritik der Methode

#### 5.1.1 Versuchsbedingungen

Für die vorliegende Studie wurde ein randomisiertes lateinisches Quadrat als Studiendesign gewählt, indem alle Versuchsfuttermittel zeitgleich bei den Katzen eingesetzt wurden. Somit konnten mögliche Umwelteinflüsse sowie der Einfluss tierspezifischer Unterschiede auf die Untersuchungsparameter ausgeschlossen werden.

Insgesamt wurden die Versuchsfuttermittel in sechs aufeinanderfolgenden Fütterungsperioden eingesetzt. Im Laufe der ersten Versuchshälfte musste eine Katze krankheitsbedingt durch ein anderes Tier ersetzt werden (Paßlack et al., 2017; 2018). Die Erkrankung stand hierbei in keinem Zusammenhang mit dem Versuch bzw. den Versuchsfuttermitteln (Paßlack et al., 2017; 2018). Für die statistische Auswertung wurden die Daten von beiden Tieren zusammengefasst, um die Anzahl gültiger Fälle zu erhöhen. Dies ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen, da die mikrobielle

Zusammensetzung im Kot gewissen individuellen Schwankungen unterliegt (Desai et al., 2009; Ritchie et al., 2010; Minamoto et al., 2012).

Für jede Versuchsdiät wurde eine Fütterungsperiode von sechs Wochen vorgesehen. Da Bermingham et al. (2011) Veränderungen in der Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota von Katzen bereits nach einer fünfwöchigen Fütterungsphase beobachten konnten, kann in der vorliegenden Studie von einer ausreichend langen Versuchsdauer zur Detektion von fütterungsassoziierten Unterschieden ausgegangen werden.

Die Bewertung der Proteinqualität in den Versuchsdiäten erfolgte anhand des Gehalts an bindegewebsreichen Rohmaterialien in den Futtermitteln. Als Marker diente die Konzentration der Aminosäure Hydroxyprolin, da diese mit dem Bindegewebsanteil im Futter korreliert (Colgrave et al., 2012) und nach Messia und Marconi (2012) als Qualitätsindex herangezogen werden kann. Obgleich gewisse Überschneidungen im Hydroxyprolingehalt zwischen den einzelnen Versuchsfuttermitteln vorlagen, wurde durch den variierenden Anteil an bindegewebsreichen Rohmaterialien ein stets höherer Hydroxyprolingehalt in den Futtermitteln mit der geringeren Eiweißqualität erzielt, wenn die jeweiligen Futtermittel mit dem ähnlichen Proteingehalt miteinander verglichen wurden (Paßlack et al., 2018). Demnach konnte der mögliche Einfluss einer variierenden Eiweißqualität im Futter auf mikrobiologische Parameter im Kot von Katzen adäquat evaluiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde auf die Untersuchung von Digestaprobe verzichtet, sodass die Ermittlung von mikrobiologischen Parametern sowie der scheinbaren Rohproteinverdaulichkeit ausschließlich aus Kotproben von Katzen erfolgte. Eine Übertragung der ermittelten Zusammensetzung und metabolischen Aktivität der fäkalen Mikrobiota auf die Verhältnisse im Intestinaltrakt von Katzen ist nicht uneingeschränkt möglich. Ebenso sollte hinsichtlich der ermittelten scheinbaren Rohproteinverdaulichkeit berücksichtigt werden, dass einerseits mikrobielle Fermentationsprozesse und andererseits endogene Sekretionsvorgänge Abweichungen im Vergleich zur wahren Rohproteinverdaulichkeit bedingen (Kamphues et al., 2014).

Die Kotsammlung erfolgte aus versuchstechnischen Gründen zweimal am Tag (6:30 Uhr und 12:30 Uhr), sodass Proben von Tieren, die später am Tag Kot absetzten, erst am darauffolgenden Tag eingesammelt wurden. Ein Einfluss dieses Umstands auf die untersuchten Parameter kann aufgrund von möglichen mikrobiellen Umsetzungen in den Kotproben vor der anschließenden Lagerung bei -80 °C nicht ausgeschlossen werden und sollte folglich bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. Jedoch konnte eine Untersuchung bei Katzen zeigen, dass die Lagerung von Kotproben bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von bis 96 Stunden keine Auswirkungen auf die Zusammensetzung sowie bakterielle Diversität der fäkalen Mikrobiota hatte (Tal et al., 2017). Lediglich geringe Auswirkungen auf die Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota konnte

eine Untersuchung aus der Humanmedizin zeigen, in welcher Stuhlproben gesunder Patienten bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 24 Stunden, gelagert und anschließend untersucht wurden (Carroll et al., 2012).

## 5.1.2 Untersuchungsmethoden

### 5.1.2.1 DNA-Extraktion und quantitative Real-Time PCR

Um den Einfluss der Fütterung auf einzelne, ausgewählte Bakteriengruppen (*Bacteroides/Prevotella/Porphyromonas*, *Bifidobacterium* spp., Clostridien Cluster I, *C. leptum*-Cluster IV (Cluster nach Collins et al. (1994)), *C. coccoides*-Cluster XIVa, *Enterobacteriaceae*, *E. coli/Hafnia/Shigella*, *Lactobacillus* spp., *Salmonella* spp.) sowie Bakterienspezies (*C. perfringens*, *C. difficile*) im Kot von Katzen zu untersuchen, wurde das Verfahren der quantitativen Real-Time PCR angewandt.

Grundsätzlich ist zu berücksichtigen, dass die Aussagekraft bzw. Präzision dieses quantitativen Nachweisverfahrens bakterieller Nukleinsäuresequenzen variieren kann. So können PCR-Inhibitoren den Aufschluss der Zellen bereits bei dem Prozess der Extraktion bakterieller DNA negativ beeinflussen, den Abbau einzelner Nukleinsäuren verursachen, zu einer Hemmung der Aktivität der *Taq* DNA-Polymerase (Wilson, 1997; Kontanis und Reed, 2006) oder zu einer Aktivitätsreduktion des für die PCR verwendeten Fluoreszenzfarbstoffs (Abu Al-Soud und Radstrom, 2000) führen. Als PCR-Inhibitoren im Kot fungieren zum Beispiel komplexe Polysaccharide (Monteiro et al., 1997) sowie Gallensäuren, Zelldetritus oder bakterielle Proteasen (Wilson, 1997). Vor diesem Hintergrund wurde für die Extraktion bakterieller DNA aus dem Kot der Katzen ein Kit (QIAamp® DNA Stool Mini Kit; QIAGEN GmbH) verwendet (3.3.2.1). Dennoch konnte aufgrund einer sichtbaren Trübung der DNA-Extrakte sowie des Ergebnisses der Test-qPCR in Kombination mit den ermittelten DNA-Gehalten in den Extrakten auf verbliebene PCR-Inhibitoren in den Proben geschlossen werden.

Bei der Test-qPCR führte die 1:10-Verdünnung der DNA-Extrakte zu einer Steigerung der Effizienz der Amplifikation. Daher kann vermutet werden, dass diese Verdünnung zum einen im Verhältnis geringere Konzentrationen an inhibierenden Substanzen enthielt als der ursprüngliche DNA-Extrakt. Zum anderen lagen in dieser 1:10-Verdünnung ausreichende bakterielle DNA-Konzentrationen vor, um die in dieser Arbeit ausgewählten PCR-Produkte mittels quantitativer Real-Time PCR generieren und detektieren zu können. Es ist jedoch möglich, dass aufgrund der Probenverdünnung die Gensequenzen bestimmter Bakteriengruppen unterhalb der Detektionsgrenze der qPCR lagen, falls diese bereits im Ausgangsextrakt in geringen Konzentrationen vorhanden waren.

Aufgrund der Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit in den unverdünnten DNA-Extrakten noch PCR-Inhibitoren enthalten waren, wurde ein weiteres kommerzielles Extraktionskit verwendet (3.3.2.5). Die sichtbare Trübung konnte hierdurch beseitigt werden. Allerdings ist zu erwähnen, dass, bedingt durch diese weiteren Bearbeitungsschritte, die DNA-Konzentration in den so aufbereiteten DNA-Extrakten im Vergleich zu der Konzentration in den ursprünglichen DNA-Extrakten reduziert war. Somit ist es möglich, dass Gensequenzen von bestimmten Bakteriengruppen, die in den ursprünglichen DNA-Extrakten bereits in geringer Zahl vorlagen, während des Aufbereitungsprozesses entfernt wurden.

### **5.1.2.2 MPCR und Agarose-Gelelektrophorese**

Aufgrund der Methodik der MPCR besteht die Problematik, dass die Reaktionsbedingungen nicht für alle in dieser Studie eingesetzten Primer optimal sind, sodass es möglich ist, dass einzelne Gene weniger gut amplifiziert werden (Pass et al., 2000). Mittels des verwendeten Verfahrens erfolgte ein qualitativer Nachweis von *E. coli*-Pathogenitätsfaktoren in den Kotproben der Katzen, eine quantitative Bestimmung war mit dieser Methode hingegen nicht möglich. Zudem ist zu erwähnen, dass die untersuchten Pathogenitätsgene, mit Ausnahme von *fimf41a* (F41), auf Plasmiden codiert sind (Nagy und Fekete, 1999). Plasmide können über horizontalen Gentransfer übertragen werden, sodass die Möglichkeit besteht, dass in einem Bakterium mehrere Plasmide enthalten sind (Valentin-Weigand, 2011), wodurch wiederum die quantitative Bestimmung pathogener *E. coli* erschwert werden kann.

### **5.1.2.3 Illumina®-Sequenzierung**

Für die vorliegende Studie wurde ein „Next Generation Sequencing“ gewählt. Mithilfe der Analyse des 16S rRNA-Gens können Bakterien hierbei auf Genusebene identifiziert werden (Clarridge, 2004; Wang et al., 2007; Kim und Isaacson, 2015). In der vorliegenden Arbeit wurden die hypervariablen Regionen V3-V4 des 16S rRNA-Gens sequenziert, welche einzeln oder in Kombination in unterschiedlichen Studien ebenfalls Anwendung fanden (Liu et al., 2007; Wang et al., 2007; Liu et al., 2008; Claesson et al., 2009; 2010; Yarza et al., 2014). Allgemein wird jedoch laut Hamady und Knight (2009) keine Region als Goldstandard präferiert. Die Illumina®-Sequenzierung hat sich gegenüber anderen Methoden zur Analyse von Bakteriengemeinschaften besonders wegen der vergleichbar geringen Kosten durchgesetzt (Liu et al., 2012; Loman et al., 2012b; Schloss et al., 2016). Es ist allerdings anzumerken, dass die Illumina®-Sequenzierung aufgrund der geringen analysierten Sequenzlänge (max. 250 Bp) in Kombination mit den Primern der V3-V4 Region nur auf Genus-Ebene sichere Ergebnisse liefert (Cai et al., 2013; Schloss et al., 2016). Andere Methoden, wie die 454-Pyrosequenzierung, Ion-Torrent oder Geräte der Firma Pacific Bioscience (Menlo Park, Kalifornien, USA), sind in der Lage, längere Sequenzen zu

analysieren (bis 1000 Bp) (Di Bella et al., 2013; Schloss et al., 2016). Hierdurch können bakterielle Gemeinschaften bis auf die Ebene der Spezies analysiert werden, wobei dies jedoch abhängig von der verwendeten Datenbank und des Probematerials ist (Schloss et al., 2016). Dennoch können Veränderungen in der Zusammensetzung der Mikrobiota mit der Illumina®-Sequenzierung erfasst werden, da die Sequenzen so unterschiedlich sind, dass sie als sogenannte „operational taxonomic units“ (OTU) gewertet werden (Chen et al., 2013; Di Bella et al., 2013). Dies kann man nutzen, um ökologische Indizes, wie Diversität oder Evenness, zu ermitteln (Chen et al., 2013; Di Bella et al., 2013; Cole et al., 2014).

Grundsätzlich ist es bei Sequenzierungsmethoden, welche auf der Analyse des 16S rRNA-Gens basieren, möglich, dass bestimmte Bakteriengenera mit guanin- und cytosinreichen Regionen im Genom aufgrund einer ungenügenden Dissoziation der DNA-Stränge unzureichend detektiert werden (Suau et al., 1999; Ritchie et al., 2008; 2010; Suchodolski et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich eine qPCR mit einem Primer für *Bifidobacterium* spp. durchgeführt, da dieses Genus guanin- und cytosinreiche Regionen im Genom aufweist (Suchodolski et al., 2008). Neben der Illumina®-Sequenzierung existieren weitere „Next Generation Sequencing“-Verfahren, wie beispielsweise die Pyrosequenzierung. Bei diesem Verfahren werden die jeweiligen Nukleotide bei dem Einbau in die DNA durch Aussendung eines Lichtimpulses detektiert (Kircher und Kelso, 2010). Bei dieser Methode besteht jedoch die Gefahr, dass zum einen im DNA-Strang identische, aufeinanderfolgende Basen nicht als einzelnes Signal erfasst werden und dies so zu Deletionen führt (Di Bella et al., 2013). Zum anderen können diese Ungenauigkeiten in der Signalerfassung auch Insertionen in der Basenabfolge verursachen (Di Bella et al., 2013), wodurch wiederum die Messergebnisse beeinflusst werden (Kunin et al., 2010). Ein weiteres Verfahren, welches Wasserstoffionen während des Einbaus in die DNA detektiert und die damit einhergehende Änderung des pH-Werts erfasst, wird von der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA; Ion Personal Genome Maschine (PGM®; „bench-top“-Sequenziergerät) angeboten (Rusk, 2011; Di Bella et al., 2013). Diese Methode birgt jedoch ebenfalls den Nachteil möglicher Baseninsertionen oder -deletionen (Loman et al., 2012a). Bei der Illumina®-Sequenzierung besteht diese Problematik hingegen nicht (Luo et al., 2012). Obwohl diese Technologie ebenfalls methodisch bedingte Bias, wie Synchronisierungsbias der synthetisierten Einzelstränge, Abfall der Intensität des Lichtsignals aufgrund von Verlusten einzelner DNA-Stränge oder zyklusbedingte Überlagerungen des Lichtsignals, aufweist (Erlich et al., 2008), halten Luo et al. (2012) die Illumina®-Sequenzierung für ein adäquates Verfahren für metagenomische Untersuchungen. Das in der vorliegenden Arbeit genutzte MiSeq-Gerät der Firma Illumina Inc. (San Diego, Kalifornien, USA) weist gegenüber dem sogenannten „high-end“-Gerät HiSeq2000 derselben Firma eine kürzere Laufzeit (Di Bella et al., 2013) sowie eine geringere Datendurchsatzrate

(Liu et al., 2012) auf. Des Weiteren besitzt das MiSeq-Gerät verglichen mit anderen „bench-top“-Sequenziergeräten die geringste Fehlerquote (Di Bella et al., 2013).

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Illumina®-Sequenzierung sollte berücksichtigt werden, dass Genera, welche insgesamt weniger als zehnmal in den Kotproben (n = 60) identifiziert wurden, nicht in die statistische Auswertung der relativen Anteile der Genera je Metagenom einer jeden Probe miteinbezogen wurden, sodass eine abschließende Bewertung dieser Genera aufgrund des zu geringen Vorkommens nicht möglich ist.

Bei der Ermittlung der ökologischen Indizes mithilfe der RDP-Pipeline (Cole et al., 2014) konnte ein Probenmetagenom nicht berücksichtigt werden, da dieses die maximale Kapazität des „complete linkage clustering“-Tools von 150.000 Sequenzen überschritt. Die entsprechende Probe wies dagegen 235.538 Sequenzen auf.

Bei der statistischen Auswertung der detektierten Bakteriengenera und -gruppen ergaben sich aufgrund einer geringen Detektionsfrequenz teilweise reduzierte Fallzahlen. Dies sollte bei den dargestellten Ergebnissen berücksichtigt werden.

## **5.2 Einfluss einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität im Futter auf die Futtermittelaufnahme, Körpermasse und scheinbare Rohproteinverdaulichkeit bei Katzen**

In der vorliegenden Studie konnte eine Zunahme der Futtermittelaufnahme sowie der Körpermasse der Katzen bei höheren Proteingehalten und vergleichbarem Energiegehalt im Futter festgestellt werden (Paßlack et al., 2018). Salaun et al. (2016) beobachteten ebenfalls eine höhere Futtermittelaufnahme bei Katzen mit ansteigenden Proteingehalten im Futter. Dies lässt sich möglicherweise mit einer höheren Schmackhaftigkeit von proteinreichen Futtermitteln (Zaghini und Biagi, 2005) erklären. Der geringe, jedoch signifikante Anstieg der Körpermasse der Katzen kann im Zusammenhang mit der höheren Futter- und damit Energieaufnahme bei Einsatz der proteinreichen Diäten betrachtet werden.

Interessanterweise war die Futtermittelaufnahme bei den Katzen höher, wenn die Versuchsdieten mit der geringeren Eiweißqualität eingesetzt wurden, wohingegen die Körpermasse der Tiere von der Proteinqualität im Futter unbeeinflusst blieb. Dies könnte auf eine geringere Energieausnutzung bei Einsatz von Futtermitteln mit einem höheren Anteil an bindegewebsreichen Rohmaterialien und vergleichbarem Energiegehalt hindeuten (Paßlack et al., 2018).

In diesem Zusammenhang sind die Daten zur scheinbaren Rohproteinverdaulichkeit relevant. Diese war, unabhängig von dem Rohproteingehalt im Futter, in der vorliegenden Arbeit mit rund 90 % relativ hoch. Andere Autoren, welche ebenfalls Feuchtfuttermittel bei Katzen einsetzten, ermittelten teilweise vergleichbare Ergebnisse (Radicke (1995): 89 %),

jedoch größtenteils deutlich geringe Werte (Kendall et al. (1982b): 81–83 %; Radicke (1995): 78 %; Bermingham et al. (2013b): 83 %; Kerr et al. (2014c): 84 %).

Die fäkale Rohproteinkonzentration und -exkretion nahm entsprechend bei steigenden Rohproteingehalten im Futter zu (Paßlack et al., 2018). Die scheinbare Rohproteinverdaulichkeit unterschied sich in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht in Abhängigkeit von der Proteinqualität im Futter (Paßlack et al., 2018). Dekeyzer (1997) beobachtete bei Katzen eine höhere scheinbare Rohproteinverdaulichkeit bei Einsatz von Diäten mit Rinderherz (79–95 %) als mit Griebenmehl (78–89 %) oder Geflügelfleischmehl (73–83 %). Auch Oldenhage (2003) beschrieb bei Katzen eine höhere scheinbare Rohproteinverdaulichkeit für Diäten mit Pferdefleisch (89 bzw. 97 %) im Vergleich zu Diäten mit Griebenmehl (80 bzw. 92 %). Bei der Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die scheinbare Proteinverdaulichkeit aufgrund von endogenen Sekretionsvorgängen und mikrobiellen Fermentationsprozessen im Dickdarm von der wahren Proteinverdaulichkeit abweicht (Kamphues et al., 2014). Folglich sollte der fehlende Effekt einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität im Futter auf die scheinbare Rohproteinverdaulichkeit bei Katzen vorsichtig interpretiert werden.

### **5.3 Molekularbiologische Untersuchungen**

In der vorliegenden Arbeit sollte die Zusammensetzung und metabolische Aktivität der fäkalen Mikrobiota von Katzen in Abhängigkeit von einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität im Futter untersucht werden. Daneben wurde das relative Vorkommen bzw. die Prävalenz einzelner Bakteriengruppen oder -genera im Kot von Katzen jedoch auch unabhängig von der Fütterung evaluiert, indem die Daten der Gesamtprobenzahl (n = 60) ausgewertet und mit bestehenden Literaturangaben verglichen wurden. Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse sowie bei dem Vergleich mit anderen Studien sollte folglich beachtet werden, dass insgesamt sechs Kotproben pro Katze vorlagen und analysiert wurden. Dies ermöglicht eine Aussage zur Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota in Bezug auf die Gesamtzahl der untersuchten Proben, nicht jedoch in Bezug auf die einzelnen Tiere.

#### **5.3.1 Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota, unabhängig von der Fütterung**

##### **5.3.1.1 qPCR-Ergebnisse**

Die Auswertung der Ergebnisse der qPCR ergab, dass unabhängig von den eingesetzten Versuchsfuttermitteln die höchsten mittleren Kopienzahlen für die Bakteriengruppen *Bacteroides/Prevotella/Porphyromonas* und *C. coccooides*-Cluster XIVa vorlagen. Es konnte bereits in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass das *C. coccooides*-Cluster XIVa im Kot von Katzen zu großen Anteilen vorkommt (Ritchie et al., 2010; Handl et al., 2011). Im

Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen ermittelten Handl et al. (2011) im Kot von Katzen für das Genus *Prevotella* lediglich einen Anteil von 0,025 % (Median) und für *Bacteroides* von 0 % (Bereich von 0–1,82 %). Ritchie et al. (2010) wiesen im Kot von Katzen einen Anteil von 1,02 % für *Prevotella* und für *Bacteroides* einen Anteil von 0,41 % nach. Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit in allen untersuchten Kotproben *C. perfringens* detektiert (Mittelwert 9,31 log<sub>10</sub> Kopienzahl/g FS). Dieses Bakterium kann im Zusammenhang mit Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts beim Menschen (McClane, 1992; Meer et al., 1997; Nakamura et al., 2004) und auch bei Tieren stehen, sodass in diesem Kontext auch bei Hunden und Katzen eine Relevanz diskutiert wird (Bell et al., 2008; Marks et al., 2011; Queen et al., 2012; Suchodolski et al., 2012; 2015; Minamoto et al., 2014; Busch et al., 2015; Silva und Lobato, 2015). In der vorliegenden Studie entwickelte jedoch keines der Tiere Durchfall oder andere Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts. Queen et al. (2012) ermittelten mittels kulturellem Verfahren für *C. perfringens* eine Prävalenz von 63 % im Kot von gesunden Katzen, welche sich nicht von der Prävalenz bei erkrankten Tieren unterschied. Suchodolski et al. (2015) stellten ebenfalls keine erhöhten Zahlen von *C. perfringens* im Kot von Katzen mit Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts fest. Dieses Bakterium scheint daher eher von geringer Relevanz bei gastrointestinalen Erkrankungen bei Katzen zu sein (Queen et al., 2012; Suchodolski et al., 2015). Diese Vermutung kann durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie weiter abgesichert werden.

In der vorliegenden Studie wurde in 93 % der untersuchten Kotproben *C. difficile* (Mittelwert: 5,31 log<sub>10</sub> Kopienzahl/g FS) nachgewiesen. Dies steht in deutlichem Kontrast zu Ergebnissen früherer Studien, welche kulturelle Verfahren zum Nachweis von *C. difficile* nutzten. So ermittelten Queen et al. (2012) für *C. difficile* eine Prävalenz von 0 % im Kot gesunder Katzen. Weber et al. (1989) wiesen im Kot von Katzen ohne Erkrankungen des Intestinaltrakts für *C. difficile* eine Prävalenz von 9 % nach, während Borriello et al. (1983) für *C. difficile* eine Prävalenz von 30 % im Kot von Katzen feststellten. Es sei darauf hingewiesen, dass in den Untersuchungen von Weber et al. (1989) und Borriello et al. (1983) Kotproben von Katzen untersucht wurden, welche aus unterschiedlichen Gründen in Tierkliniken oder Kleintierpraxen vorgestellt wurden und zudem teilweise eine antibiotische Behandlung erhielten. Letzteres ist insofern relevant, als Weber et al. (1989) einen Zusammenhang zwischen einer antibiotischen Behandlung und einer erhöhten Prävalenz (12 % verglichen zu 6 % ohne Behandlung) von *C. difficile* im Kot herstellen konnten. Im Gegensatz zu diesen Studien erfolgte in der vorliegenden Arbeit der Nachweis bakterieller DNA mittels qPCR. In der Humanmedizin wird die PCR für den Nachweis toxinogener *C. difficile*-Stämme aufgrund einer höheren Sensitivität gegenüber kulturellen Methoden bevorzugt eingesetzt (Peterson et al., 2011; Jensen et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit wurde nicht untersucht, ob es sich bei den detektierten *C. difficile*-Stämmen um toxinogene

Stämme handelte. Dies ist insofern relevant, als lediglich toxinbildende Stämme Erkrankungen verursachen können (Marks et al., 2011). Allerdings ist die Bedeutung von *C. difficile* im Zusammenhang mit gastrointestinalen Erkrankungen bei der Katze noch nicht abschließend geklärt (Clooten et al., 2008; Marks et al., 2011).

Für *Salmonella* spp. konnte eine Prävalenz von knapp 22 % (n = 13) in den untersuchten Kotproben ermittelt werden. Diese war damit deutlich höher als zuvor in anderen Studien beschrieben. So wiesen Sabshin et al. (2012) bei gesunden Katzen lediglich eine Prävalenz von 4 % für das Genus *Salmonella* spp. nach, während Hill et al. (2000) unabhängig vom Gesundheitszustand der Katzen für *Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium eine Prävalenz von 1 % ermittelten. Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte jedoch berücksichtigt werden, dass sich die vorliegend ermittelte Prävalenz von *Salmonella* spp. auf die Gesamtzahl der untersuchten Kotproben (n = 60) bezieht, dieses Genus jedoch nicht durchgehend in allen Proben derselben Katze (n = 6) identifiziert wurde. Somit ergibt sich eine scheinbar höhere Prävalenz im Vergleich zu anderen Untersuchungen. Zudem ist es möglich, dass eine variierende Detektionsfrequenz aufgrund einer intermittierenden fäkalen Ausscheidung von *Salmonella* spp. (Weese, 2011) vorlag. Ebenso wird von anderen Autoren empfohlen, für die Diagnostik von *Salmonella* eine PCR in Kombination mit einem vorherigen Anreicherungsverfahren sowie anschließender Kultivierung durchzuführen (Ward et al., 2005; Bohaychuk et al., 2007; Marks et al., 2011). Aufgrund der Fragestellung in der vorliegenden Arbeit bezüglich des quantitativen Aspekts, wurde auf eine Voranreicherung verzichtet, sodass auch dies ein Grund für die variierenden Ergebnisse sein kann (Weese, 2011).

### 5.3.1.2 Verteilung der Phyla (Illumina®-Sequenzierung)

Betrachtet man die Ergebnisse der Illumina®-Sequenzierung, so konnten folgende Phyla in absteigender Reihenfolge im Kot der Katzen nachgewiesen werden: *Firmicutes* (78,7 %), *Bacteroidetes* (7,63 %), *Actinobacteria* (6,55 %), *Fusobacteria* (4,46 %), *Proteobacteria* (0,89 %), *Chlamydiae* (0,04 %) und *Synergistetes* (0,01 %). Diese Verteilung stimmt weitgehend mit Untersuchungen von Ritchie et al. (2008) überein. Hier wurde der Anteil an *Firmicutes* in Digestaprobe von gesunden Katzen mit 68 % angegeben, gefolgt von *Proteobacteria* (14 %), *Bacteroidetes* (10 %), *Fusobacteria* (5 %) und *Actinobacteria* (4 %) (Ritchie et al., 2008). Es sollte bei dem Vergleich der Ergebnisse jedoch berücksichtigt werden, dass sich die Anteile der bakteriellen Phyla in der Studie von Ritchie et al. (2008) auf Digestaprobe des gesamten Gastrointestinaltrakts von Katzen bezogen, welche nach Euthanasie der Tiere mittels Nadelaspiration gewonnen wurden, während die vorliegenden Untersuchungen hingegen mit Kotproben durchgeführt wurden. In einer weiteren Studie von Ritchie et al. (2010), in welcher ausschließlich Kotproben von Katzen untersucht wurden,

konnten deutlich höhere prozentuale Anteile an *Firmicutes* (87 %) und *Proteobacteria* (ca. 8 %) sowie geringe Anteile an *Bacteroidetes* (rund 2,4 %), *Actinobacteria* (rund 2,25 %) und *Fusobacteria* (0,20 %) als in der vorliegenden Arbeit ermittelt werden. In beiden Studien konnten (Ritchie et al., 2008; 2010) keine Vertreter der Phyla *Chlamydiae* und *Synergistetes* nachweisen. Diese wurden jedoch in einer Arbeit von Tun et al. (2012) im Kot von gesunden Katzen detektiert, wobei das prozentuale Vorkommen für die *Chlamydia/Verrucomicrobia*-Gruppe bei 0,34 % sowie für das Phylum *Synergistetes* bei 0,58 % lag. Anders als in der vorliegenden Arbeit sowie in früheren Untersuchungen (Ritchie et al., 2008; 2010; Desai et al., 2009; Handl et al., 2011) wiesen Tun et al. (2012) als dominierendes Phylum die *Bacteroidetes/Chlorobi*-Gruppe nach. Die Gründe für diese Abweichungen sind unklar (Tun et al., 2012).

Insgesamt kann gesagt werden, dass die vorliegenden Ergebnisse weitgehend mit Daten aus früheren Studien übereinstimmen. Allerdings lassen sich Unterschiede im Vergleich zu Katzen mit chronischen Darmerkrankungen erkennen. So stellten Ramadan et al. (2014) einen deutlich geringeren Anteil an *Firmicutes* (34–36 %) sowie einen deutlich höheren Anteil an *Bacteroidetes* (26–34 %), *Fusobacteria* (15–26 %) und *Proteobacteria* (7–9 %) im Kot kranker Tiere fest. Zudem wurde das Phylum *Tenericutes* mit einem Vorkommen von 6–7 % von den Autoren beschrieben (Ramadan et al., 2014), welches in der vorliegenden Arbeit lediglich in einer Probe identifiziert wurde (Daten werden nicht gezeigt). Suchodolski et al. (2015) stellten bei Katzen mit Durchfallerkrankungen Anstiege der fäkalen Anteile an *Proteobacteria* sowie *Firmicutes* im Vergleich zu gesunden Tieren fest. Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung und der Ergebnisse aus der Literatur kann somit vermutet werden, dass sich die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft im Kot von erkrankten und gesunden Katzen unterscheidet. Dieses sowie mögliche Änderungen der metabolischen Aktivität der Darmbakterien sind aus diagnostischen und therapeutischen Überlegungen von klinischem Interesse, müssen aber in zukünftigen Studien weitergehend untersucht werden (Suchodolski et al., 2015).

### 5.3.1.3 Verteilung der Genera (Illumina®-Sequenzierung)

Die Ergebnisse der Illumina®-Sequenzierung konnten zeigen, dass rund 20 % der identifizierten Sequenzen in den Kotproben der Katzen dem Genus *Clostridium* zuzuordnen waren. Dies stimmt mit den beschriebenen Ergebnissen der qPCR überein, da bei diesen ebenfalls hohe Kopienzahlen für die Clostridien Cluster XIVa, I, IV sowie für *C. perfringens* ermittelt wurden. Auch das Genus *Blautia* wurde zu relativ hohen Anteilen (17,4 %) in den Kotproben der Tiere nachgewiesen. Diese Beobachtung stimmt überwiegend mit den Ergebnissen, welche in einer Untersuchung mit Kotproben von Katzenwelpen (2,24–9,75 %) ermittelt wurden, überein (Hooda et al., 2013), wohingegen in einer anderen Arbeit bei zwei

unterschiedlichen Rationsvarianten nur sehr geringe Anteile (0,3 bzw. 2,3 %) für *Blautia* im Kot von Katzen ermittelt wurden (Bermingham et al., 2013b). *Blautia* zählt zu der Familie der *Lachnospiraceae* (Koskey et al., 2014) und wird somit dem *C. coccooides*-Cluster XIVa zugeordnet (Hayashi et al., 2006; Eren et al., 2015). Auch hier ist eine gewisse Übereinstimmung zwischen den vorliegenden Ergebnissen der Illumina®-Sequenzierung und denen der qPCR zu erkennen, da hier das *C. coccooides*-Cluster XIVa mit einem Mittelwert von 9,91 log<sub>10</sub> Kopienzahl/g FS sowie einer Prävalenz von 100 % in den Kotproben der Katzen auftrat.

Ebenso konnte in den vorliegend untersuchten Kotproben ein relativ hoher Anteil der Familie *Peptostreptococcaceae* (12,5 %) nachgewiesen werden. Diese Beobachtung stimmt überwiegend mit den Ergebnissen einer anderen Studie mit Katzenwelpen überein (10,4–31,9 %) (Bermingham et al., 2013a).

In den untersuchten Kotproben konnte für das Genus *Prevotella* ein mittleres Vorkommen von etwa 5 % festgestellt werden. Weitestgehend vergleichbare Ergebnisse werden von Bermingham et al. (2013a; b) bei adulten (4,5 % und 7,5 %) und wachsenden Katzen (5,81–16,95 %) berichtet, wohingegen Ritchie et al. (2010) und Handl et al. (2011) geringere prozentuale Anteile für *Prevotella* im Kot von Katzen nachwiesen (1,02 % bzw. 0,025 %).

Insgesamt betrachtet, konnten viele der in der vorliegenden Studie detektierten Genera auch in anderen Studien im Kot von Katzen mittels verschiedener Sequenzierungsverfahren identifiziert werden (Ritchie et al., 2010; Handl et al., 2011; Bermingham et al., 2013a; b; Hooda et al., 2013; Deusch et al., 2014). Hierbei lagen jedoch mitunter verschiedene prozentuale Häufigkeiten vor. Diese Unterschiede könnten zum einen die Folge verschiedener Nachweisverfahren sein (Deusch et al., 2014). Zum anderen könnten sie jedoch auch fütterungsassoziierte Veränderungen darstellen, da sich die Fütterung in den genannten Studien voneinander unterschied. So wurden in der vorliegenden Arbeit Feuchtfuttermittel mit variierenden Proteingehalten und einer unterschiedlichen Proteinqualität eingesetzt, während in anderen Untersuchungen Trocken- und Feuchtfuttermittel (Ritchie et al., 2008; 2010; Bermingham et al., 2013a; b) sowie Futtermittel mit variierenden Proteingehalten (Hooda et al., 2013; Deusch et al., 2014) eingesetzt wurden. Zudem sollte berücksichtigt werden, dass sich das Alter der Katzen aus der vorliegenden Studie von dem der Tiere aus den Studien von Bermingham et al. (2013a), Hooda et al. (2013) und Deusch et al. (2014) unterschied. Altersassoziierte Unterschiede in der Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota von Katzen wurden bereits in einigen Untersuchungen beschrieben (Jia et al., 2011a; b; Bermingham et al., 2013a; Hooda et al., 2013; Deusch et al., 2014; 2015; Masuoka et al., 2017), sodass dieser Aspekt eine mögliche Ursache für die teilweise differierenden Ergebnisse zwischen den Studien darstellen könnte.

In der vorliegenden Arbeit konnte im Gegensatz zu den Ergebnissen der qPCR mittels Illumina®-Sequenzierung in keiner Kotprobe das Genus *Salmonella* nachgewiesen werden. Ähnliches berichteten Kerr et al. (2014b). Die Autoren verwendeten als Nachweismethode die Pyrosequenzierung und vermuteten, dass die Sensitivität dieses Verfahrens nicht ausreichend für die Detektion dieses Genus sei (Kerr et al., 2014b). Eine ungenügende Sensitivität der Illumina®-Sequenzierung bei einer sehr geringen Sequenzanzahl in den Kotproben könnte auch im Falle der vorliegenden Untersuchungen einen Erklärungsansatz für den fehlenden Nachweis von *Salmonella* darstellen.

In diesem Kontext ist auch der Nachweis des Genus *Bifidobacterium* zu betrachten, welches mittels Illumina®-Sequenzierung in lediglich fünf Kotproben mit einem relativen Anteil von 0,01–0,05 % vorgefunden wurde (Daten werden nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu konnte das Genus anhand der qPCR in 23 Kotproben nachgewiesen werden. Bermingham et al. (2013b) konnten das Genus *Bifidobacterium* im Kot von Katzen mittels Pyrosequenzierung ebenfalls nicht nachweisen, wohingegen Ritchie et al. (2010) anhand eines universellen 16S rRNA-Primers sowie Handl et al. (2011) mittels Pyrosequenzierung das Genus *Bifidobacterium* im Kot von sehr wenigen Katzen (bei 2 von 15 (Ritchie et al., 2010) bzw. 2 von 12 (Handl et al., 2011)) detektiert haben.

Auch das Genus *Escherichia* wurde bei der Illumina®-Sequenzierung nicht in den Kotproben der Katzen vorgefunden, wohingegen die Bakteriengruppe *E. coli/Hafnia/Shigella* mithilfe der qPCR nachgewiesen werden konnte. Ebenso gelang der qualitative Nachweis von *E. coli*-Pathogenitätsfaktoren (5.3.2). Aus diesem Grund kann geschlussfolgert werden, dass das Genus *Escherichia* im Kot der Katzen auftrat, die Anzahl der Bakterien jedoch anhand der ausgewählten Methode nicht ermittelt werden kann. Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass der Nachweis mittels qPCR und Gruppenprimer erfolgte und möglicherweise nur eine sehr geringe Anzahl an *E. coli* innerhalb der Gruppe *E. coli/Hafnia/Shigella* vertreten war, sodass die Sensitivität der Illumina®-Sequenzierung, wie bereits für das Genus *Salmonella* vermutet wurde, nicht genügte, um *Escherichia* zu detektieren. In früheren Studien konnte mithilfe kultureller Verfahren *E. coli* in Dünndarmdigesta (Stöcker, 1987; Papasouliotis et al., 1998; Sparkes et al., 1998a) sowie in Dickdarmdigesta (Stöcker, 1987) und in Kotproben von Katzen (Sparkes et al., 1998b) detektiert werden. Anhand molekularbiologischer Methoden konnte das Genus *Escherichia* in Duodenalbiopsien (Janeczko et al., 2008) sowie im Kot von Katzen (Janeczko et al., 2008; Lubbs et al., 2009; Vester et al., 2009; 2010; Handl et al., 2011; Deusch et al., 2014; Kieler et al., 2016) nachgewiesen werden. Methodische Aspekte sind bei der Interpretation zu berücksichtigen. So konnten Hooda et al. (2013) das Genus *Escherichia* in Kotproben von Katzenwelpen mithilfe der Pyrosequenzierung nicht nachweisen, wohingegen Deusch et al. (2014) dieses mittels Illumina®-Sequenzierung in denselben Kotproben detektieren konnten. In einer weiteren Studie wurden

Bakteriensequenzen, welche die Autoren als „*E. coli*-ähnlich“ bezeichneten, lediglich im Kot von zwei der insgesamt 15 untersuchten Katzen nachgewiesen (Ritchie et al., 2010). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Vorkommen von *E. coli* im Kot von Katzen entweder variabel oder abhängig von der Untersuchungsmethode ist.

### 5.3.2 Qualitativer Nachweis pathogener *E. coli* im Katzenkot

In der vorliegenden Arbeit sollte weiterhin untersucht werden, ob pathogene *E. coli*-Stämme im Kot von Katzen qualitativ nachweisbar sind. Dieser qualitative Nachweis von *E. coli*-Pathogenitätsgenen erfolgte mittels einer MPCR nach einer am Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin für Fäzes vom Schwein etablierten Methode (Göbel, 2003) sowie einer anschließenden Agarose-Gelelektrophorese. *E. coli* ist zum einen ein Kommensale im Darm vieler Tiere, zum anderen existieren auch pathogene *E. coli*-Stämme (Wieler und Ewers, 2011). Pathogene *E. coli*-Stämme können wiederum in intestinal pathogene und extraintestinal pathogene *E. coli* eingeteilt werden (Wieler und Ewers, 2011). Darmpathogene *E. coli* werden weiter in enteropathogene (EPEC), enterotoxische (ETEC), enteroinvasive (EIEC), Shigatoxin-bildende (STEC), enteroaggregative (EaggEC) sowie diffus-adhärenzte (DAEC) *E. coli* differenziert (Beutin, 1999; Puño-Sarmiento et al., 2013). Verschiedene Studien berichten sowohl über das Vorkommen von EPEC im Kot von Katzen mit intestinalen Erkrankungen als auch über das Vorkommen ebendieser bei gesunden Katzen (Beutin, 1999; Goffaux et al., 2000; Morato et al., 2009; Puño-Sarmiento et al., 2013). In der vorliegenden Studie wurden die Kotproben der Katzen auf das Vorkommen folgender Pathogenitätsgene untersucht: *elt-IA*, *elt-Ib*, *est-II*, *faeG*, *fan*, *fasA*, *fedA* und *fimf41a*. Die Fimbrienantigene enterotoxischer *E. coli* *faeG* (F4), *fan* (F5), *fasA* (F6), *fedA* (F18) und *fimf41a* (F41) werden auch als Adhäsine bezeichnet, über welche *E. coli* an den Enterozyten anheften kann (Wieler und Ewers, 2011). Das Gen *elt-IA* codiert für das hitzelabile Enterotoxin (LT) A, die Gene *elt-Ib* und *est-II* für die hitzestabilen Enterotoxine I und II (St<sub>a</sub>P, St<sub>b</sub>) (Bosworth und Casey, 1997). Diese Toxine werden von ETEC gebildet (Beutin, 1999). Die *E. coli*-Pathogenitätsgene, welche in der vorliegenden Arbeit auf das Vorhandensein im Kot der Katzen untersucht wurden, konnten bereits in verschiedenen Untersuchungen in der Digesta von Schweinen nachgewiesen werden (Frydendahl, 2002; Göbel, 2003; Schierack et al., 2006; Kirsch, 2010).

In den Kotproben der vorliegenden Studie gelang kein qualitativer Nachweis für die Pathogenitätsgene *elt-IA*, *faeG* und *fimf41a*. Dagegen konnte in etwa 32 % der untersuchten Kotproben das hitzestabile Enterotoxin I sowie in insgesamt 17 % der Proben das hitzestabile Enterotoxin II detektiert werden. Des Weiteren konnten in etwa 52 % der untersuchten Kotproben das Pathogenitätsgen *fasA*, in ca. 38 % der Proben das *fedA*-Gen

sowie in 5 % der Proben das *fan*-Gen nachgewiesen werden. Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte berücksichtigt werden, dass sich die Prozentangaben auf die Gesamtprobenzahl ( $n = 60$ ), welche sich aus jeweils sechs Einzelproben einer Katze zusammensetzte, beziehen. So konnten mitunter in einer individuellen Kotprobe bestimmte Pathogenitätsfaktoren nachgewiesen werden, während in den anderen Proben derselben Katze keine entsprechenden Pathogenitätsfaktoren detektierbar waren. Dies weist darauf hin, dass es im zeitlichen Auftreten bzw. der Ausscheidung von Klonen mit entsprechenden Pathogenitätsfaktoren Diskontinuitäten gibt.

Insgesamt wurden im Kot der Katzen verschiedene Pathogenitätsgene, wie sie bei ETEC vorkommen können (Wieler und Ewers, 2011), qualitativ nachgewiesen. Vor dem Hintergrund der Ergebnisse der qPCR, welche das Vorkommen der *E. coli/Hafnia/Shigella*-Gruppe aufzeigen konnten, kann demnach vermutet werden, dass es sich hierbei teilweise um ETEC gehandelt haben könnte. Bislang liegen nur wenige Studien zu dem Vorkommen von ETEC bei der Katze vor, sodass auch wenig über die Rolle von ETEC bei dieser Tierart bekannt ist (Beutin, 1999). Beim Menschen (Nataro und Kaper, 1998; Shabana et al., 2013; Sahl et al., 2015; Joffre et al., 2016) sowie bei anderen Tierarten (Holland, 1990; Byun et al., 2013) haben ETEC hingegen eine große Bedeutung hinsichtlich der Entstehung von intestinalen Erkrankungen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung unterscheiden sich teilweise mit Beobachtungen aus anderen Studien. So konnten Blanco et al. (1993) mittels kultureller Verfahren keinen Nachweis des hitzelablen Enterotoxins von *E. coli* im Kot gesunder Katzen erbringen. Dagegen detektierten die Autoren hämolysierende *E. coli*-Stämme sowie Cytonekrosefaktor 1-produzierenden Isolate, welche gewisse Parallelen zu humanpathogenen Stämmen aufwiesen (Blanco et al., 1993). Eine andere Studie konnte ebenfalls kein Vorkommen von *E. coli*-Stämmen, welche hitzelabile oder hitzestabile Enterotoxine bilden, im Kot von gesunden und kranken Katzen aufzeigen (Abaas et al., 1989). Auch in neueren Untersuchungen wurde ETEC weder im Kot von gesunden Katzen noch von Katzen mit gastrointestinalen Erkrankungen detektiert (Morato et al., 2009; Puño-Sarmiento et al., 2013).

Für die Interpretation der Ergebnisse sollte erwähnt werden, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer und Referenzstämme bislang nur für den Nachweis von schweinepathogenen *E. coli*-Stämmen eingesetzt wurden. Bei Schweinen beschrieben Schierack et al. (2006) keine klinischen Erkrankungen trotz des Nachweises von ETEC- bzw. EDEC-Pathogenitätsgenen im Kot der Tiere. Die Autoren vermuteten daher eine geringe bzw. keine Genexpression im Darmtrakt, eine geringe Anzahl pathogener *E. coli*, oder eine Unterdrückung dieser durch andere Bakterien (Schierack et al., 2006). Diese Hypothesen sind auch für die vorliegende Studie anwendbar, da bei den Katzen ebenfalls keine

klinischen Anzeichen einer Erkrankung vorlagen. Vor dem Hintergrund, dass mittels MPCR und anschließender Agarose-Gelelektrophorese keine Aussage zum quantitativen Vorkommen pathogener *E. coli* sowie zu der Vitalität der Bakterien möglich ist, kann keine abschließende Bewertung des vorliegenden Nachweises bestimmter Pathogenitätsfaktoren von *E. coli* im Kot der Katzen getroffen werden. Dieser Aspekt sollte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

### **5.3.3 Einfluss einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität im Futter auf die fäkale Mikrobiota von Katzen**

#### **5.3.3.1 qPCR**

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss einer variierenden Proteinkonzentration und -qualität im Futter auf die Zusammensetzung der Mikrobiota im Kot von Katzen mittels verschiedener molekularbiologischer Verfahren evaluiert. Studien von Zentek et al. (2003; 2004) und Lubbs et al. (2009) konnten einen Anstieg von *C. perfringens* im Kot von Hunden und Katzen bei hohen Proteingehalten im Futter aufzeigen. Lubbs et al. (2009) vermuteten vor diesem Hintergrund, dass ein hoher Proteingehalt im Futter zu einem generell vermehrten Vorkommen peptidolytischer Bakterien im Dickdarm führen kann. Zudem wurde von den Autoren postuliert, dass eine geringere Proteinverdaulichkeit zu einem vermehrten Einstrom von Eiweiß in den Dickdarm führen kann und dadurch das Wachstum und die Aktivität peptidolytischer Bakterien gefördert werden (Lubbs et al., 2009). Vor diesem Hintergrund ergab sich für die vorliegende Arbeit die Hypothese, dass Variationen im Proteingehalt und in der Proteinqualität eines Futters zu Veränderungen in der Zusammensetzung sowie in der Stoffwechselaktivität der Mikrobiota im Kot von Katzen führen und insbesondere peptidolytische Bakterien positiv beeinflussen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie konnten zeigen, dass eine geringere Proteinqualität im Futter, unabhängig von der Proteinkonzentration, zu höheren Kopienzahlen des *C. coccoides*-Clusters XIVa im Kot der Katzen führte ( $P = 0,011$ ). Diesem Cluster werden Vertreter der Genera *Clostridium*, *Coprococcus*, *Eubacterium*, *Lachnospira* und *Ruminococcus* zugeordnet (Matsuki et al., 2002) und beinhaltet vor allem Butyrat-bildende Bakterien (Pryde et al., 2002; Louis und Flint, 2009). Aufgrund der Nutzung von Butyrat als Energielieferant für Darmepithelien (Roediger, 1980; Cummings, 1995; Fung et al., 2012), stehen Butyrat-bildende Bakterien seit langem im Fokus vieler Forschungsarbeiten (Barcenilla et al., 2000; Pryde et al., 2002; Louis et al., 2007; Louis und Flint, 2009). Das *C. coccoides*-Cluster XIVa konnte in einer Studie von Ritchie et al. (2008) bei Katzen, ähnlich wie beim Menschen (Wang et al., 2003; Louis und Flint, 2009), überwiegend im Kolon detektiert werden. Zudem identifizierten Ritchie et al. (2010) dieses Cluster mit einem Anteil

von 24 % im Kot von Katzen. Handl et al. (2011) beschrieben im Kot von Katzen hingegen einen Anteil von über 60 % für das *C. coccooides* Cluster XIVa. Zwar scheint dieses Cluster vornehmlich Saccharose zu fermentieren (Rivière et al., 2016), jedoch lassen die Ergebnisse der vorliegenden Studie vermuten, dass peptidolytische Aktivitäten vorliegen könnten. So kann der in der vorliegenden Studie detektierte Anstieg des *C. coccooides*-Clusters XIVa im Kot der Katzen bei Einsatz von Futtermitteln mit einer geringeren Eiweißqualität einen Hinweis auf eine verstärkte mikrobielle Proteinferrmentation aufgrund eines vermehrten Einstroms von unverdaulichem Eiweiß in den Dickdarm darstellen. Ähnliches konnten Rist et al. (2013) bei Ferkeln, die Rationen mit unterschiedlichen Eiweißqualitäten erhielten, beobachten. Hier führte eine im Vergleich zu Casein schlechter verdauliche Ration auf Basis von Sojamehl zu höheren Zahlen des *C. coccooides*-Clusters XIVa im Kot der Tiere (Rist et al., 2014).

Für das Vorkommen von *C. difficile* im Kot der Katzen konnte sowohl ein Einfluss des Proteingehalts als auch der Proteinqualität in den Versuchsdiäten ermittelt werden. So führten geringe ebenso wie hohe Gehalte an Protein im Vergleich zu einer mittleren Eiweißkonzentration im Futter zu geringeren Kopienzahlen von *C. difficile*. Dieser Effekt konnte jedoch nur bei einer gleichzeitig geringen Eiweißqualität in den Diäten beobachtet werden. *C. difficile* wird dem *Clostridium* Cluster XI zugeordnet (Collins et al., 1994) und wird beim Menschen und auch bei Katzen als pathogenes Bakterium betrachtet (Marks et al., 2011). In der vorliegenden Studie konnte in 93 % der Kotproben *C. difficile* nachgewiesen werden, ohne dass jedoch Durchfallerkrankungen bei den Katzen auftraten. Ebenso wurde in anderen Untersuchungen *C. difficile* im Kot von gesunden Katzen detektiert (Borriello et al., 1983; Weber et al., 1989; Riley et al., 1991; al Saif und Brazier, 1996; Madewell et al., 1999; Tun et al., 2012).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Zentek et al. (2003; 2004) und Lubbs et al. (2009) führte ein hoher Proteingehalt im Futter in der vorliegenden Studie zu keinem signifikanten Anstieg der Kopienzahlen von *C. perfringens* im Kot der Katzen. *C. perfringens* wird dem *Clostridium* Cluster I zugeordnet (Collins et al., 1994), welches in der vorliegenden Studie ebenfalls nicht durch die Fütterung beeinflusst wurde. Ein Grund für diese Diskrepanz zu den Ergebnissen aus der Literatur könnte einerseits die verwendete Methode sein, da Zentek et al. (2003; 2004) kulturelle Verfahren zum Nachweis von *C. perfringens* nutzten, während in der vorliegenden Untersuchung molekularbiologische Methoden Anwendung fanden. Andererseits könnten die abweichenden Ergebnisse dadurch zu erklären sein, dass in der vorliegenden Studie andere Primersequenzen als bei Lubbs et al. (2009) verwendet wurden. Vester et al. (2009) konnten im Kot von Katzenwelpen ebenso keine Beeinflussung von *C. perfringens* in Abhängigkeit von der Proteinaufnahme der Tiere aufzeigen. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass in der Studie von Vester et al. (2009) eine sehr geringe Fallzahl

vorlag. So erhielten lediglich zwei Katzen das Futter mit einem hohen Proteingehalt und vier Katzen ein Futter mit einem mittleren Proteingehalt (Vester et al., 2009).

Weder der Proteingehalt, noch die Proteinqualität im Futter übten in der vorliegenden Arbeit einen Einfluss auf das Vorkommen von *Lactobacillus* spp. im Kot der Katzen aus. Diese Beobachtung stimmt mit Ergebnissen von Lubbs et al. (2009) überein. Dagegen konnten Vester et al. (2009) und Hooda et al. (2013) eine Abnahme von *Lactobacillus* spp. im Kot von Katzenwelpen bei einem hohen Proteingehalt im Futter aufzeigen. Ebenso wurde in einer *in vitro*-Studie ein Rückgang von *Lactobacillus* spp. beobachtet, wenn ein enzymatisch vorverdautes Futter mit einem hohen Proteingehalt mit einem fäkalen Inokulum von Katzen inkubiert wurde (Pinna et al., 2014). Insgesamt liegen demnach bei der Katze uneinheitliche Berichte zur Beeinflussung fäkaler Laktobazillen durch einen variierenden Proteingehalt im Futter vor. Hierbei sollte auch berücksichtigt werden, dass möglicherweise weitere Futterkomponenten in der vorliegenden Arbeit sowie in den zuvor genannten Studien (Lubbs et al., 2009; Vester et al., 2009; Hooda et al., 2013; Pinna et al., 2014) einen Einfluss auf den Anteil an Laktobazillen im Kot der Katzen genommen haben könnten. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Laktobazillen auch durch den Gehalt an Kohlenhydraten im Futter beeinflusst werden können (Terada et al., 1993; Barry et al., 2010). Zudem scheint dieses Genus einen positiven Einfluss auf die Darmgesundheit zu haben (Rastall, 2004; Rist et al., 2013), wie beispielsweise durch Produktion antimikrobieller Stoffe (Rastall, 2004) oder Konkurrenz um Nährstoffe oder Adhäsionsstellen (van der Waaij, 1991; Rist et al., 2013). Allerdings scheint dieses Genus im Vorkommen und Anteil auch individuellen Schwankungen zu unterliegen (Grzeškowiak et al., 2015).

Für die Daten zum Vorkommen von *Bifidobacterium* spp., der *E. coli/Hafnia/Shigella*-Gruppe sowie von *Salmonella* spp. im Kot der Katzen konnte in der vorliegenden Studie aufgrund einer zu geringen Detektionsfrequenz keine Kontrastberechnung durchgeführt werden, sodass keine abschließende Bewertung von fütterungsassoziierten Einflüssen möglich ist. Einer häufigen Auffassung folgend beeinflussen die Genera *Bifidobacterium* und *Lactobacillus* die Darmgesundheit beim Menschen und beim Tier positiv, indem sie beispielsweise antimikrobielle Substanzen produzieren können (Fuller, 1989; Gibson und Wang, 1994; Gibson und Roberfroid, 1995; Rastall, 2004; Wang et al., 2014). Vor diesem Hintergrund werden Bifidobakterien- und Laktobazillenstämme auch als Probiotika eingesetzt (Butel, 2014). Bei Katzen konnte ein Rückgang von *Bifidobacterium* spp. im Kot bei hohen Proteingehalten im Futter aufgezeigt werden (Lubbs et al., 2009; Vester et al., 2009; Hooda et al., 2013; Deusch et al., 2014). Die Autoren vermuteten, dass dieser Rückgang im Zusammenhang mit einem vermehrten Vorkommen peptidolytischer Bakterien im Darm der Katzen sowie deren Metaboliten steht (Lubbs et al., 2009; Vester et al., 2009; Hooda et al.,

2013). Daneben könnte dieser Effekt auch die Folge des geringen Kohlenhydratanteils im Futter sein (Lubbs et al., 2009; Vester et al., 2009; Hooda et al., 2013).

Für *E. coli* wurde bei Katzenwelpen eine Abnahme im Kot bei einer hohen Proteinaufnahme beschrieben (Vester et al., 2009), wohingegen dieser Effekt bei adulten Tieren nicht auftrat (Lubbs et al., 2009). Einige Vertreter der Gruppe der *Enterobacteriaceae*, darunter beispielsweise *E. coli* und *Salmonella* spp., können für das Tier sowie für den Menschen als pathogene Bakterien betrachtet werden (Marks et al., 2011). Jedoch können diese auch bei gesunden Tieren isoliert werden (Hill et al., 2000; Minamoto et al., 2012). In einer Studie von Tun et al. (2012) wurden Vertreter des Genus *Salmonella* im Kot von Katzen mit einem Anteil zwischen 0,02–0,07 % nachgewiesen.

Insgesamt kann anhand der ermittelten Ergebnisse der vorliegenden Studie gesagt werden, dass *Bifidobacterium* spp., die *E. coli/Hafnia/Shigella*-Gruppe und *Salmonella* spp. lediglich zu geringen Anteilen im Kot von Katzen vorzufinden sind und diese Bakteriengruppen einer variierenden Detektionsfrequenz unterliegen. Weiterführende Untersuchungen erscheinen notwendig, um mögliche fütterungsassoziierte Einflüsse auf das Vorkommen dieser Bakteriengruppen im Gastrointestinaltrakt von Katzen zu evaluieren.

#### 5.3.3.2 Illumina®-Sequenzierung

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Einfluss des Futterproteins auf die Phyla *Firmicutes*, *Bacteroidetes* sowie *Fusobacteria* in den Kotproben der Katzen aufgezeigt werden. Der Einsatz von Diäten mit einer hohen Proteinqualität führte hierbei zu einem höheren Anteil an *Firmicutes* sowie zu geringeren Anteilen an *Bacteroidetes* und *Fusobacteria* als Diäten mit einer geringeren Eiweißqualität. Steigende Proteingehalte führten, unabhängig von der Proteinqualität, im Futter zu einer Zunahme an *Fusobacteria* im Kot der Katzen.

Der höhere prozentuale Anteil dieses Phylums im Kot der Katzen bei einer geringen Proteinqualität sowie bei steigenden Proteingehalten im Futter könnte daher möglicherweise durch einen höheren Anteil an präzäkal unverdaulichem Protein im Dickdarm und einer damit verbundenen höheren Substratverfügbarkeit für *Fusobacteria* erklärt werden.

Allgemein zählen zu dem Phylum *Fusobacteria* Vertreter des Genus *Fusobacterium*, welche überwiegend Aminosäuren als Substrat nutzen (Loesche und Gibbons, 1968; Potrykus et al., 2008).

Bermingham et al. (2013a) und Hooda et al. (2013) konnten bei Katzen ebenfalls einen prozentualen Anstieg dieses Phylums im Kot bei hohen Proteingehalten im Futter verzeichnen. Insgesamt lagen in der vorliegenden Studie die prozentualen Anteile von *Fusobacteria* bei einer hohen Proteinaufnahme (6–8%) der Katzen unter den ermittelten Anteilen von Hooda et al. (2013) (12–13 %). Auch Bermingham et al. (2013a) ermittelten bei einer hohen Proteinaufnahme weitaus höhere Anteile an *Fusobacteria* im Kot trächtiger

Katzen (ca. 25 %) und bei den Welpen (ca. 13 % bzw. 24 %; 2 Fütterungsgruppen) dieser Tiere. Zwar wurden diese Untersuchungen bei wachsenden (Hooda et al., 2013) sowie trächtigen und wachsenden Tieren (Bermingham et al., 2013a) durchgeführt, jedoch konnten Hooda et al. (2013) speziell für dieses Phylum keinen altersassoziierten Effekt im Alter von 8–16 Wochen feststellen. Allerdings kann ein möglicher Einfluss des Alters in größeren Zeitintervallen oder des Reproduktionsstatus nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Des Weiteren differierten die Versuchsfuttermittel der verschiedenen Untersuchungen. So verwendeten Hooda et al. (2013) ein Trockenfuttermittel, während in der vorliegenden Untersuchung sowie in der Studie von Bermingham et al. (2013a) ein Feuchtfuttermittel eingesetzt wurde. Bermingham et al. (2013b) konnten aufzeigen, dass im Kot von Katzen bei Fütterung eines Feuchtfuttermittels höhere Anteile des Phylums *Fusobacteria* vorlagen (23 %) als nach der Fütterung eines Trockenfuttermittels (0,3 %). Die Autoren wiesen jedoch darauf hin, dass neben der Konfektionierung auch andere Faktoren, wie die Nährstoffzusammensetzung der Versuchsfuttermittel einen Einfluss auf die Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota der Katzen ausgeübt haben könnten (Bermingham et al., 2013b). Ritchie et al. (2010), Handl et al. (2011) und Tun et al. (2012) stellten hingegen im Kot von Katzen deutlich geringere Anteile an *Fusobacteria* im Vergleich zu dessen Anteil in der vorliegenden Arbeit fest. Mögliche Erklärungsansätze für diese variierenden Studienergebnisse stellen Unterschiede im Proteingehalt oder in der Zusammensetzung der Versuchsdiäten (Bermingham et al., 2013b) sowie in den eingesetzten Analysemethoden dar. Vor diesem Hintergrund erscheint eine Studie von Deusch et al. (2014) interessant, in welcher eine Illumina®-Sequenzierung mit denselben Kotproben von Katzenwelpen aus der Studie von Hooda et al. (2013) durchgeführt wurde. So konnten Deusch et al. (2014) ebenfalls höhere Anteile an *Fusobacteria* im Kot bei hohem Proteingehalten im Futter feststellen, jedoch lagen diese Anteile (ca. 2 %) deutlich unter den von Hooda et al. (2013) mittels Pyrosequenzierung ermittelten Werten.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei Einsatz der Diät mit einer geringeren Proteinqualität und einem mittleren Proteingehalt ein höherer Anteil an *Proteobacteria* im Kot der Katzen detektiert werden als bei Einsatz der Diäten mit einem niedrigen und hohem Proteingehalt bei gleichzeitig geringerer Proteinqualität. Der gegenteilige Effekt konnte bei Einsatz der Versuchsfuttermittel mit der hohen Proteinqualität beobachtet werden, hier lag der geringste Anteil an *Proteobacteria* im Kot der Katzen bei Einsatz der Diät mit dem mittleren Proteingehalt vor. Dagegen stellten Hooda et al. (2013) und Deusch et al. (2014) bei Fütterung einer Diät mit einem hohen Proteingehalt insgesamt höhere Anteile an *Proteobacteria* im Kot von Katzen fest als bei Einsatz einer Diät mit einem geringen Proteingehalt. Allerdings wurde in diesen Untersuchungen die Qualität der verwendeten Eiweißquelle nicht berücksichtigt, welche in der vorliegenden Studie einen Einfluss auf

dieses Phylum ausübte. Zudem wurde in der vorliegenden Studie im Gegensatz zu den Untersuchungen von Hooda et al. (2013) und Deusch et al. (2014) ein Feuchtfuttermittel eingesetzt. Unterschiede in der Konfektionierung und Zusammensetzung der Versuchsdiäten stellen einen möglichen Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Studien dar. So konnten in einer Studie mit adulten Katzen bei Einsatz eines Feuchtfuttermittels höhere Anteile für das Phylum *Proteobacteria* im Kot der Tiere festgestellt werden als beim Einsatz eines Trockenfuttermittels (Bermingham et al., 2013b).

Bezüglich des Phylums *Actinobacteria* beschrieben Hooda et al. (2013) und Deusch et al. (2014) eine Abnahme im Kot von Katzen bei hohen Proteingehalten im Futter, während in der vorliegenden Studie keine fütterungsassoziierte Beeinflussung dieses Phylums detektiert wurde. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz stellt wiederum eine unterschiedliche Konfektionierung bzw. Zusammensetzung der Versuchsfuttermittel dar, da Bermingham et al. (2013b) geringere Anteile für *Actinobacteria* (0,1 %) im Kot von Katzen bei Einsatz eines Feuchtfuttermittels beobachteten als bei dem Einsatz eines Trockenfuttermittels (16,5 %). Bei der genaueren Betrachtung der Ergebnisse von Hooda et al. (2013) fällt zudem auf, dass der diätassoziierte Effekt des Phylums *Actinobacteria* vornehmlich durch eine Abnahme des Anteils an *Bifidobacteriaceae* hervorgerufen wurde (Hooda et al., 2013). Hierzu zählt das Genus *Bifidobacterium*, welches in der vorliegenden Untersuchung mittels Illumina®-Sequenzierung in lediglich 5 Kotproben detektiert werden konnte (Daten werden nicht gezeigt). Es ist daher möglich, dass der fehlende fütterungsassoziierte Effekt auf das Phylum *Actinobacteria* auf die geringe Detektionsfrequenz von *Bifidobacterium* zurückzuführen ist. Den unregelmäßigen Nachweis von Bifidobakterien bestätigen auch andere Publikationen, wobei sich altersassoziierte Effekte schon ab dem Welpenalter abzeichnen (Jia et al., 2011a; b; Hooda et al., 2013; Deusch et al., 2014; 2015; Masuoka et al., 2017). Während Hooda et al. (2013) einen altersassoziierten Anstieg von *Bifidobacterium* im Kot von Katzenwelpen im Alter von 8–16 Wochen feststellen konnten, beobachteten Deusch et al. (2015) im Kot von Katzen im Alter von 18–42 Wochen eine Abnahme von *Bifidobacterium*. In diesem Zusammenhang beschrieben Masuoka et al. (2017) im Kot von Katzen im Alter von rund 17 Jahren höhere Zahlen an *Bifidobacterium* im Vergleich zu 3 und 11 Jahre alten Tieren. Insgesamt deuten die Ergebnisse aus der vorliegenden Studie sowie aus anderen Untersuchungen darauf hin, dass das Genus *Bifidobacterium* sehr variabel im Kot von Katzen vorkommt (Jia et al., 2011a; b), altersbedingt beeinflusst wird (Hooda et al., 2013; Deusch et al., 2015; Masuoka et al., 2017) oder aufgrund unterschiedlicher Analysemethoden unzureichend detektiert wird (Suau et al., 1999; Ritchie et al., 2008; 2010; Suchodolski et al., 2008; Masuoka et al., 2017).

In der vorliegenden Arbeit führten steigende Proteinkonzentrationen im Futter zu einer Abnahme des relativen Anteils an *Prevotella* im Kot der Katzen. Eine Abnahme dieses Genus bei steigendem Protein- und abnehmendem Kohlenhydratgehalt im Futter wurde auch von Deusch et al. (2014) im Kot von Katzenwelpen beschrieben. In Untersuchungen aus der Humanmedizin wird das Vorkommen dieses Genus vorwiegend mit kohlenhydratreicher Diät in Verbindung gebracht (De Filippo et al., 2010; Wu et al., 2011; Kovatcheva-Datchary et al., 2015; Ley, 2016), da dieses Genus zum Abbau von Polysacchariden befähigt ist (Gasparic et al., 1995; Ramsak et al., 2000; Miyazaki et al., 2003; Flint et al., 2008; 2012). Daher kann vermutet werden, dass der in der vorliegenden Studie beobachtete Rückgang dieses Genus im Kot der Katzen bei proteinreicher Fütterung auf den damit verbundenen geringeren Gehalt an Kohlenhydraten in den Versuchsfuttermitteln zurückzuführen ist.

Bei der Interpretation der Ergebnisse sollten jedoch methodische Aspekte berücksichtigt werden, da unterschiedliche Analysemethoden derselben Kotproben bei Hooda et al. (2013) und Deusch et al. (2014) zu teilweise differierenden Ergebnissen führten. So stellten Hooda et al. (2013) im Gegensatz zu Deusch et al. (2014) keinen fütterungsassoziierten Effekt für das Genus *Prevotella* fest. In weiteren Studien führte die Fütterung eines Trockenfutters mit einem mittleren Proteingehalt (33 % (Bermingham et al., 2013b) bzw. 35 % (Bermingham et al., 2013a)) verglichen mit einem Feuchtfutter mit einem höheren Proteingehalt (42 % (Bermingham et al., 2013b) bzw. 45 % (Bermingham et al., 2013a)) zu keinem Unterschied in dem relativen Anteil an *Prevotella* im Kot von adulten Katzen (Bermingham et al., 2013b) sowie von Katzenwelpen (Bermingham et al., 2013a). Diese Futtermittel unterschieden sich zwar im Rohproteingehalt, jedoch auch im Kohlenhydratanteil sowie im Rohfettgehalt, sodass ein Einfluss weiterer Futterkomponenten auf die Mikrobiota im Kot der Katzen möglich ist (Bermingham et al., 2013a; b). Zudem lagen die Rohproteingehalte der verwendeten Feuchtfuttermittel von Bermingham et al. (2013a; b) unter den Rohproteingehalten, welche in der vorliegenden Studie für die Versuchsfuttermittel mit den höchsten Proteingehalten (54,9 % bzw. 56,1%) vorgesehen wurden, sodass Unterschiede in der quantitativen Proteinaufnahme der Katzen ebenfalls einen Erklärungsansatz für die variierenden Ergebnisse der vorliegenden Studie sowie der Arbeiten von Bermingham et al. (2013a; b) darstellen könnten.

Die vorliegenden Ergebnisse konnten zudem einen Einfluss der Proteinqualität im Futter auf das Vorkommen von *Prevotella* im Kot der Katzen aufzeigen, indem bei Einsatz der Versuchsdiäten mit der geringeren Proteinqualität höhere prozentuale Anteile dieses Genus detektiert wurden. Grundsätzlich könnte eine geringere präzäkale Proteinverdaulichkeit bei Einsatz der Futtermittel mit der geringeren Eiweißqualität zu einer höheren Substratverfügbarkeit im Dickdarm geführt haben. Dazu liegen für Katzen aktuell keine

Berichte in der Literatur vor. Ob einzelne Spezies mit peptidolytischer Aktivität, wie beispielsweise *Prevotella ruminicola* (Wallace, 1996), im Wachstum gefördert wurden, muss offenbleiben.

Macfarlane et al. (1986) konnten in einer *in vitro*-Studie zeigen, dass Vertreter des Genus *Bacteroides* im Kot vom Menschen proteolytische Aktivität aufwiesen. Zudem wird in der Humanmedizin ein vermehrtes Vorkommen dieses Genus mit einer protein- und auch fettreichen (vor allem tierischen Ursprungs) Ernährung in Verbindung gebracht (Wu et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte ein Anstieg von *Bacteroides* im Kot von Katzen mit steigenden Proteingehalten im Futter festgestellt werden. Zudem wurden für das Genus *Parabacteroides* in der vorliegenden Untersuchung ebenfalls ansteigende prozentuale Anteile im Kot bei zunehmenden Proteinkonzentrationen im Futter nachgewiesen. *Parabacteroides faecis* sp. nov., welches unter anderem auch zum Abbau von Aminosäuren befähigt ist, wurde kürzlich im Kot vom Menschen nachgewiesen (Sakamoto et al., 2015). Möglicherweise hat eine hohe Proteinaufnahme der Katzen in der vorliegenden Studie das Wachstum derartiger *Parabacteroides* spp. gefördert. Hohe Anteile der Genera *Bacteroides* und *Parabacteroides* wurden auch im Kot von Katzen nach Fütterung einer proteinreichen Diät festgestellt (Deusch et al., 2014). Ebenso detektierten Bermingham et al. (2013a) bei Einsatz einer eiweißreichen Diät höhere Anteile an *Bacteroides* im Kot von Katzen als bei der Fütterung einer Diät mit einem mittleren Proteingehalt. Insgesamt kann anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie der Beobachtungen früherer Studien (Bermingham et al., 2013a; Deusch et al., 2014) gesagt werden, dass ein hoher Proteingehalt im Futter das Wachstum der Genera *Bacteroides* und *Parabacteroides* im Darm von Katzen scheinbar fördert, während die Proteinqualität nicht relevant zu sein scheint.

Der prozentuale Anteil an *Fusobacterium* im Kot der Katzen stieg mit zunehmenden Proteingehalten im Futter an. Grundsätzlich fermentieren Vertreter dieses Genus Aminosäuren (Jackins und Barker, 1951; Loesche und Gibbons, 1968; Rogers et al., 1991; Ramezani et al., 1999) und bilden vornehmlich n-Buttersäure, jedoch keine i-Buttersäure oder i-Valeriansäure (Bennett und Eley, 1993). Der vorliegend bei einer hohen Proteinaufnahme beobachtete Anstieg des Genus *Fusobacterium* im Kot von Katzen stimmt mit Beobachtungen von Hooda et al. (2013), Bermingham et al. (2013a) und Deusch et al. (2014) überein. Des Weiteren konnten in der vorliegenden Untersuchung bei Einsatz der Versuchsdiäten mit einer geringeren Proteinqualität insgesamt höhere Anteile an *Fusobacterium* im Kot der Katzen nachgewiesen werden als bei Fütterung der Diäten mit einer hohen Proteinqualität. Diese Beobachtung könnte möglicherweise dadurch erklärt werden, dass bei Einsatz der Diäten mit der geringeren Proteinqualität ein größerer Anteil an präzäkal unverdaulichem Protein im Dickdarm für den Metabolismus peptidolytischer Bakterien

zu Verfügung stand und somit diese vermehrt im Wachstum gefördert wurden (Lubbs et al., 2009).

Die statistische Datenauswertung ergab für das Genus *Robinsoniella* eine Interaktion zwischen der Proteinqualität und der Proteinkonzentration im Futter. Hierbei konnte gezeigt werden, dass bei Einsatz der Versuchsdiäten mit der geringeren Eiweißqualität, ein Anstieg des relativen Anteils an *Robinsoniella* im Kot der Katzen mit höheren Proteingehalten im Futter auftrat. Im Gegensatz dazu nahm der Anteil dieses Genus bei Einsatz des Futtermittels mit der höheren Proteinqualität und der höchsten Eiweißkonzentration im Vergleich zu den Diäten mit dem geringen und mittleren Eiweißgehalt und gleichzeitig hoher Eiweißqualität ab. Cotta et al. (2009) benannten erstmals einen Vertreter des Genus *Robinsoniella* als *Robinsoniella peoriensis* gen. nov., sp. nov. und konnten diesen dem *C. coccoides* Cluster XIVa nach Collins et al. (1994) zuordnen. In der vorliegenden Studie wurden für dieses Cluster insgesamt geringere Kopienzahlen im Kot der Katzen bei Einsatz der Versuchsdiäten mit einer hohen Proteinqualität aufgezeigt als bei Fütterung der Diäten mit der geringeren Proteinqualität. Bislang wurde für dieses Genus offenbar kein fütterungsassoziierter Einfluss bei Katzen beschrieben.

Steigende Proteingehalte im Futter führten in der vorliegenden Arbeit zu einer Abnahme an *Faecalibacterium* und *Phascolarctobacterium* im Kot der Katzen. Hooda et al. (2013) konnten hingegen bei hohen Proteinkonzentrationen im Futter höhere Anteile beider Genera im Kot von Katzenwelpen feststellen als bei mittleren Proteingehalten im Futter. Vertreter des Genus *Faecalibacterium* bilden vor allem Butyrat (Louis et al., 2014), während Vertreter des Genus *Phascolarctobacterium* Propionat aus Succinat bilden (Watanabe et al., 2012), sodass diese Genera überwiegend bei der Fermentation von Kohlenhydraten aus der Nahrung eine Rolle spielen (Topping und Clifton, 2001; Benus et al., 2010; Hooda et al., 2012; Louis et al., 2014).

Die Versuchsdiäten der vorliegenden Studie wiesen mit steigendem Proteingehalt einen abnehmenden Kohlenhydratanteil auf. Die beobachtete Abnahme von *Faecalibacterium* und *Phascolarctobacterium* im Kot der Katzen bei steigenden Proteingehalten im Futter könnte somit zum einen im Zusammenhang mit einer geringeren Kohlenhydratverfügbarkeit im Dickdarm zusammenhängen.

*Faecalibacterium (F.) prausnitzii* wird zu dem *C. leptum*-Cluster IV nach Collins et al. (1994) gezählt und gilt neben anderen Vertretern des *C. coccoides*-Clusters XIVa als ein wichtiges Butyrat-bildendes Bakterium im Darm des Menschen (Louis und Flint, 2009). Auch im Darm von Tieren konnten *F. prausnitzii* sowie verwandte Vertreter dieses Bakteriums beschrieben werden (Miquel et al., 2014). Untersuchungen konnten eine Reduktion der Zahl von *F. prausnitzii* im Kot von Patienten mit Morbus Crohn aufzeigen (Fujimoto et al., 2013; Galecka et al., 2013). Aufgrund von anti-inflammatorischen Eigenschaften von *F. prausnitzii* ist eine

Förderung des Wachstums dieses Bakteriums bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen in der Humanmedizin von wissenschaftlichem Interesse (Sokol et al., 2008; Cao et al., 2014; Miquel et al., 2015; Quévrain et al., 2016). Bei Katzen konnte gezeigt werden, dass Tiere mit gastrointestinalen Erkrankungen geringere Zahlen des *C. leptum*-Clusters IV, zu welchem das Genus *Faecalibacterium* gehört, im Kot aufwiesen (Suchodolski et al., 2015).

*Faecalibacterium* stellt einen Bestandteil der kommensalen Mikrobiota im Darm dar (Suchodolski, 2016), sodass die in der vorliegenden Studie beobachtete Abnahme dieses Genus im Kot bei einer hohen Proteinaufnahme der Katzen somit einen Hinweis auf eine, von Suchodolski (2016) beschriebene, Dysbiose geben könnte. Im Zusammenhang mit dem Anstieg von *Bacteroides* spp. und *Fusobacterium* spp. im Kot der Katzen bei einer hohen Proteinaufnahme ist ein Rückgang von vornehmlich kohlenhydratfermentierenden Bakterien im Dickdarm der Katzen denkbar, wohingegen proteinfermentierende Bakterien vermehrt im Wachstum gefördert wurden. Somit kommt es zu einer Abnahme an *Faecalibacterium* und *Phascolarctobacterium* im Kot der Katzen bei einer hohen Proteinaufnahme der Tiere, da insbesondere *Faecalibacterium* vornehmlich durch Kohlenhydrate bzw. präbiotische Faserstoffe in der Nahrung gefördert wird (Fernando et al., 2010; Hooda et al., 2012). Allerdings entwickelten die Katzen während des gesamten Versuchszeitraums keine Anzeichen einer intestinalen Erkrankung, sodass zukünftige Studien den Effekt des Proteingehalts auf *Faecalibacterium* insbesondere im Zusammenhang mit Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts bei Katzen berücksichtigen sollten, um eine mögliche Bedeutung dieses Genus weitergehend zu untersuchen.

Eine geringe Proteinqualität in den Versuchsdieten führte zu höheren Anteilen an *Ethanoligenens* in den Kotproben der Katzen als eine hohe Proteinqualität im Futter ( $P = 0,015$ ). Ein fütterungsassoziierter Einfluss auf das Vorkommen dieses Genus wurde bislang bei Katzen nur von Deusch et al. (2014) beschrieben. Die Autoren konnten einen Anstieg von *Ethanoligenens* im Kot von Katzen bei einer proteinreichen Diät detektieren (Deusch et al., 2014). Dieser Effekt des Proteingehalts wurde in der vorliegenden Studie nicht beobachtet. In einer Studie von Handl et al. (2011) konnte *Ethanoligenens* im Kot von Katzen mit einem Anteil von 0–0,11 % (Median = 0;  $n = 12$ ) detektiert werden. In der vorliegenden Studie wurde dieses Genus im Kot von allen Tieren nachgewiesen mit Anteilen von 0,3–1,6 %, welche vergleichbar sind mit den für dieses Genus ermittelten Werten von Deusch et al. (2014) (0,2–0,9 %). Die Bedeutung dieses Genus für die bakterielle Gemeinschaft im Darm von Katzen sowie die Relevanz des in der vorliegenden Studie beobachteten fütterungsbedingten Einflusses auf sein Vorkommen kann somit nicht abschließend geklärt werden und ist möglicherweise eher von geringerer Relevanz.

Das Genus *Selenomonas* wurde in der vorliegenden Studie weder durch den Proteingehalt, noch durch die Proteinqualität im Futter beeinflusst. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Deusch et al. (2014), die eine Reduktion des Anteils an *Selenomonas* im Kot von Katzen bei einer hohen Proteinaufnahme feststellen konnten. Allerdings konnten Hooda et al. (2013) bei der Analyse derselben Proben keinen fütterungsassoziierten Einfluss auf dieses Genus aufzeigen. Mögliche Erklärungsansätze könnten Unterschiede in der Analysemethode (Illumina® (Deusch et al., 2014) vs. Pyrosequenzierung (Hooda et al., 2013)) oder statistischen Datenauswertung darstellen (Hooda et al., 2013; Deusch et al., 2014). So konnte bei dem Vergleich der Ergebnisse beider Studien gezeigt werden, dass die bakterielle Zusammensetzung im Kot der Katzen bereits auf Phylumbene Unterschiede in der prozentualen Verteilung aufwies (Hooda et al., 2013; Deusch et al., 2014). Das Genus *Selenomonas* fermentiert sowohl stickstoff- als auch kohlenstoffhaltige Verbindungen (Ricke et al., 1996). Die Anpassungsfähigkeit dieses Genus (Ricke et al., 1996) könnte sowohl den durch Deusch et al. (2014) beobachteten Anstieg im Kot der Katzen bei einem proteinreichen Futter, als auch einen fehlenden Effekt bei einer hohen Proteinaufnahme der Katzen in der vorliegenden Untersuchung erklären.

Einige der vorliegend detektierten Genera traten in nur wenigen Kotproben der Katzen auf, sodass ein statistischer Vergleich zwischen den Fütterungsgruppen nicht möglich war. Hierzu zählten *Atopobium*, *Leuconostoc*, *Desulfovibrio*, *Megamonas*, *Anaerostipes*, *Raoultella*, *Bacillus*, *Cryptobacterium*, *Propionibacterium*, *Ureibacillus*, *Veillonella*, *Arthrobacter*, *Carnobacterium*, *Oxobacter*, *Alistipes*, *Peptostreptococcus*, *Vagococcus*, *Campylobacter*, *Anaplasma*, *Corynebacterium*, *Pyramidobacter* sowie die Familie der *Lachnospiraceae* und die Klasse der *Betaproteobacteria*. Deusch et al. (2014) konnten bei einem hohen Proteingehalt im Futter höhere Anteile für *Desulfovibrio* im Kot von Katzen als bei einem moderaten Proteingehalt im Futter feststellen. Für *Campylobacter jejuni* wurde eine sehr geringe Prävalenz von 0,8 % im Katzenkot ermittelt (Spain et al., 2001). In einer weiteren Untersuchung kam diese Spezies mit einem Anteil von nur 0,02 % im Kot von Katzen vor (Tun et al., 2012). Diese Ergebnisse sind in etwa vergleichbar mit den in der vorliegenden Studie ermittelten Anteilen des Genus *Campylobacter* (0,01–0,7 %). Ein höherer Anteil von *Lachnospiraceae* in Kotproben von Katzenwelpen wurde von Hooda et al. (2013) beschrieben, wenn ein hoher statt ein mittlerer Proteingehalt im Futter vorlag. Allerdings konnten Deusch et al. (2014) bei Analyse derselben Kotproben dieses Ergebnis nicht bestätigen. Diese Unterschiede zwischen den Ergebnissen von Hooda et al. (2013) und Deusch et al. (2014) könnten, wie bereits zuvor erwähnt, mit dem Einsatz von verschiedenen Analysemethoden (Illumina® (Deusch et al., 2014) vs. Pyrosequenzierung (Hooda et al., 2013)) oder einer unterschiedlichen, statistischen Datenauswertung erklärt werden.

### **5.3.3.3 Bakterielle Diversität**

Betrachtet man die Ergebnisse in Bezug auf die bakterielle Diversität im Kot der Katzen, so konnte kein Einfluss der Proteinkonzentration oder der Proteinqualität im Futter auf den CHAO1-Index sowie auf den Shannon-Weaver-Index festgestellt werden. Die Evenness (E) war hingegen bei Einsatz der Versuchsdiäten mit einer hohen Proteinqualität geringer ( $P = 0,015$ ) als bei der Fütterung der Diäten mit einer geringeren Proteinqualität. Dies bedeutet, dass die verschiedenen Bakterienspezies im Kot der Tiere bei einer hohen Proteinqualität im Futter unregelmäßiger verteilt waren als bei einer geringen Proteinqualität im Futter. Dazu liegen bei Katzen allerdings bislang keine weiteren Erkenntnisse im Schrifttum vor.

Deusch et al. (2014) konnten bei Einsatz eines Futters mit einem hohen Proteingehalt einen höheren Shannon-Weaver-Index (Index: 4,1) und eine damit verbundene höhere bakterielle Diversität in Kotproben von Katzenwelpen als bei der Fütterung einer Diät mit einem mittleren Proteingehalt (Index: 3,1) aufzeigen. Zudem beobachteten die Autoren geringere interindividuelle Schwankungen in der Zusammensetzung der Mikrobiota im Kot der Katzen, wenn das Futter mit einem hohen Proteingehalt eingesetzt wurde (Deusch et al., 2014). Aus diesem Grund postulierten die Autoren, dass hohe Proteingehalte im Futter eine höhere Diversität und gleichzeitig eine spezialisiertere Mikrobiota im Kot von Katzen bedingen kann (Deusch et al., 2014).

Im Vergleich zu der vorliegenden Studie konnten Handl et al. (2011) bei gesunden Katzen geringere Werte für den Shannon-Weaver-Index, jedoch ähnliche Werte für die Evenness ermitteln. Bei Katzen mit Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts wurde im Vergleich zu gesunden Tieren eine Abnahme des CHAO1-Indexes, Shannon-Weaver-Indexes sowie des Speziesreichtums in Kotproben aufgezeigt (Suchodolski et al., 2015).

Der Aspekt der bakteriellen Diversität sollte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden, insbesondere im Hinblick auf Katzen mit bestehenden gastrointestinalen Erkrankungen.

## **5.4 Bakterielle Metaboliten**

Die Bestimmung ausgewählter bakterieller Metaboliten diene dem Ziel, mögliche fütterungsassoziierte Veränderungen in der metabolischen Aktivität der fäkalen Mikrobiota zu detektieren. Hierfür wurden die Gehalte an Ammonium, kurzkettigen Fettsäuren, Laktat und biogenen Aminen im Kot der Katzen bestimmt.

### **5.4.1 Ammonium**

Ammoniak entsteht im Dickdarm bei der Deaminierung von Aminosäuren (Wrong et al., 1985; Macfarlane et al., 1986; Blachier et al., 2007) und stellt allgemein ein Produkt des

mikrobiellen Abbaus von Protein dar (Breves, 2015). Ammoniak liegt bei physiologischen pH-Werten von 7,21–7,54 (Gäbel, 2015) mehrheitlich als Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) vor (Langendorf, 1969).

In der vorliegenden Studie führten ansteigende Proteingehalte im Futter zu höheren Konzentrationen an Ammonium im Kot der Katzen. Die Ergebnisse stimmen mit Daten von Katzen überein (Dekeyzer, 1997; Oldenhage, 2003). Zudem konnte in einer *in vitro*-Studie ebenfalls ein Anstieg der Ammoniumkonzentrationen in fäkalen Inokula von Katzen bei hohen Proteingehalten im Futter festgestellt werden (Pinna et al., 2014).

Die Qualität des Futterproteins übte in der vorliegenden Studie keinen Einfluss auf den Ammoniumgehalt im Kot der Katzen aus. Im Gegensatz dazu konnten Nery et al. (2012) bei Hunden höhere fäkale Ammoniumgehalte bei Einsatz eines Futtermittels mit einer mäßigen Proteinqualität aufzeigen als bei der Fütterung einer Diät mit einer höheren Proteinqualität. Hierbei wurde Geflügelmehl als Proteinquelle von mäßiger Qualität und Weizenklebermehl als hochverdauliche Proteinquelle eingesetzt (Nery et al., 2012). Die Autoren vermuteten, dass die geringere präzäkale Verdaulichkeit von Geflügelmehl zu einer höheren mikrobiellen Proteinferrmentation im Dickdarm und einem damit verbundenen vermehrten Anfall von Ammonium führte (Nery et al., 2012). Ähnliche Ergebnisse ergab eine Untersuchung mit Schweinen, in welcher Futtermittel mit einer geringen Rohproteinverdaulichkeit ebenfalls zu höheren Ammoniumkonzentrationen in der Digesta von Ferkeln führten (Pieper et al., 2012). Insgesamt kann anhand der Ergebnisse der vorliegenden Studie vermutet werden, dass der Einsatz von Futtermitteln mit einem hohen Proteingehalt bei Katzen zu einer erhöhten metabolischen Aktivität peptidolytischer Bakterien im Darm geführt hat. Dieses könnte mit der beobachteten Zunahme der Genera *Bacteroides* und *Fusobacterium* bei hohen Proteingehalten im Futter zusammenhängen.

#### **5.4.2 Biogene Amine**

Biogene Amine spielen zum einen eine Rolle im Stoffwechsel von Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen (Ladero Losada et al., 2010). Zum anderen sind sie Produkte der mikrobiellen Proteinferrmentation (Mortensen und Clausen, 1996; Williams et al., 2005) und entstehen durch mikrobielle Decarboxylierung von Aminosäuren (Blachier et al., 2007; Ladero Losada et al., 2010). Die in der vorliegenden Studie untersuchten biogenen Amine Histamin, Cadaverin, Putrescin und Thyramin entstehen beim Abbau der Aminosäuren Histidin, Lysin, Ornithin und Tyramin (Teti et al., 2002; Ladero Losada et al., 2010; Pegg, 2013). Zudem kann aus Putrescin Spermidin sowie aus Spermidin Spermin gebildet werden (Tabor und Tabor, 1985; Ikeguchi et al., 2006; Pegg und Michael, 2010; Pegg, 2013).

In der vorliegenden Studie führten ansteigende Proteingehalte im Futter zu einer Abnahme an Histamin und Cadaverin sowie des Gesamtgehalts an biogenen Aminen im Kot der Katzen. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu Ergebnissen einer *in-vitro* Studie von Pinna et al. (2014), in welcher Suspensionen aus Katzenkot und Futtermitteln mit niedrigem (135 g/kg) und hohem Proteingehalt (311 g/kg) inkubiert wurden. Die Autoren konnten bei einem hohen Proteingehalt im Futter höhere Gehalte an Cadaverin, Putrescin, Spermidin und Spermin im Kot der Katzen messen (Pinna et al., 2014). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch bei Ferkeln erzielt (Pieper et al., 2012; 2014). So führte die Zulage von Sojamehl, welches durch Hitzeschädigung eine reduzierte *in vitro*-Verdaulichkeit zeigte, zu der Ration zu einem Anstieg der Putrescin- und Histaminkonzentration in Koloninhalten der Ferkel (Pieper et al., 2012). In einer weiteren Untersuchung mit Ferkeln konnte bei Einsatz eines proteinreichen Futters ebenfalls ein Anstieg biogener Amine in der Digesta gemessen werden (Pieper et al., 2014). So wurde in ilealer Digesta ein Anstieg der Putrescinkonzentration und der Gesamtamine festgestellt, während in Zäkuminhalten der Gehalt an Histamin und in Koloninhalten die Konzentration von Cadaverin anstieg (Pieper et al., 2014). Auch Fan et al. (2017) beobachteten bei einer Reduktion des Rohproteingehalts im Futter von 16 % auf 13 % in der TS eine Abnahme der Histamin-, Spermidin- und Putrescinkonzentrationen in der Kolondigesta von Schweinen.

In einer weiteren Studie führten dagegen Diäten mit einem abnehmenden Proteingehalt (17 % und 15 % Rp in der TS) zu einem Anstieg der Konzentrationen an Gesamtaminen sowie Spermidin in der Kolondigesta von Schweinen im Vergleich zu Diäten mit einem moderaten (20 % Rp in der TS) und sehr geringem Proteingehalt (14 % Rp in der TS) (Peng et al., 2017). Zudem wurden höhere Tyramingehalte in der Kolondigesta bei Einsatz von Diäten mit geringem Proteingehalt (15 % und 14 % Rp in der TS) gemessen als bei Fütterung der Diät mit einem moderaten Proteingehalt (20 % Rp in der TS) (Peng et al., 2017).

Biogene Amine werden beispielsweise von *Bacteroides*, *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Enterobacteriaceae*, Laktobazillen und Streptokokken gebildet (Rist et al., 2013) und sind für den Organismus in Bezug auf den zellulären Stoffwechsel (Pegg und McCann, 1982; Pegg, 2013) sowie für das Immunsystem (Fan et al., 2015) bedeutsam.

Beim Vergleich zwischen den angeführten Untersuchungen sowie den Ergebnissen der vorliegenden Studie sollte die Untersuchung unterschiedlichen Probenmaterials (ileale Digesta, Zäkum- und Kolondigesta bzw. Kot) berücksichtigt werden, da eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Absorptions- und Metabolisierungsprozesse durch das Dickdarmepithel (Hughes et al., 2000; Aschenbach et al., 2006) möglich ist.

Insgesamt betrachtet kann die Ursache der in der vorliegenden Studie beobachteten Abnahme der Konzentrationen an biogenen Aminen im Kot der Katzen bei steigenden Proteingehalten im Futter nicht abschließend geklärt werden. Zukünftige Studien sollten daher darauf abzielen, die Zusammenhänge zwischen dem Gehalt an biogenen Aminen im Kot von Katzen und einem hohen Proteingehalt bzw. einer geringen Proteinqualität im Futter weitergehend zu untersuchen.

### 5.4.3 Kurzkettige Fettsäuren

Die kurzkettigen Fettsäuren Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure werden bei der mikrobiellen Fermentation von Kohlenhydraten (Cummings et al., 1987; Reilly und Rombeau, 1993) und Proteinen gebildet (Macfarlane und Allison, 1986; Macfarlane und Macfarlane, 2012). Zudem entstehen durch den mikrobiellen Abbau der Aminosäuren Valin, Isoleucin und Leucin die verzweigt-kettigen Fettsäuren i-Buttersäure, 2-Methylbuttersäure und i-Valeriansäure (Rasmussen et al., 1988; Mortensen und Clausen, 1996; Williams et al., 2005; Nyangale et al., 2012; Verbeke et al., 2015). Der Gehalt an verzweigt-kettigen Fettsäuren im Kot kann für die Beurteilung der Proteinfermentation von Darmbakterien herangezogen werden (Macfarlane et al., 1986; Blachier et al., 2007; Macfarlane und Macfarlane, 2012; Scott et al., 2013). Kurzkettige Fettsäuren dienen dem Darmepithel als Energielieferanten (Roediger, 1980; Cummings, 1995; Fung et al., 2012). Daneben können sie zu einer Absenkung des luminalen pH-Werts im Darm führen (Louis et al., 2007; Pinna et al., 2014) und somit das Wachstum potenziell pathogener Bakterien hemmen (Prohaszka et al., 1990; Cherrington et al., 1991; Duncan et al., 2009).

Nery et al. (2012) zeigten in einer Studie mit Hunden, dass hohe Proteingehalte (38 bzw. 39 % Rp in der TS) im Vergleich zu einem niedrigen Proteingehalt (21 % Rp in der TS) im Futter zu einem Anstieg an verzweigt-kettigen Fettsäuren im Kot führten. Zudem wurden höhere Gehalte an verzweigt-kettigen Fettsäuren im Kot der Hunde bei Einsatz eines Futters mit Geflügelmehl im Vergleich zu einem Futter mit Weizenklebermehl beobachtet (Nery et al., 2012). Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse haben die Autoren vermutet, dass eine verstärkte mikrobielle Fermentation von Protein im Dickdarm der Tiere bei Einsatz des Futters auf Basis von Geflügelmehl stattgefunden hat (Nery et al., 2012). In diesem Zusammenhang wurde in einer *in vitro*-Studie mit Kotsuspensionen von Katzen ebenfalls ein Anstieg verzweigt-kettiger Fettsäuren und damit eine erhöhte peptidolytische Aktivität der fäkalen Mikrobiota aufgezeigt, wenn der Kot mit einem Futter mit einem hohen Proteingehalt (311 g/kg) inkubiert wurde verglichen zu einer Inkubation mit einem Futter mit einem geringen Proteingehalt (135 g/kg) (Pinna et al., 2014).

Basierend auf diesen Studien wurde für die vorliegende Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass neben einem hohen Proteingehalt zudem eine geringe Proteinqualität im Futter zu einer Zunahme der Konzentration an verzweigtkettigen Fettsäuren im Kot von Katzen und somit zu einer Zunahme der peptidolytischen Aktivität der intestinalen Mikrobiota führen kann.

In der vorliegenden Arbeit nahmen die Konzentrationen an i-Valeriansäure und n-Valeriansäure in den Kotproben der Katzen mit steigenden Proteingehalten in den Versuchsdiäten zu. In Anlehnung an Studien von Nery et al. (2012) und Pinna et al. (2014) kann aufgrund der Zunahme von i-Valeriansäure auf eine vermehrte mikrobielle Fermentation von präzäkal unverdaulichem Eiweiß im Dickdarm geschlossen werden. Dies bestätigt ebenfalls der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Anstieg der fäkalen Ammoniumkonzentrationen bei steigenden Proteingehalten im Futter (siehe Abschnitt 5.4.1). Die fäkalen Konzentrationen an Essigsäure, Propionsäure und n-Buttersäure sowie der Gesamtgehalt an kurzkettigen Fettsäuren im Kot der Katzen wurden in der vorliegenden Studie nicht durch die Fütterung beeinflusst. Dagegen konnten Pinna et al. (2014) in einer *in vitro*-Studie von fäkalen Kulturen mit einem proteinreichen Futter eine Abnahme der Konzentrationen an Essigsäure und Propionsäure sowie des Gesamtgehalts an kurzkettigen Fettsäuren und eine Zunahme der Konzentrationen an n-Buttersäure beobachten. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der *in vitro*-Studie von Pinna et al. (2014) und der vorliegenden Arbeit könnte die rasche Absorption kurzkettiger Fettsäuren aus dem Darmlumen sein (McNeil et al., 1978; Ruppin et al., 1980; Roediger und Moore, 1981; Louis et al., 2014), da hierdurch lediglich ein geringer Anteil (5 %) der ursprünglich im Darm vorhandenen Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren im Kot messbar war (Topping und Clifton, 2001). Vor diesem Hintergrund sollte berücksichtigt werden, dass eine Übertragung der Ergebnisse aus Kotanalysen auf die tatsächlichen Verhältnisse im Dickdarm nicht uneingeschränkt möglich ist (Cummins et al., 1987). Zudem sollte berücksichtigt werden, dass Buttersäure, Essigsäure und Propionsäure beim mikrobiellen Abbau von Protein, jedoch auch von präzäkal unverdaulichem Kohlenhydraten gebildet werden (Macfarlane und Macfarlane, 2012; Nery et al., 2012). Ein Einfluss des Kohlenhydratanteils im Futter auf die Konzentrationen an kurzkettigen Fettsäuren im Kot der Katzen kann daher für die vorliegende Studie nicht ausgeschlossen werden.

Bei Betrachtung der prozentualen Anteile der jeweiligen kurzkettigen Fettsäuren an der Gesamtkonzentration an kurzkettigen Fettsäuren wurde mit steigendem Proteingehalt im Futter eine Zunahme an n-Valeriansäure sowie eine Abnahme an Propionsäure im Kot der Katzen detektiert. Diese Beobachtung steht in Übereinkunft mit den oben erläuterten fütterungsassoziierten Effekten auf den Gehalt an n-Valeriansäure im Kot der Tiere. Im Gegensatz dazu wurde der Gehalt an Propionsäure nicht durch die Fütterung beeinflusst.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung lassen vermuten, dass der Einfluss des Proteingehalts im Futter auf die peptidolytische Aktivität der intestinalen Mikrobiota von Katzen größer ist als der Einfluss der Qualität des Futterproteins. Im Hinblick auf zum Teil abweichende Ergebnisse aus der Literatur sollte allerdings berücksichtigt werden, dass sich die eingesetzten Proteinquellen zwischen den Arbeiten unterscheiden.

### 5.4.4 D/L-Laktat

Allgemein entsteht Laktat als Zwischenprodukt bei der bakteriellen Fermentation von Kohlenhydraten im Dickdarm (Macfarlane und Macfarlane, 2003; Macfarlane und Macfarlane, 2012) und kann beispielweise durch *Bacteroides*, Clostridien *Desulfovibrio*, Enterobakterien, *Propionibacterium* und anaerobe Kokken weiter verstoffwechselt werden (Macfarlane und Macfarlane, 2012). Neben den positiv bewerteten Effekten hoher Konzentrationen an Laktat, wie beispielsweise eine antimikrobielle Wirkung aufgrund einer Senkung des pH-Werts im Darm (Hinton et al., 1992a; b; Hinton et al., 1993; Swanson et al., 2002), wurden in der Humanmedizin erhöhte Laktatwerte im Kot von Patienten mit Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts beschrieben (Vernia et al., 1988a; b; Hove et al., 1994). Im Zusammenhang mit einem möglichen fütterungsbedingten Einfluss auf fäkale Laktatgehalte bei Katzen stellte Kienzle (1994) bei Einsatz kohlenhydratreicher Diäten (Laktose 11 % und 28 %, Maisstärke 29 % (gekocht) und 35 % (roh), Sucrose 36 %, Kartoffelstärke (roh) 37 %, Galactose 39 % und Glucose 40 % in der TS) im Vergleich zu einer kohlenhydratfreien Diät keinen fütterungsassoziierten Effekt fest. Allerdings variierten zudem die Laktatkonzentrationen im Kot der Katzen sehr deutlich (Kienzle, 1994). In einer weiteren Studie beobachteten Fischer et al. (2012) höhere Laktatgehalte im Kot von Katzen, wenn diese eine extrem faserreiche Diät (25,6 % Rfa in der TS) erhielten, im Vergleich zu einer Kontrolldiät, die immerhin noch 11,5 % Rfa in der TS enthielt. Bislang existieren bei Katzen keine Untersuchungen zu dem Einfluss des Proteingehalts sowie der Qualität des Proteins im Futter auf fäkale Laktatgehalte. Die Laktatkonzentrationen im Kot der Katzen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht durch die Fütterung beeinflusst. Hierbei sollte berücksichtigt werden, dass für eine Vielzahl der Proben die Messwerte unterhalb der Nachweisgrenze lagen, sodass eine vorsichtige Interpretation der Ergebnisse erfolgen sollte. Duncan et al. (2004) identifizierten im Kot von gesunden Menschen laktatverwertende Bakterien, von denen einige verwandt mit *Eubacterium hallii* und *Anaerostipes caccae* sind, sowie weitere, die dem *C. coccoides* Cluster XIVa angehören. Es besteht die Vermutung, dass das Vorkommen dieser Bakteriengruppen beim Menschen eine mögliche Ursache für geringe Laktatkonzentrationen im Kot darstellt (Duncan et al., 2004; Louis et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde, unabhängig von der Fütterung, ein relativ hohes Vorkommen

(9,91 log<sub>10</sub> Kopienzahl/g FS) von Vertretern des *C. coccoides*-Clusters XIVa im Kot der Katzen festgestellt. Somit kann ebenfalls vermutet werden, dass das Vorliegen von Laktatverwertern zu den geringen Laktatkonzentrationen im Kot der Katzen beigetragen hat. Aufgrund der Tatsache, dass Laktat jedoch von einer Vielzahl an Bakterien gebildet wird (Duncan et al., 2004), wie *Atopobium* spp., *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Enterobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Eubacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Faecalibacterium* spp., *Fusobacterium* spp., *Peptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Ruminococcus* spp. und *Streptococcus* spp. (Macfarlane und Macfarlane, 2012), und wiederum von anderen Bakterien weiter verstoffwechselt werden kann (Reilly und Rombeau, 1993; Duncan et al., 2004; Macfarlane und Macfarlane, 2012) oder der Absorption im Darm unterliegt (Macfarlane und Macfarlane, 2012), kann die Ursache der vorliegend beobachteten geringen Laktatkonzentrationen im Kot der Katzen nicht abschließend geklärt werden.

## **5.5 Schlussfolgerung**

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern die Proteinkonzentration sowie die Proteinqualität im Futter die Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota von Katzen beeinflusst. Daneben diente die Messung ausgewählter Metaboliten der Beurteilung der metabolischen Aktivität der intestinalen Mikrobiota.

Die erzielten Ergebnisse können helfen, die Relevanz des Futterproteins für die Zusammensetzung und Stoffwechselaktivität der Darmbakterien bei Katzen besser zu beschreiben sowie weiterführende Studien und diätetische Konzepte zu entwickeln, um bei gesunden und erkrankten Tieren gezielte Fütterungsmaßnahmen zur Stabilisierung der intestinalen Mikrobiota ergreifen zu können.

## 6 Zusammenfassung

Thies, Louisa:

### **Untersuchungen zum Einfluss des Proteingehalts sowie der Proteinqualität im Futter auf die fäkale Mikrobiota von Katzen**

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, den Einfluss des Proteingehalts sowie der Proteinqualität im Futter auf die Zusammensetzung und Stoffwechselaktivität der intestinalen Mikrobiota von Katzen zu untersuchen. Die Hypothese des Versuchs lautete, dass die Proteinmenge und die -qualität im Futter einen Effekt auf mikrobielle Parameter haben.

In einem Fütterungsversuch wurden sechs Futtermittel, welche drei verschiedene Proteinkonzentrationen und zwei verschiedene Proteinqualitäten (bindegewebsarm bzw. -reich) aufwiesen, bei insgesamt zehn adulten gesunden Katzen eingesetzt. Das Studiendesign im Sinne eines randomisierten lateinischen Quadrats ermöglichte eine zeitgleiche Verwendung aller sechs Versuchsfuttermittel. Die Tiere erhielten dabei jedes Versuchsfuttermittel über einen Zeitraum von sechs Wochen. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kotproben wurden jeweils an den Tagen 41–42 einer jeden Fütterungsperiode gesammelt und bis zur weiteren Analytik bei -80 °C gelagert.

Die Sequenzierung der V3-V4 Regionen des 16S rRNA-Gens mithilfe der Illumina® Sequenzierung ergab, dass im Kot von Katzen fütterungsunabhängig das Genus *Clostridium* mit einem Anteil von etwa 20 % auftrat sowie das Genus *Blautia* mit rund 17 %. Daneben wurden Anteile zwischen 4 % und 5 % für die Genera *Prevotella*, *Collinsella*, *Fusobacterium* und *Eubacterium* ermittelt, während die Mehrheit der im Kot der Katzen detektierten Genera Anteile unter 1 % aufwies. Fütterungsassoziierte Veränderungen in der Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota der Katzen wurden insbesondere für die Genera *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Prevotella* und *Faecalibacterium* beobachtet. So führten ansteigende Proteingehalte im Futter zu einer relativen Zunahme von *Fusobacterium* und *Bacteroides*, während die relativen Anteile an *Prevotella* und *Faecalibacterium* abnahmen. Zudem resultierte der Einsatz einer geringen Proteinqualität in den Versuchsfuttermitteln in einem Anstieg des Anteils an *Fusobacterium* im Kot der Katzen. Die Untersuchung mittels qPCR ergab einen Anstieg des *C. coccoides*-Clusters XIVa im Kot der Katzen bei Einsatz der Diäten mit einer geringeren Proteinqualität. Zusammengefasst konnte anhand der Untersuchungen ein Anstieg vorwiegend peptidolytischer Bakterien, wie beispielsweise *Bacteroides* und *Fusobacterium* im Kot von Katzen bei einer hohen Proteinaufnahme

festgestellt werden, wohingegen der Einfluss der Proteinqualität im Futter weniger deutlich ausfiel.

Neben der Untersuchung der Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota von Katzen anhand molekularbiologischer Analysen dienten chemisch-analytische Methoden in der vorliegenden Studie dazu, den Einfluss des Proteingehalts sowie der Proteinqualität im Futter auf die Stoffwechselaktivität der intestinalen Mikrobiota der Katzen zu untersuchen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Qualität des Futterproteins keinen Einfluss auf die untersuchten bakteriellen Metaboliten (Ammonium, biogenen Amine, D-/L-Laktat sowie die kurzkettigen Fettsäuren) im Kot der Katzen ausübte. Dagegen führten hohe Proteingehalte im Futter zu einem Anstieg der Ammonium- und i-Valeriansäurekonzentrationen im Kot sowie zu einer Abnahme der fäkalen Histamin- und Cadavergehalte. Insgesamt kann anhand dieser Ergebnisse eine vermehrte peptidolytische Aktivität der intestinalen Mikrobiota bei einem hohen Proteingehalt im Futter vermutet werden. Die Ursache für die beobachteten abnehmenden Konzentrationen an biogenen Aminen im Kot bei einer hohen Proteinaufnahme der Katzen kann jedoch nicht abschließend geklärt werden, sodass dieser Aspekt in zukünftigen Studien weiter untersucht werden sollte.

Bei zusammenfassender Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse kann gesagt werden, dass die Zusammensetzung und die Stoffwechselaktivität der intestinalen Mikrobiota von Katzen eher durch die Proteinkonzentration als durch die Proteinqualität im Futter beeinflusst wurde. Die vorliegende Arbeit trägt somit zu einem verbesserten Verständnis der Effekte des Futterproteins auf die intestinale Mikrobiota von Katzen bei. Die Ergebnisse können helfen, weiterführende Studien und diätetische Maßnahmen zu entwickeln, um die Darmgesundheit sowohl von gesunden als auch von erkrankten Katzen gezielt zu unterstützen.

## 7 Summary

Thies, Louisa:

### **Investigations on the impact of dietary protein concentration and quality on the fecal microbiota in cats**

The objective of this study was to investigate the impact of dietary protein concentration and quality on the composition and metabolic activity of the intestinal microbiota in cats. The hypothesis of the study was that dietary protein concentration and quality can affect microbial traits.

In a feeding trial, six different diets varying in protein quantity and quality (lower or higher amount of connective tissue) were offered to ten clinically healthy adult cats. A randomized latin square cross over design allowed simultaneous use of all six diets. Cats received each diet over a period of six weeks. Fecal samples examined in this study were collected on day 41 or 42 of each feeding period and were stored at -80 °C until further analysed.

Sequencing the V3-V4-region of the 16S rRNA-gene by Illumina® showed that the relative abundance of the genus *Clostridium* in feline fecal samples was over 20 % and of the genus *Blautia* approximately 17 %, regardless of the used diet. In addition, the prevalence of the genera *Prevotella*, *Collinsella*, *Fusobacterium* and *Eubacterium* reached between 4 and 5 %. However, the majority of all detected genera in cat feces showed proportions below 1 %. Dietary associated changes in the composition of feline fecal microbiota were determined for the relative abundance of *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Prevotella* and *Faecalibacterium*. In particular, increasing protein concentrations led to a higher relative abundance of *Fusobacterium* and *Bacteroides*, whereas the relative abundance of *Prevotella* and *Faecalibacterium* decreased. Moreover, low protein quality of the diets resulted in an increase of the relative abundance of *Fusobacterium* in feline feces.

Investigations of fecal samples by use of qPCR showed an increase of *C. coccoides*-Cluster XIVa in fecal samples when cats received a diet with low protein quality.

Taken together, molecular methods revealed an increase of predominantly peptidolytic bacteria, especially *Fusobacterium* and *Bacteroides* in feces of cats with a higher protein intake, whereas the impact of protein quality was not as distinct.

Apart from the investigation of the microbial composition of feline fecal microbiota with molecular biological analyses, further chemical analysis were used in this study to assess the effect of dietary protein content and protein quality on the metabolic activity of the intestinal microbiota in cats. Dietary protein quality showed no effect on investigated bacterial

metabolites, such as ammonia, biogenic amines, D-/L-lactate and short chain fatty acids in feline fecal samples. In contrast, high dietary protein levels led to an increase of fecal ammonia and i-valeric acid concentrations and to a decrease of fecal histamine and cadaverine concentrations.

Based on the results, it can be presumed that high dietary protein levels caused an increase of peptidolytic activity of the intestinal microbiota. However, the cause of the observed decreasing concentrations of biogenic amines in the feces of the cats fed a diet high in dietary protein has not been fully clarified. Therefore, further studies are required to investigate this aspect more thoroughly.

In conclusion, the results of the present study lead to the assumption that the composition and metabolic activity of the intestinal microbiota in cats is more distinctly influenced by dietary protein concentration than protein quality. The present study contributes to an improved understanding of the effects of dietary protein on the intestinal microbiota in cats. The results can help to develop further studies and dietetic strategies to support specifically gastrointestinal health in both healthy and diseased cats.

## 8 Literaturverzeichnis

Abaas, S., Franklin, A., Kühn, I., Orskov, F., Orskov, I., (1989). Cytotoxin activity on Vero cells among *Escherichia coli* strains associated with diarrhea in cats. American Journal of Veterinary Research 50(8), 1294-1296.

Abu Al-Soud, W., Radstrom, P., (2000). Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. Journal of Clinical Microbiology 38(12), 4463-4470.

Agilent Technologies Inc., (2016). Agilent DNA 1000 Kit Guide. Edition 12/2016. Manual Part Number: G2938-90014 Rev. C, Waldbronn

Aguirre, G.D., (1978). Retinal degeneration associated with the feeding of dog foods to cats. Journal of the American Veterinary Medical Association 172(7), 791-796.

al Saif, N., Brazier, J.S., (1996). The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. Journal of Medical Microbiology 45(2), 133-137.

Angulo, F.J., Glaser, C.A., Juranek, D.D., Lappin, M.R., Regnery, R.L., (1995). Caring for pets of immunocompromised persons. Canadian Veterinary Journal 36(4), 217-222.

Angulo, F.J., Swerdlow, D.L., (1995). Bacterial enteric infections in persons infected with human immunodeficiency virus. Clinical Infectious Diseases 21 (Suppl 1) S84-S93.

Aschenbach, J.R., Schwelberger, H.G., Ahrens, F., Füll, B., Gäbel, G., (2006). Histamine inactivation in the colon of pigs in relationship to abundance of catabolic enzymes. Scandinavian Journal of Gastroenterology 41(6), 712-719.

Association of American Feed Control Officials (AAFCO), (2004). 2004 Official Publication. In: Association of American Feed Control Officials, Oxford, 142-143.

Association of American Feed Control Officials (AAFCO), (2014). 2014 Official Publication. In: Association of American Feed Control Officials, Oxford, 136-164.

Association of American Feed Control Officials (AAFCO), (2017). Official Publication. In: Association of American Feed Control Officials, Oxford, 149-173.

- Aw, W., Fukuda, S., (2015). Toward the comprehensive understanding of the gut ecosystem via metabolomics-based integrated omics approach. *Seminars in Immunopathology* 37(1), 5-16.
- Barcenilla, A., Pryde, S.E., Martin, J.C., Duncan, S.H., Stewart, C.S., Henderson, C., Flint, H.J., (2000). Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology* 66(4), 1654-1661.
- Barry, K.A., Hernot, D.C., Van Loo, J., Fahey, G.C., Jr., de Godoy, M.R., (2014). Fructan supplementation of senior cats affects stool metabolite concentrations and fecal microbiota concentrations, but not nitrogen partitioning in excreta. *Journal of Animal Science* 92(11), 4964-4971.
- Barry, K.A., Middelbos, I.S., Vester Boler, B.M., Dowd, S.E., Suchodolski, J.S., Henrissat, B., Coutinho, P.M., White, B.A., Fahey, G.C., Jr., Swanson, K.S., (2012). Effects of dietary fiber on the feline gastrointestinal metagenome. *Journal of Proteome Research* 11(12), 5924-5933.
- Barry, K.A., Wojcicki, B.J., Middelbos, I.S., Vester, B.M., Swanson, K.S., Fahey, G.C., Jr., (2010). Dietary cellulose, fructooligosaccharides, and pectin modify fecal protein catabolites and microbial populations in adult cats. *Journal of Animal Science* 88(9), 2978-2987.
- Bell, E.T., Suchodolski, J.S., Isaiah, A., Fleeman, L.M., Cook, A.K., Steiner, J.M., Mansfield, C.S., (2014). Faecal microbiota of cats with insulin-treated diabetes mellitus. *PloS One* 9(10), e108729.
- Bell, J.A., Kopper, J.J., Turnbull, J.A., Barbu, N.I., Murphy, A.J., Mansfield, L.S., (2008). Ecological characterization of the colonic microbiota of normal and diarrheic dogs. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 2008, Article ID 149694
- Bellhorn, R.W., Aguirre, G.D., Bellhorn, M.B., (1974). Feline central retinal degeneration. *Investigative Ophthalmology* 13(8), 608-616.
- Bennett, K.W., Eley, A., (1993). Fusobacteria: new taxonomy and related diseases. *Journal of Medical Microbiology* 39(4), 246-254.

Benus, R.F., van der Werf, T.S., Welling, G.W., Judd, P.A., Taylor, M.A., Harmsen, H.J., Whelan, K., (2010). Association between *Faecalibacterium prausnitzii* and dietary fibre in colonic fermentation in healthy human subjects. *British Journal of Nutrition* 104(5), 693-700.

Bermingham, E.N., Kittelmann, S., Henderson, G., Young, W., Roy, N.C., Thomas, D.G., (2011). Five-week dietary exposure to dry diets alters the faecal bacterial populations in the domestic cat (*Felis catus*). *British Journal of Nutrition* 106 (Suppl 1), 49-52.

Bermingham, E.N., Kittelmann, S., Young, W., Kerr, K.R., Swanson, K.S., Roy, N.C., Thomas, D.G., (2013a). Post-weaning diet affects faecal microbial composition but not selected adipose gene expression in the cat (*Felis catus*). *PloS One* 8(11), e80992.

Bermingham, E.N., Young, W., Kittelmann, S., Kerr, K.R., Swanson, K.S., Roy, N.C., Thomas, D.G., (2013b). Dietary format alters fecal bacterial populations in the domestic cat (*Felis catus*). *Microbiology Open* 2(1), 173-181.

Beutin, L., (1999). *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Veterinary Research* 30(2-3), 285-298.

Bindels, L.B., Porporato, P., Dewulf, E.M., Verrax, J., Neyrinck, A.M., Martin, J.C., Scott, K.P., Buc Calderon, P., Feron, O., Muccioli, G.G., Sonveaux, P., Cani, P.D., Delzenne, N.M., (2012). Gut microbiota-derived propionate reduces cancer cell proliferation in the liver. *British Journal of Cancer* 107(8), 1337-1344.

Blachier, F., Mariotti, F., Huneau, J.F., Tomé, D., (2007). Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino Acids* 33(4), 547-562.

Blanco, J., Blanco, M., Wong, I., Blanco, J.E., (1993). Haemolytic *Escherichia coli* strains isolated from stools of healthy cats produce cytotoxic necrotizing factor type 1 (CNF1). *Veterinary Microbiology* 38(1-2), 157-165.

Bohaychuk, V.M., Gensler, G.E., McFall, M.E., King, R.K., Renter, D.G., (2007). A real-time PCR assay for the detection of *Salmonella* in a wide variety of food and food-animal matrices. *Journal of Food Protection* 70(5), 1080-1087.

Borriello, S.P., Honour, P., Turner, T., Barclay, F., (1983). Household pets as a potential reservoir for *Clostridium difficile* infection. *Journal of Clinical Pathology* 36(1), 84-87.

Bosworth, B.T., Casey, T.A., (1997). Identification of toxin and pilus genes in porcine *Escherichia coli* using polymerase chain reaction (PCR) with multiple primer pairs. 97th general meeting of the American Society for Microbiology, 4<sup>th</sup> -8<sup>th</sup> May, 1997, Miami Beach, Florida, Abstract B-509, 116

Breves, G., (2015). Funktionen des Dickdarms. In: von Engelhardt, W., Breves, G., Diener, M., Gäbel, G. (Hrsg.): *Physiologie der Haustiere*. 5., vollständig überarbeitete Auflage, Enke Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG, Stuttgart, S. 434-441.

Bugaut, M., (1987). Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Comparative Biochemistry* 86(3), 439-472.

Bula-Rudas, F.J., Rathore, M.H., Maraqa, N.F., (2015). *Salmonella* Infections in Childhood. *Advances in Pediatrics* 62(1), 29-58.

Burger, I.H., Blaza, S.E., Kendall, P.T., Smith, P.M., (1984). The protein requirement of adult cats for maintenance. *Feline Practice* 14(2), 8-14.

Busch, K., Suchodolski, J.S., Kühner, K.A., Minamoto, Y., Steiner, J.M., Mueller, R.S., Hartmann, K., Unterer, S., (2015). *Clostridium perfringens* enterotoxin and *Clostridium difficile* toxin A/B do not play a role in acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs. *Veterinary Record* 176(10), 253.

Butel, M.J., (2014). Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et Maladies Infectieuses* 44(1), 1-8.

Byun, J.W., Jung, B.Y., Kim, H.Y., Fairbrother, J.M., Lee, M.H., Lee, W.K., (2013). Real-time PCR for differentiation of F18 variants among enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from piglets with diarrhoea and oedema disease. *The Veterinary Journal* 198(2), 538-540.

Cai, L., Ye, L., Tong, A.H., Lok, S., Zhang, T., (2013). Biased diversity metrics revealed by bacterial 16S pyrotags derived from different primer sets. *PLoS One* 8(1), e53649.

Cani, P.D., Delzenne, N.M., Amar, J., Burcelin, R., (2008). Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding. *Pathologie Biologie* 56(5), 305-309.

Cantas, L., Suer, K., (2014). Review: the important bacterial zoonoses in "one health" concept. *Front Public Health* 2144.

Cao, Y., Shen, J., Ran, Z.H., (2014). Association between *Faecalibacterium prausnitzii* reduction and inflammatory bowel disease: a meta-analysis and systematic review of the literature. *Gastroenterology Research and Practice* 2014, Article ID 872725.

Carciofi, A.C., de-Oliveira, L.D., Valério, A.G., Borges, L.L., de Carvalho, F.M., Brunetto, M.A., Vasconcellos, R.S., (2009). Comparison of micronized whole soybeans to common protein sources in dry dog and cat diets. *Animal Feed Science and Technology* 151(3-4), 251-260.

Caricilli, A.M., Saad, M.J.A., (2014). Gut microbiota composition and its effects on obesity and insulin resistance. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 17(4), 312-318.

Carroll, I.M., Ringel-Kulka, T., Siddle, J.P., Klaenhammer, T.R., Ringel, Y., (2012). Characterization of the fecal microbiota using high-throughput sequencing reveals a stable microbial community during storage. *PloS One* 7(10), e46953.

Case, L.P., Daristotle, L., Hayek, M.G., Raasch, M.F., (2011). History and Regulation of Pet Foods. In: *Canine and Feline Nutrition 3rd Edition*. Mosby (Saint Louis), 121-129.

Chao, A., (1984). Nonparametric-estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics* 11(4), 265-270.

Chen, W., Liu, F., Ling, Z., Tong, X., Xiang, C., (2012). Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PloS One* 7(6), e39743.

Chen, W., Zhang, C.K., Cheng, Y., Zhang, S., Zhao, H., (2013). A comparison of methods for clustering 16S rRNA sequences into OTUs. *PloS One* 8(8), e70837.

Cherrington, C.A., Hinton, M., Pearson, G.R., Chopra, I., (1991). Short-chain organic acids at pH 5.0 kill *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. without causing membrane perturbation. *Journal of Applied Bacteriology* 70(2), 161-165.

Claesson, M.J., O'Sullivan, O., Wang, Q., Nikkilä, J., Marchesi, J.R., Smidt, H., de Vos, W.M., Ross, R.P., O'Toole, P.W., (2009). Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PloS One* 4(8), e6669.

Claesson, M.J., Wang, Q., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., Cole, J.R., Ross, R.P., O'Toole, P.W., (2010). Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Research* 38(22), e200.

Clarridge, J.E., (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 17(4), 840-862.

Clooten, J., Kruth, S., Arroyo, L., Weese, J.S., (2008). Prevalence and risk factors for *Clostridium difficile* colonization in dogs and cats hospitalized in an intensive care unit. *Veterinary Microbiology* 129(1-2), 209-214.

Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J.A., Chai, B., McGarrell, D.M., Sun, Y., Brown, C.T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C.R., Tiedje, J.M., (2014). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 42(D1), D633-D642.

Colgrave, M.L., Allingham, P.G., Tyrrell, K., Jones, A., (2012). Multiple reaction monitoring for the accurate quantification of amino acids: using hydroxyproline to estimate collagen content. In: Alterman M., Hunziker P. (Hrsg.): *Amino Acid Analysis. Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa (New Jersey), 828, 291-303.

Collins, M.D., Lawson, P.A., Willems, A., Cordoba, J.J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., Farrow, J.A., (1994). The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44(4), 812-826.

Colwell, R.K., Coddington, J.A., (1994). Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 345(1311), 101-118.

Cotta, M.A., Whitehead, T.R., Falsen, E., Moore, E., Lawson, P.A., (2009). *Robinsoniella peoriensis* gen. nov., sp. nov., isolated from a swine-manure storage pit and a human clinical source. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59(1), 150-155.

Cowell, C.S., Stout, N.P., Brinkman, M.F., Moser, E.A., Crane, S.W., (2002). Kommerzielle Herstellung von Haustierfutter. In: Hand, M.S., Thatcher, C.D., Remillard, R.L., Roudebush, P. (Hrsg.): *Klinische Diätetik für Kleintiere*. 4., stark erweiterte und vollständig neu bearbeitete Auflage, Mark Morris Institute, Topeka (Kansas), S. 159-185.

Cummings, J., (1995). Short chain fatty acids. In: Gibson G.R, Macfarlane GT (Hrsg.): *Human Colonic Bacteria: Role in Nutritional Physiology and Pathology*. CRC Press, Boca Raton (Florida), 101-130

Cummings, J.H., Pomare, E.W., Branch, W.J., Naylor, C.P., Macfarlane, G.T., (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28(10), 1221-1227.

da Silva, S.T., dos Santos, C.A., Bressan, J., (2013). Intestinal microbiota, relevance to obesity and modulation by prebiotics and probiotics. *Nutrición Hospitalaria* 28(4), 1039-1048.

Damborg, P., Broens, E.M., Chomel, B.B., Guenther, S., Pasmans, F., Wagenaar, J.A., Weese, J.S., Wieler, L.H., Windahl, U., Vanrompay, D., Guardabassi, L., (2015). Bacterial zoonoses transmitted by household pets: state-of-the-art and future perspectives for targeted research and policy actions. *Journal of Comparative Pathology* 155 (Suppl 1), S27-S40.

Dasti, J.I., Tareen, A.M., Lugert, R., Zautner, A.E., Gross, U., (2010). *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *International Journal of Medical Microbiology* 300(4), 205-211.

De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J.B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., Lionetti, P., (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(33), 14691-14696.

Deguchi, T., Ohtsuki, S., Otagiri, M., Takanaga, H., Asaba, H., Mori, S., Terasaki, T., (2002). Major role of organic anion transporter 3 in the transport of indoxyl sulfate in the kidney. *Kidney International* 61(5), 1760-1768.

Dekeyzer, A. (1997). Untersuchungen zum Proteinbedarf adulter Katzen. Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.

Desai, A.R., Musil, K.M., Carr, A.P., Hill, J.E., (2009). Characterization and quantification of feline fecal microbiota using cpn60 sequence-based methods and investigation of animal-to-animal variation in microbial population structure. *Veterinary Microbiology* 137(1-2), 120-128.

Deusch, O., O'Flynn, C., Colyer, A., Morris, P., Allaway, D., Jones, P.G., Swanson, K.S., (2014). Deep Illumina-based shotgun sequencing reveals dietary effects on the structure and function of the fecal microbiome of growing kittens. *PloS One* 9(7), e101021.

Deusch, O., O'Flynn, C., Colyer, A., Swanson, K.S., Allaway, D., Morris, P., (2015). A longitudinal study of the feline faecal microbiome identifies changes into early adulthood irrespective of sexual development. *PloS One* 10(12), e0144881.

Di Bella, J.M., Bao, Y., Gloor, G.B., Burton, J.P., Reid, G., (2013). High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. *Journal of Microbiological Methods* 95(3), 401-414.

DiBaise, J.K., Zhang, H., Crowell, M.D., Krajmalnik-Brown, R., Decker, G.A., Rittmann, B.E., (2008). Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clinic Proceedings* 83(4), 460-469.

Dieter, J.A., Stewart, D.R., Haggarty, M.A., Stabenfeldt, G.H., Lasley, B.L., (1993). Pregnancy failure in cats associated with long-term dietary taurine insufficiency. *Journal of Reproduction and Fertility*. (Suppl 47), 457-463.

Díez-Municio, M., Herrero, M., Olano, A., Moreno, F.J., (2014). Synthesis of novel bioactive lactose-derived oligosaccharides by microbial glycoside hydrolases. *Microbial Biotechnology* 7(4), 315-331.

Duncan, S.H., Louis, P., Flint, H.J., (2004). Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Applied and Environmental Microbiology* 70(10), 5810-5817.

Duncan, S.H., Louis, P., Thomson, J.M., Flint, H.J., (2009). The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology* 11(8), 2112-2122.

DuPont, A.W., DuPont, H. L., (2011). The intestinal microbiota and chronic disorders of the gut. *Nature Reviews: Gastroenterology & Hepatology* 8(9), 523-531.

Eren, A.M., Sogin, M.L., Morrison, H.G., Vineis, J.H., Fisher, J.C., Newton, R.J., McLellan, S.L., (2015). A single genus in the gut microbiome reflects host preference and specificity. *The ISME Journal* 9(1), 90-100.

Erlich, Y., Mitra, P.P., delaBastide, M., McCombie, W.R., Hannon, G.J., (2008). Alta-Cyclic: a self-optimizing base caller for next-generation sequencing. *Nature Methods* 5(8), 679-682.

Esteve, E., Ricart, W., Fernandez-Real, J.M., (2011). Gut microbiota interactions with obesity, insulin resistance and type 2 diabetes: did gut microbiote co-evolve with insulin resistance? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 14(5), 483-490.

Fan, P., Li, L., Rezaei, A., Eslamfam, S., Che, D., Ma, X., (2015). Metabolites of dietary protein and peptides by intestinal microbes and their impacts on gut. *Current Protein and Peptide Science* 16(7), 646-654 .

Fan, P., Liu, P., Song, P., Chen, X., Ma, X., (2017). Moderate dietary protein restriction alters the composition of gut microbiota and improves ileal barrier function in adult pig model. *Scientific Reports* 7, Article number 43412.

Fédération européenne de l'industrie des aliments pour animaux familiers (FEDIAF), (2016). Nutritional Guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs. <http://www.fediaf.org/self-regulation/nutrition/>. (zuletzt abgerufen am 22.10.2017 um 18:40 Uhr)

Fekete, S., Hullár, I., Andrásófszky, E., Rigó, Z., Berkényi, T., (2001). Reduction of the energy density of cat foods by increasing their fibre content with a view to nutrients' digestibility. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 85(7-8), 200-204.

Fernando, W.M., Hill, J.E., Zello, G.A., Tyler, R.T., Dahl, W.J., Van Kessel, A.G., (2010). Diets supplemented with chickpea or its main oligosaccharide component raffinose modify faecal microbial composition in healthy adults. *Beneficial Microbes* 1(2), 197-207.

Figge, S. (1989). Untersuchungen über Akzeptanz, Verträglichkeit und Verdaulichkeit von Eiweißfuttermitteln bei Katzen. Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.

Fischer, M.M., Kessler, A.M., de Sá, L.R., Vasconcellos, R.S., Filho, F.O., Nogueira, S.P., Oliveira, M.C., Carciofi, A.C., (2012). Fiber fermentability effects on energy and macronutrient digestibility, fecal traits, postprandial metabolite responses, and colon histology of overweight cats. *Journal of Animal Science* 90(7), 2233-2245.

Flint, H.J., (2011). Obesity and the gut microbiota. *Journal of Clinical Gastroenterology* 45 (Suppl 3), S128-S132.

Flint, H.J., Bayer, E.A., Rincon, M.T., Lamed, R., White, B.A., (2008). Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nature Reviews: Microbiology* 6(2), 121-131.

Flint, H.J., Duncan, S.H., Scott, K.P., Louis, P., (2015). Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society* 74(1), 13-22.

Flint, H.J., Scott, K.P., Duncan, S.H., Louis, P., Forano, E., (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes* 3(4), 289-306.

Foley, J., Hirsh, D.C., Pedersen, N.C., (1996). An outbreak of *Clostridium perfringens* enteritis in a cattery of Bengal cats and experimental transmission to specific pathogen free cats. *Feline Practice* 24(6), 31-35.

Fox, J.G., Beaucage, C.M., (1979). The incidence of *Salmonella* in random-source cats purchased for use in research. *Journal of Infectious Diseases* 139(3), 362-365.

Fox, J.G., Correa, P., Taylor, N.S., Zavala, D., Fontham, E., Janney, F., Rodriguez, E., Hunter, F., Diavolitsis, S., (1989). *Campylobacter pylori*-associated gastritis and immune response in a population at increased risk of gastric carcinoma. *American Journal of Gastroenterology* 84(7), 775-781.

Frydendahl, K., (2002). Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Veterinary Microbiology* 85(2), 169-182.

Fuhrmann, H., Sallmann, H.-P., (2015). Physiologische Funktionen der Leber. In: von Engelhardt, W., Breves, G., Diener, M., Gäbel, G. (Hrsg.): *Physiologie der Haustiere*. 5., vollständig überarbeitete Auflage, Enke Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG, Stuttgart, S. 450-463.

Fujimoto, T., Imaeda, H., Takahashi, K., Kasumi, E., Bamba, S., Fujiyama, Y., Andoh, A., (2013). Decreased abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* in the gut microbiota of Crohn's disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 28(4), 613-619.

Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J.M., Topping, D.L., Suzuki, T., Taylor, T.D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., Ohno, H., (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469(7331), 543-547.

Fuller, R., (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66(5), 365-378.

Fung, K.Y., Cosgrove, L., Lockett, T., Head, R., Topping, D.L., (2012). A review of the potential mechanisms for the lowering of colorectal oncogenesis by butyrate. *British Journal of Nutrition* 108(5), 820-831.

Gäbel, G., (2015). Säure-Basen-Haushalt. In: von Engelhardt, W., Breves, G., Diener, M., Gäbel, G. (Hrsg.): *Physiologie der Haustiere*. 5., vollständig überarbeitete Auflage, Enke Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG, Stuttgart, S. 335-344.

Galecka, M., Szachta, P., Bartnicka, A., Lykowska-Szuber, L., Eder, P., Schwiertz, A., (2013). *Faecalibacterium prausnitzii* and Crohn's disease - is there any connection? *Polish Journal of Microbiology* 62(1), 91-95.

Gasparic, A., Martin, J., Daniel, A.S., Flint, H.J., (1995). A xylan hydrolase gene cluster in *Prevotella ruminicola* B(1)4: sequence relationships, synergistic interactions, and oxygen sensitivity of a novel enzyme with exoxylanase and beta-(1,4)-xylosidase activities. *Applied and Environmental Microbiology* 61(8), 2958-2964.

Gibson, G.R., Roberfroid, M.B., (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125(6), 1401-1412.

Gibson, G.R., Wang, X., (1994). Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* 77(4), 412-420.

Glaser, C.A., Angulo, F.J., Rooney, J.A., (1994). Animal-associated opportunistic infections among persons infected with the human immunodeficiency virus. *Clinical Infectious Diseases* 18(1), 14-24.

Göbel, S.B. (2003). Multiplex-Polymerase-Ketten-Reaktion (MPCR) zum Nachweis ausgewählter Virulenzfaktoren schweinepathogener *Escherichia coli* - Einsatz bei Ferkeln mit *Bacillus cereus* var. *toyoi* Zulage. Dissertation. Freie Universität Berlin, Berlin.

Goffaux, F., China, B., Janssen, L., Mainil, J., (2000). Genotypic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated in Belgium from dogs and cats. *Research in Microbiology* 151(10), 865-871.

Gotelli, N.J., Colwell, R.K., (2011). Estimating species richness. In: *Biological Diversity: frontiers in measurement and assessment*. Oxford University Press, Inc., New York, 39-54

Gray, C.M., Sellon, R.K., Freeman, L.M., (2004). Nutritional adequacy of two vegan diets for cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 225(11), 1670-1675.

Grześkowiak, Ł., Endo, A., Beasley, S., Salminen, S., (2015). Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. *Anaerobe* 34, 14-23.

Guard, B.C., Barr, J.W., Reddivari, L., Klemashevich, C., Jayaraman, A., Steiner, J.M., Vanamala, J., Suchodolski, J.S., (2015). Characterization of microbial dysbiosis and metabolomic changes in dogs with acute diarrhea. *PloS One* 10(5), e0127259.

Hamady, M., Knight, R., (2009). Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. *Genome Research* 19(7), 1141-1152.

Handl, S., Dowd, S.E., Garcia-Mazcorro, J.F., Steiner, J.M., Suchodolski, J.S., (2011). Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS Microbiology Ecology* 76(2), 301-310.

Handl, S., German, A.J., Holden, S.L., Dowd, S.E., Steiner, J.M., Heilmann, R.M., Grant, R.W., Swanson, K.S., Suchodolski, J.S., (2013). Faecal microbiota in lean and obese dogs. *FEMS Microbiology Ecology* 84(2), 332-343.

Hayashi, H., Sakamoto, M., Kitahara, M., Benno, Y., (2006). Diversity of the *Clostridium coccooides* group in human fecal microbiota as determined by 16S rRNA gene library. *FEMS Microbiology Letters* 257(2), 202-207.

Hayes, K.C., Carey, R.E., Schmidt, S.Y., (1975). Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat. *Science* 188(4191), 949-951.

Heck, K.L., van Belle, G., Simberloff, D., (1975). Explicit calculation of the rarefaction diversity measurement and the determination of sufficient sample size. *Ecology* 56(6), 1459-1461.

Herter, C.A., Kendall, A.I., (1910). The influence of dietary alternations on the types of intestinal flora. *Journal of Biological Chemistry* 7(3), 203-236.

Hill, S.L., Cheney, J.M., Taton-Allen, G.F., Reif, J.S., Bruns, C., Lappin, M.R., (2000). Prevalence of enteric zoonotic organisms in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 216(5), 687-692.

Hinnebusch, B.F., Meng, S., Wu, J.T., Archer, S.Y., Hodin, R.A., (2002). The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *Journal of Nutrition* 132(5), 1012-1017.

Hinton, A.J., Corrier, D.E., Deloach, J.R., (1992a). *In vitro* inhibition of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* 0157:H7 by an anaerobic gram-positive coccus isolated from the cecal contents of adult chickens. *Journal of Food Protection* 55(3), 162-166.

Hinton, A.J., Corrier, D.E., Deloach, J.R., (1992b). Inhibition of the growth of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 on chicken feed media by bacteria isolated from the intestinal microflora of chickens. *Journal of Food Protection* 55(6), 419-423.

Hinton, A.J., Hume, M.E., Deloach, J.R., (1993). Role of metabolic intermediates in the inhibition of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* by *Veillonella*. *Journal of Food Protection* 56(11), 932-937.

Holland, R.E., (1990). Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clinical Microbiology Reviews* 3(4), 345-375.

Honneffer, J.B., Minamoto, Y., Suchodolski, J.S., (2014). Microbiota alterations in acute and chronic gastrointestinal inflammation of cats and dogs. *World Journal of Gastroenterology* 20(44), 16489-16497.

Hooda, S., Boler, B.M., Seroo, M.C., Brulc, J.M., Staeger, M.A., Boileau, T.W., Dowd, S.E., Fahey, G.C., Jr, Swanson, K.S., (2012). 454 pyrosequencing reveals a shift in fecal microbiota of healthy adult men consuming polydextrose or soluble corn fiber. *The Journal of Nutrition* 142(7), 1259-1265.

Hooda, S., Vester Boler, B.M., Kerr, K.R., Dowd, S.E., Swanson, K.S., (2013). The gut microbiome of kittens is affected by dietary protein:carbohydrate ratio and associated with blood metabolite and hormone concentrations. *British Journal of Nutrition* 109(9), 1637-1646

Hove, H., Nordgaardandersen, I., Mortensen, P.B., (1994). Fecal DL-lactate concentration in 100 gastrointestinal patients. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 29(3), 255-259.

Hughes, R., Magee, E.A., Bingham, S., (2000). Protein degradation in the large intestine: relevance to colorectal cancer. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 1(2), 51-58.

Ikeguchi, Y., Bewley, M.C., Pegg, A.E., (2006). Aminopropyltransferases: function, structure and genetics. *Journal of Biochemistry* 139(1), 1-9.

Imaki, H., Moretz, R.C., Wisniewski, H.M., Sturman, J.A., (1986). Feline maternal taurine deficiency: effects on retina and tapetum of the offspring. *Developmental Neuroscience* 8(3), 160-181.

Inness, V.L., McCartney, A.L., Khoo, C., Gross, K.L., Gibson, G.R., (2007). Molecular characterisation of the gut microflora of healthy and inflammatory bowel disease cats using fluorescence *in situ* hybridisation with special reference to *Desulfovibrio* spp.. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 91(1-2), 48-53.

Itoh, K., Mitsuoka, T., Maejima, K., Hiraga, C., Nakano, K., (1984). Comparison of fecal flora of cats based on different housing conditions with special reference to *Bifidobacterium*. Laboratory Animals 18(3), 280-284.

Jackins, H.C., Barker, H.A., (1951). Fermentative processes of the fusiform bacteria. Journal of Bacteriology 61(2), 101-114.

Janeczko, S., Atwater, D., Bogel, E., Greiter-Wilke, A., Gerold, A., Baumgart, M., Bender, H., McDonough, P.L., McDonough, S.P., Goldstein, R.E., Simpson, K.W., (2008). The relationship of mucosal bacteria to duodenal histopathology, cytokine mRNA, and clinical disease activity in cats with inflammatory bowel disease. Veterinary Microbiology 128(1-2), 178-193.

Jensen, M.B., Olsen, K.E., Nielsen, X.C., Hoegh, A.M., Dessau, R.B., Atlung, T., Engberg, J., (2015). Diagnosis of *Clostridium difficile*: real-time PCR detection of toxin genes in faecal samples is more sensitive compared to toxigenic culture. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 34(4), 727-736.

Jhung, M.A., Thompson, A.D., Killgore, G.E., Zukowski, W.E., Songer, G., Warny, M., Johnson, S., Gerding, D.N., McDonald, L.C., Limbago, B.M., (2008). Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. Emerging Infectious Diseases 14(7), 1039-1045.

Jia, J., Frantz, N., Khoo, C., Gibson, G.R., Rastall, R.A., McCartney, A.L., (2011a). Investigation of the faecal microbiota of geriatric cats. Letters in Applied Microbiology 53(3), 288-293.

Jia, J., Frantz, N., Khoo, C., Gibson, G.R., Rastall, R.A., McCartney, A.L., (2011b). Investigation of the faecal microbiota of kittens: monitoring bacterial succession and effect of diet. FEMS Microbiology Ecology 78(2), 395-404.

Joffre, E., von Mentzer, A., Svennerholm, A.M., Sjoling, A., (2016). Identification of new heat-stable (STa) enterotoxin allele variants produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *International Journal of Medical Microbiology* 306(7), 586-594.

Johnston, K.L., Swift, N.C., Forster-van Hijfte, M., Rutgers, H.C., Lamport, A., Ballèvre, O., Batt, R.M., (2001). Comparison of the bacterial flora of the duodenum in healthy cats and cats with signs of gastrointestinal tract disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 218(1), 48-51.

Kallus, S.J., Brandt, L.J., (2012). The Intestinal Microbiota and Obesity. *Journal of Clinical Gastroenterology* 46(1), 16-24.

Kamphues, J., Wolf, P., Coenen, M., Eder, K., Iben, C., Kienzle, E., Liesegang, A., Männer, K., Zebeli, Q., Zentek, J., (2014). *Supplemente zur Tierernährung für Studium und Praxis*. 12., überarbeitete Auflage. M.& H. Shaper GmbH, Hannover; S.14; S. 404.

Kanakubo, K., Fascetti, A.J., Larsen, J.A., (2015). Assessment of protein and amino acid concentrations and labeling adequacy of commercial vegetarian diets formulated for dogs and cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 247(4), 385-392.

Kanakupt, K., Vester Boler, B.M., Dunsford, B.R., Fahey, G.C., Jr., (2011). Effects of short-chain fructooligosaccharides and galactooligosaccharides, individually and in combination, on nutrient digestibility, fecal fermentative metabolite concentrations, and large bowel microbial ecology of healthy adult cats. *Journal of Animal Science* 89(5), 1376-1384.

Kane, E., Morris, J.G., Rogers, Q.R., (1981). Acceptability and digestibility by adult cats of diets made with various sources and levels of fat. *Journal of Animal Science* 53(6), 1516-1523.

Kendall, P.T., Holme, D.W., Smith, P.M., (1982a). Comparative evaluation of net digestive and absorptive efficiency in dogs and cats fed a variety of contrasting diet types. *Journal of Small Animal Practice* 23(9), 577-587.

Kendall, P.T., Smith, P.M., Holme, D.W., (1982b). Factors affecting digestibility and *in-vivo* energy content of cat foods. *Journal of Small Animal Practice* 23(9), 538-554.

Kerr, K.R., Dowd, S.E., Swanson, K.S., (2014a). Faecal microbiota of domestic cats fed raw whole chicks v. an extruded chicken-based diet. *Journal of Nutritional Science* 3(e22),1-5.

Kerr, K.R., Dowd, S.E., Swanson, K.S., (2014b). Salmonellosis impacts the proportions of faecal microbial populations in domestic cats fed 1–3-d-old chicks. *Journal of Nutritional Science* 3(e30)1-5.

Kerr, K.R., Morris, C.L., Burke, S.L., Swanson, K.S., (2014c). Apparent total tract energy and macronutrient digestibility of one to three-day-old, adult ground, extruded and canned chicken-based diets in domestic cats (*Felis silvestrus catus*). *Journal of Animal Science* 92(8), 3441-3448.

Kerr, K.R., Vester Boler, B.M., Morris, C.L., Liu, K.J., Swanson, K.S., (2012). Apparent total tract energy and macronutrient digestibility and fecal fermentative end-product concentrations of domestic cats fed extruded, raw beef-based, and cooked beef-based diets. *Journal of Animal Science* 90(2), 515-522.

Kieler, I.N., Molbak, L., Hansen, L.L., Hermann-Bank, M.L., Bjornvad, C.R., (2016). Overweight and the feline gut microbiome - a pilot study. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 100(3), 478-484.

Kienzle, E. (1990). Untersuchungen zum Intestinal- und Intermediärstoffwechsel von Kohlenhydraten (Stärke verschiedener Herkunft und Aufbereitung, Mono- und Disaccharide) bei der Hauskatze (*Felis catus*). Habilitationsschrift. Tierärztliche Hochschule Hannover

Kienzle, E., (1994). Effect of carbohydrates on digestion in the cat. *Journal of Nutrition* 124(12 Suppl), 2568S-2571S.

Kienzle, E., Meyer, H., Schneider, R., (1991). Investigations on palatability, digestibility and tolerance of low digestible food components in cats. *Journal of Nutrition* 121(11 Suppl), S56-S57.

Kim, H.B., Isaacson, R.E., (2015). The pig gut microbial diversity: Understanding the pig gut microbial ecology through the next generation high throughput sequencing. *Veterinary Microbiology* 177(3-4), 242-251.

Kircher, M., Kelso, J., (2010). High-throughput DNA sequencing – concepts and limitations. *Bioessays* 32(6), 524-536.

Kirk, C.A., Debraekeleer, J., Armstrong, P.J., (2002). Ernährung gesunder Katzen. In: Hand, M.S., Thatcher, C.D., Remillard, R.L., Roudebush, P. (Hrsg.): *Klinische Diätetik für Kleintiere*. 4., stark erweiterte und vollständig neu bearbeitete Auflage, Mark Morris Institute, Topeka (Kansas), S. 375-446.

Kirsch, K. (2010). Die Wirkung organischer Säuren als Futterzusatzstoff auf Nährstoffumsatz und Bakterienpopulationen im Verdauungstrakt von Absetzferkeln. Dissertation. Freie Universität Berlin, Berlin

Klär, I. (2008). Einfluss der Verfütterung des Probiotikums *E. faecium* NCIMB 10415 im frühen postnatalen Stadium auf die Zusammensetzung und Stoffwechselaktivität der gastrointestinalen Mikrobiota bei Ferkeln. Dissertation. Freie Universität Berlin, Berlin

Knopf, K., Sturman, J.A., Armstrong, M., Hayes, K.C., (1978). Taurine: an essential nutrient for the cat. *Journal of Nutrition* 108(5), 773-778.

König, H.E., Sótónyi, P., Liebich, H.-G., (2009). Verdauungsapparat (*Apparatus digestorius*). In: König, H. E., Liebich, H.-G. (Hrsg): *Anatomie der Haussäugetiere*. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. 4., überarbeitete Auflage, Schattauer GmbH, Stuttgart, S. 301-366.

Kontanis, E.J., Reed, F.A., (2006). Evaluation of real-time PCR amplification efficiencies to detect PCR inhibitors. *Journal of Forensic Sciences* 51(4), 795-804.

Koskey, A.M., Fisher, J.C., Eren, A.M., Ponce-Terashima, R., Reis, M.G., Blanton, R.E., McLellan, S.L., (2014). *Blautia* and *Prevotella* sequences distinguish human and animal fecal pollution in Brazil surface waters. *Environmental Microbiology Reports* 6(6), 696-704.

Kovatcheva-Datchary, P., Nilsson, A., Akrami, R., Lee, Y.S., De Vadder, F., Arora, T., Hallen, A., Martens, E., Björck, I., Bäckhed, F., (2015). Dietary fiber-induced improvement in glucose metabolism is associated with an increased abundance of *Prevotella*. *Cell Metabolism* 22(6), 971-982.

Krause, G., Zimmermann, S., Beutin, L., (2005). Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (eae) gene positive *Escherichia coli* types. *Veterinary Microbiology* 106(1-2), 87-95.

Kuijper, E.J., van Dissel, J.T., Wilcox, M.H., (2007). *Clostridium difficile*: changing epidemiology and new treatment options. *Current Opinion in Infectious Diseases* 20(4), 376-383.

Kunin, V., Engelbrekton, A., Ochman, H., Hugenholtz, P., (2010). Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environmental Microbiology* 12(1), 118-123.

Kwak, T.J., Peterson, J.T., (2007). Community indices, parameters, and comparisons. In: Guy, C.S., Brown, M.L. (Hrsg.): *Analysis and interpretation of freshwater fisheries data*. Bethesda (Maryland), 677-763.

Ladero Losada, V.M., Calles-Enríquez, M., Fernández García, M., Álvarez González, M.A., (2010). Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines. *Current Nutrition and Food Science* 6(2), 145-156.

Langendorf, H., (1969). Ammoniak als Lebensmittelbestandteil und als Metabolit. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* 9(4), 301-311.

Langhans, W., Lutz, T.A., (2015). Steuerung der Nahrungsaufnahme. In: von Engelhardt, W., Breves, G., Diener, M., Gäbel, G. (Hrsg.): *Physiologie der Haustiere*. 5., vollständig überarbeitete Auflage, Enke Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH und Co. KG, Stuttgart, S. 519-530.

Lee, S., Lee, J., Ha, J., Choi, Y., Kim, S., Lee, H., Yoon, Y., Choi, K.H., (2016). Clinical relevance of infections with zoonotic and human oral species of *Campylobacter*. *Journal of Microbiology* 54(7), 459-467.

Legrand-Defretin, V., (1994). Differences between cats and dogs: a nutritional view. *Proceedings of the Nutrition Society* 53(1), 15-24.

Lévêque, C., Mounolou, J.-C., (2003). Measuring biological diversity In: Lévêque, C., Mounolou, J.-C. (Hrsg.): *Biodiversity*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester (England), 26-27.

Levine, U.Y., Looft, T., Allen, H.K., Stanton, T.B., (2013). Butyrate-producing bacteria, including mucin degraders, from the swine intestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology* 79(12), 3879-3881.

Ley, R.E., (2010). Obesity and the human microbiome. *Current Opinion in Gastroenterology* 26(1), 5-11.

Ley, R.E., (2016). Gut microbiota in 2015: *Prevotella* in the gut: choose carefully. *Nature Reviews: Gastroenterology & Hepatology* 13(2), 69-70.

LGC Inc., (2017). Illumina HiSeq & NextSeq. <http://www.lgcgroup.com/services/dna-sequencing/next-generation-sequencing/illumina-miseq-nextseq/>. (zuletzt abgerufen am 14.10.2017 um 16:21 Uhr)

Lin, H.C., Visek, W.J., (1991). Colon mucosal cell damage by ammonia in rats. *Journal of Nutrition* 121(6), 887-893.

Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., Law, M., (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012, Article ID 251364.

Liu, Z., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., Knight, R., (2008). Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. *Nucleic Acids Research* 36(18), e120.

Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F.D., Knight, R., (2007). Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Research* 35(18), e120.

Loesche, W.J., Gibbons, R.J., (1968). Amino acid fermentation by *Fusobacterium nucleatum*. *Archives of Oral Biology* 13(2), 191-202.

Loman, N.J., Constantinidou, C., Chan, J.Z., Halachev, M., Sergeant, M., Penn, C.W., Robinson, E.R., Pallen, M.J., (2012a). High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity. *Nature Reviews: Microbiology* 10(9), 599-606.

Loman, N.J., Misra, R.V., Dallman, T.J., Constantinidou, C., Gharbia, S.E., Wain, J., Pallen, M.J., (2012b). Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nature Biotechnology* 30(5), 434-439.

Louis, P., Flint, H.J., (2009). Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiology Letters* 294(1), 1-8.

Louis, P., Hold, G.L., Flint, H.J., (2014). The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature Reviews: Microbiology* 12(10), 661-672.

Louis, P., Scott, K.P., Duncan, S.H., Flint, H.J., (2007). Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *Journal of Applied Microbiology* 102(5), 1197-1208.

Lubbs, D.C., Vester, B.M., Fastinger, N.D., Swanson, K.S., (2009). Dietary protein concentration affects intestinal microbiota of adult cats: a study using DGGE and qPCR to evaluate differences in microbial populations in the feline gastrointestinal tract. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 93(1), 113-121.

Luo, C., Tsementzi, D., Kyripides, N., Read, T., Konstantinidis, K.T., (2012). Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample. *PLoS One* 7(2), e30087.

Macfarlane, G.T., Allison, C., (1986). Utilisation of protein by human gut bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 2(1), 19-24.

Macfarlane, G.T., Cummings, J.H., Allison, C., (1986). Protein degradation by human intestinal bacteria. *Journal of General Microbiology* 132(6), 1647-1656.

Macfarlane, G.T., Macfarlane, S., (2012). Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. *Journal of AOAC International* 95(1), 50-60.

Macfarlane, S., Macfarlane, G.T., (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society* 62(1), 67-72.

Madewell, B.R., Bea, J.K., Kraegel, S.A., Winthrop, M., Tang, Y.J., Silva, J., Jr., (1999). *Clostridium difficile*: a survey of fecal carriage in cats in a veterinary medical teaching hospital. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 11(1), 50-54.

Malinen, E., Kassinen, A., Rinttilä, T., Palva, A., (2003). Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology* 149(1), 269-277.

Marks, S.L., Rankin, S.C., Byrne, B.A., Weese, J.S., (2011). Enteropathogenic bacteria in dogs and cats: diagnosis, epidemiology, treatment, and control. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25(6), 1195-1208.

Maslowski, K.M., Vieira, A.T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Yu, D., Schilter, H.C., Rolph, M.S., Mackay, F., Artis, D., Xavier, R.J., Teixeira, M.M., Mackay, C.R., (2009). Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* 461(7268), 1282-1286.

Masuoka, H., Shimada, K., Kiyosue-Yasuda, T., Kiyosue, M., Oishi, Y., Kimura, S., Ohashi, Y., Fujisawa, T., Hotta, K., Yamada, A., Hirayama, K., (2017). Transition of the intestinal microbiota of cats with age. *PLoS One* 12(8), e0181739.

Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Miyamoto, Y., Takada, T., Matsumoto, K., Oyaizu, H., Tanaka, R., (2002). Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology* 68(11), 5445-5451.

Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Takada, T., Tanaka, R., (2004). Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology* 70(12), 7220-7228.

McClane, B.A., (1992). *Clostridium perfringens* enterotoxin - structure, action and detection. *Journal of Food Safety* 12(3), 237-252.

McNeil, N.I., Cummings, J.H., James, W.P., (1978). Short chain fatty acid absorption by the human large intestine. *Gut* 19(9), 819-822.

Meer, R.R., Songer, J.G., Park, D.L., (1997). Human disease associated with *Clostridium perfringens* enterotoxin. In: Ware, G.W. (Hrsg.): Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Springer-Verlag, New York (New York), 150, 75-94.

Messia, M.C., Marconi, E., (2012). Innovative and rapid procedure for 4-hydroxyproline determination in meat-based foods. In: Alterman M., Hunziker P. (Hrsg.): Amino Acid Analysis. Methods in Molecular Biology, Humana Press, Totowa (New Jersey), 828, 281-289.

Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., Olson, R., Glass, E., Kubal, M., Paczian, T., Rodriguez, A., Stevens, R., Wilke, A., Wilkening, J., Edwards, R., (2008). The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. BMC Bioinformatics 9(1), 1-8.

Minamoto, Y., Dhanani, N., Markel, M.E., Steiner, J.M., Suchodolski, J.S., (2014). Prevalence of *Clostridium perfringens*, *Clostridium perfringens* enterotoxin and dysbiosis in fecal samples of dogs with diarrhea. Veterinary Microbiology 174(3-4), 463-473.

Minamoto, Y., Hooda, S., Swanson, K.S., Suchodolski, J.S., (2012). Feline gastrointestinal microbiota. Animal Health Research Reviews 13(1), 64-77.

Miquel, S., Leclerc, M., Martin, R., Chain, F., Lenoir, M., Raguideau, S., Hudault, S., Bridonneau, C., Northen, T., Bowen, B., Bermudez-Humaran, L.G., Sokol, H., Thomas, M., Langella, P., (2015). Identification of metabolic signatures linked to anti-inflammatory effects of *Faecalibacterium prausnitzii*. MBio 6(2), e00300-15.

Miquel, S., Martín, R., Bridonneau, C., Robert, V., Sokol, H., Bermúdez-Humarán, L.G., Thomas, M., Langella, P., (2014). Ecology and metabolism of the beneficial intestinal commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii*. Gut Microbes 5(2), 146-151.

Miyazaki, K., Miyamoto, H., Mercer, D.K., Hirase, T., Martin, J.C., Kojima, Y., Flint, H.J., (2003). Involvement of the multidomain regulatory protein XynR in positive control of xylanase gene expression in the ruminal anaerobe *Prevotella bryantii* B<sub>14</sub>. Journal of Bacteriology 185(7), 2219-2226.

MOBIO Laboratories Inc., (2014). PowerSoil<sup>®</sup> DNA Isolation Kit: Instruction manual (Version 07272016), Carlsbad (Kalifornien).

Monteiro, L., Bonnemaïson, D., Vekris, A., Petry, K.G., Bonnet, J., Vidal, R., Cabrita, J., Mégraud, F., (1997). Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *Journal of Clinical Microbiology* 35(4), 995-998.

Moran, C.P., Shanahan, F., (2014). Gut microbiota and obesity: role in aetiology and potential therapeutic target. *Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology* 28(4), 585-597.

Morato, E.P., Leomil, L., Beutin, L., Krause, G., Moura, R.A., Pestana de Castro, A.F., (2009). Domestic cats constitute a natural reservoir of human enteropathogenic *Escherichia coli* types. *Zoonoses and Public Health* 56(5), 229-237.

Morris, M.L., Jr., (1965). Feline degenerative retinopathy. *The Cornell Veterinarian* 55(2), 295-308.

Mortensen, P.B., Clausen, M.R., (1996). Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 31(Suppl. 216), 132-148.

Nagy, B., Fekete, P.Z., (1999). Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Veterinary Research* 30(2-3), 259-284.

Nakamura, M., Kato, A., Tanaka, D., Gyobu, Y., Higaki, S., Karasawa, T., Yamagishi, T., (2004). PCR identification of the plasmid-borne enterotoxin gene (*cpe*) in *Clostridium perfringens* strains isolated from food poisoning outbreaks. *International Journal of Medical Microbiology* 294(4), 261-265.

Nataro, J.P., Kaper, J.B., (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 11(1), 142-201.

National Research Council (NRC), (2006). Nutrient requirements of cats and dogs. The National Academies Press, Washington, DC.

Naumann, C., Bassler, R., Seibold, R., Barth, C., (2012). Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. *Methodenbuch Band III. 8. Ergänzungslieferung*. VDLUFA-Verlag, Darmstadt.

Neiger, R., Dieterich, C., Burnens, A., Waldvogel, A., Corthesy-Theulaz, I., Halter, F., Lauterburg, B., Schmassmann, A., (1998). Detection and prevalence of *Helicobacter* infection in pet cats. *Journal of Clinical Microbiology* 36(3), 634-637.

Neiger, R., Simpson, K.W., (2000). *Helicobacter* infection in dogs and cats: facts and fiction. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 14(2), 125-133.

Nery, J., Goudez, R., Biourge, V., Tournier, C., Leray, V., Martin, L., Thorin, C., Nguyen, P., Dumon, H., (2012). Influence of dietary protein content and source on colonic fermentative activity in dogs differing in body size and digestive tolerance. *Journal of Animal Science* 90(8), 2570-2580.

Ng, W., Tonzetich, J., (1984). Effect of hydrogen sulfide and methyl mercaptan on the permeability of oral mucosa. *Journal of Dental Research* 63(7), 994-997.

Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E., (1999). Verdauungsapparat, *Apparatus digestorius*. In: Freiwein, J., Gasse, H., Leiser, R., Roos, H., Thomé, H., Vollmerhaus, B., Waibl, H. (Hrsg.): *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band II Eingeweide. 8., vollständig neubearbeitete Auflage*, Parey-Buchverlag im Blackwell Wissenschafts-Verlag GmbH, Berlin, S. 15-18.

Nyangale, E.P., Mottram, D.S., Gibson, G.R., (2012). Gut microbial activity, implications for health and disease: the potential role of metabolite analysis. *Journal of Proteome Research* 11(12), 5573-5585.

Oldenhage, S. (2003). Einfluss der Proteinversorgung auf einige mikrobielle Metaboliten im Darmlumen und Harn sowie die Histologie des Kolons bei Katzen. Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.

Osbaldiston, G.W., Stowe, E.C., (1971). Microflora of alimentary tract of cats. *American Journal of Veterinary Research* 32(9), 1399-1405.

Papasouliotis, K., Sparkes, A.H., Werrett, G., Egan, K., Gruffydd-Jones, E.A., Gruffydd-Jones, T.J., (1998). Assessment of the bacterial flora of the proximal part of the small intestine in healthy cats, and the effect of sample collection method. *American Journal of Veterinary Research* 59(1), 48-51.

Paris, J.K., Wills, S., Balzer, H.J., Shaw, D.J., Gunn-Moore, D.A., (2014). Enteropathogen co-infection in UK cats with diarrhoea. *BMC Veterinary Research* 10(1), 13.

Park, H.J., Lee, S.E., Kim, H.B., Isaacson, R.E., Seo, K.W., Song, K.H., (2015). Association of obesity with serum leptin, adiponectin, and serotonin and gut microflora in Beagle dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 29(1), 43-50.

Parsonnet, J., Friedman, G.D., Vandersteen, D.P., Chang, Y., Vogelman, J.H., Orentreich, N., Sibley, R.K., (1991). *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *New England Journal of Medicine* 325(16), 1127-1131.

Pass, M.A., Odedra, R., Batt, R.M., (2000). Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. *Journal of Clinical Microbiology* 38(5), 2001-2004.

Paßlack, N., Kohn, B., Doherr, M.G., Zentek, J., (2017). Impact of dietary protein concentration and quality on immune function of cats. *PloS One* 12(1), e0169822.

Paßlack, N., Kohn, B., Doherr, M.G., Zentek, J., (2018). Influence of protein concentration and quality in a canned diet on urine composition, apparent nutrient digestibility and energy supply in adult cats. *BMC Veterinary Research* 14(1), 225.

Patil, A.R., Czarnecki-Maulden, G., Dowling, K.E., (2000). Effect of advances in age on fecal microflora of cats. *FASEB Journal* 14(4), A488-A488.

Pawlak, K., Brzosko, S., Mysliwiec, M., Pawlak, D., (2009a). Kynurenine, quinolinic acid—the new factors linked to carotid atherosclerosis in patients with end-stage renal disease. *Atherosclerosis* 204(2), 561-566.

Pawlak, K., Kowalewska, A., Mysliwiec, M., Pawlak, D., (2009b). Kynurenine and its metabolites—kynurenic acid and anthranilic acid are associated with soluble endothelial adhesion molecules and oxidative status in patients with chronic kidney disease. *American Journal of the Medical Sciences* 338(4), 293-300.

Pegg, A.E., (2013). Toxicity of polyamines and their metabolic products. *Chemical Research in Toxicology* 26(12), 1782-1800.

Pegg, A.E., McCann, P.P., (1982). Polyamine metabolism and function. *American Journal of Physiology* 243(5), C212-C221.

Pegg, A.E., Michael, A.J., (2010). Spermine synthase. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67(1), 113-121.

Peng, Y., Yu, K., Mu, C., Hang, S., Che, L., Zhu, W., (2017). Progressive response of large intestinal bacterial community and fermentation to the stepwise decrease of dietary crude protein level in growing pigs. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101(13), 5415-5426.

Peterson, L.R., Mehta, M.S., Patel, P.A., Hacek, D.M., Harazin, M., Nagwekar, P.P., Thomson, R.B., Jr., Robicsek, A., (2011). Laboratory testing for *Clostridium difficile* infection: light at the end of the tunnel. *American Journal of Clinical Pathology* 136(3), 372-380.

Pieper, R., Boudry, C., Bindelle, J., Vahjen, W., Zentek, J., (2014). Interaction between dietary protein content and the source of carbohydrates along the gastrointestinal tract of weaned piglets. *Archives of Animal Nutrition* 68(4), 263-280.

Pieper, R., Kröger, S., Richter, J.F., Wang, J., Martin, L., Bindelle, J., Htoo, J.K., von Smolinski, D., Vahjen, W., Zentek, J., Van Kessel, A.G., (2012). Fermentable fiber ameliorates fermentable protein-induced changes in microbial ecology, but not the mucosal response, in the colon of piglets. *Journal of Nutrition* 142(4), 661-667.

Pinna, C., Stefanelli, C., Biagi, G., (2014). *In vitro* effect of dietary protein level and nondigestible oligosaccharides on feline fecal microbiota. *Journal of Animal Science* 92(12), 5593-5602.

Pion, P.D., Kittleson, M.D., Rogers, Q.R., Morris, J.G., (1987). Myocardial failure in cats associated with low plasma taurine: a reversible cardiomyopathy. *Science* 237(4816), 764-768.

Pitcher, M.C., Cummings, J.H., (1996). Hydrogen sulphide: a bacterial toxin in ulcerative colitis? *Gut* 39(1), 1-4.

Potrykus, J., White, R.L., Bearne, S.L., (2008). Proteomic investigation of amino acid catabolism in the indigenous gut anaerobe *Fusobacterium varium*. *Proteomics* 8(13), 2691-2703.

Prohaszka, L., Jayarao, B.M., Fabian, A., Kovacs, S., (1990). The role of intestinal volatile fatty acids in the *Salmonella* shedding of pigs. *Journal of Veterinary Medicine. Series B* 37(1-10), 570-574.

Pryde, S.E., Duncan, S.H., Hold, G.L., Stewart, C.S., Flint, H.J., (2002). The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiology Letters* 217(2), 133-139.

Puño-Sarmiento, J., Medeiros, L., Chiconi, C., Martins, F., Pelayo, J., Rocha, S., Blanco, J., Blanco, M., Zanutto, M., Kobayashi, R., Nakazato, G., (2013). Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil. *Veterinary Microbiology* 166(3-4), 676-680.

QIAGEN®, (2010). Quick-Start Protocol .QIAquick® PCR Purification Kit.

QIAGEN®, (2012). QIAamp® DNA Stool Handbook. For DNA purification from stool samples.

Queen, E.V., Marks, S.L., Farver, T.B., (2012). Prevalence of selected bacterial and parasitic agents in feces from diarrheic and healthy control cats from Northern California. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 26(1), 54-60.

Quévrain, E., Maubert, M.A., Michon, C., Chain, F., Marquant, R., Tailhades, J., Miquel, S., Carlier, L., Bermúdez-Humarán, L.G., Pigneur, B., Lequin, O., Kharrat, P., Thomas, G., Rainteau, D., Aubry, C., Breyner, N., Afonso, C., Lavielle, S., Grill, J.P., Chassaing, G., Chatel, J.M., Trugnan, G., Xavier, R., Langella, P., Sokol, H., Seksik, P., (2016). Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* 65(3), 415-425.

Rabin, A.R., Hayes, K.C., Berson, E.L., (1973). Cone and rod responses in nutritionally induced retinal degeneration in the cat. *Investigative Ophthalmology* 12(9), 694-704.

Radicke, B. (1995). Der Einfluss unterschiedlicher Nährstoffgehalte in Alleinfuttermitteln für die Katze auf den energetischen Erhaltungsbedarf, auf die Teilwirkungsgrade für den energetischen Ansatz und auf den Rohproteinbedarf von adulten Katzen. Dissertation. Freie Universität Berlin, Berlin.

Ramadan, Z., Xu, H., Laflamme, D., Czarnecki-Maulden, G., Li, Q.J., Labuda, J., Bourqui, B., (2014). Fecal microbiota of cats with naturally occurring chronic diarrhea assessed using 16S

rRNA gene 454-pyrosequencing before and after dietary treatment. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28(1), 59-65.

Ramezani, M., MacIntosh, S.E., White, R.L., (1999). Utilization of D-amino acids by *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium varium*. *Amino Acids* 17(2), 185-193.

Ramsak, A., Peterka, M., Tajima, K., Martin, J.C., Wood, J., Johnston, M.E., Aminov, R.I., Avgustin, G., (2000). Unravelling the genetic diversity of ruminal bacteria belonging to the CFB phylum. *FEMS Microbiology Ecology* 33(1), 69-79.

Rasmussen, H.S., Holtug, K., Mortensen, P.B., (1988). Degradation of amino acids to short-chain fatty acids in humans. An *in vitro* study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 23(2), 178-182.

Rastall, R.A., (2004). Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance. *The Journal of Nutrition* 134(8 Suppl), 2022S-2026S.

Reilly, K.J., Rombeau, J.L., (1993). Metabolism and potential clinical applications of short-chain fatty-acids. *Clinical Nutrition* 12(1 Suppl), S97-S105.

Ricke, S.C., Martin, S.A., Nisbet, D.J., (1996). Ecology, metabolism, and genetics of ruminal selenomonads. *Critical Reviews in Microbiology* 22(1), 27-56.

Riley, T.V., Adams, J.E., O'Neill, G.L., Bowman, R.A., (1991). Gastrointestinal carriage of *Clostridium difficile* in cats and dogs attending veterinary clinics. *Epidemiology and Infection* 107(3), 659-665.

Rinttilä, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogus, L., Palva, A., (2004). Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology* 97(6), 1166-1177.

Rist, V.T., Weiss, E., Eklund, M., Mosenthin, R., (2013). Impact of dietary protein on microbiota composition and activity in the gastrointestinal tract of piglets in relation to gut health: a review. *Animal* 7(7), 1067-1078.

Rist, V.T., Weiss, E., Sauer, N., Mosenthin, R., Eklund, M., (2014). Effect of dietary protein supply originating from soybean meal or casein on the intestinal microbiota of piglets. *Anaerobe* 25, 72-79.

Ritchie, L.E., Burke, K.F., Garcia-Mazcorro, J.F., Steiner, J.M., Suchodolski, J.S., (2010). Characterization of fecal microbiota in cats using universal 16S rRNA gene and group-specific primers for *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. *Veterinary Microbiology* 144(1-2), 140-146.

Ritchie, L.E., Steiner, J.M., Suchodolski, J.S., (2008). Assessment of microbial diversity along the feline intestinal tract using 16S rRNA gene analysis. *FEMS Microbiology Ecology* 66(3), 590-598.

Rivière, A., Selak, M., Lantin, D., Leroy, F., De Vuyst, L., (2016). Bifidobacteria and Butyrate-producing colon bacteria: importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Frontiers in Microbiology* 7, Article 979.

Rochus, K., Janssens, G.P., Hesta, M., (2014). Dietary fibre and the importance of the gut microbiota in feline nutrition: a review. *Nutrition Research Reviews* 27(2), 295-307.

Rochus, K., Janssens, G.P., Van de Velde, H., Verbrugghe, A., Wuyts, B., Vanhaecke, L., Hesta, M., (2013). Highly viscous guar gum shifts dietary amino acids from metabolic use to fermentation substrate in domestic cats. *British Journal of Nutrition* 109(6), 1022-1030.

Roediger, W.E., (1980). Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut* 21(9), 793-798.

Roediger, W.E., Moore, A., (1981). Effect of short-chain fatty acid on sodium absorption in isolated human colon perfused through the vascular bed. *Digestive Diseases and Sciences* 26(2), 100-106.

Roediger, W.E., Moore, J., Babidge, W., (1997). Colonic sulfide in pathogenesis and treatment of ulcerative colitis. *Digestive Diseases and Sciences* 42(8), 1571-1579.

Rogers, A.H., Zilm, P.S., Gully, N.J., Pfennig, A.L., Marsh, P.D., (1991). Aspects of the growth and metabolism of *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953 in continuous culture. *Oral Microbiology and Immunology* 6(4), 250-255.

Rosenthal, S.M., Fisher, E.R., Stohlman, E.F., (1952). Nephrotoxic action of spermine. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 80(3), 432-434.

Rubin, L.F., (1963). Atrophy of rods and cones in the cat retina. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 142, 1415-1420.

Ruppin, H., Bar-Meir, S., Soergel, K.H., Wood, C.M., Schmitt, M.G., Jr., (1980). Absorption of short-chain fatty acids by the colon. *Gastroenterology* 78(6), 1500-1507.

Rusk, N., (2011). Torrents of sequence. *Nature Methods* 8(1), 44.

Russell, W.R., Hoyles, L., Flint, H.J., Dumas, M.E., (2013). Colonic bacterial metabolites and human health. *Current Opinion in Microbiology* 16(3), 246-254.

Sabshin, S.J., Levy, J.K., Tupler, T., Tucker, S.J., Greiner, E.C., Leutenegger, C.M., (2012). Enteropathogens identified in cats entering a Florida animal shelter with normal feces or diarrhea. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 241(3), 331-337.

Sahl, J.W., Sistrunk, J.R., Fraser, C.M., Hine, E., Baby, N., Begum, Y., Luo, Q., Sheikh, A., Qadri, F., Fleckenstein, J.M., Rasko, D.A., (2015). Examination of the enterotoxigenic *Escherichia coli* population structure during human infection. *MBio* 6(3), e00501.

Saito, K., Fujigaki, S., Heyes, M.P., Shibata, K., Takemura, M., Fujii, H., Wada, H., Noma, A., Seishima, M., (2000). Mechanism of increases in L-kynurenine and quinolinic acid in renal insufficiency. *American Journal of Physiology: Renal Physiology* 279(3), F565-F572.

Sakamoto, M., Tanaka, Y., Benno, Y., Ohkuma, M., (2015). *Parabacteroides faecis* sp. nov., isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65(4), 1342-1346.

Salaun, F., Blanchard, G., Le Paih, L., Roberti, F., Niceron, C., (2016). Impact of macronutrient composition and palatability in wet diets on food selection in cats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*.

Sanders, M.K., Peura, D.A., (2002). *Helicobacter pylori*-associated Diseases. *Current Gastroenterology Reports* 4(6), 448-454.

Schierack, P., Steinruck, H., Kleta, S., Vahjen, W., (2006). Virulence factor gene profiles of *Escherichia coli* isolates from clinically healthy pigs. *Applied and Environmental Microbiology* 72(10), 6680-6686.

Schloss, P.D., Jenior, M.L., Koumpouras, C.C., Westcott, S.L., Highlander, S.K., (2016). Sequencing 16S rRNA gene fragments using the PacBio SMRT DNA sequencing system. *PeerJ* 4, e1869.

Schmitt, K. (2014). Identifizierung und Charakterisierung transkribierter Loci der humanen endogenen Retrovirus-Gruppen HERV-K(HML-2) und HERV-W im Kontext von Tumorerkrankungen und Multipler Sklerose. Dissertation. Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, S. 75-77

Schneider, R. (1988). Untersuchungen zur Akzeptanz, Verdaulichkeit und Verträglichkeit verschiedener schwerverdaulicher Futtermittel bei der Katze. Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.

Scott, K.P., Antoine, J.M., Midtvedt, T., van Hemert, S., (2015). Manipulating the gut microbiota to maintain health and treat disease. *Microbial Ecology in Health and Disease* 26, e25877.

Scott, K.P., Gratz, S.W., Sheridan, P.O., Flint, H.J., Duncan, S.H., (2013). The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological Research* 69(1), 52-60.

Scott, P.P., (1964). Nutritional requirements and deficiencies. In: Catcott, E.J. (Hrsg.): *Feline Medicine and Surgery*. American Veterinary Publications, Inc., Santa Barbara (Kalifornien), 60-70.

Shabana, I.I., Zaraket, H., Suzuki, H., (2013). Molecular studies on diarrhea-associated *Escherichia coli* isolated from humans and animals in Egypt. *Veterinary Microbiology* 167(3-4), 532-539.

Shimi, A., Barin, A., (1977). *Salmonella* in cats. *Journal of Comparative Pathology* 87(2), 315-318.

Silva, R.O.S., Lobato, F.C.F., (2015). *Clostridium perfringens*: A review of enteric diseases in dogs, cats and wild animals. *Anaerobe* 33, 14-17.

Sipos, M., Jeraldo, P., Chia, N., Qu, A., Dhillon, A.S., Konkel, M.E., Nelson, K.E., White, B.A., Goldenfeld, N., (2010). Robust computational analysis of rRNA hypervariable tag datasets. *PloS One* 5(12), e15220.

Smith, H.W., (1965). Observations on flora of alimentary tract of animals and factors affecting its composition. *Journal of Pathology and Bacteriology* 89(1), 95-122.

Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L.G., Gratadoux, J.J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.P., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottière, H.M., Doré, J., Marteau, P., Seksik, P., Langella, P., (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(43), 16731-16736.

Song, Y., Liu, C., Finegold, S.M., (2004). Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children. *Applied and Environmental Microbiology* 70(11), 6459-6465.

Spain, C.V., Scarlett, J.M., Wade, S.E., McDonough, P., (2001). Prevalence of enteric zoonotic agents in cats less than 1 year old in Central New York State. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 15(1), 33-38.

Sparkes, A.H., Papasouliotis, K., Sunvold, G., Werrett, G., Clarke, C., Jones, M., Gruffydd-Jones, T.J., Reinhart, G., (1998a). Bacterial flora in the duodenum of healthy cats, and effect of dietary supplementation with fructo-oligosaccharides. *American Journal of Veterinary Research* 59(4), 431-435.

Sparkes, A.H., Papasouliotis, K., Sunvold, G., Werrett, G., Gruffydd-Jones, E.A., Egan, K., Gruffydd-Jones, T.J., Reinhart, G., (1998b). Effect of dietary supplementation with fructo-oligosaccharides on fecal flora of healthy cats. *American Journal of Veterinary Research* 59(4), 436-440.

Stöcker, R. (1987). Bakteriologische Untersuchungen zur Zusammensetzung der Darmflora der Katze. Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.

Sturman, J.A., (1988). Taurine in development. *Journal of Nutrition* 118(10), 1169-1176.

Sturman, J.A., Gargano, A.D., Messing, J.M., Imaki, H., (1986). Feline maternal taurine deficiency: effect on mother and offspring. *Journal of Nutrition* 116(4), 655-667.

Sturman, J.A., Lu, P., (1997). Role of feline maternal taurine nutrition in fetal cerebellar development: an immunohistochemical study. *Amino Acids* 13(3-4), 369-377.

Sturman, J.A., Messing, J.M., (1991). Dietary taurine content and feline reproduction and outcome. *Journal of Nutrition* 121(8), 1195-1203.

Sturman, J.A., Messing, J.M., (1992). High dietary taurine effects on feline tissue taurine concentrations and reproductive performance. *Journal of Nutrition* 122(1), 82-88.

Sturman, J.A., Palackal, T., Imaki, H., Moretz, R.C., French, J., Wisniewski, H.M., (1987). Nutritional taurine deficiency and feline pregnancy and outcome. In: Huxtable R.J., Franconi F., Giotti A. (Hrsg.): *The Biology of Taurine. Advances in Experimental Medicine and Biology* Springer, Boston (Massachusetts) 217, 113-124.

Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J.J., Gibson, G.R., Collins, M.D., Doré, J., (1999). Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and Environmental Microbiology* 65(11), 4799-4807.

Suchodolski, J.S., (2011a). Companion animals symposium: microbes and gastrointestinal health of dogs and cats. *Journal of Animal Science* 89(5), 1520-1530.

Suchodolski, J.S., (2011b). Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 41(2), 261-272.

Suchodolski, J.S., (2016). Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats. *The Veterinary Journal* 215, 30-37 .

Suchodolski, J.S., Camacho, J., Steiner, J.M., (2008). Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. *FEMS Microbiology Ecology* 66(3), 567-578.

Suchodolski, J.S., Foster, M.L., Sohail, M.U., Leutenegger, C., Queen, E.V., Steiner, J.M., Marks, S.L., (2015). The fecal microbiome in cats with diarrhea. *PloS One* 10(5), e0127378.

Suchodolski, J.S., Markel, M.E., Garcia-Mazcorro, J.F., Unterer, S., Heilmann, R.M., Dowd, S.E., Kachroo, P., Ivanov, I., Minamoto, Y., Dillman, E.M., Steiner, J.M., Cook, A.K., Toresson, L., (2012). The fecal microbiome in dogs with acute diarrhea and idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS One* 7(12), e51907.

Suchodolski, J.S., Xenoulis, P.G., Paddock, C.G., Steiner, J.M., Jergens, A.E., (2010). Molecular analysis of the bacterial microbiota in duodenal biopsies from dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Veterinary Microbiology* 142(3-4), 394-400.

Swanson, K.S., Dowd, S.E., Suchodolski, J.S., Middelbos, I.S., Vester, B.M., Barry, K.A., Nelson, K.E., Torralba, M., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Cann, I.K., White, B.A., Fahey, G.C., Jr., (2011). Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *The ISME Journal* 5(4), 639-649.

Swanson, K.S., Grieshop, C.M., Flickinger, E.A., Bauer, L.L., Healy, H.P., Dawson, K.A., Merchen, N.R., Fahey, G.C., Jr., (2002). Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. *Journal of Nutrition* 132(5), 980-989.

Tabor, C.W., Rosenthal, S.M., (1956). Pharmacology of spermine and spermidine – some effects on animals and bacteria. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 116(2), 139-155.

Tabor, C.W., Tabor, H., (1985). Polyamines in microorganisms. *Microbiological Reviews* 49(1), 81-99.

Tal, M., Verbrugge, A., Gomez, D.E., Chau, C., Weese, J.S., (2017). The effect of storage at ambient temperature on the feline fecal microbiota. *BMC Veterinary Research* 13(1), 256.

Terada, A., Hara, H., Kato, S., Kimura, T., Fujimori, I., Hara, K., Maruyama, T., Mitsuoka, T., (1993). Effect of lactosucrose (4<sup>G</sup>-β-D-galactosylsucrose) on fecal flora and fecal putrefactive products of cats. *Journal of Veterinary Medical Science* 55(2), 291-295.

Teti, D., Visalli, M., McNair, H., (2002). Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. *Journal of Chromatography. B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 781(1-2), 107-149.

Thermo Scientific, (2010). NanoDrop 3300 Fluorospectrometer V2.8. User's Manual.

Thomé, H., (1999). Mundhöhle und Schlundkopf. In: Frewein, J., Gasse, H., Leiser, R., Roos, H., Thomé, H., Vollmerhaus, B., Waibl, H (Hrsg.) Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band II. Eingeweide. 8., vollständig neubearbeitete Auflage, Parey Buchverlag im Blackwell Wissenschafts-Verlag GmbH, Berlin, S. 19-102.

Topping, D.L., Clifton, P.M., (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews* 81(3), 1031-1064.

Tun, H.M., Brar, M.S., Khin, N., Jun, L., Hui, R.K., Dowd, S.E., Leung, F.C., (2012). Gene-centric metagenomics analysis of feline intestinal microbiome using 454 junior pyrosequencing. *Journal of Microbiological Methods* 88(3), 369-376.

Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley, R.E., Sogin, M.L., Jones, W.J., Roe, B.A., Affourtit, J.P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A.C., Knight, R., Gordon, J.I., (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457(7228), 480-484.

Turski, M.P., Turska, M., Paluszkiwicz, P., Parada-Turska, J., Oxenkrug, G.F., (2013). Kynurenic acid in the digestive system—new facts, new challenges. *International Journal of Tryptophan Research* 6, 47-55.

Untersteiner, H., (2005). Biostatistik – Datenauswertung mit SPSS und Excel für Naturwissenschaftler und Mediziner. *Facultas Universitätsverlag* Facultas Verlags- und Buchhandels AG, Wien.

Uzal, F.A., Freedman, J.C., Shrestha, A., Theoret, J.R., Garcia, J., Awad, M.M., Adams, V., Moore, R.J., Rood, J.I., McClane, B.A., (2014). Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. *Future Microbiology* 9(3), 361-377.

Valentin-Weigand, P., (2011). Teil II Allgemeine Bakteriologie: 3. Grundlagen. In: Selbitz, H.-J., Truyen, U., Valentin-Weigand, P. (Hrsg.): Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 9., vollständig überarbeitete Auflage Enke Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG, Stuttgart, S. 84-112.

van der Waaij, D., (1991). The microflora of the gut: recent findings and implications. *Digestive Diseases* 9(1), 36-48.

Varga, G., Érces, D., Fazekas, B., Fülöp, M., Kovács, T., Kaszaki, J., Fülöp, F., Vécsei, L., Boros, M., (2010). *N*-methyl-*D*-aspartate receptor antagonism decreases motility and inflammatory activation in the early phase of acute experimental colitis in the rat. *Neurogastroenterology and Motility* 22(2), 217-225.

Verbeke, K.A., Boobis, A.R., Chiodini, A., Edwards, C.A., Franck, A., Kleerebezem, M., Nauta, A., Raes, J., van Tol, E.A., Tuohy, K.M., (2015). Towards microbial fermentation metabolites as markers for health benefits of prebiotics. *Nutrition Research Reviews* 28(1), 42-66.

Vernia, P., Caprilli, R., Latella, G., Barbetti, F., Magliocca, F.M., Cittadini, M., (1988a). Fecal lactate and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 95(6), 1564-1568.

Vernia, P., Gnaedinger, A., Hauck, W., Breuer, R.I., (1988b). Organic anions and the diarrhea of inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences* 33(11), 1353-1358.

Vester, B.M., Beloshapka, A.N., Middelbos, I.S., Burke, S.L., Dikeman, C.L., Simmons, L.G., Swanson, K.S., (2010). Evaluation of nutrient digestibility and fecal characteristics of exotic felids fed horse- or beef-based diets: use of the domestic cat as a model for exotic felids. *Zoo Biology* 29(4), 432-448.

Vester, B.M., Dalsing, B.L., Middelbos, I.S., Apanavicius, C.J., Lubbs, D.C., Swanson, K.S., (2009). Faecal microbial populations of growing kittens fed high- or moderate-protein diets. *Archives of Animal Nutrition* 63(3), 254-265.

Vodde, H. (2014). Einfluss eines Hefezellwandproduktes auf die zootecnische Leistung sowie verdauungsphysiologische, mikrobiologische und immunologische Parameter bei Masthühnern. *Disseration. Freie Universität Berlin, Berlin, S. 47.*

Vollmerhaus, B., Roos, H., (1999). Speiseröhre, Magen, Darm und Darmanhangsdrüsen. In: Frewein, J., Gasse, H., Leiser, R., Roos, H., Thomé, H., Vollmerhaus, B., Waibl, H (Hrsg.) *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band II. Eingeweide. 8., vollständig neubearbeitete Auflage, Parey Buchverlag im Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, S. 103-213.*

Wallace, R.J., (1996). Ruminal microbial metabolism of peptides and amino acids. *Journal of Nutrition* 126(4 Suppl), 1326S-1334S.

Wang, L., Fang, M., Hu, Y., Yang, Y., Yang, M., Chen, Y., (2014). Characterization of the most abundant *Lactobacillus* species in chicken gastrointestinal tract and potential use as probiotics for genetic engineering. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 46(7), 612-619.

Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R., (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 73(16), 5261-5267.

Wang, X., Heazlewood, S.P., Krause, D.O., Florin, T.H., (2003). Molecular characterization of the microbial species that colonize human ileal and colonic mucosa by using 16S rDNA sequence analysis. *Journal of Applied Microbiology* 95(3), 508-520.

Ward, M.P., Alinovi, C.A., Couëttil, L.L., Wu, C.C., (2005). Evaluation of a PCR to detect *Salmonella* in fecal samples of horses admitted to a veterinary teaching hospital. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 17(2), 118-123.

Warren, J.R., Marshall, B.J., (1983). Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *The Lancet* 321(8336), 1273-1275.

Watanabe, Y., Nagai, F., Morotomi, M., (2012). Characterization of *Phascolarctobacterium succinatutens* sp. nov., an asaccharolytic, succinate-utilizing bacterium isolated from human feces. *Applied and Environmental Microbiology* 78(2), 511-518.

Weber, A., Kroth, P., Heil, G., (1989). Untersuchungen zum Vorkommen von *Clostridium difficile* in Kotproben von Hunden und Katzen. *Journal of Veterinary Medicine. Series B* 36(8), 568-576.

Weese, J.S., (2011). Bacterial enteritis in dogs and cats: diagnosis, therapy, and zoonotic potential. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 41(2), 287-309.

Weese, J.S., Weese, H.E., Bourdeau, T.L., Staempfli, H.R., (2001). Suspected *Clostridium difficile*-associated diarrhea in two cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 218(9), 1436-1439.

Wieler, L.H., Ewers, C., (2011). 9.2.3 Gattung *Escherichia*. In: Selbitz, H.-J., Truyen, U., Valentin-Weigand, P. (Hrsg.): Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 9., vollständig überarbeitete Auflage, Enke Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG, Stuttgart, S. 187-197.

Wikoff, W.R., Anfora, A.T., Liu, J., Schultz, P.G., Lesley, S.A., Peters, E.C., Siuzdak, G., (2009). Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(10), 3698-3703.

Williams, B.A., Bosch, M.W., Awati, A., Konstantinov, S.R., Smidt, H., Akkermans, A.D.L., Verstegen, M.W.A., Tamminga, S., (2005). *In vitro* assessment of gastrointestinal tract (GIT) fermentation in pigs: fermentable substrates and microbial activity. *Animal Research* 54(3), 191-201.

Wilson, I.G., (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 63(10), 3741-3751.

Wolffram, S., (2015a). Funktionen des einhöhligen Magens. In: von Engelhardt, W., Breves, G., Diener, M., Gäbel, G. (Hrsg.): *Physiologie der Haustiere*. 5., vollständig überarbeitete Auflage. Enke Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG, Stuttgart, S. 404-410.

Wolffram, S., (2015b). Funktionen des Dünndarms und seiner Anhangsdrüsen. In: von Engelhardt, W., Breves, G., Diener, M., Gäbel, G. (Hrsg.): *Physiologie der Haustiere*. 5., vollständig überarbeitete Auflage. Enke Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG, Stuttgart, S. 410-434.

Wotherspoon, A.C., Ortiz-Hidalgo, C., Falzon, M.R., Isaacson, P.G., (1991). *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *The Lancet* 338(8776), 1175-1176.

Wrong, O.M., Vince, A.J., Waterlow, J.C., (1985). The contribution of endogenous urea to faecal ammonia in man, determined by <sup>15</sup>N labelling of plasma urea. *Clinical Science* 68(2), 193-199.

Wu, G.D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.Y., Keilbaugh, S.A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W.A., Knight, R., Sinha, R., Gilroy, E., Gupta, K., Baldassano, R., Nessel, L., Li, H., Bushman, F.D., Lewis, J.D., (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 334(6052), 105-108.

Xenoulis, P.G., Palculict, B., Allenspach, K., Steiner, J.M., Van House, A.M., Suchodolski, J.S., (2008). Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. *FEMS Microbiology Ecology* 66(3), 579-589.

Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F.O., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B., Euzéby, J., Amann, R., Rosselló-Móra, R., (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology* 12(9), 635-645.

Zaghini, G., Biagi, G., (2005). Nutritional peculiarities and diet palatability in the cat. *Veterinary Research Communications* 29 (Suppl 2), 39-44.

Zentek, J., (1995a). Influence of diet composition on the microbial activity in the gastrointestinal tract of dogs. 1. Effects of varying protein intake on the composition of the ileum chyme and the feces. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 74(1-2), 43-52.

Zentek, J., (1995b). Influence of diet composition on the microbial activity in the gastrointestinal tract of dogs. 2. Effects on the microflora in the ileum chyme. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 74(1-2), 53-61.

Zentek, J., (2016). Allgemeine Bedingungen im Lumen des Verdauungstraktes. In: Zentek, J. (Hrsg.): Ernährung des Hundes – Grundlagen – Fütterung – Diätetik. 8., aktualisierte Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, S. 31-34.

Zentek, J., Fricke, S., Hewicker-Trautwein, M., Ehinger, B., Amtsberg, G., Baums, C., (2004). Dietary protein source and manufacturing processes affect macronutrient digestibility, fecal consistency, and presence of fecal *Clostridium perfringens* in adult dogs. *Journal of Nutrition* 134(8 Suppl), 2158S-2161S.

Zentek, J., Marquart, B., Pietrzak, T., Ballèvre, O., Rochat, F., (2003). Dietary effects on bifidobacteria and *Clostridium perfringens* in the canine intestinal tract. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 87(11-12), 397-407.

Zhang, Y.J., Li, S., Gan, R.Y., Zhou, T., Xu, D.P., Li, H.B., (2015). Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 16(4), 7493-7519.

Zhao, J., (2013). Plasma kynurenic acid/tryptophan ratio: a sensitive and reliable biomarker for the assessment of renal function. *Renal Failure* 35(5), 648-653.

## 9 Anhang

### A 1 Weender Analyse

Tabelle A 1: Übersicht der Geräte und Chemikalien für die Weender Analyse

Bezeichnung	Hersteller	Stadt, (Staat,) Land
Gefriertrocknungsanlage, Alpha 1-4 LSC	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH	Osterode am Harz, Deutschland
Grindomix GM 200 (für Futtermittelproben)	Retsch GmbH	Haan, DE
Ultra-Zentrifugalmühle ZM 200 (für Kotproben)	Retsch GmbH	Haan, DE
Analysewaage Typ Genius	Sartorius AG	Göttingen, DE
Heraeus® Trockenschrank T5042	Heraeus Holding GmbH	Hanau, DE
Exsikkator: Duran®, DN 300, Exsikkator-Deckel; mit Tubus NS 24/29 Novus	Duran Group GmbH	Wertheim/Main, DE
Muffelofen: Heraeus® M 110	Heraeus Holding GmbH	Hanau, DE
Makro-Elementaranalysator vario max CN	Elementar Analysesysteme GmbH	Hanau, DE
XT4 Filter Bags	ANKOM Technology	Macedon, (New York,) USA
Petroleumbenzin (reinst)	Merck KGaA	Darmstadt, DE
Extraktionssystem B-811	BÜCHI Labortechnik GmbH	Essen, DE
Lackrockenschrank LUT 6050 F	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, (Massachusetts,) USA
ANKOM 2000 Fiber Analyzer	ANKOM Technology	Macedon, (New York,) USA
F57 Filter Bags	ANKOM Technology	Macedon, (New York,) USA
Schwefelsäure (1,25 %)	J.T. Baker	Griesheim, DE
Natriumhydroxid (1,25 %)	Carl ROTH GmbH und Co. KG	Karlsruhe, DE
Salzsäure (36-38 %)	J.T. Baker	Griesheim, DE
Sandbad	Harry Gestigkeit GmbH	Düsseldorf, DE
Faltenfilter (Whatman 595 ½, 125 mm)	GE Healthcare	Little Chalfont, UK
Atomabsorptionsspektrophotometer vario 6	Analytik Jena AG	Jena, DE
Salpetersäure (65 %)	Merck KGaA	Darmstadt, DE
Ammoniumvanadat	Merck KGaA	Darmstadt, D DE eutschland
Photometer Ultrospec 2100 pro	Amersham Pharmacia Biotech Inc.	Piscataway, (New Jersey,) USA

## A 2 Bestimmung der Mineralstoffgehalte

Tabelle A 2: Übersicht der Geräte und Chemikalien für die Mineralstoffbestimmung

Bezeichnung	Hersteller	Stadt, (Staat,) Land
Salzsäure (36-38 %)	J.T. Baker	Griesheim, DE
Sandbad	Harry Gestigkeit GmbH	Düsseldorf, DE
Faltenfilter (Whatman 595 1/2, 125 mm)	GE Healthcare	Little Chalfont, UK
Atomabsorptionsspektrometer vario 6	Analytik Jena AG	Jena, DE
Salpetersäure (65 %)	Merck KGaA	Darmstadt, DE
Ammoniumvanadat	Merck KGaA	Darmstadt, DE
Photometer Ultrospec 2100 pro	Amersham Pharmacia Biotech Inc.	Piscataway, (New Jersey), USA
Wasseraufbereitungssystem: Milli-Q® Advantage A10®	Merck Millipore in Merck KGaA	Darmstadt, DE

## A 3 Messung der Ammoniumkonzentration

Tabelle A 3: Geräte zur Bestimmung der Ammoniumkonzentration

Bezeichnung	Hersteller	Stadt, (Staat,) Land
Heraeus Fresco 17 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Inc	Waltham, (Massachusetts,) USA
Tecan	Tecan Group Ltd.	Männedorf, CH
Mikrotiterplattenlesegerät, Infinite M200 Pro	Tecan Group Ltd.	Männedorf, CH
i-control™ Microplate Reader Software 1.7	Tecan Group Ltd.	Männedorf, CH
Mikrotiterplatte (96 well, PS-Microplatte, F-Boden, transparent)	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, AT
Reinstwassersystem: Genpure mit Dispenser	TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH (in Thermo Fisher Scientific Inc.)	Niederelbert, DE
Salzsäure (HCL, 1 M)	Carl ROTH GmbH und Co. KG	Karlsruhe, DE

### Chemikalien zur Ammoniumbestimmung

#### 100 mM MOPS, pH 7,0:

Für die Herstellung der 100 mM MOPS-Lösung wurden 2,0928 g MOPS (MOPS PUFFERAN® 3-N-Morpholinopropansulfonsäure, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) in 100 ml Reinstwasser gelöst und der pH bei + 4 °C auf 7,0 eingestellt.

#### 1000 µM Ammoniumchloridlösung:

Zur Erstellung einer Standardreihe mit bekannten Ammoniumkonzentrationen wurden 0,0535g reines Ammoniumchlorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) in 10 ml der zuvor hergestellten 100 mM MOPS-Lösung gelöst, sodass zunächst eine 100 mM Ammoniumchloridlösung hergestellt wurde. Anschließend wurde diese Lösung zweimal 1:10 verdünnt, um eine 1000 µM Ammoniumchloridlösung zu erhalten.

Phenolnitroprussid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA)

#### 0,2 % ige Natriumhypochloridlösung:

Zur Herstellung einer 0,2 % igen Natriumhypochloridlösung wurde 1 ml 12 % iges Natriumhypochlorid (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe) in 59 ml 1 M Natriumhydroxid (≥ 99 %; Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe) gegeben.

**A 4 Bestimmung biogener Amine**

Tabelle A 4: Geräte und Reagenzien zur Bestimmung biogener Amine

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Stadt, (Staat,) Land</b>
Biochrom 20Plus (Aminosäureanalytator)	Laborservice Onken GmbH	Gründau, DE
Polyamin-Ionenaustauschersäule	Laborservice Onken GmbH	Gründau, DE
Schüttler VV 3	VV 3, VWR International GmbH	Darmstadt, DE
Centrifuge 5415 C	Eppendorf AG	Hamburg, DE
25 mm Cellulose-Acetat-Spritzenvorsatzfilter (0,45 µm)	VV 3, VWR International GmbH	Darmstadt, DE
Ninhydrin	Laborservice Onken GmbH,	Gründau, DE

## A 5 Geräte und Reagenzien zur Analyse kurzkettiger Fettsäuren

Tabelle A 5: Geräte zur Analyse kurzkettiger Fettsäuren

Bezeichnung	Hersteller	Stadt, (Staat), Land
Rüttler VV 3	VWR International GmbH	Darmstadt, DE
Centrifuge 5415 C	Eppendorf AG	Hamburg, DE
Screw cap vials	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara, (Kalifornien,) USA
Gaschromatograph GC 6890N	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara, (Kalifornien,) USA
19095N-123 HP- Säule INNOWAX, Polyethylen Glycol	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara, (Kalifornien,) USA
Gasgenerator: Parker ChromGas 9150	Parker Hannifin Corp.	Cleveland, (Ohio,) USA
Injektionsspritze	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara, (Kalifornien,) USA
HP ChemStation Software	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara, (Kalifornien,) USA
Wasseraufbereitungssystem: Milli-Q® Advantage A10®	Merck Millipore in Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Hexansäure	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, (Missouri,) USA
Oxalsäure-Dihydrat	Carl ROTH GmbH und Co. KG	Karlsruhe, DE

### Verwendete Reagenzien zur Bestimmung der Konzentration kurzkettiger Fettsäuren

#### Standardlösung (0,5 mM) zur Kalibrierung:

SUPELCO 4-6975 „Volatile Acids Standard Mix“ (10 mM)	50 µl
Oxalsäure-Dihydrat	10 mg
Reinstwasser	950 µl

#### Stammlösung (10 mM) für Proben:

Hexansäure	250 µl
Oxalsäure-Dihydrat	2 g
Reinstwasser	ad 200 ml

Verdünnungslösung (0,5 mM) für Proben:

Stammlösung (10 mM)	50 ml
Oxalsäure-Dihydrat	10 g
Reinstwasser	ad 1000 ml

**A 6 Geräte und Chemikalien zur Bestimmung der Konzentrationen von D- und L-Laktat**

Tabelle A 6: Geräte und Reagenzien zur Analyse von D- und L-Laktat

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Stadt, (Staat,) Land</b>
Heraeus Fresco 21 Microcentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, (Massachusetts,) USA
Cellulose-Acetat-Spritzenvorsatzfilter (0,45 µm)	VWR International GmbH	Darmstadt, DE
Probengefäße: Screw cap vials	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara, (Kalifornien,) USA
HPLC Agilent 1100	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara, (Kalifornien,) USA
Phenomenex C18 4.0 (L mm x 2,0 ID mm)	Phenomenex Inc.	Torrance, (Kalifornien,) USA
Phenomenex Chirex 3126 (D)-penicillamine (150 × 4,6 mm)	Phenomenex Inc.	Torrance, (Kalifornien,) USA
Chromeleon® Software Version 6.80	Dionex Corporation (in Thermo Fisher Scientific, Inc.)	Sunnyval, (Kalifornien,) USA
Kupfer-II-Sulfat (wasserfrei)	Merck KGaA	Darmstadt, DE
Zinkchlorid Technipur	Merck KGaA	Darmstadt, DE
Wasseraufbereitungssystem: Milli-Q® Advantage A10®	Merck Millipore in Merck KGaA	Darmstadt, DE

## Reagenzien zur Bestimmung des Laktatgehaltes

Kupfer-II-Sulfat-Lösung (2,5 mM):

Kupfer-II-Sulfat	399,02 mg
2 Propanol	50 ml

-

Reinstwasser ad 1000 ml

Kupfer-II-Sulfat-Lösung (0,5 mM):

Kupfer-II-Sulfat 79,80 mg

Aqua bidest. ad 1000 ml

Carrez I:

Zinkchlorid 17 mg

Reinstwasser 100 ml

Carrez II:

Kaliumhexacyanoferrat (II) 15 mg

Reinstwasser 100 ml

**A 7 Geräte und Reagenzien zur Extraktion bakterieller DNA aus Kotproben**

Tabelle A 7: Geräte und Kits zur Extraktion bakterieller DNA aus Kotproben

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Stadt, (Staat,) Land</b>
Analysewaage Sartorius BP 110S	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
MP FastPrep 24™ 5G	MP Biomedicals	Santa Ana, (Kalifornien,) USA
FastPrep24 Lysing Matrix E-Röhrchen	MP Biomedicals	Santa Ana, (Kalifornien,) USA
AccuBlock™ Digital Dry Bath	Labnet International, Inc.	Edison, (New York,) USA
PV-1 Vortex Mixer	Grant Instruments Ltd.	Cambridge, UK
eppendorf® Centrifuge 5430	Eppendorf AG	Hamburg, DE
QIAamp® DNA Stool Mini Kit	QIAGEN GmbH	Hilden, DE
Eppendorf Safe Lock Tubes (1,5 und 2 ml)	Eppendorf AG	Hamburg, DE

## A 8 Bestimmung des Gesamtgehalts an DNA in den Proben

Tabelle A 8: Geräte zur DNA-Konzentrationsbestimmung

Bezeichnung	Hersteller	Stadt, (Staat,) Land
NanoDrop™ 3300 Fluorospektrometer	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, (Massachusetts,) USA
PV-1 Vortex Mixer	Grant Instruments Ltd.	Cambridge, UK
Reinstwassersystem: Genpure mit Dispenser	TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH (in Thermo Fisher Scientific Inc.)	Niederelbert, DE
Wasser (BioScience-Grade, Nuklease-frei und autoklaviert, DEPC-behandelt)	Carl ROTH GmbH und Co. KG	Karlsruhe, DE
Kalibrierreihe: Kalbsthymus- DNA (Type XV)	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, (Missouri,) USA
Natriumchlorid	Carl ROTH GmbH und Co. KG	Karlsruhe, DE
Trishydroxymethyl- aminomethan (Tris)	Carl ROTH GmbH und Co. KG	Karlsruhe, DE
EDTA	Carl ROTH GmbH und Co. KG	Karlsruhe, DE
Eppendorf Safe Lock Tubes (1,5 und 2 ml)	Eppendorf AG	Hamburg, DE
Rotilabo®-Reaktionsgefäße schwarz (1,5 ml)	Carl ROTH GmbH und Co. KG	Karlsruhe, DE
Hoechst Dye 33258	Sigma-Aldrich Co	St. Louis, (Missouri,) USA

### TNE-Puffer (10 ×):

Reinstwasser	70 ml
NaCl (5 M)	70 ml
Tris-Puffer (1 M)	20 ml
EDTA (0,2 M)	10 ml

Der pH-Wert wurde mit Salzsäure (HCl; 1M) auf 7,4 HCl eingestellt und die Lösung mit Nuklease-freiem Wasser auf 200 ml aufgefüllt.

TNE-Puffer (1 ×):

TNE (10 ×)	5 ml
Nuklease-freies Wasser	45 ml
Danach Sterilfiltration	

Stammlösung (10 mg/ml):

Hoechst Dye 33258 Farbstoffs	25 mg
Nuklease-freies Wasser	2,5 ml

Verdünnte Stammlösung (100 µg/ml):

Stammlösung (10 mg/ml)	5 µl
TNE (1 ×)	495 µl

Arbeitslösung (200 ng/ml):

Schritt 1

Verdünnte Stammlösung (100 µg/ml)	2 µl
TNE (1 ×)	98 µl

Schritt 2

TNE (1 ×)	ad 1000 µl
-----------	------------

Alle Lösungen wurden in schwarzen Reaktionsgefäßen hergestellt, sodass die Lösungen vor Licht geschützt waren.

## A 9 Test-qPCR auf Inhibitoren

Für die Test-qPCR wurden die Reaktionsansätze zu je 25 µl pipettiert.

25 µl Ansatz bestehend aus:

12,5 µl	Master Mix	(Gesamtvolumen / 2)
1 µl	Primer 1 (10 µM):	(Gesamtvolumen / 25 = 0,4 µM)
1 µl	Primer 2 (10 µM):	(Gesamtvolumen / 25 = 0,4 µM)
9,5 µl	Nuklease-freies Wasser	(Gesamtvolumen – [Summe aller Komponenten])
1 µl	der jeweiligen Probe	

## Anhang

Tabelle A 9: Geräte und Produkte für Test-qPCR

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Stadt, (Staat,) Land</b>
Brilliant II SYBR <sup>®</sup> Green Low ROX QPCR Master Mix	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara, (Kalifornien,) USA
Primer	Eurofins Genomics	Ebersberg, DE
PCR-Produkte	Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin	Berlin, DE
Wasser (BioScience-Grade, Nuklease-frei und autoklaviert, DEPC-behandelt)	Carl ROTH GmbH und Co. KG	Karlsruhe, DE
PV-1 Vortex Mixer	Grant Instruments Ltd.	Cambridge, UK
Optical tube strips (8x Strip)	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara, (Kalifornien,) USA
Optical caps strips (8x Strip)	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara, (Kalifornien,) USA
Stratagene Mx3000Pro Thermocycler	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara, (Kalifornien,) USA
MxPro QPCR Software	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara, (Kalifornien,) USA
Eppendorf Safe Lock Tubes (1,5 und 2 ml)	Eppendorf AG	Hamburg, DE

Tabelle A 10: Verwendete Primer für die Test-qPCR

Bakterien- gruppe	Primer	Sequenz	Länge (Bp)	Temperatur (°C)	Quelle
C. <i>coccoides</i> - Cluster XIVa	g-Ccoc- F g-Ccoc- R	5'-AAA TGA CGG TAC CTG ACT AA-3' 5'-CTT TGA GTT TCA TTC TTG CGA A-3'	455	60	Matsuki et al. (2004)

Tabelle A 11: Temperaturprogramm der Test-PCR

Phase	Dauer	Temperatur (°C)	Anzahl der Zyklen
Initialisierung	15 Min.	95	1
Denaturierung	15–30 s	95	40
Anlagerung	30–60 s	48–63	
Elongation	30–60 s	72	
Schmelzkurve	60 s	25	1

## A 10 Quantitative Real-Time PCR

Die Berechnung der PCR-Reaktionsansätze erfolgte mit folgender Formel:

### 25 µl Ansatz bestehend aus:

12,5 µl	Master Mix	(Gesamtvolumen / 2)
1 µl	Primer 1 (10 µM):	(Gesamtvolumen / 50 = 0,2 µM)
1 µl	Primer 2 (10 µM):	(Gesamtvolumen / 50 = 0,2 µM)
9,5 µl	Nuklease-freies Wasser	(Gesamtvolumen – [Summe aller Komponenten])
1 µl	der jeweiligen Probe	

Für die Herstellung der Real-Time PCR-Reaktionslösung für die Vertreter des *C. leptum*-Clusters IV und für die *Enterobacteriaceae* wurde folgende Formel verwendet:

### 25 µl Ansatz bestehend aus:

12,5 µl	Master Mix	(Gesamtvolumen / 2)
1,5 µl	Primer 1 (10 µM):	(Gesamtvolumen / 16,67 = 0,6 µM)
1,5 µl	Primer 2 (10 µM):	(Gesamtvolumen / 16,67 = 0,6 µM)
8,5 µl	Nuklease-freies Wasser	(Gesamtvolumen – [Summe aller Komponenten])
1 µl	der jeweiligen Probe	(1:10 Verdünnung)

## Anhang

Tabelle A 12: Verwendete Geräte und Produkte für die qPCR

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Stadt, Staat, Land</b>
Brilliant II SYBR® Green Low ROX QPCR Master Mix	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara, (Kalifornien,) USA
Primer	Eurofins Genomics	Ebersberg, DE
PCR-Produkte	Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin	Berlin, DE
Wasser (BioScience-Grade, Nuklease-frei und autoklaviert, DEPC-behandelt)	Carl ROTH GmbH und Co. KG	Karlsruhe, DE
PV-1 Vortex Mixer	Grant Instruments Ltd.	Cambridge, UK
Stratagene Mx3000Pro Thermocycler	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara, (Kalifornien,) USA
MxPro QPCR Software	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara, (Kalifornien,) USA
Optical tube strips (8x Strip)	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara, (Kalifornien,) USA
Optical caps strips (8x Strip)	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara, (Kalifornien,) USA
Eppendorf Safe Lock Tubes (1,5 und 2 ml)	Eppendorf AG	Hamburg, DE

Anhang

Tabelle A 13: In dieser Arbeit verwendete Primer für die verschiedenen qPCRs

<b>Bakteriengruppe/ -spezies</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Länge (Bp)</b>	<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Quelle</b>
<i>Bacteroides/ Prevotella/ Porphyromonas</i>	BPP1	5'-GGT GTC GGC TTA AGT GCC AT-3'	147	55	Rinttilä et al. (2004)
	BPP2	5'-CGG AYG TAA GGG CCG TGC-3'			
<i>Bifidobacterium</i> spp.	g-BIFID-F	5'-TCG CGT CYG GTG TGA AAG-3'	251	58	Rinttilä et al. (2004)
	g-BIFID-R	5'-CCA CAT CCA GCR TCC AC-3'			
Clostridien-Cluster I	CI-F1	5'-TAC CHR AGG AGG AAG CCA C-3'	239	63	Song et al. (2004)
	CI-R2	5'-GTT CTT CCT AAT CTC TAC GCA T-3'			
<i>Clostridium leptum</i> - Cluster IV	sg-Clept-F	5'-GCA CAA GCA GTG GAG T-3'	253	60	Matsuki et al. (2004)
	sg-Clept-R	5'-CTT CCT CCG TTT TGT CAA-3'			
<i>Clostridium coccoides</i> -Cluster XIVa	g-Ccoc-F	5'-AAA TGA CGG TAC CTG ACT AA-3'	455	60	Matsuki et al. (2002)
	g-Ccoc-R	5'-CTT TGA GTT TCA TTC TTG CGA A-3'			
<i>E. coli/Hafnia/ Shigella</i>	Entero-F	5'-GTT AAT ACC TTT GCT CAT TGA-3'	354	55	Malinen et al. (2003)
	Entero-R	5'-ACC AGG GTA TCT AAT CCT GTT-3'			
<i>Enterobacteriaceae</i>	EntqPCR3417f	5'-GTB TCD CCR CGC AGR C-3'	454	55	Im Institut für Tierernährung entwickelt
	EntqPCR3852r	5'-TGC GYC TGG TRA TCT A-3'			

## Anhang

Fortsetzung Tabelle A 13: In dieser Arbeit verwendete Primer für die verschiedenen qPCRs

<b>Bakteriengruppe/ -spezies</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Länge (Bp)</b>	<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Quelle</b>
<i>Lactobacillus</i> spp.	Lac1	5'-AGC AGT AGG GAA TCT TCC A-3'	351	58	Rinttilä et al. (2004)
	Lac2	5'-CAC CGC TAC ACA TGG AG-3'			
<i>Clostridium difficile</i>	Cdiff-16S-1f	5'-TTG AGC GAT TTA CTT CGG TAA AGA-3'	174	58	Im Institut für Tierernährung entwickelt
	Cdiff-16S-1r	5'-CCA TCC TGT ACT GGC TCA CCT-3'			
<i>Clostridium perfringens</i>	Cpa1a	5'-AGG CGC TTA TTT GTG CTA CG-3'	90	48	Im Institut für Tierernährung entwickelt
	Cpa1b	5'-TCA ATC TTT CCA TCC CAA GC-3'			
<i>Salmonella</i> spp.	QVR133	5'-GAA GCA GCG CCT GTA AAA TC-3'	20	60	Im Institut für Tierernährung entwickelt
	QVR134	5'-TGG CTG TGG TGC AAA ATA TC-3'			

Tabelle A 14: Temperaturprogramm der Real-Time PCR

Phase	Dauer	Temperatur (°C)	Anzahl der Zyklen
Initialisierung	15 Min.	95	1
Denaturierung	15–30 s	95	
Anlagerung	30–60 s	48–63	40
Elongation	30–60 s	72	
Schmelzkurve	60 s	25	1

## A 11 DNA-Aufbereitung

Tabelle A 15: Produkte und Geräte zur DNA-Aufbereitung

Bezeichnung	Hersteller	Stadt, (Staat,) Land
MOBIO® PowerSoil DNA Isolation Kit	MO BIO Laboratories Inc.	Carlsbad, (Kalifornien,) USA
PV-1 Vortex Mixer	Grant Instruments Ltd.	Cambridge, UK
eppendorf® Centrifuge 5430	Eppendorf AG	Hamburg, DE
Eppendorf Safe Lock Tubes (1,5 und 2 ml)	Eppendorf AG	Hamburg, DE

## A 12 MPCR und Agarose-Gelelektrophorese

Tabelle A 16: Geräte und Reagenzien für Multiplex PCR und Agarose-Gelelektrophorese

Bezeichnung	Hersteller	Stadt,(Staat,) Land
PCR-Cycler T1 Thermocycler	Biometra GmbH	Göttingen, DE
Qiagen® Multiplex PCR Kit	QIAGEN GmbH	Hilden, DE
Primer	Eurofins Genomics	Ebersberg, DE
Wasser (BioScience-Grade, Nuklease-frei und autoklaviert, DEPC-behandelt)	Carl ROTH GmbH und Co. KG	Karlsruhe, DE
<i>E. coli</i> Positivkontrollstämme (Stammsammlung; K2-4, K6)	Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin	Berlin, DE
<i>E. coli</i> IMT 203/7 (K5)	Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität Berlin	Berlin, DE
<i>E. coli</i> DSM 2840 (K1)	DSMZ GmbH	Braunschweig, DE
Agarose GTQ	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, DE
SYBR® Green I Nucleic Acid Stain	Lonza Group AG	Basel, CH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Co.	St. Louis, (Missouri,) USA
Roti®-Load DNA-tricolor (with glycerol)	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, DE
DNA-Marker: 100 Bp-Leiter „equalized“	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, DE
Agarose-Gelelektrophorese: Agagel Maxi	Biometra GmbH	Göttingen, DE
CCD-Kamera SensiCam QE 12 bit	PCO Computer Optics	Kehlheim, DE
PCR Single Cap 8er-SoftStrips (0,2 ml, farblos)	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, DE
Eppendorf Safe Lock Tubes (1,5 und 2 ml)	Eppendorf AG	Hamburg, DE
EDTA	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, DE
Eisessig	Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, DE
Reinstwassersystem: Genpure mit Dispenser	TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH (in Thermo Fisher Scientific Inc.)	Niederelbert, DE

## Anhang

---

### TAE-Puffer (50 ×):

TRIS	242 g
Reinstwasser	600 ml
Eisessig	57,1 ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	100 ml
Reinstwasser	ad 1000 ml

### TAE-Puffer (1 ×):

TAE-Puffer (50 ×)	50 ml
Reinstwasser	ad 2500 ml

### Agarosegel:

Agarose	6,25 g
TAE (1 ×)	250 ml

### Multiplex-PCR Reaktionsansätze (30 µl je Ansatz) :

Qiagen® Multiplex PCR Master Mix	15 µl
Nuklease-freies Wasser	8 µl
Primermix 1 (10 µM)	3 µl
Primermix 2 (10 µM)	3 µl
DNA-Extrakt	1 µl

### Reaktionsansätze für die Agarose-Gelelektrophorese:

#### Gelladepuffer (1 ×):

Roti®-Load DNA-tricolor (6 ×)	67 µl
Nuklease-freies Wasser	335 µl

#### DNA-Leiter (0,05 µg/µl):

DNA-Marker (100 Bp-Leiter „equalized“)	20 µg
Gelladepuffer (1×)	402 µl

## Anhang

### Probenansätze (31 µl je Ansatz):

SYBR® Green (1:100 Verdünnung mit Dimethylsulfoxid)	1 µl
Gelladepuffer (Roti®-Load DNA-tricolor)	5 µl
PCR-Produkt der MPCR	25 µl

### Kontrollstammansätze (12 µl je Ansatz):

Nuklease-freies Wasser	6 µl
PCR-Produkt der MPCR	3 µl
Gelladepuffer (Roti®-Load DNA-tricolor)	2 µl
SYBR® Green (1:100 Verdünnung mit Dimethylsulfoxid)	1 µl

### DNA-Leiter-Ansatz (9 µl je Ansatz):

DNA-Leiter (0,5µg/µl)	8 µl
SYBR® Green (1:100 Verdünnung mit Dimethylsulfoxid)	1 µl

Tabelle A 17: Verwendete Primersequenzen für Pathogenitätsfaktoren von *E. coli* nach Bosworth und Casey (1997)

Pathogenitätsfaktor– Gen	Primer	Primersequenz	Länge des Produkts (Bp)
hitzelabiles Enterotoxin A – <i>elt-IA</i> (LT)	LT1	5'-GGC GTT ACT ATC CTC TCT AT- 3'	272
	LT2	5'-TGG TCT CGG TCA GAT ATG T- 3'	
hitzestabiles Enterotoxin I – <i>est-Ib</i> (StaP)	STaP1	5'-CAA CTG AAT CAC TTG ACT CTT- 3'	158
	StaP2	5'-TTA ATA ACA TCC AGC ACA GG- 3'	
hitzestabiles Enterotoxin II – <i>est-II</i> (Stb)	Stb1	5'-TGC CTA TGC ATC TAC ACA AT- 3'	113
	Stb2	5'-CTC CAG CAG TAC CAT CTC TA- 3'	
Fimbrien – <i>faeG</i> (K88, F4)	K881	5'-GTT GGT ACA GGT CTT AAT GG- 3'	499
	K882	5'-GAA TCT GTC CGA GAA TAT CA- 3'	
Fimbrien Fan A und B – <i>fan</i> (K99, F5)	K991	5'-AAT ACT TGT TCA GGG AGA AA- 3'	230
	K992	5'-AAC TTT GTG GTT AAC TTC CT- 3'	
Fimbrien (Fas - G Protein) – <i>fasA</i> (987P, F6)	987P1	5'-GTA ACT CCA CCG TTT GTA TC- 3'	409
	987P2	5'-AAG TTA CTG CCA GTC TAT GC- 3'	
Fimbrien F107 – <i>fedA</i> (F18)	F18-1	5'-TGG TAA CGT ATC AGC AAC TA- 3'	313
	F18-2	5'-ACT TAC AGT GCT ATT CGA CG- 3'	
Adhesin – <i>fimf41a</i> (F41)	F411	5'-AGT ATC TGG TTC AGT GAT GG- 3'	612
	F412	5'-CCA CTA TAA GAG GTT GAA GC- 3'	

## Anhang

Tabelle A 18: Kontrollstämme (Negativ- und Positivkontrollen) für die MPCR und Gelelektrophorese mit bereits bekannten Pathogenitätsgenen

<b>Positiv- bzw. Negativkontrolle</b>	<b><i>E. coli</i>-Stamm</b>	<b>Anzahl der Banden im Gel</b>	<b>Pathogenitätsgen</b>
K1	<i>E. coli</i> DSM 2840 (Negativkontrolle)	-	-
K2	<i>E. coli</i> O9:K35:K99 (PS37)	3	<i>fan, est-lb, Fimf41a</i>
K3	<i>E. coli</i> O147:K89:K88 (PS79)	3	<i>fae G, elt-la, est-II</i>
K4	<i>E. coli</i> CS2011 (PS90)	2	<i>fas A, est-lb</i>
K5	<i>E. coli</i> Abbotstown (IMT203/7)	5	<i>est-II, elt-la, est-lb, fas A, fae G</i>
K6	<i>E. coli</i> 9910297-2STM (O138:F18)	3	<i>est-II, Fed A</i>

Tabelle A 19: Temperaturprogramm für „touch-down“ MPCR

<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Zeit (s)</b>	<b>Zyklen</b>
95	900	1
94	30	10
60	90	
(-0,5 je Zyklus)		
72	30	
94	30	30
55	90	
72	90	
72	600	1
4	hold	1

## A 13 Generierung von PCR-Produkten für das Next Generation Sequencing mittels Illumina®

Tabelle A 20: Geräte und Produkte für die Illumina®-Sequenzierung

Bezeichnung	Hersteller	Stadt,( Staat,) Land
Primersequenzen	LGC Genomics GmbH	Berlin, DE
Primersynthese	Eurofins Genomics	Ebersberg, DE
Brilliant II SYBR® Green Low ROX QPCR Master Mix	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara, (Kalifornien,) USA
PV-1 Vortex Mixer	Grant Instruments Ltd.	Cambridge, UK
Wasser (BioScience-Grade, Nuklease-frei und autoklaviert, DEPC-behandelt)	Carl ROTH GmbH und Co. KG	Karlsruhe, DE
Masterclear Cap Strips und <i>real-time</i> -PCR Tube Strips	Eppendorf AG	Hamburg, DE
Stratagene Mx3000Pro Thermocycler	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara, (Kalifornien,) USA
MxPro QPCR Software	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara, (Kalifornien,) USA
KAPA HiFi HotStart Ready Mix PCR Kit	Kapa Biosystems, Inc.	Wilmington, (Massachusetts,) USA
Optical tube strips (8x Strip)	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara, (Kalifornien,) USA
Optical caps strips (8x Strip)	Agilent Technologies Inc.	Santa Clara, (Kalifornien,) USA
BioAnalyzer	Agilent Technologies Inc,	Santa Clara, (Kalifornien,) USA
Eppendorf Safe Lock Tubes (1,5 und 2 ml)	Eppendorf AG	Hamburg, DE

## Anhang

Tabelle A 21: Primersequenzen der Firma LGC Genomics GmbH für die Markierung der verschiedenen Proben

<b>Primerpaar</b>	<b>Oligoname</b>	<b>Sequenz</b>
Primerpaar 1	341F_01	5'- ACAACCAGTTCCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_01	5'- ACAACCAGTTGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'
Primerpaar 2	341F_02	5'- NAACAGACCTTCCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_02	5'- NAACAGACCTTGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'
Primerpaar 3	341F_03	5'- NNACAAGGTCTTCCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_03	5'- NNACAAGGTCTTGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'
Primerpaar 4	341F_04	5'- NNNAAGTCTTCGTCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_04	5'- NNNAAGTCTTCGTGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'
Primerpaar 5	341F_05	5'- ACATGAGGTTCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_05	5'- ACATGAGGTTGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'
Primerpaar 6	341F_06	5'- NAAGCTCACTTCCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_06	5'- NAAGCTCACTTGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'
Primerpaar 7	341F_07	5'- NNACGATACGTTCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_07	5'- NNACGATACGTTGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'
Primerpaar 8	341F_08	5'- NNNAATGCGCTATCCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_08	5'- NNNAATGCGCTATGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'
Primerpaar 9	341F_09	5'- ACCTCATCTTCCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_09	5'- ACCTCATCTTGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'
Primerpaar 10	341F_10	5'- NAACAGCTCATCCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_10	5'- NAACAGCTCATGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'
Primerpaar 11	341F_11	5'- NNACTGTTGACTCCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_11	5'- NNACTGTTGACTGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'
Primerpaar 12	341F_12	5'- NNNAGAGTTGCTTCCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_12	5'- NNNAGAGTTGCTTGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'
Primerpaar 13	341F_13	5'- ACCTTGACATCCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_13	5'- ACCTTGACATGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'
Primerpaar 14	341F_14	5'- NACAACGTGTCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_14	5'- NACAACGTGTGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'
Primerpaar 15	341F_15	5'- NNACTTAGCACTCCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_15	5'- NNACTTAGCACTGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'
Primerpaar 16	341F_16	5'- NNNAATACGACCTCCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_16	5'- NNNAATACGACCTGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'

## Anhang

Fortsetzung Tabelle A 21: Primersequenzen der Firma LGC Genomics GmbH für die Markierung der verschiedenen Proben

<b>Primerpaar</b>	<b>Oligoname</b>	<b>Sequenz</b>
Primerpaar 17	341F_17	5'- ACGATCGTATCCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_17	5'- ACGATCGTATGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'
Primerpaar 18	341F_18	5'- NACCAATCAGTCCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_18	5'- NACCAATCAGTGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'
Primerpaar 19	341F_19	5'- NNAGGACTTGTTCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_19	5'- NNAGGACTTGTTGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'
Primerpaar 20	341F_20	5'- NNNAGCTGAATCTCCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_20	5'- NNNAGCTGAATCTGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'
Primerpaar 21	341F_21	5'- ACTCACTGTTCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_21	5'- ACTCACTGTTGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'
Primerpaar 22	341F_22	5'- NAGAGCAATGTCCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_22	5'- NAGAGCAATGTGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'
Primerpaar 23	341F_23	5'- NNAGTCATCCTTCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_23	5'- NNAGTCATCCTTGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'
Primerpaar 24	341F_24	5'- NNNAGTAGCCTATCCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_24	5'- NNNAGTAGCCTATGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'
Primerpaar 25	341F_25	5'- AGATAGCGATCCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_25	5'- AGATAGCGATGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'
Primerpaar 26	341F_26	5'- NAACGGAACATCCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_26	5'- NAACGGAACATGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'
Primerpaar 27	341F_27	5'- NNATATAGCCGTCCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_27	5'- NNATATAGCCGTGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'
Primerpaar 28	341F_28	5'- NNNAGTGAACCTCCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_28	5'- NNNAGTGAACCTCTGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'
Primerpaar 29	341F_29	5'- ATACGGACTTCCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_29	5'- ATACGGACTTGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'
Primerpaar 30	341F_30	5'- NAGCTCCTTATCCTACGGGNGGCWGCAG -3'
	785R_30	5'- NAGCTCCTTATGACTACHVGGGTATCTAAKCC -3'

## Anhang

Tabelle A 22: Temperaturprogramm für die qPCR zur Überprüfung der Eignung der Primer

<b>Phase</b>	<b>Dauer</b>	<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Anzahl der Zyklen</b>
Initialisierung	3 Min.	98	1
Denaturierung	15–30 s	98	
Anlagerung	30 s	50–55	39
Elongation	90 s	70	

Tabelle A 23: Temperaturprogramm für die PCR mit KAPA HiFi Ready Mix

<b>Phase</b>	<b>Dauer</b>	<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Anzahl der Zyklen</b>
Initialisierung	3 Min.	98	1
Denaturierung	15–30 s	98	
Anlagerung	30 s	50–55	30–36
Elongation	90 s	70	
Abkühlung	30 s	25	1

Tabelle A 24: Temperaturprogramm der qPCR zur Qualitätskontrolle der KAPA-PCR-Produkte

<b>Phase</b>	<b>Dauer</b>	<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Anzahl der Zyklen</b>
Initialisierung	15 Min.	95	1
Denaturierung	15 s	95	
Anlagerung	60 s	55	40
Elongation	60 s	72	
Denaturierung	60 s	95	
Anlagerung	30 s	55	1
Denaturierung	30 s	95	

**A 14 Qualitätskontrolle der PCR-Produkte**

Tabelle A 25: Geräte und Produkte zur Kontrolle der Qualität der PCR-Produkte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Stadt, (Staat,) Land</b>
Agilent 2100 Bioanalyzer (G2939A)	Agilent Technologies, Inc.	Santa Clara, (Kalifornien,) USA
Agilent DNA 1000 Kit (5067-1504)	Agilent Technologies, Inc.	Santa Clara, (Kalifornien,) USA
IKA vortex mixer	Agilent Technologies, Inc.	Santa Clara, (Kalifornien,) USA
Agilent 2100 Bioanalyzer Expert Software	Agilent Technologies, Inc.	Santa Clara, (Kalifornien,) USA
Wasser (BioScience-Grade, Nuklease-frei und autoklaviert, DEPC-behandelt)	Carl ROTH GmbH und Co. KG	Karlsruhe, DE
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH	Hilden, DE
Eppendorf Safe Lock Tubes (1,5 und 2 ml)	Eppendorf AG	Hamburg, DE

## 10 Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Zentek für die Annahme als Doktorandin am Institut für Tierernährung, die Überlassung des spannenden Themas und die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Besonders danke ich Frau Dr. Nadine Paßlack für die hervorragende Betreuung während der gesamten Zeit sowie die fortwährende Unterstützung und umfassende Beratung bei der Erstellung dieser Dissertation.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Wilfried Vahjen für die großartige und unermüdliche Hilfsbereitschaft und Unterstützung in allen Fragen zu Methoden und zur Statistik bedanken.

Mein Dank gilt darüber hinaus Marita Eitinger, Katharina Topp, Anett Kriesten und Luisa Ebersbach für die großartige Hilfsbereitschaft und hervorragende technische Assistenz im Labor.

Mein Dank geht dabei auch an Corinna Schmidt, Ines Bebert, Sandra Fischer und Chris Schulze für die Betreuung und Versorgung der Katzen.

Ich danke außerdem allen Mitarbeitern des Instituts für Tierernährung und Doktoranden für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre sowie stete Hilfsbereitschaft.

Mein aufrichtiger und größter Dank gilt meiner Familie und meinem Mann, ohne deren fabelhafte Unterstützung und immerwährenden Zuspruch sowie Rückhalt und Verständnis diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ich möchte außerdem an dieser Stelle meinem Vater ganz besonders dafür danken, dass er mir mein Studium und meinen bisherigen Weg ermöglicht hat. Danke an meine ganz persönlichen Superhelden.

## **11 Selbstständigkeitserklärung**

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

Berlin, den 16.07.2018

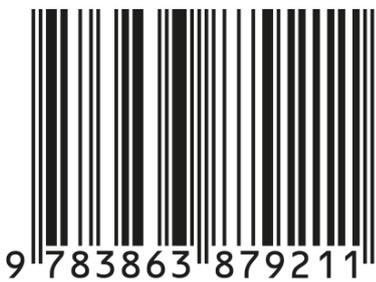
Louisa Verena Thies











**mbv**berlin | mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-86387-921-1