

10-01-2017

# Ændring af elges (*Alces alces*) mikrobiom ved translokation fra Sverige til Lille Vildmose i Danmark



Mark Holm Larsen  
SPECIALE PROJEKT – BIOLOGI - AAU

[Blank Side]

## Titelblad

### Titel:

Ændring af elges (*Alces alces*) mikrobiom ved translokation fra Sverige til Lille Vildmose i Danmark

### Projektperiode:

1/9/2016 – 10/1/2017

### Forfatter:

Mark Holm Larsen

---

### Vejledere:

Trine Hammer Jensen

Mads Albertsen

Sideantal: 50

Sider appendiks: 4

Afleveringsdato: 10/1-2016

Formålet med dette projekt var at undersøge hvordan det gastrointestinale mikrobiom hos fem elge, fra to forskellige indhegninger (Målilla og Vrigstad) i Sverige, ville blive påvirket af en translokation til Lille Vildmose i Danmark

Elgenes mikrobiom er blevet undersøgt med teknikken 16S rRNA amplikon sekventering, hvor fæcesprøvers bakterielle samfund blev undersøgt ud fra bakteriernes 16S rRNA gen. Der er i projektet blevet indsamlet fæcesprøver ved ankomsten til Danmark, og i forbindelse med at elgene blev bedøvet otte måneder efter ankomsten til Danmark. Derudover er der blevet indsamlet fæcesprøver fra felten et år efter ankomsten til Danmark. Ligeledes blev der tilsendt prøver fra elge, fra elghegnet i Sverige, disse prøver var ligeledes taget et år efter ankomsten af de fem elge i Lille Vildmose.

Resultaterne af fæcesprøverne viste at alle fem elge havde oplevet en ændring af deres mikrobiom efter otte måneder, samt efter et år. Ligeledes viste resultaterne at elgene efter de første otte måneder havde fået et mere forskelligartet mikrobiom.

[Blank side]

## Forord

Dette specialeprojekt er udarbejdet af Mark Holm Larsen i Biologi på Det Ingeniør- og Naturvidenskabelige fakultet på Aalborg Universitet. Projektet er udarbejdet i perioden 1/9-2016 til 10/01-2017. Dog med prøvetagning begyndende i november 2015.

Der rettes en stor tak til mine vejledere Trine Hammer Jensen og Mads Albertsen for god vejledning og konstruktiv kritik af projektet. Herudover skal der lyde en stor tak til Flemming Jacobsen som arbejder ved elghegnet i Målilla for prøveindsamling og information omkring elgene i svenske elghegn.

For hjælp i laboratorie og databehandling skal der ligeledes lyde en stor tak til Jakob Brandt, Martin Hjorth Andersen og Jannie Munk Kristensen fra Institut for Kemi og Biovidenskab – Sek. for bioteknologi

[Blank Side]

## Abstract

The aim of this project is to study how the gastrointestinal microbiome with five moose would be impacted by a translocation from two enclosures (Målilla and Vrigstad) in Sweden to Lille Vildmose in Denmark. The moose that are being studied are part of a major restoration project of the Mellemområde in Lille Vildmose which is supported by EU Life among others.

The 16S rRNA amplicon sequencing technique has been used to examine the moose microbiome, as bacteria from faeces samples have been examined from the bacterial 16S rRNA gene. This gene is preferred as all bacteria has this gene while this gene also contains highly conserved positions and highly variable positions. Faeces samples were collected when they arrived in Denmark and eight months later while they were sedated. Furthermore, faeces samples have been collected in the field a year after they arrived in Denmark. Additionally, samples have been sent from moose from the two enclosures in Sweden a year after the five moose arrived in Lille Vildmose.

The tests proved that the moose had experienced a change in their microbiome after eight months and after a year. Additionally, the tests showed that the moose had got a more diverse microbiome after eight months. However, this increase did not show in the samples collected a year after their arrival. This difference could be due to the fact, that the samples have been collected in a different way, since other studies have showed an increased amount of aerobe bacteria in faeces samples that are affected by abiotic and biotic conditions in a long period of time. Therefore, it is necessary to study how long faeces from moose can lie in the field before they are gathered, if future studies are to use this method for collecting samples.

Samples of the moose core bacteria at arrival and eight months later, show that the moose from Vrigstad had more core bacteria than those from Målilla. After eight months, the moose from Vrigstad had also maintained more of their core bacteria than the moose from Målilla.

[Blank side]



## Indholdsfortegnelse

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introduktion.....                                               | 1  |
| 2. Formål .....                                                    | 3  |
| 3. Teori.....                                                      | 5  |
| 3.1 Elg ( <i>Alces alces</i> ) .....                               | 5  |
| 3.2 Elgene i Lille Vildmose .....                                  | 6  |
| 3.3 16S rRNA sekventering, som metode til studie af mikrobiom..... | 7  |
| 3.4 Mikrobiomets og værtsorganismens påvirkning af hinanden.....   | 9  |
| 4. Materialer og metoder.....                                      | 13 |
| 4.1 Felt- & Laboratoriearbejde .....                               | 13 |
| 4.2 Bioinformatik analyse.....                                     | 14 |
| 5. Resultater .....                                                | 17 |
| 5.1 Gruppering af mikrobiom .....                                  | 18 |
| 5.2 Mikrobioms $\alpha$ -diversitet og core arter .....            | 21 |
| 6. Diskussion.....                                                 | 25 |
| 7. Konklusion.....                                                 | 29 |
| 8. Perspektivering .....                                           | 31 |
| 9. Reference .....                                                 | 32 |
| 10. Appendiks.....                                                 | 37 |
| 10.1 Rmarkdown.....                                                | 37 |
| 10.2 Rarecurve .....                                               | 40 |

[Blank side]

## 1. Introduktion

Igennem et stort naturgenopretningsprojekt af Mellemområdet i Lille Vildmose, som blandt andet er støttet af EU Life, er der udsat fem elge (*Alces alces*). Projektets overordnede mål er at bibeholde karakteren af det åbne og dynamiske landskab, der vil udvikle sig hen imod højmose. Dette vil sikre en gunstig bevaring af de prioriterede naturtyper, dog med genopretning af den aktive del af højmosen som førsteprioritet (Buttenschøn 2013). Som et led i denne aktion er fem elge blevet udsat i Lille Vildmose. Disse elge stammer fra to forskellige elghegn i Sverige. Deres funktion i genopretningsprocessen er at fouragere på træer og buske, hovedsageligt birk, da disse kan være en trussel mod højmosen. Elgene er vigtige i genopretningsprocessen, da de æder i en anden højde end kronstyr og rådyr i området (Buttenschøn 2013).

På baggrund af de sidste års udvikling af 16S rRNA amplikon sekventering er det muligt at undersøge forskellige miljøers unikke bakterielle sammensætning, samt hvilke individuelle bakterier der gør sig gældende i disse miljøer (Karst et al. 2016). Metoden er i stor stil blevet brugt ved undersøgelser af pattedyrs mikrobiom, i særdeleshed for herbivores gastrointestinale mikrobiom (Ley et al. 2015).

Studier på vertebrater har vist, at mikrobiomet blandt andet kan have påvirkning på værtorganismens evne til at nedbryde føde og modstå abiotiske variationer (Stumpf et al. 2016). Mikrobiomet kan være med til at påvirke værtens generelle fitness, som er evnen til at overleve, kombineret med evnen til at producere fertilt afkom (Frankham 2016). Studier har vist, at habitat, føde og genotype kan have stor påvirkning på mikrobiomet hos vertebrater (McSweeney & Mackie 2012). Ligeledes er det blevet vist at elge fra Alaska, Nord Amerika og Norge ikke har identiske mikrobiomer, hvilket Ishaq & Wright 2014 tolker at være grundet de forskellige habitater og fødetilgængeligheder der er i disse habitater. Ley et al. 2015 har ligeledes set forskelle på arters mikrobiom, hvor der blandt andet ses en tydelig gruppering mellem herbivorer, carnivorer og omnivorer. Med denne viden ses en begyndende tendens, til at viden omhandlerende dyrs mikrobiom kan bruges i arbejdet med bevaringsstrategier (Stumpf et al. 2016). Nogle bevaringsstrategier anvender truede dyrearter, som er opfostret i fangenskab, for derefter at udsætte dem i deres oprindelige habitater. Denne metode har i flere tilfælde haft begrænset succes, dette kan blandt andet skyldes manglende erfaring eller evne til at overleve i et naturligt miljø, prædation, sygdom,

abiotiske eller biotiske forhold (Stamps & Swaisgood 2007). Med mikrobiomets indflydelse på fitness og dets plasticitet i forhold til blandt andet føde, habitat og genotype er det væsentligt at overveje det mikrobielle samfunds indflydelse på dyr, som oplever translokationer på baggrund af blandt andet bevaringsstrategier (Redford et al. 2012). Translokationen af elgene fra Sverige til Danmark giver en unik mulighed for at undersøge påvirkningen af elges mikrobiom ved en translokation. Den nuværende videnskab på området omhandler sammenligning af mikrobiom hos andre arter, som lever i forskellige habitater (Ren et al. 2016; Amato et al. 2013; Ishaq & Wright 2014) eller arter i fangenskab (Alfano et al. 2015; Kohl et al. 2014; Delsuc et al. 2014). Der vil i forbindelse med translokationen af elgene være mulighed for at undersøge en eventuel ændring af mikrobiomet før og efter en translokation. Da elgene bliver flyttet fra et lille område på fem hektar i Sverige til et stort område på 2100 hektar i Lille Vildmose, Danmark.

## 2. Formål

På baggrund af ovenstående er det overordnede formål formuleret for projektet:

Vil en translokation af elge fra Sverige til Danmark, hvor de lever i større indhegning og ikke længere modtager tilskuds fodring, ændre på hvilke og antallet af forskellige bakterier der kan findes i elgenes fæces?

[Blank side]

### 3. Teori

#### 3.1 Elg (*Alces alces*)

Elgen (*Alces alces*) er en stor ruminant, som i dag er den størst nulevende art i hjortefamilien (Cervidae). Arten er udbredt i store dele af verden, lige fra de nordlige og østlige dele af Europa, til Asien og Nordamerika. Bestanden af elge på verdensplan er opdelt i 7 underarter, hvor den der findes i Sverige og fra 2015 i Lille Vildmose er af underarten europæisk elg (*Alces alces alces*). Europæisk elg vejer fra 300-500 kilogram og har en skulderhøjde på 2 meter. De



Figur 1 Elg (*Alces alces*). Foto Colourbox.dk

har lange ben og forholdsvis kort hals (Figur 1). Denne størrelse gør dem i stand til at nå skud, blade og knopper i op til 3 meters højde, hvilket er i en højde ingen andre samlevende arter kan nå, hvorimod de har svært ved at nå græs og urter på jorden (Sunde & Olesen 2007). Mysterud's studie fra 2000 undersøgte 32 svenske og norske studier af elges fødevalg og viste at elgenes kost hovedsageligt består af browse; altså skud, blade, knopper og kviste fra nåle- og løvtræer. Studiet viste desuden at fødevariationen er mindst om vinteren, hvor føden primært består af nåletræer (Mysterud 2000). Grundet elgens lange ben og korte hals, er det en meget lille del af elgenes føde som kommer fra græs og urter, modsat andre hjorte arter (Sunde & Olesen 2007).

Som alle andre ruminanter, har elgen et fordøjelsessystem som består af fire maver, rumen, reticulum, omasum og abomasum. Rumen er den første af de fire maver, når føden kommer ned i rumen, sker der en fermentering ved hjælp af en masse anaerobe bakterier. Det er under fermenteringen at cellulose, stivelse og hemicellulose nedbrydes mens flygtige fedtsyrer (VFAs), aminosyrer og ammonium produceres. VFA og ammonium kan optages gennem rumenvæggen, mens de fleste aminosyrer bliver brugt af bakterierne under fermenteringen (McSweeney & Mackie 2012). Efter fermentering kommer føden over i reticulum, her bliver de mindste partikler og bakterier sendt videre til omasum. Partikler, som endnu er for store til omasum, bliver gylpet op i munden og tygget igen. Dette kaldes rumination, hvoraf navnet for ruminanter stammer fra. I omasum sker der en yderligere nedbrydelse og en stor mængde vand bliver ligeledes

absorberet i omasum. Fra omasum føres maden til den sidste mave, som er abomasum. Abomasum fungerer ligesom mavesækken i et monogastrisk system, og er den eneste af maverne, som udskiller fordøjelsesenzymer (Randall et al. 2002). Efter abomasum føres det videre til de tyndtarmen og derfra videre i fordøjelses systemet (Dehority 2002).

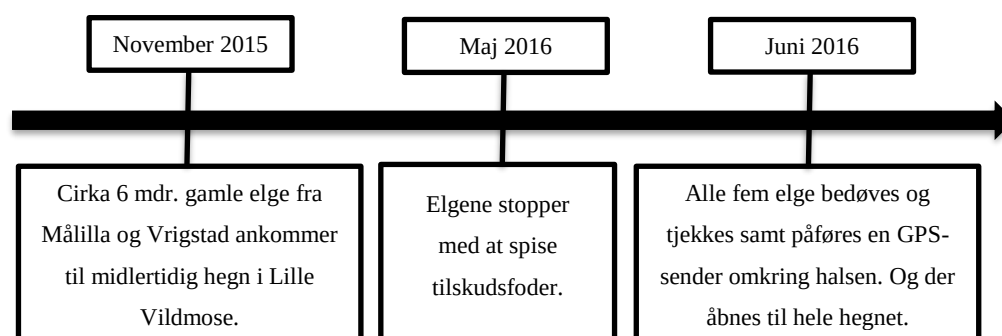
### 3.2 Elgene i Lille Vildmose

Elgene i Lille Vildmose stammer fra to forskellige elghegn i Sverige (Målilla og Vrigstad). Der er to tyre og tre køer, de to køer og ene tyr stammer fra Målilla, hvor tyren og den ene ko er søskende, mens den anden ko er genetisk forskellig fra disse. De to andre elge stammer fra Vrigstad og er ligeledes søskende, se tabel 1.

Tabel 1, Fakta om de fem udsatte elge. Søskende: 1 = søskende, 2 = ingen søskende, 3 = søskende

| Navn | Køn | Fødested | Født       | Søskende |
|------|-----|----------|------------|----------|
| Elg1 | ♂   | Målilla  | 15-05-2015 | 1        |
| Elg2 | ♀   | Målilla  | 15-05-2015 | 1        |
| Elg3 | ♀   | Målilla  | 12-05-2015 | 2        |
| Elg4 | ♂   | Vrigstad | 15-05-2015 | 3        |
| Elg5 | ♀   | Vrigstad | 15-05-2015 | 3        |

Elgene var omkring et halvt år, da de blev transporteret til Danmark, her blev de udsat i et midlertidigt hegn, hvor de stadig blev tilskudsfordret med det samme kraftfoder som i Sverige. I maj 2016 stoppede elgene med at spise foderet, og levede udelukkende af naturligt føde i Lille Vildmose. I juni 2016 blev elgene bedøvet og fæcesprøver blev taget, samtidig blev en GPS-sender monteret om halsen på alle fem elge. Dernæst blev elgene lukket ud i hele Mellemområdet af Lille Vildmose (Figur 3). Se figur 2 for overblik over elgenes første 8 måneder i Lille Vildmose.

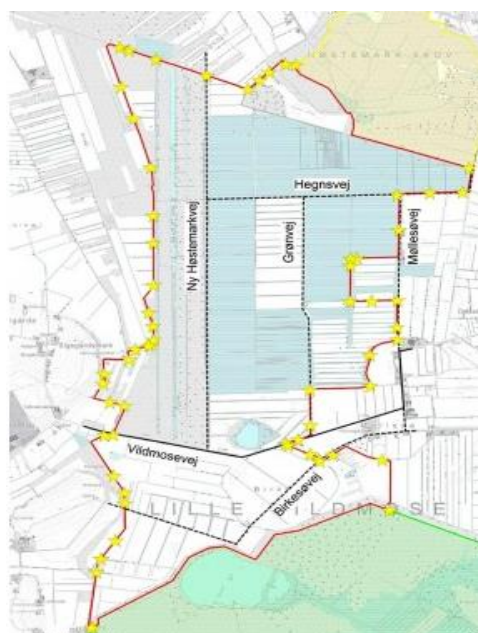


Figur 2 Oversigt over elgenes ankomst og væsentlige begivenheder de første 8 mdr. i Lille Vildmose.



I Sverige lever der 250.000 – 300.000 fritlevende elge (Svenska Jägareförbundet 2016), udover disse har man visse steder i Sverige lavet elghegn, hvor det er muligt for mennesker at komme helt tæt på elgene. En elgpark, som den i Målilla, har op imod 12.000 gæster om året, som alle har mulighed for at komme i kontakt med elgene. I disse elgparker tilskudsfores elgene med kraftfoder og kartofler eller roer. Dette skyldes, at der i elghegnene ikke er tilstrækkelig fødeproduktion. I elgparken Målilla, hvor tre af elgene fra Lille Vildmose stammer fra, går der 3-6 elge i en indhegning på 5 hektar. Disse populationer består af en tyr og to køer, yderligere kan der være et-års kalve og nye kalve i heget. Dyrene i Målilla bliver behandlet for orm og fluer. Ormebehandlingen blandes i foderet, mens fluebehandlingen sprøjtes uden på dyrene. (Personlig kommunikation: Flemming Jacobsen, 2016). Dyrene fra Vrigstad lever under lignende forhold, dog er den nøjagtige fødesammensætning ikke kendt.

Mellemområdet i Lille Vildmose, hvor elgene er blevet udsat, er indhegnet af et 31 km langt hegn (Figur 3). Hegnet omringer et område på 2100 hektar, hvor der er fri passage for mennesker på stier og veje. Området er stærkt præget af fortidens tørvegravning og dræning af området. Området består blandt andet af højmoser, som er under tilgroning af hovedsageligt dunbirk, og skovområder af dun- og vortebirk. Ligeledes findes der åbne områder, men generelt for området, sker der en tilgroning af birk og pil i området. Udover de fem elge, er der også udsat 22 krondyr i området. Krondyrene kommer fra andre områder i Vildmosen, hvor der er en naturlig bestand af krondyr. Elgene og krondyrene skal i samarbejde blandt andet være med til at reducere tilgroningen af birk og pil i området (Buttenschøn 2013).



Figur 3, Foto af Mellemområdet, hvor rød linje angiver hvor heget er omkring det 2100 hektar store område. Stjerne angiver forskellige åbninger til heget. (Aage V. Jensens Naturfond)

### 3.3 16S rRNA sekventering, som metode til studie af mikrobiom

Menneskets og dyrenes samfund af mikroorganismer (bakterier, archaeer, fungier og virus) på og i kroppen betegnes som mikrobiomet. Et menneskes mikrobiom består af op imod  $10^{14}$  mikroorganismer, hvilket er ti gange så mange celler som menneskekroppen er opbygget af. Denne store mængde mikroorganismer befinder sig

i stor stil i fordøjelseskanaalen, hvor der bare i tyktarmen er op imod  $10^{12}$  bakterier/g. (Madigan et al. 2013). Det er med nye teknologier blevet muligt at kortlægge disse bakterier. Dette gøres på baggrund af bakteriernes 1500 basepar (bp) lange 16S rRNA gen, da det består af konserverede områder, som kan bruges som target for primer. Yderligere indeholder genet ni variable områder, som gør det muligt at differentiere de forskellige bakterier fra hinanden, ved at sammenligne de variable frekvenser af 16S rRNA genet med databaser af kendte bakterier, og på den baggrund kortlægge hvilke bakterier, der befinder sig i mikrobiomet (Karst et al. 2016).

Ved brug af 16S rRNA sekventering, er det som tidligere nævnt muligt at kortlægge, hvilke bakterier der findes i et mikrobiom. Der skal dog tages visse forbehold for resultaterne, da der under processen kan forekomme forskellige bias, afhængig af den anvendte metode. Albertsen et al. 2015 fandt at forskellige tidsintervaller i bead beating (mekanisk lysis af celler) kan medføre større forskelle, end prøver taget med fem måneders mellemrum i samme renseanlæg. Henderson et al. 2013 har undersøgt bead beating påvirkning af DNA ekstraktion i fæces, og de viste at længere bead beating under ekstraktionen øgede hyppigheden af Firmicutes og modsat faldt hyppigheden af Bacteroidetes. Primervalg kan også have indflydelse på resultatet. Der kan vælges forskellige primere, alt efter hvilke variable regioner i 16S rRNA genet som anvendes. Der er påvist, at nogle grupper af bakterier ikke amplificeres ved brug af V1-V3, mens de bliver amplificeret ved brug af V4 (Albertsen et al. 2015). Yderligere kan blandt andet prøvetagning, prøveopbevaring, PCR-opsætning og valget af database have effekt på resultaterne og skabe bias, som er vigtige at overveje ved sammenligning med andre studier (Karst et al. 2016).

Fæcesprøver er en hyppigt anvendt metode til at undersøge pattedyrs mikrobiom igennem 16S rRNA sekventering. Indsamling af fæcesprøver i felten er en ikke-invasiv metode og derfor fordelagtig at anvende i forsøg med især vilde dyr. Alfano et al. viste i sit studie fra 2015, at fæcesprøver taget fra koalabjørne ikke har samme  $\alpha$ -diversitet som svaberprøver fra rektum. De fandt at svaberprøver fra rektum havde 44 forskellige bakterier på genera niveau, mens der i fæcesprøverne blev fundet 15 forskellige. De 15 var alle repræsenteret blandt de 44 fra rektumprøverne. De fandt altså en mindre  $\alpha$ -diversitet i prøverne ved brug af fæces i forhold til det mikrobiom, der er fundet i andre dele af fordøjelsessystemet. Dermed vil resultater fra fæcesprøver, udelukkende kunne give et udpluk mikrobiomet. Det har dog stadig været muligt at anvende fæcesprøver til undersøgelse af ændringer eller forskelle hos forskellige arters mikrobiom. Blandt

andet fandt Amato et al. i 2016 hos Kattalamurer (*L. catta*), at habitatforstyrrelser, alder og sociale interaktioner påvirker mikrobiomet i fæcesprøver fra Kattalamurer. Samme metode anvendte Barelli et al. 2015, da de fandt at  $\alpha$ -diversiteten hos røde Colobus aber (*Procolobus gordonorum*) i Afrika var faldende hos de aber, som levede i skove påvirket af mennesker, modsat de aber som levede i uberørte skove.

Ved anvendelse af fæcesprøver, er det nødvendigt at være opmærksom på fæcesprøvens eksponering af biotiske og abiotiske forhold, da forskellige forhold vil kunne ændre på det bakterielle samfund i prøven. Menke et al. 2015 undersøgte i deres studie, hvordan giraf- og springbukfæces ændres henover en tidsperiode på syv dage. De så, at der syv dage efter defækation stadig var muligt at bruge giraffæces til at undersøge giraffens naturlige mikrobiom, dog så de en variation fra dag til dag. Ved springbukken så de, at der allerede efter tre dage var sket store ændringer i den mikrobielle sammensætning, således at informationen fra disse prøver ville være halveret. De abiotiske og biotiske forhold der påvirker fæces kan være vejrforhold, såsom regn og sol eller prøverne kan blive kontamineret af bakterier fra det omkringliggende miljø. Samtidig kan størrelsen af fæces være betydende for muligheden for at finde en region i prøven, som er mindre kontamineret (Menke et al. 2015).

### 3.4 Mikrobiomets og værtsorganismens påvirkning af hinanden

Det gastrointestinale mikrobiom er betegnelse for det mikrobielle samfund, som findes i mavetarmsystemet hos alle vertebrater. Hos ruminanter er bakterier i rumen afgørende for fermenteringen og dermed hele fordøjelsen, da ruminanter ikke er i stand til at foretage denne fermentering selv (Dehority 2002). Det er ikke kun i rumen, at bakterier har en rolle i forbindelse med fordøjelsen, dette er gældende hele vejen igennem fordøjelseskanaalen. Derfor vil der opleves forskellige mikrobiomer, alt efter hvilket område af fordøjelseskanaalen prøven tages (Alfano et al. 2015).

Igennem mange år har forskere anvendt forskellige teorier omkring makrobiologiske samfund, for at kunne forudsige en fødekæde og et fødenets fremtidige udvikling. Disse teorier kan muligvis også gøre sig gældende for mikrobiologiske samfund og dermed kunne forudsige et mikrobioms udvikling ved forskellige ændringer af abiotisk eller biotiske forhold (Hessen 2007). Et studie, hvor babyers mikrobiom er fulgt fra fødsel og to år frem, har vist, at deres mikrobiom gradvist bliver mere forskelligartet, og samtidig efter to år har et sammenligneligt mikrobiom med voksne (Koenig et al. 2011).

Denne observation kan knyttes til successionsteorien, som siger, at der sker tidsmæssige ændringer i et biologisk samfund. Dette kunne være kendte ændringer af babyers mikrobiom de første to leveår.

En teori der ligeledes kan knyttes til den mikrobielle verden er metasamfundsteorien, som beskriver hvordan et lokalt samfund kan påvirkes, eksempelvis kan det gastrointestinale mikrobiom, betragtes som værende en del af et metasamfund. Metasamfundet består af flere lokale samfund, som kan være værtens orale mikrobiom samt føde og andre individer (Christian et al. 2015). Påvirkningen af sådanne faktorer fra andre lokale samfund kan eventuelt forklare forskellene i et studie lavet på elge fra Norge, Alaska og Nordamerika. Det viser, at Bacteroidetes og Firmicutes er dominerende i elgenes mikrobiom, men Bacteroidetes er dog mest repræsenteret hos elgene fra Norge og Alaska, mens Firmicutes er dominerende hos elgene fra Nordamerika. Indenfor phylum Bacteroidetes var *Prevotellaceae* den mest dominerende hos alle elge på familieniveau, hvor de fleste tilhørte *Prevotella* på genusniveau, mens det indenfor Firmicutes var *Lachnospiraceae* på familieniveau som dominerede ved alle elge (Ishaq & Wright 2014). Inkonsistensen for hvilke bakterier som er dominerende, især på phylumniveau, viser hvordan ruminanternes mikrobiom er afhængig af forskellige faktorer. En af disse faktorer er fødetilgængeligheden, hvilket ses i studier om rensdyr fra Svalbard, hvor det er fundet, at Bacteroidetes er dominerende i vinterhalvåret (Pope et al. 2012), hvor et andet studie viser at Firmicutes er dominerende i sommerhalvåret, hvor den tilgængelige føde er forskellig fra vinterhalvåret (Sundset et al. 2007). Forskere har ligeledes vist, at en meget fiberholdig føde favoriserer især Bacteroidetes, hvorimod en kost bestående af megen stivelse øger mængden af Firmicutes i fordøjelsessystemet (S C Fernando et al. 2010). Selvom der ses forskel på tværs af forskellige ruminanter og individers bakteriesammensætning på phylumniveau, betyder det ikke, at dyrene har mikrobiomer med forskellige egenskaber. Dette skyldes, at der på tværs af de forskellige phylumniveauer, findes bakterier med de samme gener og egenskaber (Huttenhower & Human Microbiome Project Consortium 2012; Martiny et al. 2013).

Habitat kan ligeledes påvirke arters mikrobiom, dette ses eksempelvis hos dyr som lever i fangenskab, som har anderledes mikrobiomer i forhold til identiske arter i naturen, selvom de får den samme føde som i naturen (Kohl et al. 2014). Ligeledes så Kohl et al. 2014, at rotter fanget i naturen, efter seks måneder i fangenskab havde et mindre forskelligartet mikrobiom. De fandt yderligere ud af, at rotterne ikke var i stand

til at genetablere deres naturlige mikrobiom efter seks måneder, hvor de igen var blevet fodret med deres naturlige fødevalg, hvilket kan tyde på denne habitats påvirkning. Det er ligeledes set, at menneskelig påvirkning af værtens habitat, kan have indflydelse på eksempelvis diversiteten hos Sorte Brøleaber (*Alouatta pigra*) (Amato et al. 2013). Man så hos disse, at diversiteten var størst hos aberne i store områder med regnskov, kontra et område med lidt regnskov og tæt beliggende ved mennesker (Amato et al. 2013). I dette tilfælde er mennesker og aber hver deres lokale samfund i et metasamfund. Hvor resultaterne altså tyder på, at tætheden af disse lokale samfund har betydning på mikrobiomet (Amato 2013).

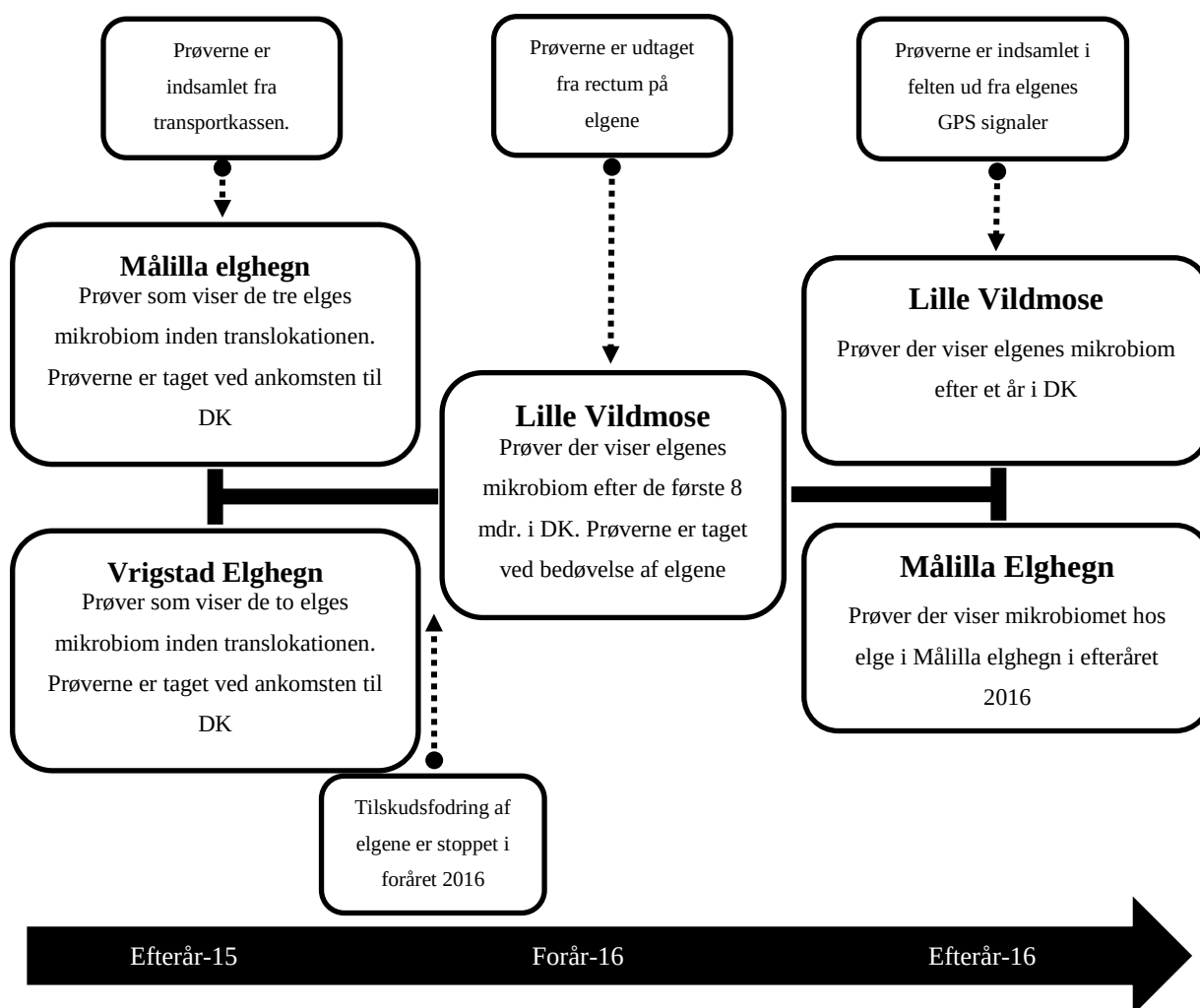
Viden omkring faktorerne, som har indvirkning på mikrobiomer, giver mulighed for at kunne finde årsagerne til at dyr og mennesker oplever en ændring af deres mikrobiom. Samtidig vil det også blive muligt at forudsige eventuelle ændringer af mikrobiomer ved ændringer af værtens abiotiske eller biotiske forhold. Yderligere vil dette kunne bruges til at ændre på mikrobiomet, som det er set gjort med eksempelvis fæces transplantationer (Christian et al. 2015).

[Blank side]

## 4. Materialer og metoder

### 4.1 Felt- & Laboratoriearbejde

Prøveindsamlingen er foregået over fem gange. De første fem prøver blev taget 11. november 2015 da elgene ankom til Danmark. Fæcesprøver blev opsamlet fra transportkasserne og derefter nedfrosset ved  $-18^{\circ}\text{C}$  grader. Disse prøver gav et billede af elgenes mikrobiom inden translokationen. De næste prøver blev udtaget fra elgenes rectum ved bedøvelse 28. maj 2016, og nedfrosset ved  $-18^{\circ}\text{C}$  grader. Disse prøver viste hvordan elgenes mikrobiom var efter de første otte måneder i Danmark. Fæcesprøver fra Målilla elghegn i Sverige blev indsamlet 14. september 2016 og sendt til Danmark. Prøverne var en reference for eventuelle successionelle ændringer i mikrobiomet hos elgene. De blev modtaget 48 timer efter og nedfrosset til  $-18^{\circ}\text{C}$  grader. Der er indsamlet 9 prøver fra indhegningen i Lille Vildmose, disse blev indsamlet i områder hvor elgene,



Figur 4 Oversigt over de forskellige prøveindsamlinger og opdeling af disse. Samt hvordan prøverne er taget. Pilen angiver tidspunkt for de forskellige prøvetagninger, og prøvernes angivelse fremover i projektet.

jævnfør GPS-signal, havde opholdt sig 0-36 timer forinden. Disse prøver blev brugt til undersøgelse af muligheden for individgenkendelse. Ved indsamlingen blev der kun medtaget fæces, som ikke havde været i direkte fysisk kontakt med omkringværende miljø. Prøverne blev indsamlet i 50 ml greinerrør og opbevaret i fryseboks (max 6t) indtil nedfrysning ved -18° C. Disse prøver blev indsamlet den 14. og 27. september 2016. Overblik over prøveindsamlingen kan ses på figur 4.

For alle fæcesprøver blev der anvendt cirka 0,1 mg fæces ved ekstraktion. Der blev anvendt FastDNA spin kit for soil til ekstraktionen. Fremgangsmåden for ekstraktionen er gjort jf. Standard protocol DNA extraction – AD sludge (McIlroy et al. 2015). Prøvekvaliteten af DNA-ekstraktionen blev testet ved en koncentrationsmåling med Infinite F200 PRO HS DNA Assay og TapeStation 2200, HS D1000 Screen Tape System. Der blev lavet enkeltvis amplikon library på alle ekstraherede prøver.

Fra hver ekstraherede prøve blev der brugt 10 µg DNA til PCR reaktionen (25 µL), som indeholdt 1X Platinum High Fidelity buffer, dNTPs (400µM), MgSO<sub>4</sub> (1,5 nM), Platinum Taq DNA polymerase HF(1U) og 10 µL barcoded 16S V1-V3 adaptor mix (1µM); 27F AGAGTTTGATCCTGGCTCAG and 534R ATTACCGC-GGCTGCTGG. PCR var indstillet med en start denaturering ved 95°C i 2 min. Derefter 30 cyklusser med; 95°C i 20 sek., 56°C i 30 sek. og 72°C i 60 sek. og efter cyklusserne 72°C i 5 min. Alle prøver blev kørt i duplikater under PCR og sammenblandet til et samlet library efter endt PCR.

Alle libraries blev oprenset med Agencourt AMPure XP, hvor prøve/beat blandingen var i forholdet 4/5. De blev efterfølgende kvalitetstjekket på TapeStation 2200, HS D1000 Screen Tape System. Efter oprensning og kvalitetstjek af libraries, blev de sammenblandet på baggrund af målte DNA-koncentrationer med Infinite F200 PRO HS DNA Assay og udregnet amplikon størrelse.

De sammenblandede libraries blev fortyndet til 4nM inden sekventering. Prøverne blev sekventeret på en MiSeq (Illumina) med en Miseq Reagent kit v3 og 600 cyklusser. De medfølgende standard anvisninger for klargørelse af Miseq til sekventering blev fulgt.

## 4.2 Bioinformatik analyse

De aflæste sekvenser blev kvalitets tjekket ved brug af Trimmomatic v. 0,32 (Bolger et al. 2014) med indstillingerne SLIDINGWINDOW:5:3 og MINLEN:275. Efterfølgende blev forward og reverse sekvenserne sammensat til hele sekvenser ved brug af FLASH



v. 1.2.7 (Magoč & Salzberg 2011) med indstillingerne -m 25 -M200. De sammensatte sekvenser blev replikeret og formateret for at kunne bruges i arbejdsprocessen UPARSE (Edgar 2013). De replikerede sekvenser blev grupperet ved brug af usearch v. 7.0.1090-cluster\_otus med standard indstillinger. OTU hyppigheden blev estimeret ved brug af usearch v.7.0.1090-usearch\_global med kommandoen id 0.97. Taksonomien for OTU'erne var tildelt med RDP (Wang et al. 2007) klassificering som er implementeret i parallel\_assign\_taxonomy\_rdp.py script i QIIME (Caporaso et al. 2012), hvor MiDAS databasen v.1.20 (McIlroy et al. 2015) blev anvendt.

Resultaterne er blevet analyseret i R gennem Rstudio. Ampvis pakken (Albertsen et al. 2015) er brugt til at lave analysen og visualiseringen af resultater. De anvendte pakker og kommandoer kan ses i Appendiks 10.2. Principal components analyse (PCA) er lavet, hvor grupperinger af prøverne er blevet undersøgt. Heatmap viser de 10 hyppigste bakterier i prøverne. For undersøgelse af  $\alpha$ -diversiteten af prøverne er der blevet anvendt antal observerede arter. Disse værdier er visualiseret i boksplot. Til sammenligning af elgenes og prøvetidspunkterne core arter, er de anvendte kriterier for core art følgende; forekommer i alle prøver, med en hyppighed på mindst 0,1 procent. Disse er blevet visualiseret i Venn diagram.

[Blank side]

## 5. Resultater

GPS signaler som modtages fra elgenes monterede GPS-halsbånd, viser at elgene færdes mest i den vestlige og nordlige del af hegnet. Indsamling af fæcesprøverne fra efteråret 2016 er også indsamlet i disse områder. I alt er der i projektet blevet arbejdet med 24 forskellige fæces prøver, hvor der er blevet lavet tekniske triplikater af to (U4 og S2) for at undersøge variansen i prøverne. På figur 6 ses en tættere gruppering af triplikaterne U4 end de øvrige prøver. Ligeledes viste negativ og positiv prøve det forventede. Der er fundet for få reads i prøverne S2,1; S2,2; S2,3; S3 og S4 da de havde under 1000 reads. Øvrige prøver har reads på 1.275 - 31.830, og blevet fundet brugbare. Dette er på baggrund af rarecurve (appendiks 10.2), hvor det ses at prøverne efter 1000 reads flader ud, og dermed er det vurderet at alle bakterier er blevet aflæst. Antallet af OTU'er, der er observeret i hver prøve, varierer fra 85 – 845 forskellige.

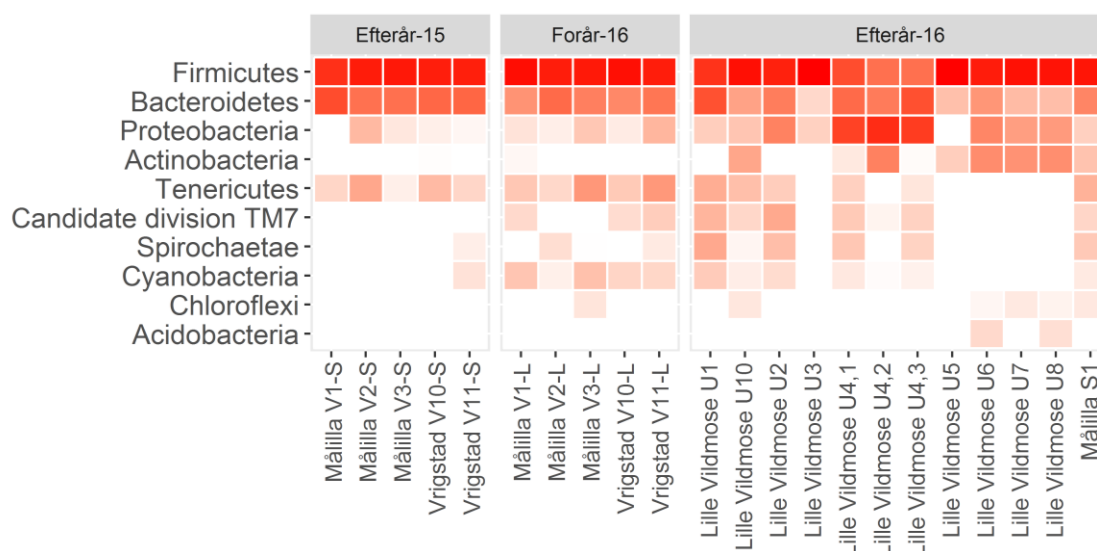
Ved undersøgelse af mikrobiomerne i fæces fra elge, som er flyttet fra to forskellige elghegn i Sverige til et område i Lille Vildmose, blev der fundet forskellige mønstre i elgenes mikrobiom. Disse vil blive vist i de efterfølgende afsnit, hvor første afsnit vil omhandle prøvernes forskellige grupperinger, og hvilke bakterier der påvirker disse grupperinger. Andet afsnit vil omhandle elgenes  $\alpha$ -diversitet, samt hvilke bakterier som elgene deler på tværs af hinanden (core bakterier).

Tabel 2 Beskrivelse af de forskellige angivelser, som vil komme i resultatafsnittet. Grupper: de forskellige grupperinger som laves i databehandlingen. Kategorier: eksempler på hvilke inddelinger der er i grupperne. Beskrivelse: forklaring på de forskellige grupper og kategorier.

| Grupper               | Kategorier                                      | Beskrivelse                                                                                                                                                                                                                                       |
|-----------------------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <u>Prøvetidspunkt</u> | Efterår-15, Forår-16, Efterår-16 og Efterår-16S | Inddeling af hvornår prøverne er blevet taget. S angiver at prøven er taget i Sverige.                                                                                                                                                            |
| <u>SampleID</u>       | Eksempler: V1-S, V1-DK, U1 og S1                | Hver enkel prøves specifikke ID. V1 er den enkelte elg, hvor S angiver at prøven er taget ved ankomsten til Lille Vildmose. DK angiver at de har været i Danmark. U1 er ukendte prøver. S1 er prøver tilsendt fra Målilla elghegn efteråret 2016. |
| <u>Elghegn</u>        | Målilla og Vrigstad                             | Angiver hvor elgene oprindeligt stammer fra.                                                                                                                                                                                                      |
| <u>Individ</u>        | Elg1, Elg2, Elg3, Elg4 og Elg5.                 | Viser hvilken specifik elg prøven er fra                                                                                                                                                                                                          |
| <u>Land</u>           | Sverige og Danmark                              | Sverige er prøverne taget ved ankomsten til Lille Vildmose. Danmark er prøverne efter seks mdr. i Lille Vildmose                                                                                                                                  |

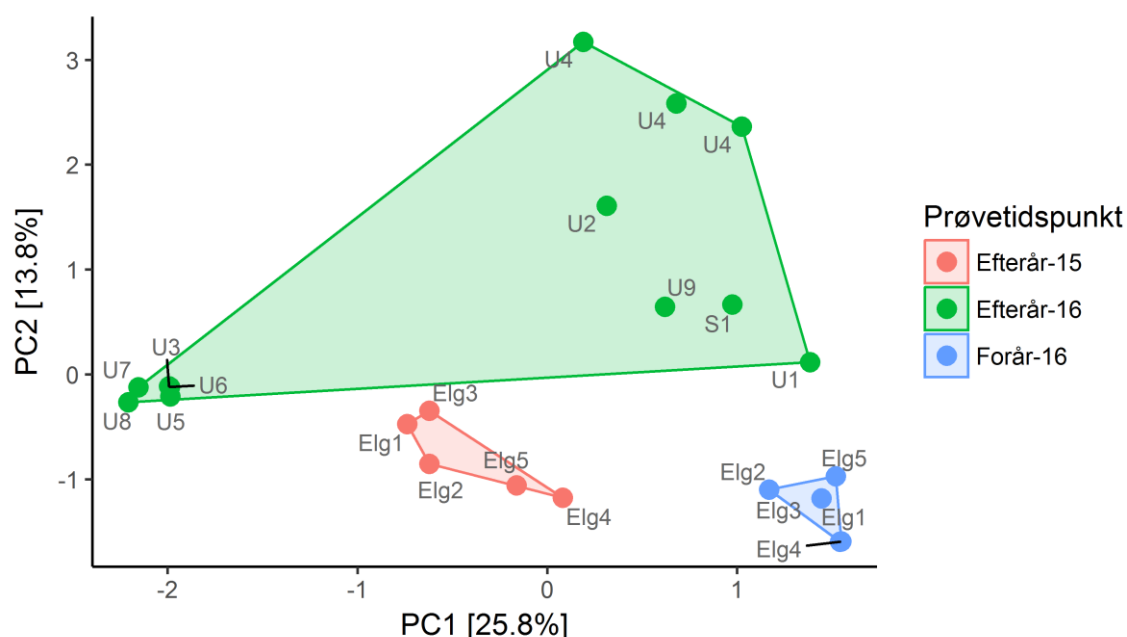
## 5.1 Gruppering af mikrobiom

Ved undersøgelse af elgenes mikrobiomer på phylumniveau, viser figur 5 at Firmicutes i alle prøver er den hyppigst forekommende. Bacteroidetes og Proteobacteria udgør ligeledes en stor del af bakterierne i alle prøverne. Yderligere ses det, at der i prøverne Forår-16 og Efterår-16 er repræsenteret flere forskellige bakteriegrupper på phylum niveau end i Efterår-15 prøverne, blandt andet Candidate division TM7, Actinobacteria, Chloroflexi og Acidobacteria.



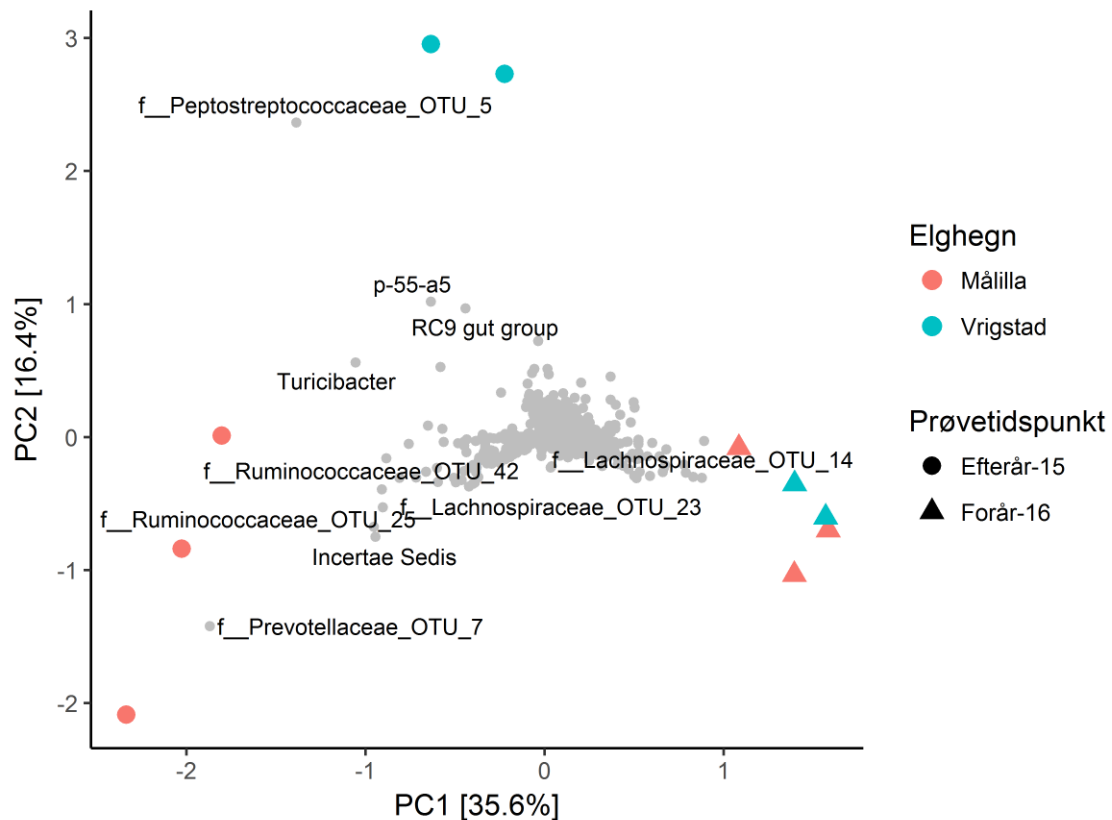
Figur 5 Heat map som viser alle prøver i projektet. Bakterier er angivet på phylum niveau, og prøverne er på x-aksen angivet med elghegn, SampleID og Prøvetidspunkt. (LV=Lille Vildmose) (U = ukendt individ).

På figur 6 ses en tydelig gruppering af prøverne i forhold til prøvetidspunktet. Hvor prøverne fra ankomsten til Danmark (Efterår-15) grupperes, i forhold til prøverne efter otte måneder i Danmark (Forår-16). Ligeledes grupperes de ukendte prøver, som blev samlet i Lille Vildmose et år efter udsættelsen (Efterår-16) væk fra de øvrige prøver. Yderligere kan det ses, at prøven fra en elg i Målilla (S1), taget samme tid som de ukendte, ligger i området af de ukendte prøver. Prøverne Efterår-15 og Forår-16 er grupperet i et lille område, i forhold til prøverne Efterår-16. Fem af prøverne i denne gruppe (U3, U5, U6, U7, U8), grupperes modsat de fire øvrige prøver. U1, U2, U4 og U9 er mere spredte og forskellige fra de øvrige prøver fra Efterår-16. Prøverne U3, U5, U6, U7, U8 er, jf. figur 6, mere ens med prøverne Efterår-15 end U1, U2, U4 og U9 prøverne.



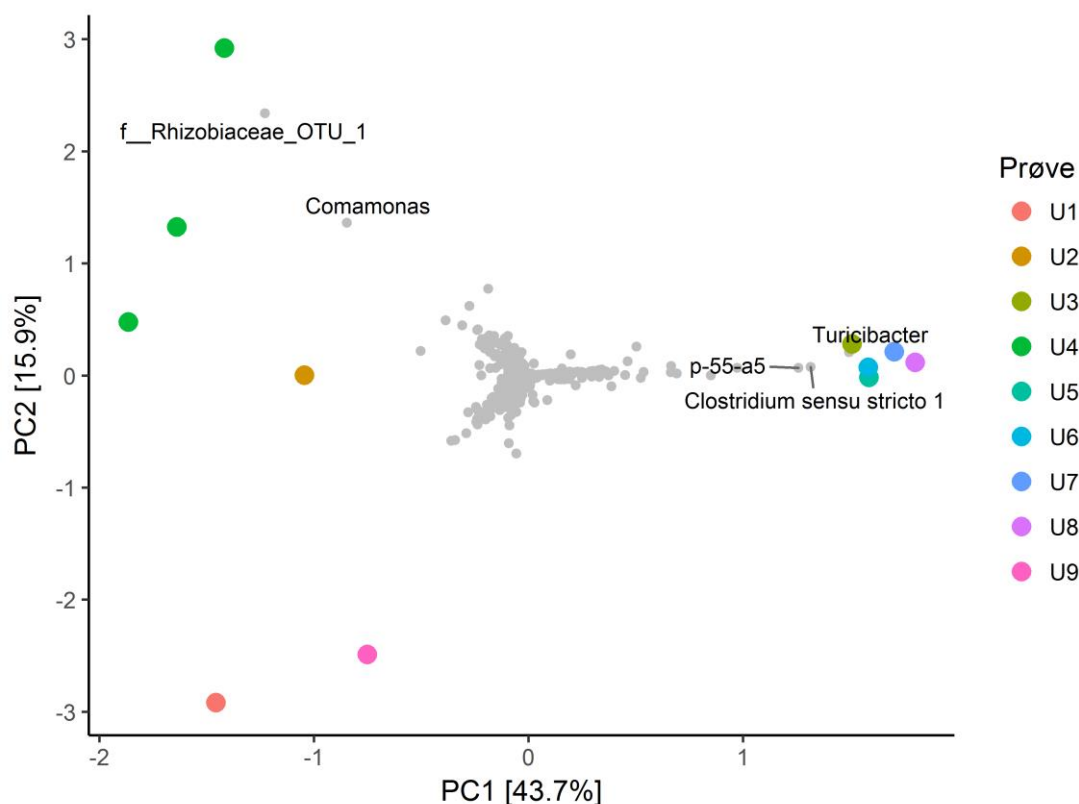
Figur 6 PCA-plot som viser grupperinger af alle prøver i projektet. [ ] = angiver variansen på den pågældende akse. Røde prøver er taget i efteråret 2015 ved ankomst til Lille Vildmose. Lilla viser prøverne taget foråret 2016 i Lille Vildmose. Grøn viser prøverne indsamlet i Lille Vildmose i efteråret 2016. Blå er en prøve tilsendt fra Målilla elgpark i efteråret 2016. U4 er repræsenteret 3 gange, dette er triplikat af samme fæces prøve

Ved analyse af prøverne Efterår-15, ses der en gruppering af elgene, som kommer fra det samme elghegn. På figur 7 grupperes elgene fra Målilla nede i venstre hjørne, mens elgene fra Vrigstad grupperer sig i toppen af plottet. Prøverne Forår-16, som er taget cirka otte måneder senere, grupperer sig alle fem nede i højre hjørne. Altså har de fem elge fået et mere ens mikrobiom efter otte måneder i Danmark. Ved at undersøge hvilke bakterier som har størst indflydelse på disse grupperinger, ser man at for elgene i Vrigstad har *Peptostreptococcaceae\_OTU\_5* en afgørende rolle. Kendetegnende for denne familie er at de alle er anaerobe bakterier og deres metabolisme bygger på fermentering (Brenner et al. 2005). For elgene fra Målilla har bakterierne *Prevotellaceae\_OTU\_7* og *Ruminococcaceae\_OTU\_25* betydning for deres gruppering, fælles for familien *Prevotellaceae* bakterier er at de er velkendte bakterier i prøver fra rumen, samt at de kan nedbryde kulhydrater og proteiner. *Ruminococcaceae* familien forekommer ofte i tarm prøver, og de er butansyre producerende (Brenner et al. 2005). *Lachnospiraceae\_OTU\_14* er den dominerende blandt flere bakterier som har betydning for grupperingen af prøverne Forår-16. Fælles for *Lachnospiraceae* familien er at de er anaerobe (Brenner et al. 2005).



Figur 7 PCA plot som angiver grupperingen af prøverne Efterår-15 og Forår-16. Rød farve viser elgene fra Målilla, mens den blå farve angiver elgene fra Vrigstad. En cirkel angiver prøverne taget ved ankomsten til DK, hvor trekanten angiver prøverne taget efter otte måneder. [ ] = angiver variansen på den pågældende akse. Bakterier er angivet på genus hvis muligt, ellers familie niveau og OTU navn.

Prøverne, der er indsamlet i Lille Vildmose, og som ikke kan henføres til en bestemt elg, udviser jævnfør figur 8 en større spredning end de øvrige prøver. Hvor fem prøver grupperes tæt i højre side af plottet, hvor det på genus niveau er bakterierne *Clostridium sensu stricto 1*, *Turicibacter* og *p-55-a5* som de mest afgørende bakterier, for at prøverne grupperes i dette område af plottet. Disse bakterier er normale tarmbakterier, og er alle anaerobe bakterier. De øvrige prøver grupperes mere spredt i modsatte side af plottet, hvor bakterien på genusniveau, *Comamonas* og på familieniveau *Rhizobiaceae* er dominerende. Disse bakterier er begge aerobe bakterier og forekommer kun i prøverne Efterår-16 og hovedsageligt i prøverne U1, U2, U4 og U9.

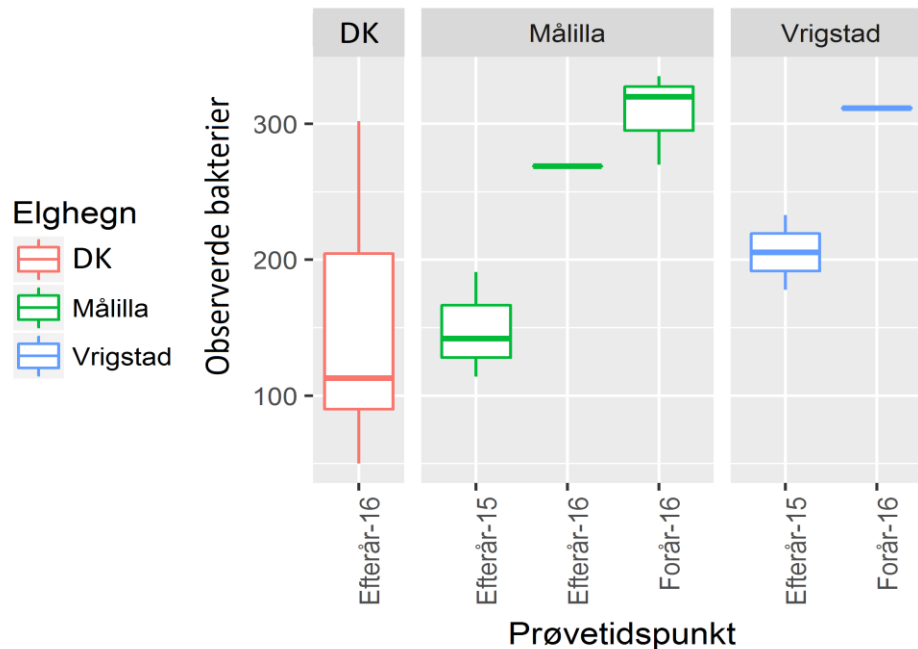


Figur 8 PCA plot som angiver grupperingen af prøverne fra Efterår-16. Prøve er hver en ukendt prøve som er indsamlet i Lille Vildmose. [ ] = angiver variansen på den pågældende akse. Bakterier er angivet på genus hvis muligt, ellers familie niveau og OTU navn.

## 5.2 Mikrobioms $\alpha$ -diversitet og core arter

$\alpha$ -diversiteten for hver prøve er undersøgt med antal observerede arter. Elgenes  $\alpha$ -diversitet er grupperet efter prøvetidspunkt, og her ses en øget  $\alpha$ -diversitet, efter de første otte måneder i Danmark. Elgene fra Målilla havde ved ankomst i gennemsnit 143 (n=3) forskellige bakterier, hvor de efter otte måneder havde i gennemsnit 293 (n=3) forskellige bakterier, de har altså i gennemsnit cirka fordoblet antallet af forskellige bakterier. Elgene fra Vrigstad har ligeledes opnået en større  $\alpha$ -diversitet, dog ikke i lige så stor grad som Målilla elgene. Vrigstad elgene havde i gennemsnit 213 (n=2) forskellige bakterier ved ankomst, mens de efter otte måneder havde 335 (n=2) forskellige bakterier i gennemsnit, altså en forøgelse på cirka 60 %.

På figur 9, ses det at prøverne indsamlet i Lille Vildmoses et år efter translokationen, i gennemsnit har en mindre  $\alpha$ -diversitet, men er på niveau med de værdier, som blev fundet i prøverne Efterår-15. Efterår-16 prøverne har samtidig en større spredning end de øvrige grupper.



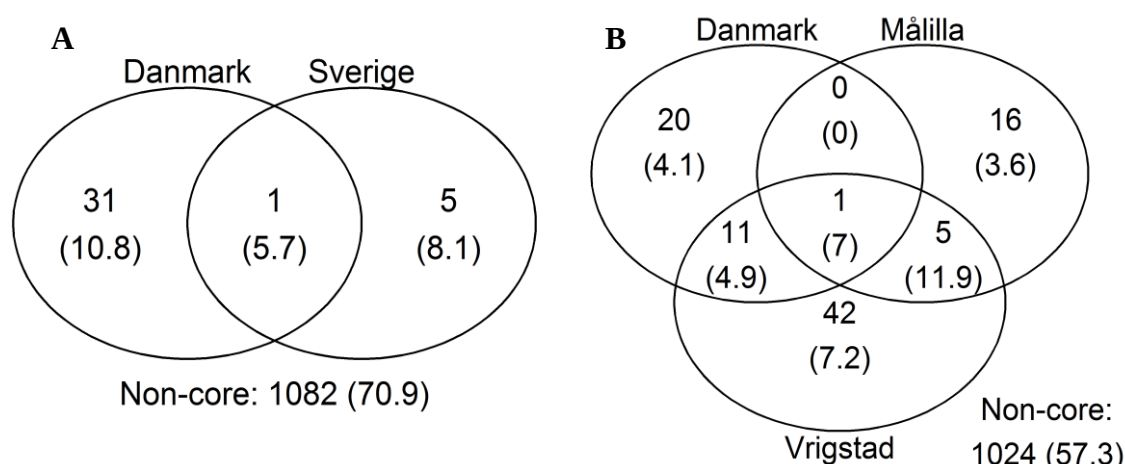
Figur 9 Boksplot som angiver diversiteten i prøverne, fordelt på elghegn og prøvetidspunkt. Y-aksen angiver antal observerede OTU'er i prøverne.

|                                            | Elg1               |                  | Elg2               |                  | Elg3               |                  | Elg4                |                   | Elg5                |                   |
|--------------------------------------------|--------------------|------------------|--------------------|------------------|--------------------|------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| Firmicutes; p-55-a5                        | 6.7                | 3.1              | 13.4               | 7.3              | 9.3                | 1.2              | 15                  | 2.5               | 15.4                | 2.9               |
| Firmicutes; f__Peptostreptococcaceae_OTU_5 | 1.4                | 0                | 3.2                | 0.1              | 3.2                | 0                | 19.6                | 0                 | 22.5                | 0                 |
| Firmicutes; Incertae Sedis                 | 13.5               | 3.3              | 2.3                | 1.3              | 13.1               | 1.7              | 2.6                 | 3.2               | 2                   | 2.5               |
| Bacteroidetes; f__Prevotellaceae_OTU_7     | 30                 | 0                | 4.4                | 0                | 0                  | 0                | 0                   | 0                 | 0                   | 0                 |
| Bacteroidetes; Bacteroides                 | 1.3                | 2.2              | 0.9                | 4.5              | 6.5                | 2.9              | 5.9                 | 2.9               | 2.5                 | 3.8               |
| Bacteroidetes; RC9 gut group               | 0                  | 0.3              | 0.9                | 1.7              | 0.1                | 0.5              | 6.3                 | 0.4               | 13.9                | 2.5               |
| Firmicutes; Ruminococcus                   | 0.5                | 4.7              | 1.9                | 2.1              | 1.3                | 3.2              | 1.9                 | 5.5               | 0.5                 | 2.6               |
| Firmicutes; Mogibacterium                  | 0.1                | 1.4              | 0.2                | 1.1              | 0.7                | 8.6              | 1                   | 1.4               | 0.5                 | 2.8               |
| Firmicutes; Coprococcus                    | 0.8                | 2.2              | 1.1                | 0.7              | 3.6                | 3.8              | 1                   | 1.6               | 0.4                 | 0.3               |
| Firmicutes; Clostridium sensu stricto 1    | 6.2                | 0                | 4.8                | 0.3              | 2.2                | 0                | 0.3                 | 0.1               | 0.3                 | 0.3               |
|                                            | Efterår-15-Målilla | Forår-16-Målilla | Efterår-15-Målilla | Forår-16-Målilla | Efterår-15-Målilla | Forår-16-Målilla | Efterår-15-Vrigstad | Forår-16-Vrigstad | Efterår-15-Vrigstad | Forår-16-Vrigstad |

Figur 10 Heat map der viser de 10 hyppigste bakterier på phylum og genus niveau, (hvis dette ikke er muligt bliver de vist på bedst mulige niveau) som er fundet i prøverne Efterår-15 of Forår-16. Prøverne er grupperet efter individ og x-aksen angiver Prøvetidspunkt og elghegn.



Nærmere analyse af den relative hyppighed for bakterierne efter otte måneder i Danmark kan ses på figur 10, den viser, at før translokationen var *F. p-55-a5* på genus niveau en af de mest dominerende i alle prøver, men denne er i alle prøver blevet mindre dominerende efter de første otte måneder i Danmark. De to af elgene fra Målilla, som var søskende, blev der fundet en stor mængde af én bakterie i familien *B. Prevotellaceae* (OTU\_7) i prøverne Efterår-15. Denne bakterie forekom ikke i de øvrige prøver fra efteråret 2015, og bakterien blev ikke observeret i nogle af Forår-16 prøverne.



Figur 11 Venn-diagram som angiver prøvernes core bakterier som grupperne har indbyrdes og deler imellem hinanden. For at bakterierne er core bakterier, skal de være repræsenteret i alle prøver fra gruppen samt have en hyppighed på mindst 0,1 %. Tallet angivet i ( ) viser den procentvise andel af mikrobiomet bakterierne dækker over. A) Danmark = prøverne Forår-16, Sverige = prøverne Efterår-15. B) Danmark = prøverne Forår-16, Målilla = Efterår-15 fra Målilla, Vrigstad = Efterår-15 fra Vrigstad.

Ved undersøgelse af prøvernes core arter, ses det på figur 11.A, at elgene deler enkelte bakterier på tværs af de forskellige grupperinger af prøver. Det ses blandt andet at alle elgene ved ankomsten til Danmark kun delte 6 bakterier. Efter elgene havde været i Danmark i otte måneder ses det, at de delte 32 bakterier. Ud af disse 32 bakterier, er der kun én (*p-55-a5\_OTU\_4*) art som er repræsenteret både før og efter translokationen. På figur 11.B er gruppen Sverige opdelt i elghegn, og den viser, at elgene fra de to forskellige elghegn deler fem forskellige arter inden translokationen. Desuden ses det at elgene fra Vrigstad deler 59 bakterier, hvor Målilla elgene deler 22 bakterier. Elgene fra Vrigstad har 12 bakterier, som også er repræsenteret ved prøverne taget otte måneder senere. Hvorimod elgene fra Målilla kun har én bakterie, som er gennemgående i alle prøverne efter otte måneder i Danmark.

[Blank side]

## 6. Diskussion

I dette projekt er det undersøgt hvordan elges mikrobiom ændres efter en translokation fra Sverige til Danmark. Det er blevet fundet, at elgenes mikrobiom har ændret sig i tidsperioden fra de ankommer og otte måneder frem og yderligere ændret sig de efterfølgende otte måneder. Imellem første og anden prøvetagning, Efterår-15 og Forår-16, er elgene gradvist blevet fravendt deres tilskudsfodring, som de var vant til fra de svenske elghegn. Elgene var kort inden anden prøvetagning stoppet med at spise tilskudsfodret. Elgenes ændring i fødeindtag har givetvis været en stor faktor i ændring af elgenes mikrobiom, da flere studier har vist, at fødeindtaget har stor betydning for individets mikrobiom (S. C. Fernando et al. 2010; Amato et al. 2016). Dette kan yderligere underbygges af teorien omkring metasamfund, hvor en ændret næringstilførsel kan ses som påvirkning mellem to samfund og der vil derfor ske en ændring af mikrobiomet (Amato 2016). Denne ændring vil kunne betyde at nye nicher vil opstå for bakterier, mens en øget konkurrence vil udrydde eller reducere andre bakterier.

Yderligere kan det antages, at elgenes ankomst til en større indhegning, vil medføre et ændret mikrobiom. Da det forventes, at der i indhegningen ikke vil være nogen kontakt til mennesker, som der var i Sverige. Mindre eksponering for mennesker har kunnet medvirke til et ændret mikrobiom. Et studie lavet på røde Colobus aber viste netop, at områder, der er mere påvirket af mennesker, var med til at give et ændret mikrobiom hos aberne (Barelli et al. 2015).

Ishaq & Wright 2014 fandt i deres studie af elge fra Alaska, Norge og Nordamerika at deres mikrobiom på phylum niveau var domineret af Firmicutes og Bacteroidetes, hvilket også er tilfældet i dette projekt. Prøverne i dette projekt har alle flest Firmicutes, hvor Ishaq & Wright 2014 fandt knap så stor en mængde Firmicutes, og i flere tilfælde fandt de større mængder af Bacteroidetes. At sammenligne elgenes mikrobiom på phylumniveau, fortæller meget lidt omkring mikrobiomets egenskaber, men giver et overbliksbillede som andre lignende studier bruger. Dette skyldes, at mange gener er gennemgående på lavere fylogenetiske niveauer. Det er kun få og meget komplekse pathways som er specifikke på phylumniveau (Martiny et al. 2013). Derfor vil det være relevant at se på lavere niveauer, for at kunne undersøge eventuelle egenskaber ved de fundne bakterier, som gør, at de observerede ændringer kan forklares.

Prøverne fra efteråret 2016 grupperer sig fra de øvrige, men samtidig ses der en større spredning på disse. På figur 8 ses det at spredningen i den ene retning i høj grad skyldes

bakterierne på familieniveau *C. Comamonas* og på genusniveau *Rhizobiaceae*, disse bakteriegrupper er alle aerobe bakterier. Sammenholdt med hvad Menke et al. 2015 fandt ud af i deres studie, hvor de undersøgte hvordan mikrobiomet i fæces hos giraf og springbukken ændres, ved eksponering af biotiske og abiotiske forhold i en tidsperiode på syv dage. De viser at den relative hyppighed af aerobe bakterier er stigende hen over de 7 dage. Dette kan tyde på at prøverne i dette projekt, som er grupperet i den del hvor de aerobe bakterier er dominerende, er ældre end de øvrige bakterier. Hvilket kan resultere i et mindre retvisende billede af elgenes mikrobiom.

Undersøgelsen af elgenes  $\alpha$ -diversitet viste, at alle elge oplevede en større  $\alpha$ -diversitet efter de første otte måneder i Danmark, hvorimod prøverne taget et år efter udsættelsen viste en  $\alpha$ -diversitet på samme niveau som ved ankomsten. Forklaringer herpå kan være måden prøverne er blevet taget, da prøverne Efterår-15 og Forår-16 foregik ved en udtagelse af fæces fra rectum, hvorimod prøverne Efterår-16 blev indsamlet i felten. Hvilket gør at disse prøver bliver eksponeret for abiotiske og biotiske forhold, som de øvrige prøver ikke er blevet udsat for. Menke et al. 2015 undersøgte også hvordan  $\alpha$ -diversiteten hos giraffer og springbukke ændredes henover de syv dage. De fandt, at prøvernes  $\alpha$ -diversitet var faldende i løbet af de syv dage, hvilket kan forklare, at  $\alpha$ -diversiteten ved prøverne Efterår-16 er lavere end ved Forår-16 prøverne.

Resultaterne indikerer at elgene har en større  $\alpha$ -diversitet efter otte måneder i Danmark, kan tyde på, at dyr som har været i fangenskab og deraf oplevet en reduceret  $\alpha$ -diversitet, vil kunne genetablere et mere forskelligartet mikrobiom efter genudsættelse i et mere naturligt habitat. Elgene i Danmark har dog ikke udviklet en  $\alpha$ -diversitet som matcher værdierne fundet i Ishaq & Wright 2014, som fandt en højere  $\alpha$ -diversitet i vilde elge. Det er dog vigtigt at tage højde for forskellige fremgangsmåder i de to undersøgelser, da der er flere trin i forsøgsdesignet, som kan resultere i forskellige bias (Albertsen et al. 2015; Karst et al. 2016; Alfano et al. 2015). Derfor er yderligere undersøgelser af elgene i Danmark og vilde elge nødvendige for at kunne afgøre om en yderligere stigning af deres  $\alpha$ -diversitet er mulig, for at opnå samme niveau som vilde elge. Studie lavet på rotter af Kohl et al. 2014 viser, at for rotter kan ikke kun føden genoprette det oprindelige mikrobiom, men at føde kun er en af flere faktorer som påvirker mikrobiomet, det kan antages, at en genudsætning af rotterne til deres oprindelige habitat, ville kunne øge  $\alpha$ -diversiteten yderligere. Kohl et al. 2014's studie er som sagt lavet på rotter, og det er derfor usikkert, om studiet kan overføres direkte til elge.

En reduceret  $\alpha$ -diversitet hos de udsatte elge kan have indflydelse på dyrenes evne til at klare sig i det nye habitat. Blandt andet kan en mindre  $\alpha$ -diversitet gøre mikrobiomet mere modtagelig overfor eventuelle patogene påvirkninger (Rosenfeld 2002; Costello et al. 2012). Sådanne overvejelser er vigtige i forbindelse med genudsættelse af truede dyrearter, og det vil eventuelt være en fordel at oparbejde så høj en  $\alpha$ -diversitet som muligt, inden en genudsættelse effektueres.

I forbindelse med elgenes ændrede mikrobiom og forøgede  $\alpha$ -diversitet henover de første otte måneder i Danmark, skal det tages med i overvejelserne, at det var unge elge (6 mdr.), som kom til Danmark. Naturlig succession af kvægkalve og babyers mikrobiom er set resultere i en større  $\alpha$ -diversitet ved køer og voksne (Koenig et al. 2011; Jami et al. 2013). Det kan antages, at der er sket en naturlig succession af elgenes mikrobiom. Hos kvægkalvene, som ligeledes er drøvtyggere, observerede Jami et al. 2013 øget diversitet imellem prøver taget da kalvene var 6 måneder og 2 år. Hvis det samme er gældende for elgkalve, er det muligt, at elgenes mikrobiom endnu ikke er fuldt udviklet. Hvor længe elgkalve er om at udvikle deres fuldtudviklede mikrobiom, kræver yderligere undersøgelser specifikt af elgkalve.

Undersøgelse af elgenes fælles bakterier, eller bakterier som de enkelte elge ville bibeholde på trods af translokationen, er blevet undersøgt ved at analysere prøvernes core bakterier. Det er bakterier, som forekommer i alle prøver med en hyppighed på mindst 0,1 % indenfor en valgt gruppe. Ved sammenligning af prøvernes core ved ankomst til Danmark og prøverne taget i foråret 2016 kan det ses at elgene er gået fra at dele fem forskellige bakterier, til at dele 38 bakterier, hvilket stemmer overens med den tættere gruppering af prøverne som ses på figur 8. Ved opdeling af prøverne Efterår-15 i elghegn, ser man at elgene fra Vrigstad har bibeholdt en større del af sit mikrobiom. Da Vrigstad elgene deler 11 bakterier med prøverne taget i foråret 2016, hvorimod Målilla elgene kun deler én bakterie. Dette kan tyde på, at Vrigstad elgene muligvis er bedre tilpasset til de nye forhold, hvis man udelukkende kigger på elgenes core mikrobiom.

På figur 11.B ses det, at elgene fra Målilla deler en mindre gruppe bakterier (22) end tilfældet er for Vrigstad elgene (59). Denne forskel kan eventuelt skyldes de genetiske relationer som er mellem elgene, da Vrigstad elgene kun består af et søskendepar, og Målilla elgene består af ét søskendepar og en anden elg, som ingen genetiske relationer har til de andre to elge. At netop genetiske relationer kan have påvirkning på

mikrobiomet er blevet vist i studier lavet på enæggede tvillinger, som viste, at de har mere ensartet mikrobiom, end de øvrige deltagere i studiet (Zoetendal et al. 2001).

Ved undersøgelse af vilde dyr i naturen, gør ofte prøvetagningen besværlig i forhold til undersøgelse i fangenskab. Dette har også været gældende i indeværende projekt. Da prøvetagningen har været når dyrene skulle bedøves, eller at finde fæcesprøverne umiddelbart efter defækation i naturen. Disse forhold har også gjort det svært at undersøge hvilke faktorer, som har skyldtes de fundne forskelle i elgenes mikrobiom. Samtidig har det ikke være muligt at styre hvornår tilskudsfodringen ophørte, hvilket måske ville have givet en bedre mulighed for at undersøge hvor stor denne tilskudsfodring havde af indflydelse på mikrobiomet. Den forskellige måde hvorpå prøverne også er indsamlet, kan have betydning, da de opsamlede fæcesprøver kan være nogle dage gamle når de bliver fundet. Derfor vil analyser lavet på baggrund af en sammenligning, af fæcesprøver udtaget fra rectum og fæcesprøver indsamlet umiddelbart efter defækation i naturen, være af en vis usikkerhed.

## 7. Konklusion

Dette projekt har undersøgt hvorvidt en translokation af fem elge fra to forskellige elghegn i Sverige, til en 21 hektar stor indhegning i Lille Vildmose ville påvirke elgenes mikrobiom.

Det er sket en ændring af alle fem elges mikrobiom efter otte måneder i Lille Vildmose. I denne periode er elgene stoppet med at indtage tilskudsfodringen som de var vant til fra Sverige, det er dog ikke muligt ud fra dette projekt at sige hvor stor en betydning denne faktor har på ændringen.

I samme periode udviklede elgene ligeledes et mere forskelligartet (større  $\alpha$ -diversitet) mikrobiom. Prøver fundet et år efter ankomsten til Lille Vildmose, viser igen et ændret mikrobiom, dog er  $\alpha$ -diversiteten i disse prøver på niveau med prøverne ved ankomsten. Samtidig er det fundet at elgene, som stammer fra Vrigstad elghegn, har bibeholdt flere af deres core bakterier efter translokationen, sammenlignet med elgene fra Målilla.

Fæcesprøverne taget efter et år er indsamlet fra naturen. Nogle af disse fæcesprøver var påvirket af aerobe bakterier, hvilket tyder på at de var af ældre dato. Det er derfor vigtigt at være opmærksom på eventuelle forurening af fæcesprøver indsamlet på denne måde.

[Blank Side]



## 8. Perspektivering

Der er i dette projekt blevet set en problemstilling ved indsamling af fæcesprøver i naturen, da der er fundet aerobe bakterier i nogle af prøverne. Og disse bakterier er ikke fundet i fæcesprøverne, som er udtaget fra rectum. Det vil derfor være interessant at undersøge hvor længe elgefæces kan ligge i naturen, inden den ikke længere er et repræsentativt billede elgenes mikrobiom.

Det vil være væsentligt at sammenligne ungdyr og fuldvoksne dyrs mikrobiom efter en translokation, for på den måde at undersøge om alder kan have indflydelse på mikrobiomets tilpasningsevne til det nye habitat. Da det jf. succesionsteorien sker en naturlig ændring af mikrobiomet især i de tidlige leveår. Kan det forventes at en tidlig eksponering for det nye område vil gavne tilpasningsevnen for arten.

Ved sammenligning af elgenes mikrobiom i Lille Vildmose, og et igangværende projekt omkring elgenes fødevalg i mosen, ville det være interessant at se om der kan findes nogle ligheder mellem mikrobiom og fødevalg. På den måde vil det måske være muligt, ud fra fæcesprøver, at undersøge om elgene eventuelt vil skifte fødevalg i fremtiden. Dette kunne eventuelt skyldes en større konkurrence i takt med at populationen af elge i Lille Vildmose øges. Dette vil måske kunne bruges som et redskab for hvor mange elge der kan befinde sig i Lille Vildmose.

## 9. Reference

- Albertsen, M. et al., 2015. Back to Basics – The Influence of DNA Extraction and Primer Choice on Phylogenetic Analysis of Activated Sludge Communities. *Plos One*, 10(7), p.e0132783. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0132783>.
- Alfano, N. et al., 2015. Variation in koala microbiomes within and between individuals: effect of body region and captivity status. *Scientific Reports*, 5(May), p.10189. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/srep10189>.
- Amato, K.R., 2013. Co-evolution in context: The importance of studying gut microbiomes in wild animals. *Microbiome Science and Medicine*, 1(1), pp.10–29. Available at: <http://www.degruyter.com/view/j/micsm.2014.1.issue-1/micsm-2013-0002/micsm-2013-0002.xml>.
- Amato, K.R. et al., 2013. Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes. *The ISME Journal*, 7(7), pp.1344–1353. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2013.16>.
- Amato, K.R., 2016. Incorporating the gut microbiota into models of human and non-human primate ecology and evolution. *American Journal of Physical Anthropology*, 159, pp.S196–S215.
- Amato, K.R. et al., 2016. Phylogenetic and ecological factors impact the gut microbiota of two Neotropical primate species. *Oecologia*, 180(3), pp.717–733.
- Barelli, C. et al., 2015. Habitat fragmentation is associated to gut microbiota diversity of an endangered primate: implications for conservation. *Scientific reports*, 5(October), p.14862. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4595646&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Bolger, A.M., Lohse, M. & Usadel, B., 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), pp.2114–2120.
- Brenner, D. et al., 2005. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, pp.333–379. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/0-387-29298-5>.
- Buttenschøn, R.M., 2013. Anbefalinger vedrørende naturpleje af Mellemområdet , Lille Vildmose. , pp.32–37.
- Caporaso, J.G. et al., 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on

- the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*, 6(8), pp.1621–1624. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2012.8>.
- Christian, N., Whitaker, B.K. & Clay, K., 2015. Microbiomes: Unifying animal and plant systems through the lens of community ecology theory. *Frontiers in Microbiology*, 6(SEP), pp.1–15.
- Costello, E.K. et al., 2012. The Application of Ecological Theory. , 336(June), pp.1255–1262.
- Dehority, B.A., 2002. Gastrointestinal tracts of herbivores, particularly the ruminant: Anatomy, physiology and microbial digestion of plants. *Journal of Applied Animal Research*, 21(2), pp.145–160.
- Delsuc, F. et al., 2014. Convergence of gut microbiomes in myrmecophagous mammals. *Molecular Ecology*, 23(6), pp.1301–1317.
- Edgar, R.C., 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 10(10), pp.996–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2604>.
- Fernando, S.C. et al., 2010. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(22), pp.7482–7490.
- Fernando, S.C. et al., 2010. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Applied and environmental microbiology*, 76(22), pp.7482–90. Available at: <http://aem.asm.org/cgi/content/long/76/22/7482> [Accessed November 10, 2016].
- Frankham, R., 2016. Genetic rescue benefits persist to at least the F3 generation, based on a meta-analysis. *Biological Conservation*, 195, pp.33–36.
- Henderson, G. et al., 2013. Effect of DNA extraction methods and sampling techniques on the apparent structure of cow and sheep rumen microbial communities. *PloS one*, 8(9), p.e74787. Available at: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0074787>.
- Hessen, D.O., 2007. *Hvad er Biologi?*, Akademisk Forlag.
- Huttenhower, C. & Human Microbiome Project Consortium, 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), pp.207–14. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3564958&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Ishaq, S.L. & Wright, A.D., 2014. High-Throughput DNA Sequencing of the Ruminant Bacteria from Moose (*Alces alces*) in Vermont, Alaska, and Norway. *Microbial Ecology*, 68(2), pp.185–195.
- Jami, E. et al., 2013. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *The ISME journal*, 7(6), pp.1069–79. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3660679&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Karst, S.M. et al., 2016. Chapter 8 : Molecular Methods for Identification of Microorganisms Experimental Methods in Wastewater Treatment. , pp.285–320.
- Koenig, J.E. et al., 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl(Supplement\_1), pp.4578–85. Available at: [http://www.pnas.org/cgi/content/short/108/Supplement\\_1/4578](http://www.pnas.org/cgi/content/short/108/Supplement_1/4578) [Accessed December 2, 2016].
- Kohl, K.D., Skopec, M.M. & Dearing, M.D., 2014. Captivity results in disparate loss of gut microbial diversity in closely related hosts. *Conservation Physiology*, 2, pp.1–11.
- Ley, R.E. et al., 2015. All use subject to JSTOR Terms and Conditions Evolution and Their of Mammals Gut Microbes. , 320(5883), pp.1647–1651.
- Madigan et al., 2013. *Brock Biology of Microorganisms*,
- Magoč, T. & Salzberg, S.L., 2011. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27(21), pp.2957–2963.
- Martiny, A.C., Treseder, K. & Pusch, G., 2013. Phylogenetic conservatism of functional traits in microorganisms. *The ISME Journal*, 7(4), pp.830–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2012.160>.
- McIlroy, S.J. et al., 2015. MiDAS: The field guide to the microbes of activated sludge. *Database*, 2015(2), pp.1–8.
- McSweeney, C.S. & Mackie, R., 2012. Micro-organisms and ruminant digestion: state of knowledge, trends and future prospects. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, (61), pp.1–62. Available at: [www.fao.org/docrep/016/me992e/me992e.pdf](http://www.fao.org/docrep/016/me992e/me992e.pdf).
- Menke, S., Meier, M. & Sommer, S., 2015. Shifts in the gut microbiome observed in wildlife faecal samples exposed to natural weather conditions: Lessons from time-series analyses using next-generation sequencing for application in field

- studies. *Methods in Ecology and Evolution*, pp.1080–1087.
- Mysterud, A., 2000. Diet overlap among ruminants in Fennoscandia. *Oecologia*, 124(1), pp.130–137.
- Pope, P.B. et al., 2012. Metagenomics of the svalbard reindeer rumen microbiome reveals abundance of polysaccharide utilization loci. *PLoS ONE*, 7(6), pp.1–10.
- Redford, K.H. et al., 2012. Conservation and the Microbiome. *Conservation Biology*, 26(2), pp.195–197.
- Ren, T. et al., 2016. Development, diet and dynamism: Longitudinal and cross-sectional predictors of gut microbial communities in wild baboons. *Environmental Microbiology*, 18(5), pp.1312–1325.
- Rosenfeld, J.S., 2002. Functional redundancy in ecology and conservation. *Oikos*, 98(1), pp.156–162. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1600-0706.2002.980116.x/abstract%5Cnhttp://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1600-0706.2002.980116.x/full%5Cnhttp://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1034/j.1600-0706.2002.980116.x/asset/j.1600-0706.2002.980116>.
- Stumpf, R.M. et al., 2016. Microbiomes, metagenomics, and primate conservation: New strategies, tools, and applications. *Biological Conservation*, 199, pp.56–66. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2016.03.035>.
- Sunde, P. & Olesen, C.R., 2007. *Elg i Danmark? Vurdering af mulighederne for og konsekvenserne af etablering af en dansk elg-bestand*,
- Sundset, M.A. et al., 2007. Novel rumen bacterial diversity in two geographically separated sub-species of reindeer. *Microbial Ecology*, 54(3), pp.424–438.
- Svenska Jägareförbundet, 2016. Älg. Available at: <https://jagareforbundet.se/vilt/viltvetande/artpresentation/daggdjur/alg/#>.
- Wang, Q. et al., 2007. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), pp.5261–5267.
- Zoetendal, E.G. et al., 2001. The Host Genotype Affects the Bacterial Community in the Human Gastrointestinal Tract. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 13(3), pp.129–134. Available at: <http://libraries.ou.edu/access.aspx?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=aph&AN=5171396&site=ehost-live>.

[Blank side]

## 10. Appendiks

### 10.1 Rmarkdown

#### Metadata

```
sample_variables(d)

## [1] "SeqID"          "Individ"        "SampleID"
## [4] "AdaptorID"      "Dato"           "Konc..1"
## [7] "Konc..2."       "Samplegroup"    "Elghegn"
## [10] "Familie"        "Elg"            "Elghegn_samplegrou
rou"
## [13] "Core"           "Core2"          "Prøvetidspunkt"
## [16] "Heatmap"        "Prøveid"        "Prøve"
## [19] "Elg1"           "Elg2"           "Elg3"
## [22] "Elg4"           "Elg5"           "Køn"

d

## phyloseq-class experiment-level object
## otu_table() OTU Table: [ 1805 taxa and 28 samples ]
## sample_data() Sample Data: [ 28 samples by 24 sample variables ]
## tax_table() Taxonomy Table: [ 1805 taxa by 7 taxonomic ranks ]
## refseq() DNASTringSet: [ 1805 reference sequences ]
```

#### Appendiks - Rarecurve

```
amp_rarecurve(d, color= "Samplegroup" ,
              legend.position = "topleft",
              xlim = c(0,5000))
title(main="Rarefaction Curve", sub=NULL, xlab=NULL, ylab=NULL, line
=NA, outer=FALSE)
```

```
ggsave(file = "fig1.png", height = 400, width = 600, units = "mm",
dpi = 600)
```

## Subset

Fjerner dem med under 1000 reads, til procent og sjældne arter.

```
dsn <- subset_samples(d, sample_sums(d) > 1000) %>%
  subset_samples(Samplegroup %in% c("2015e", "2016f", "2016e", "2016S")) %>%
  transform_sample_counts(fun = function(x) x / sum(x) * 100)

dsnf <- filter_taxa(dsn, function(x) max(x) >= 0.1, TRUE)

dsr <- subset_samples(d, sample_sums(d) > 1000) %>%
  subset_samples(Samplegroup %in% c("2015e", "2016f", "2016e", "2016Sve")) %>%
  rarefy_even_depth(sample.size = 1000)
```

## Figur 5 - Heatmap alle prøver

```
amp_heatmap(dsn,
  group = c("Elghegn", "SampleID", "Prøvetidspunkt"),
  tax.aggregate = "Phylum",
  plot.numbers = F,
  tax.show = 10,
  plot.text.size = 4,
  color.vector = c("White", "Red")) +
  facet_grid(~Prøvetidspunkt, scales = "free_x", space = "free") +
  theme(legend.position = "none")

ggsave(file = "Heat_all.png", height = 115, width = 185, units = "mm", dpi = 600)
```

## Figur 6 - PCA alle prøver

```
dsns <- subset_samples(dsnf, !is.na(Core))
amp_ordinate(dsnf,
  plot.color = "Prøvetidspunkt",
  plot.group = "chull",
  plot.label = "Individ",
  plot.label.repel = T) +
  theme_classic() +
  theme(axis.line.x = element_line(),
        axis.line.y = element_line())

ggsave(file = "PCA_all.png", height = 85, width = 150, units = "mm", dpi = 600)
```

## Figur 7 - PCA plot med kendte prøver

```
dsnfs <- subset_samples(dsnf, !is.na(Core))
amp_ordinate(data = dsnfs,
  plot.color = "Elghegn",
  plot.shape = "Prøvetidspunkt",
  plot.nspecies = 10,
  plot.species = T,
  scale.species = T,
  plot.nspecies.size = 3,
```



```

        plot.nspecies.repel = T) +
  theme_classic() +
  theme(axis.line.x = element_line(),
        axis.line.y = element_line())

ggsave(file = "PCA_kendte.png", height = 111, width = 150, units =
"mm", dpi = 600)

```

## Figur 8 - PCA plot med ukendte prøver

```

dsnfst <- subset_samples(dsnf, Samplegroup %in% "2016e")

amp_ordinate(data = dsnfst,
              plot.nspecies = 5,
              plot.species = T,
              scale.species = T,
              plot.nspecies.size = 3,
              plot.nspecies.repel = T,
              plot.color = "Prøve") +
  theme_classic() +
  theme(axis.line.x = element_line(),
        axis.line.y = element_line())

ggsave(file = "PCA_ukendte.png", height = 111, width = 150, units =
"mm", dpi = 600)

```

## Observeret

```

dsr <- subset_samples(d, sample_sums(d) > 1000) %>%
  subset_samples(Samplegroup %in% c("2015e", "2016f", "2016e", "2016S
")) %>%
  rarefy_even_depth(sample.size = 1000)

stats <- amp_stats(dsr, measures = "Observed")

```

## Figur 9 - Boksplot med alfa diversitet

```

ggplot(stats, aes(x = Prøvetidspunkt, y = Observed, color = Elghegn,
)) +
  geom_boxplot() +
  facet_grid(~Elghegn, scales = "free_x", space = "free") +
  theme(axis.text.x = element_text(angle = 90, hjust = 1))

ggsave(file = "Boksplot_observed.png", height = 85, width = 120, un
its = "mm", dpi = 600)

```

## Figur 10 Heatmap Kendte prøver

```

dsns <- subset_samples(dsn, !is.na(Core))

amp_heatmap(dsns, group = c("Heatmap", "Individ"),
            tax.aggregate = "Genus",
            tax.add = "Phylum",
            tax.empty = "best",
            plot.numbers = T,
            plot.text.size = 3,
            tax.show = 10,

```

```
color.vector = c("White", "Red")) +  
facet_grid(~Individ, scales = "free_x", space = "free") +  
theme(legend.position = "none")  
  
ggsave(file = "Heat_Elge.png", height = 115, width = 185, units = "  
mm", dpi = 600)
```

### Figur 11A - Core species Sverige-Danmark

```
dsnfs <- subset_samples(dsnf, !is.na(Core))  
amp_venn(dsnfs, group = "Core", cut_f = 100, cut_a = 0.1)  
  
ggsave(file = "Core.png", height = 75, width = 100, units = "mm", d  
pi = 600)
```

### Figur 11B - Core species Vrigstad/Målilla - Danmark

```
dsnfst <- subset_samples(dsnf, !is.na(Core2))  
amp_venn(dsnfst, group = "Core2",  
          cut_f = 100,  
          cut_a = 0.1 )  
  
ggsave(file = "Core2.png", height = 75, width = 100, units = "mm",  
dpi = 600)
```

## 10.2 Rarecurve

