



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Swedish University of Agricultural Sciences
Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science

Studie av tarmfloras sammansättning och årstidsvariation i grovtarmen hos travhästar med grovfoderdiet

Jonna Kangas

Examensarbete / SLU, Institutionen för husdjurens utfodring och vård, **422**

Uppsala 2013

Degree project / Swedish University of Agricultural Sciences,
Department of Animal Nutrition and Management, **422**

Examensarbete, 30 hp

Masterarbete

Husdjursvetenskap

Degree project, 30 hp

Master Thesis

Animal Science



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för husdjurens utfodring och vård

Swedish University of Agricultural Sciences
Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science
Department of Animal Nutrition and Management

Studie av tarmfloras sammansättning och årstidsvariation i grovtarmen hos travhästar med grovfoderdiet

Characterization of the composition and seasonal variation in the gut microbiota of trotting horses fed a forage diet

Jonna Kangas

Handledare:

Supervisor: Johan Dicksved

Bitr. handledare:

Assistant supervisor:

Examinator:

Examiner: Jan Erik Lindberg

Omfattning:

Extent: 30 hp

Kurstitel:

Course title: Degree project in Animal Science

Kurskod:

Course code: EX0552

Program:

Programme: Masters programme – Animal Science

Nivå:

Level: Advanced A2E

Utgivningsort:

Place of publication: Uppsala

Utgivningsår:

Year of publication: 2013

Serienamn, delnr: Examensarbete / Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens utfodring och vård, 422

Series name, part No:

On-line publicering:

On-line published: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: Tarmflora, 16S rRNA, T-RFLP, häst, PCR

Key words: Microbiota, 16S rRNA, T-RFLP, horse, PCR

Studie av tarmfloras sammansättning och årstidsvariation i grovtarmen hos travhästar med grovfoderdiet.



Foto: Sara Ringmark

Innehållsförteckning

Abstract	3
Sammanfattning	4
Inledning	5
Litteraturstudie	5
Hästens tarmflora	5
Magsäcken	6
Tunntarmen.....	6
Tjocktarmen	6
Träcken	7
Utfodringens betydelse på tarmfloran	7
Tarmfloras effekter på hästens hälsa.....	7
Identifiering av bakterier i tarmfloran.....	8
Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP).....	8
Kloning och sekvensering.....	8
Material och metoder	9
Material	9
Djur.....	9
Foder och utfodring.....	9
Uppsamling av träck.....	10
Metoder:	10
Urval av prover	10
DNA extraktion.....	10
Polymeras kedjereaktion (PCR)	10
Terminal restriction fragment lenght polymorphism (T-RFLP) analys	11
Kloning och sekvensering.....	11
Datautvärdering	12
Resultat	13
Resultat från T-RFLP analysen.....	13
T-RFLP profiler.....	13
Multivariat analys av T-RFLP data.....	14
Likhet mellan prover.....	15
Identifiering av bakterier.....	17
Foderproverna.....	17
Träckproverna	18
Diskussion	20
Slutsats	21
Referenser	22
Bilaga 1	25
Bilaga 2	26
Bilaga 3	26

Abstract

The purpose of this study was to investigate the seasonal and individual variation of the normal gut flora of trotting horses fed a forage diet. Horses ferment fiber in the large intestine and have a complex microbial ecosystem adapted for grazing high fiber and low energy diets. To eventually be able to learn and compare how different feeds affect and alter the microbial ecosystem in the horse's digestive tract it is good to know how the ecosystem functions in horses fed a natural feed. A greater understanding of the horse intestinal flora and biology is essential to know to prevent and treat intestinal diseases.

From 16 hard trained trotting horses have faeces and feed samples been collected over an entire year. Nine occasions for all 16 horses were analyzed to investigate the seasonal variation, and three times for four horses were analyzed for daily variation of the microbiota. In addition, duplicates were taken from six fecal samples. DNA was extracted from faecal and feed samples, the 16S gene was amplified by PCR (polymerase chain reaction) and T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) in combination with cloning and sequencing was used to analyze the profile of the microbiota.

The results of sequencing from faecal samples shows that very few bacteria were recognized from the available databases. Sequence data were dominated by sequences classified as Firmicutes with 61 % followed by Bacteroidetes with 32 %. T-RFLP, in combination with the cloning and sequencing dominated by bacteria *Prevotella* and *Clostridiales*. The result could not show any similarity between individual patterns. However, there appear to be similarities that suggest a difference between seasons. This difference suggests either a development of the intestinal flora or a dietary induced change in the intestinal flora followed by the grass horses have been eating during the summer.

Sammanfattning

Syftet med projektet var att undersöka årstids- och den individuella variationen av normala tarmfloran hos travhästar utfodrade med en grovfoderdiet. Hästar är grovtarmsjäsnare med ett komplex mikrobiellt ekosystem anpassat för betning av foder med högt fiberinnehåll och lågt energiinnehåll. För att i framtiden kunna veta och jämföra hur olika fodermedel påverkar och förändrar det mikrobiella ekosystemet i hästens mag- och tarmkanal är det av intresse att även veta hur ekosystemet ser ut hos hästar utfodrade med ett naturligt anpassat foder. En större förståelse om hästens biologi och tarmflora är väsentligt att veta för att undvika och behandla tarmsjukdomar.

Från 16 stycken hårt tränade travhästar har träck- och foderprov samlats under ett helt år. Vid 9 tillfällen har prover analyserats från alla 16 hästar för att studera mikrobiotans årstidsvariation samt vid 3 tillfällen för 4 av hästarna har prover samlats in under tre efterföljande dagar och analyserats för att studera mikrobiotans dagsvariation. Foderprov har analyserats från 6 tillfällen. Prover togs från hästarnas träck och DNA extraherades, 16S genen amplifierades med PCR (Polymeras kedjereaktion) och T-RFLP (Terminal- Restriction Fragment Length Polymorphism) i kombination med kloning och sekvensering användes för att analyserades bakteriefloras profil.

Resultatet från sekvenseringen visar att väldigt få bakterier från träckproverna tidigare var beskrivna i de använda databaserna. Sekvensdatan dominerades av sekvenser klassificerade som Firmicutes med 61 % följt av Bakteroidetes med 32 %. T-RFLP i kombination med kloning och sekvensering dominerades av bakterierna Prevotella och Clostridiales. Resultatet från T-RFLP analysen visade inte någon klustring mellan individerna. Däremot verkade det finnas likheter som tyder på en skillnad i mikrobiotan mellan årstiderna. Denna skillnad tyder på en utveckling av tarmfloran alternativt att tarmfloran förändrats till följd av det gräs hästarna fått i sig under sommarhalvåret.

Inledning

Hästens mag-tarmkanal är full av mikrober som kontinuerligt jäser de stora fibermängder som finns i hästens naturliga diet. Mikroberna är mycket viktiga för hästens näringsupptag. I dagens hästsamhälle utfodras dock många hästar med stora mängder koncentrat, vilket består till största delen av stärkelse (Gröndahl, 2011). Fibrer jäses till största del i grovtarmen medan stärkelse bryts ner till största del i tunntarmen (Frape, 2010). Stora mängder koncentrat kan därför medföra smärtsamma skador för hästen, såsom kolik (Hudson *et al.*, 2001) och fång (Clarke *et al.*, 1990). En gällande hypotes är att olika former av kolik och fång kan vara orsakade av förändringar i mikroorganism populationen i mag-tarmkanalen (Bailey *et al.*, 2004).

Förändringar av ekosystemet i hästens tarm kan få negativa konsekvenser för dess hälsa. Många hälsosfaktorer är kopplade till kvalitet på fodermedel, antal utfodringstillfällen och gräs i rasthagar (Frape, 2010). Man har bland annat kunnat påvisa att hästar utfodrade med stora mängder kolhydrater har visat tendenser på en ökad mängd av *Streptococcus bovis/equinus* där en ökad mängd av denna bakteriegrupp är förknippat en ökad risk för fång (Milionovich *et al.*, 2005; Milionovich *et al.*, 2007). Kunskapen om hästens tarmflora är dock mycket bristfällig. Genom att få mer kunskap om hur fodret inverkar på det mikrobiella ekosystemet samt hur den normala tarmfloran ser ut kan man utveckla bättre rekommendationer om hästens utfodring. Med rätt utfodring och en balans i det mikrobiella ekosystemet kan man även förebygga utfodringsrelaterade sjukdomar.

Hur tarmfloran varierar mellan årstider och olika grovfoder är dåligt känt. Det finns heller inte mycket kunskap om hur den normala eller optimala tarmfloran hos hästar ser ut. Syftet med projektet var därför att undersöka tarmfloras årstidsvariation samt individuell variation hos travhästar utfodrade med en grovfoderbaserad diet.

Litteraturstudie

Efter att ha levt många miljoner år på öppna betesmarker har hästens mag- och tarmkanal anpassat sig till fiberrikt foder som grovfoder och gräs. Dagens hästägare i Sverige tenderar att ge en mer stärkelserik diet med mindre andel grovfoder till sina hästar (Gröndahl, 2011) vilket kan orsaka problem för hästens hälsa. Stora mängder stärkelse har visat sig vara en riskfaktor för att hästen ska drabbas av kolik (Hudson *et al.*, 2001; Reeves *et al.*, 1996; Tinker *et al.*, 1997). Den största risken för kolik har i studier visat sig vara kopplade till direkta förändringar i foderstaten, till exempel, vid byte av kraftfoder, grovfoderparti eller rasthagar med gräs (Hudson *et al.*, 2001; Reeves *et al.*, 1996; Tinker *et al.*, 1997; Cohen *et al.*, 1999; Cohen *et al.*, 1995). För stora avvikelser från hästens normala föda bestående av fibrer i grovfoder kan även orsaka fång och kolik. Orsaken till dessa kan bland annat vara en negativ förändring i mikrofloran till följd av fel anpassat foder.

Hästens tarmflora

Mikrofloran i hästens tarm fyller viktiga funktioner för hästens hälsa. Den hjälper till att producera livsviktiga vitaminer och utan de mikrobiella enzymerna skulle hästen inte kunna bryta ner cellulosa och hemicellulosa till fria fettsyror. De fria fettsyrorna används sedan som näring av hästen. Den normala tarmfloran hjälper även till att förhindra patogena bakterier att växa och etablera sig i mag- och tarmkanalen. Det mikrobiella ekosystemet i hästens mag-

och tarmkanal är mycket känsligt för förändringar (de Fombelle *et al.*, 2001), exempelvis orsakade av foderbyte. Därav är foderstaten ett viktigt verktyg för att styra tarmfloras sammansättning.

Magsäcken

I hela hästens mag- och tarmkanal har man funnit streptokocker, laktobaciller och laktat-utnyttjande bakterier i digestan (de Fombelle *et al.*, 2003). Laktobaciller och streptokocker utgör en stor del av de mjölksyraproducerande bakterierna i magsäcken (Frape, 2010). Exempelvis så har *Lactobacillus salivarius*, *L. crispatus*, *L. reuteri* och *L. agalis* isolerats från sekretionsfria delar i magsäcken (Yuki *et al.*, 2000) och hos hästar utfodrade med grovfoder har man även funnit *L. mucosae* och *L. delbrueckii* (Al Jassim *et al.*, 2005). Den totala mängden bakterier i hästens magsäck kan vara upp till 10^9 cfu/ml av magsäcksinnehåll (de Fombelle *et al.*, 2003).

Tunntarmen

Ur tunntarmsinnehållet hos hästen har man funnit en bakterieflora som mest domineras av laktobaciller, enterobakterier, enterokocker, streptokocker samt laktat-utnyttjande bakterier. Till skillnad från magsäcken där laktobaciller är mest framträdande är streptokocker den mest vanliga bakteriegruppen i tunntarmen (de Fombelle *et al.*, 2003). Detta kan vara relaterat till det neutrala värdet av pH i tunntarmen vilket gynnar streptokockers tillväxt. Man har även funnit små mängder av *Clostridia sp.*, *Proteus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Pseudomonas sp.* och *Candida sp.* i tunntarmen hos häst (Julliand, 2005). Enligt de Fombelle *et al.* (2003) tenderar den totala mängden anaeroba bakterier i magsäcken samt tunntarmen vara något högre vid utfodring av koncentrat baserad diet medan den är mer stabil och likvärdig i hästens mag-tarmkanal med en grovfoder baserad diet. Den totala mängden bakterier i tunntarmen varierar mellan 10^6 - 10^9 cfu/ml av tunntarmsinnehållet beroende på del av tunntarmen hos hästar (de Fombelle *et al.*, 2003).

Tjocktarmen

Julliand *et al.* (1999) identifierade *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus* och *Fibrobacter succinogenes* som de tre huvudsakliga cellolytiska bakterierna i digestan i hästens tjocktarm. Daly *et al.* (2001) beskrev *Clostridium sp.*, *Ruminococcus sp.*, *Butyrivibrio sp.* och *Eubacterium sp.* som de viktigaste cellolytiska och fibrolytiska organismerna på tarmväggen i grovtarmen. Al Jassim *et al.* (2005) visade att *Streptococcus bovis*, *S. equinus*, *Lactobacillus salivarius*, *L. mucosae*, *L. delbrueckii* samt *Mitsuokella jalaludinii* är de mest dominanta laktat-producerande bakterierna i grovtarmens digesta, medan *Veillonella sp.* och *Megasphaera sp.* är de huvudsakliga laktat-utnyttjande bakterierna (Julliand, 2005). Beroende på vilken del av tjocktarmen man tittar på varierar den totala mängden bakterier. Exempelvis så har man hittat mellan 10^7 - 10^9 cfu/ml på tarmväggen i ceacum och colon, medan mängden i digesta uppgår till 10^{10} - 10^{12} cfu/g. (Julliand *et al.*, 2001; de Fombelle *et al.*, 2003). I en studie där DNA baserad teknik använts för att undersöka den bakteriella mångfalden på tarmväggen i hästens grovtarm kunde endast fem procent av alla erhållna sekvenser matchas mot kända bakteriearter via databaser. Ytterligare sex procent av sekvenserna kunde matchas mot sekvenser som genererats i tidigare DNA baserade studier. De återstående 89 procenten kunde dock inte matchas mot någon beskriven bakterieart. Detta indikerar på en bristfällig kunskap om hästens mikrobiella ekologi samt att mikrofloran till viss del utgörs av nya hittills okända bakteriearter som möjligtvis är unika för hästen (Daly *et al.*, 2001).

Träcken

Den totala mängden bakterier i hästens träck har man funnit vara mellan 10^{10} - 10^{12} bakterier/gram (Julliand *et al.*, 2001; de Fombelle *et al.*, 2003). Mikrofloran domineras framförallt av bakteriedivisionerna; *Firmicutes* (46 %), *Bacteroidetes* (46 %), *Verrucomicrobia* (4 %) och *Spirochaetes* (1,7 %) (Yamano *et al.*, 2008; Willing *et al.*, 2009). I en studie av Costa *et al.* (2012) analyserades den fekala mikrobiotan från sex friska hästar och tio hästar med kolik. Mikrofloran skiljde sig mellan hästgrupperna. Hos friska hästar dominerades sammansättningen av divisionerna *Firmicutes* (68 %), *Bacteroidetes* (14 %) och *Proteobacteria* (10 %). Hos hästarna med kolik fann man däremot att sammansättningen dominerades av *Bacteroidetes* (40 %) följt av *Firmicutes* (30 %) och *Proteobacteria* (18%). Den mikrobiella mångfalden i hästens träck är generellt sett dåligt känd men en studie har visat att sammansättningen tenderar till att vara olik och mer komplex än i colon eller ceacum (Sadet-Bourgeteau & Julliand, 2010).

Utfodringens betydelse på tarmfloran

Många studier visar på förändringar i hästens tarmflora när den utfodras med olika dieter (Kern *et al.*, 1973; de Fombelle *et al.*, 2001; Drogoul *et al.*, 2001; Bailey *et al.*, 2003; de Fombelle *et al.*, 2003; Berg *et al.*, 2005; Varloud *et al.*, 2005; Willing *et al.*, 2009). Utfodring med en stärkelsesrik diet har visat sig ha stor effekt på det mikrobiella ekosystemet i magsäcken. Framförallt så påverkas mängden laktobaciller och koncentrationen av mjölksyra, men även koncentrationen av flyktiga fettsyror (VFA) (de Fombelle *et al.*, 2003; Varloud *et al.*, 2007). En stärkelsesrik diet påverkar även blindtarmen och grovtarmen. Det är visat att den totala mängden av laktobaciller och streptokocker ökade i blindtarm och grovtarm hos ponnyer utfodrade med stärkelsesrik diet (Kern *et al.*, 1973; de Fombelle *et al.*, 2001). I en studie av Willing *et al.* (2009) undersöktes två olika dieters inverkan på tarmfloran. Sex varmlodiga travare i träning utfodrades i en cross-over design i 29 dagar med grovfoder med högt energiinnehåll och en mer traditionell foderstat med koncentrat och grovfoder. Träckprover samlades från alla hästar dag 7, 14, 21 och 29. Resultatet visade att med grovfoderdieten var den mikrobiella sammansättningen mer stabil än med kraftfoderdieten. Man såg även en minskning av *Streptococcus bovis/equinus* och totalantalet mjölksyrabakterier hos hästarna utfodrade med grovfoderdieten. *Lactobacillus ruminis* var förekommande hos alla hästar utfodrade med kraftfoderdieten men inte alls hos hästar utfodrade med grovfoderdieten. Kraftfoderdieten korrelerade även med en ökning av *Clostridia* cluster III och medföljande reduktion av en okänd grupp av *Bacteroidales*. Författarnas slutsats var att utfodring med grovfoderdiet kan öka hästarna hälsa och välbefinnande.

Tarmflorans effekter på hästens hälsa

En olämplig diet kan orsaka obalans i hästens mikrobiella ekosystem och förändra fermentationen av foder som i sin tur kan orsaka hälsoproblem hos hästen, såsom kolik, acidosis och fång. Stärkelse bryts ner framför allt i tunntarmen, men med ett överskott (> 0,4 % kg kroppsvikt per utfodringstillfälle, Potter *et al.*, 1992) kan stärkelsen transporteras vidare till grovtarmen för fermentering. Kolhydratslagringen i gräs består främst av fruktaner och oligosackarider och dessa metaboliseras framförallt i grovtarmen (Hoffman *et al.*, 2001). I en studie av Milinovich *et al.* (2005) studerades effekten av överutfodring av kolhydrater för att se hur en drastisk förändring i bakterietarmfloran kunde kopplas till fång. Överutfodring av oligofruktos användes för att inducera fång hos fem hästar. Fekala prover samlades in för

identifiering av bakteriefloran med 16S rRNA-gen sekvensering. Resultaten visade att en ökad mängd av släktet *Streptococcus* kunde vara en bidragande faktor till fång hos hästar. I en annan studie, av Bailey *et al.* (2003) studerades hur mängden streptokocker och laktobaciller förändrades i det fekala innehållet efter anaerob inkubation med antingen majsstärkelse eller inulin. Prover togs sedan med jämna mellanrum och bakteriemängden beräknades. Resultaten från studien visade att majsstärkelse och inulin bidrog till en ökad mängd av laktobaciller och streptokocker.

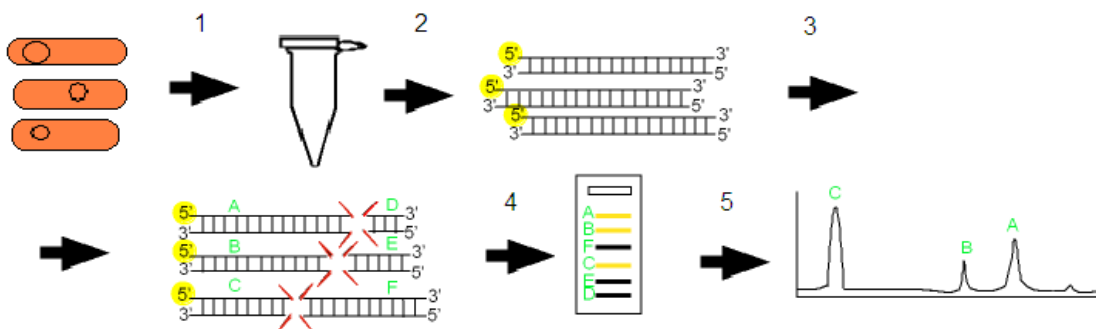
Identifiering av bakterier i tarmfloran

Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)

Terminal- restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) är en så kallad fingerprinting metod som ofta används för att karakterisera och studera dynamiken hos mikrobiella populationer. Metoden är oberoende av odling, vilket är en fördel då majoriteten av mikroorganismerna i tarmen inte kan odlas på lab. Dessutom är det en snabb, känslig och reproducerbar metod. Tekniken är PCR (Polymeras kedjereaktion) baserad, och vanligtvis används genen som kodar för 16S rRNA som markör (Osborn *et al.*, 2000). Metoden ger en profil som speglar av vilka mikroorganismer som kan finnas närvarande i ett givet prov. För att få ut information om bakteriernas identitet måste kompletterande approacher användas, exempelvis kloning och sekvensering.

Flödet för T-RFLP analysen (Figur 1) är enligt följande:

(1) Först extraheras DNA från proverna och (2) 16S rRNA genen amplifieras med PCR där åtminstone den ena av PCR primrarna är fluorescensmärkt. PCR-produkten klyvs därefter med ett restriktionsenzym (3) och (4) fragmenten separeras sen med elektrofores. Vid elektroforesen används en fluorescensdetektor vilket medför att endast de fragment som innehåller en fluorescerande markör kommer att detekteras. (5) Resultatet kommer att vara en serie av toppar (fragment) av olika storlekar och höjder som representerar profilen av provet.



Figur 1. Illustration avflödet för T-RFLP analys.

Kloning och sekvensering

Kloning och sekvensering av 16S rRNA gener är en approach som används för att identifiera bakterier eller mikrobiella ekosystem (Dicksved, 2008). Metoden är dock tidskrävande och förknippas med höga kostnader om den används i stor skala. Ett fåtal representativa prover väljs därför ofta ut för kloning och sekvensering. Resultatet från sekvenseringen, dvs. DNA sekvenser, matchas mot databaser där man får reda på vilken sorts bakterie DNA sekvensen matchar bäst.

När kloning och sekvensering används som komplement till T-RFLP, brukar ett antal representativa prover väljas ut för kloning och sekvensering. Det första steget är att amplifiera upp 16S genen. PCR produkterna ligeras därefter in i specifika vektorer som innehåller en selektion, vanligtvis antibiotikaresistensgener. Vektorerna transformeras in i kompetenta *E.coli* celler och dessa ”transformanter” selekteras fram vanligen genom att använda antibiotikaselektion. Transformanterna (som växer som kolonier på en agarplatta) screenas för dels om de har rätt storlek på sitt insert och vilken TRF storlek det inklonade fragmentet har. På så sätt kan man identifiera vilka transformanter man ska välja ut för sekvensering av inklonat fragment.

Material och metoder

Material

Djur

I studien inkluderades 16 hästar av rasen Svensk Varmblodig travare. Hästarna var födda mellan mars och juni 2009 och hade under studien en medelvikt på 459kg. Alla hästarna tränades regelbundet och hårt för sin ålder.

Foder och utfodring

Hästarna utfodrades med fri tillgång på grovfoder av kvalitén enligt Tabell 1. Tabellen visar även under vilka perioder som grovfodren har utfodrats. Utöver grovfodret har hästarna fått lusern, mineraler, Betfor®, salt och selen av den mängd som utgår i Tabell 1. Det har hela tiden funnits fri tillgång till vatten och saltsten. Foderprover har tagits under nov -10, dec -10, jan -11, maj -11 och okt -11. Foderproverna har sedan förvarats i förslutna plastpåsar vid -20°C.

Tabell 1. Näringsanalys av de olika partier av grovfoder som används i studien

Månad	okt, nov	dec	jan, mars, maj, juni/juli, aug	okt
Period	1, 2	3	4, 5, 6, 7, 8	9
Grovfoder	Grovfoder 1	Grovfoder 2	Grovfoder 3	Grovfoder 4
Torrsubstans (%)	50,2	55,9	62,2	65
Omsättningsbar Energi (MJ/kg foder)	5,5	5,7	6,8	6,9
Smältbart råprotein (gram/ kg foder)	56	51	61	47
Kalcium/Fosfor	1,1	1,3	2,3	1,9
BETE (perioder)			6, 7, 8	
Tillskottsfoder				
Lusern	1kg	1kg	250g	250g
Betfor®	100g	100g		
Mineraler	150g (Krafft röd)	150g (Krafft röd)	100g (Krafft vit)	
Extra salt				50g
Selen från Lactamin				X

Uppsamling av träck

Färska träckprover samlades in under totalt 9 perioder, med ca 1-2 månaders intervall. Första uppsamling togs oktober 2010 och den sista oktober 2011. Vid varje insamlingsperiod samlades träckprover in under tre efterföljande dagar. Efter insamling har proverna förvarats i förslutna plastpåsar vid -20°C. Under uppsamlingsdagar samt dagen innan samlingen av träck har hästarna hållits inomhus individuellt i boxar.

Metoder:

Urval av prover

Foderprover analyserades från perioderna 2, 3, 4, 5, 6 samt 9. Av träckproverna har det sista provet från varje insamlingsperiod analyserats för alla perioder. Under perioderna 1, 2, 5 och 6 analyserades dessutom samtliga insamlade prover för fyra hästar (WP, MC, GD, GT). Dubbletter togs från 6 träckprover (WP6-2, WP4-3, MC2-1, MB4-3, GT1-3, GD4-3).

DNA extraktion

DNA renades från träck- och foderproverna med QIAamp DNA Stool mini kit (QIAGEN) enligt tillverkarens protokoll, men med vissa modifieringar. Ur träckproverna borrades 3 kärnor ut (12 mm i diameter och ca 2 cm djupa) för att få ett så representativt prov som möjligt. Dessa blandades med 5ml PBS och mixades till en homogen blandning med en vortexer. Sedan togs 180-220 gram prov ut till ett skruvlocksrör innehållande 0,4g av 0,5mm glaskulor. I steg 2 användes en mini Beadbeater (Biospec products) 2x45 sekunder vid högsta hastighet, för att lysa bakteriernas cellvägg. Därefter följdes protokollet enligt tillverkarens instruktioner.

Från varje foderprov vägdes 15 gram upp i en Stomacher påse. Provet blandades med 150 ml PBS och bearbetades i Stomachern under 2 min i en hastighet av 230rpm. Därefter hälldes all vätska ur påsarna till märkta falkonrör som sedan centrifugerades under 5 min med en hastighet av 5000rpm. Pelleterade partiklar resuspenderades med ca 5 ml av supernatanten varav 500µl av suspensionen pipeterades till skruvlocksrör med 0,4g av 0,5mm glass beads. I steg 2 tillsattes 1,2ml ASL buffert och sedan homogeniserades proverna i en mini Beadbeater (Biospec) under 2x45sekunder vid högsta hastighet. Därefter följdes protokollet enligt tillverkarens instruktioner.

Från extraherade prover kontrollerades DNA koncentrationen för 20st slumpmässigt valda prover med hjälp av en BioSpec nano (Shimadzu biotech).

Polymeras kedjereaktion (PCR)

Polymeras kedjereaktion (PCR) användes för att amplifiera generna som kodar för 16S rRNA. PCR amplifiering gjordes i duplikat på alla DNA extraherade prover, totalt 178 stycken. Varje PCR reaktion innehöll 10µl Dreamtaq PCR Master Mix (Fermentas Life Science), 0,5 µl av Bovine Serum Albumin (BSA); konc. 20 mg/ml, 1 µl fluorescensinmärkt primer Bact8F-FAM (Fam- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG); konc. 10µM, 1µl av primer 926r (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'); konc. 10µM, samt sterilt vatten så slutvolymen blev 20µl.

PCRen kördes i en PCR maskin (Bio-Rad, MyCycler, Thermocycler) med följande program: 94°C under 3 min, 30 cykler av (94°C i 40 sek, 55°C i 40 sek, och 72°C i 1 min) och slutligen 72°C under 7 min. Därefter kontrollerades att PCR produkt erhöles med gel-elektrofores. För

att konfirmera att PCR produkten hade korrekt storlek användes en 100bp storleksmarkör (O'range ruler, Thermofisher scientific).

Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analys

PCR produkterna klyvdes med restriktionsenzymet FastDigest HaeIII (Fermentas Life Science). I varje klyvningsreaktion blandades 0,25 µl enzym, 16,25 µl vatten och 2,5 µl reaktionsbuffert tillsammans med 6 µl PCR produkt. Blandningen inkuberades vid 37 grader under 2 timmar. Proverna späddes därefter lika mycket med sterilt vatten och lämnades till Uppsala Genome Center för T-RFLP analys. Den T-RFLP data som genererades bearbetades först i Peak Scanner Software 1v (Applied Biosystems). I analysen inkluderades alla fragment inom storleksintervallet 50-1000 baspar. Data exporterades till Excel där varje fragments relativa mängd beräknades genom att dela arean av varje topp med den totala topparean hos samma prov. Därefter sattes ett tröskelvärde på 0,5 % där enbart de toppar med högre relativ mängd inkluderades i analysen. De toppar som inte förekom i båda duplikaten raderades och en ny profil gjordes genom att beräkna medelvärdet hos duplikaten i varje prov. I den nya profilen avrundades fragmentstorleken till heltal. En TRF datamatrix innehållandes toppstorlekar och den relativa förekomsten för varje toppstorlek skapades i Microsoft Access. I de fall där det var svårt att särskilja TRFer slogs dessa ihop för att få en säkrare bedömning.

Kloning och sekvensering

För att få identitet på de mest dominant TRFerna gjordes klonbibliotek. Extraerat DNA från sex representativa träckprover (RP1-3, HP2-3, GK2-3, GI2-3, HP5-3 och SP4-3; Bilaga 1) samt tre foderprover (foder 5, 6 och 9; Bilaga 1) användes till klonbiblioteken. DNA amplifierades i triplikat från varje prov, enligt samma protokoll som tidigare fast med skillnaden att PCRen kördes med primers utan fluorescensinmärkning. PCR produkterna laddades på en agarosgel för att kontrollera att produkt erhållits. Därefter skars DNA:t ut från gelen och renades med Qiagens gelreningskit (QIAGEN) enligt tillverkarens instruktioner. DNA koncentrationen kontrollerades sedan med Biospec-nano (Shimadzu biotech). Två DNA pooler för träckprover; A (RP1-3, HP2-3, GK2-3) och B (GI2-3, HP5-3, SP4-3) samt en pool för foderprover; C (foder 4, 5 och 6) skapades genom att poola ihop gelrenade PCR produkter. Ett klonbibliotek/DNA pool skapades enligt instruktionerna från Invitrogen, Carlsbad, CA, USA (2004). PCR poolerna klonades in i TOPO TA pCR 4,0 vektorer, följt av transformering in i *Escherichia coli* TOP 10 kompetenta celler (Invitrogen, Carlsbad, CA) så att två klonbibliotek skapades för träckproverna samt ett klonbibliotek för foderproverna.

Erhållna transformanter analyserades i en PCR maskin (Bio-Rad, MyCycler, Thermocycler) enligt samma protokoll som tidigare, med skillnaden att M13 primers riktade mot vektorn användes. Detta gjordes för att kontrollera att PCR produkten klonats in i vektorn. Förekomst och storlek på PCR produkterna kontrollerades med gelelektrofores. Därefter späddes PCR produkterna 40 ggr och användes som templat i en ny PCR med samma primers som vid T-RFLP analysen, d.v.s. Bact8F-FAM samt 926r. PCR produkterna klövs med FastDigest HaeIII, späddes 20 gånger och skickades sedan till Uppsala Genome Center för T-RFLP analys. T-RFLP resultatet analyserades i Peak scanner V1.0 och visade vilken TRF storlek de analyserade transformanterna hade. Baserat på TRF storlek valdes 31 transformanter ut för sekvensering från träckproverna samt 16 från foderproverna. Sekvenseringen utfördes av Macrogen inc. Sekvenserna matchades mot GenBank databasen med hjälp av algoritmen nukleotid BLAST vid NCBI (URL: www.ncbi.nlm.nih.gov) för att få reda på vilken sorts bakterie som sekvensen matchade med. Dessutom så användes Ribosomal Database Projekt X, (RDP 10) Sequence Match, för att göra en fylogenetisk klassificering av sekvenserna.

Datautvärdering

TRF datamatriken analyserades med hjälp av det multivariata statistikprogrammet PAalaeontological STatistics (PAST). Principal Coordinate Analysis (PCoA) användes för att hitta klustringsmönster i T-RFLP data och denna analys inkluderade alla individer och provtillfällen. En icke parametrisk multivariat variansanalys (NPMANOVA) användes för att beräkna signifikans (med Bonferroni korrektion) på det klustringsmönster som erhöles med Principal Coordinate Analysis. För att beräkna hur mikrofloran varierade över tid inom individerna, så användes ett likhetsindex (Bray-Curtis index Legendre & Legendre, 1998). Likhetsindexet användes bland annat för att beräkna mikrofloras dagsvariation, månadsvariation samt årstidsvariation.

Resultat

Alla hästar hade dagligen lämnat rester av grovfodret, vilket tyder på fri tilldelning av grovfoder. Alla hästar dokumenterades friska från utfodringsrelaterade sjukdomar under provtiden.

Resultat från T-RFLP analysen

T-RFLP profiler

TRFer detekterades inom intervallet 50- 617 baspar (bp). Totalt detekterades 114 olika TRFer, 86 TRFer i träckproverna och 28 TRFer i foderproverna. I medeltal fanns 23 TRFer per prov i träckproverna (intervall 4 - 33 TRFer/prov). I medeltal fanns 13 TRFer per prov i foderproverna (intervall 9-15 TRFer/prov).

De toppar som fanns i fler än 50 % träckproverna respektive foderproverna finns sammanställda i tabell 2 och 3. Totalt analyserades 178 prover (Bilaga 2).

Tabell 2. De 50 % vanligaste TRFerna i foderproverna

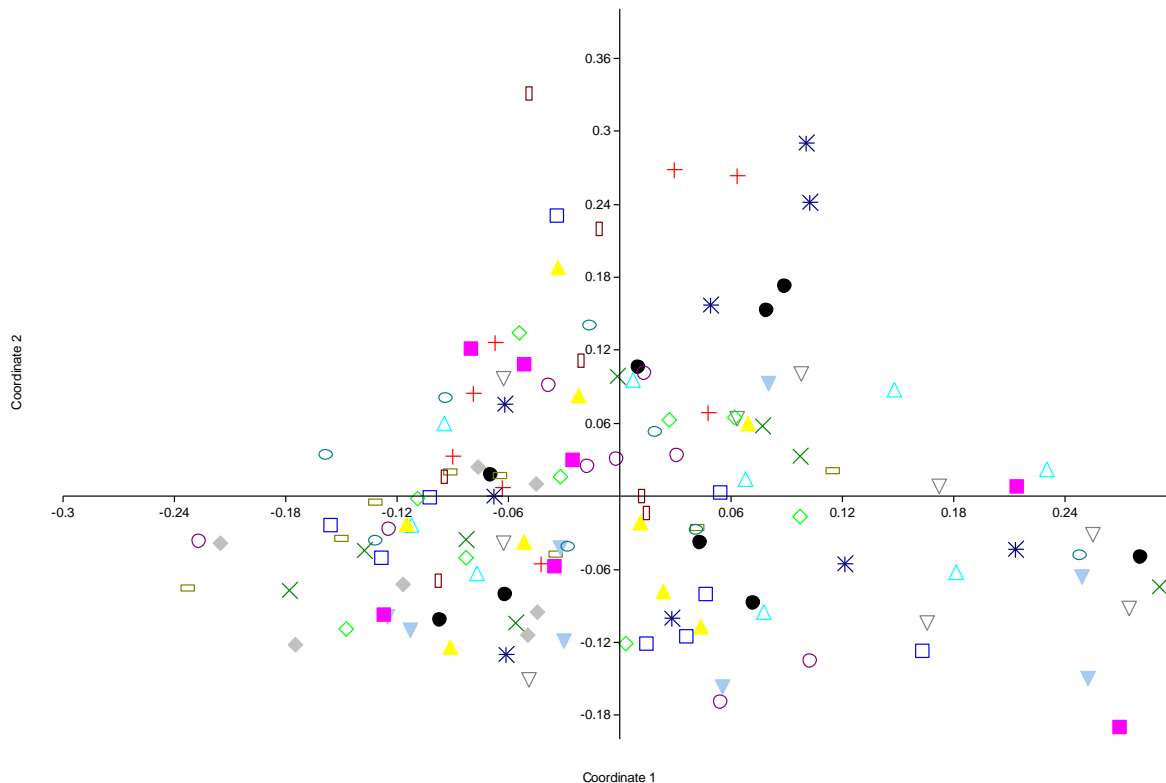
Antal baspar	Procent (%)
66	83,3
84	100
189	66,7
197	66,7
215	66,7
217	50
224	100
226	66,7
252	66,7
291	66,7
292	83,3
294	66,7
334	83,3

Tabell 3. De 50 % vanligaste TRFerna i träckproverna hos hästarna

Antal baspar	Procent (%)
91	51,7
128	71,5
197	62,8
198	54,1
228	88,4
236	95,9
246	96,5
248	90,1
254	91,9
256	98,3
259	96,5
261	99,4
271	97,7
273	94,2
287	57,6
299	88,4
300	98,3
305	61,1
316	98,3

Multivariat analys av T-RFLP data

Multivariata statistiska metoder användes för att identifiera likheter och olikheter mellan prover baserat på T-RFLP profilerna. Figur 2 visar en PCoA plot där varje symbol representerar T-RFLP data för ett prov och där varje häst är representerad av samma färg och typ av symbol. De prover som har liknande TRF profil grupperar nära varandra medan prover med olika TRF profil hamnar långt ifrån varandra i analysen. Eftersom det inte syns något klustringsmönster baserat på färg så tyder detta på att hästens mikroflora inte är individuellt unik, samt att den förändrat sig över tid.

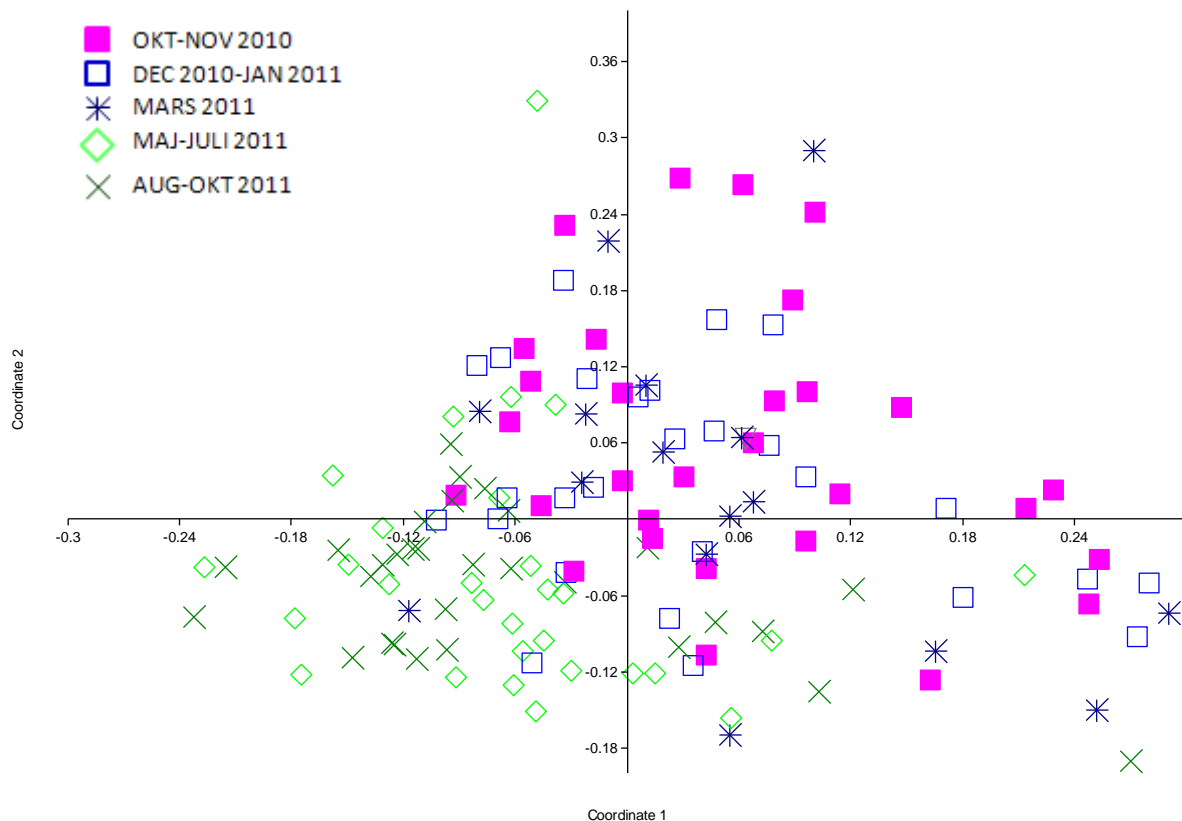


Figur 2. Principal Coordinate Analysis (PCoA) plot för T-RFLP data från träckproverna. Varje symbol motsvarar ett prov och varje färg och symboltyp motsvarar de olika hästarna. Symbolerna tenderar inte att klustra ihop efter individ.

I figur 3 motsvarar varje symboltyp och färg istället olika provtagningstillfällen. Man kan då se en viss klustring av proverna där höst och vinterproverna (okt 2010- mars 2011) tenderar att gruppera sig i den övre delen av plotten medan prover insamlade från maj 2011 generellt sett grupperar sig i den nedre vänstra delen av plotten. Det tyder dels på att det finns en skillnad i TRF mönster mellan prover som är insamlade under mars 2011 eller tidigare och under maj 2011 eller senare. Bilaga 3 visar en PCoA plot där samtliga provtagningstillfällen har en unik färg. För att validera signifikansen i klustringsmönstret användes en icke parametrisk multivariat varians analys (NPMANOVA) med Bonferroni korrektion. Den statistiska analysen visade att:

- Prover insamlade under okt- nov 2010 har ett klustringsmönster som skiljer sig signifikant från alla andra tidpunkter förutom mars 2011.

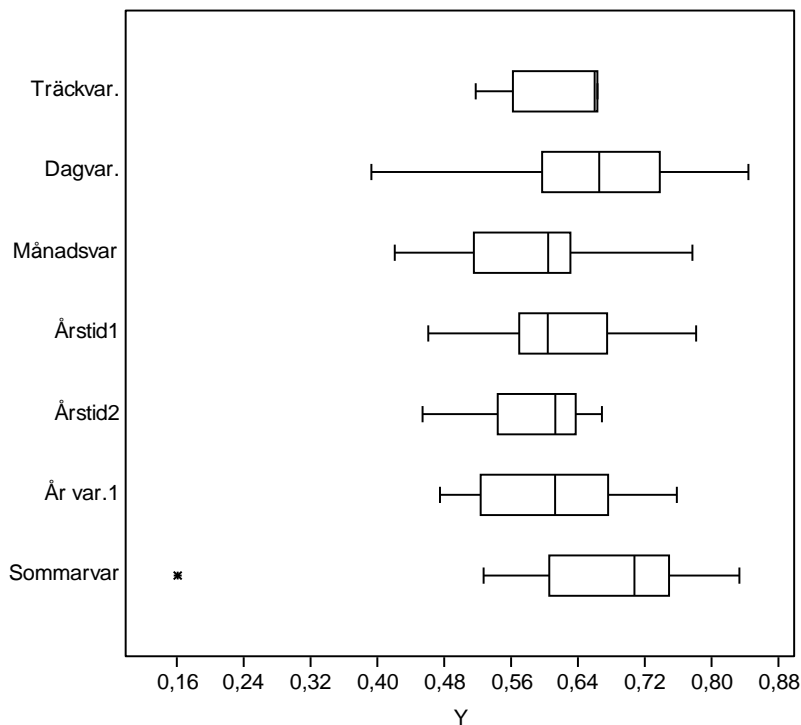
- Prover insamlade under dec 2010- jan 2011 har ett klustringsmönster som skiljer sig signifikant från alla tidpunkter förutom mars 2011.
- Maj-juli 2011 skiljer sig signifikant från övriga förutom aug-okt 2011
- Aug- okt skiljer sig signifikant från alla förutom maj- juli 2011.



Figur 3. Principal Coordinate Analysis (PCoA) plot för T-RFLP data från träckproverna. Varje symbol motsvarar ett prov och i plotten är olika tidpunkter för provtagning representerade av olika symboler och färger.

Likhet mellan prover

För att undersöka hur stabil mikrofloran var över tid så beräknades ett likhetsindex (Bray Curtis index) mellan proverna. Med hjälp av likhetsindexet gick det att få fram hur lika T-RFLP profilerna var inom en individ över olika provtagningsintervall. Variationen mellan testade prover visas i figur 4. Störst likhet fanns inom sommarproverna och den minsta likheten fanns när första och sista provtillfället jämfördes hos alla hästar, dvs för prover som samlats in med ett helt års mellanrum. Dagsvariationen i mikrofloran inom en individ är i generellt sett lägre än månadsvariationen. Variationen över en månad är inte mindre än variationen mellan olika årstider. Medianvärdet är ganska lika mellan månadsvariation, årstid 1, årstid 2 samt år.var. 1 (figur 4). Skillnader fanns även inom samma träckprov.



Figur 4. Boxplot som visar likhetsindex mellan olika prover. De horisontella linjerna visar det högsta och lägsta likhetsvärdet. Boxen visar 25-75% kvartiler samt medianvärdet för data som inkluderats. * representerar avvikande värden. Månadsvariationen är beräknad från provtillfällena 1 och 2. Årstid 1 är beräknad från provtillfällena 3 och 6. Årstid 2 är beräknad från provtillfällena 5 och 6. Årstidsvariationen 1 är beräknad på jämförelser som gjorts mellan provtillfällena 1 och 8 samt 2 och 9.

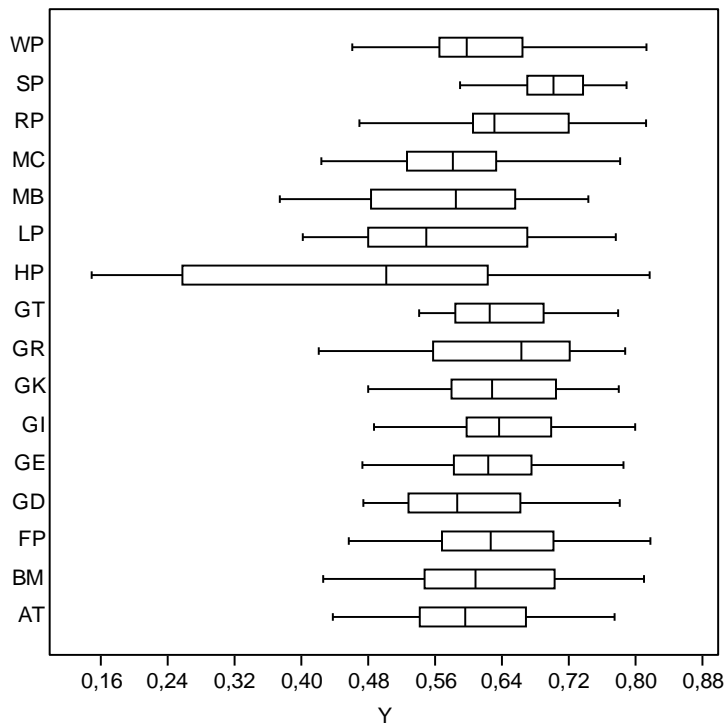
Ur vissa av träckproven har även dubletter analyserats var för sig för att se variationen i mikrofloran inom samma träckprov. Resultatet visar en stor variation även inom samma träckprov (tabell 2). Likheten visas även i Figur 4 som träckvariation.

Tabell 4 Likheten mellan dubletter ur samma träckprov

Träckprov	Likhet
GD 4-3	57 %
GT 1-3	66 %
MB 4-3	66 %
MC 2-1	52 %
WP 4-3	66 %
WP 6-2	56 %

Likhetsindexet användes även för att ta reda på hur stabil mikrofloran var inom en häst under ett år, figur 5. Mikrofloras stabilitet varierar kraftigt mellan de olika individerna. Hästen HP hade den största variationen och hade den minst stabila mikrofloran medan hästen

SP hade lägst variation och hade den mest stabila mikrofloran i jämförelse med de andra hästarna.



Figur 5. Boxplot som visar likhetsindex som beräknats inom varje hästindivid över alla perioder. De horisontella linjerna visar det högsta och lägsta likhetsvärdet och boxen visar 25-75% kvartiler samt medianvärdet för data som inkluderats. Förtydligande på hästnamn finns i Bilaga 1.

Identifiering av bakterier

Foderproverna

Från de klonbibliotek som skapats från foderproverna valdes 16 transformanter ut för sekvensering. Sekvenserna som genererades matchades mot Basic Local Alignment search tool (BLAST) i Gen Bank och erhållit resultat visade att 81 % av sekvenserna matchade mot olika typer av proteobakterier och resterande 19 % matchade mot Bacteroidetes. I tabell 5 visas de mest sannolika matchningarna (BLAST förstahandsval) för varje sekvens. Procentantalet anger hur väl sekvensen stämmer överens med referenssekvenserna i databasen. De flesta bakterier i foderproverna var igenkännbara, endast fyra sekvenser hade en sämre matchning med ett procenttal under 95 %. Detta skulle kunna innebära att dessa sekvenser kommer från nya arter som ännu inte finns beskrivna i databaserna.

Tabell 5. Sekvensresultat från 16S klonbiblioteket för foderproverna

Foderprov	TRF storlek (HaeIII)	BLAST Bästa träff	Phylum	Max identitet
1	198	Methylobacterium sp.	Proteobacteria	99 %
2	512	Xanthomonas campestris pv.	Proteobacteria	100 %
3	73	Sphingomonas sp.	Proteobacteria	99 %
4	515	Massilia sp.	Proteobacteria	99 %
5	486	Rhizobiaceae bacterium	Proteobacteria	99 %
6	310	Chryseobacterium sp.	Bacteroidetes	86 %
7	205	Methylobacterium brachiatum	Proteobacteria	91 %
8	237	Massilia sp.	Proteobacteria	99 %
9	526	Duganella zoogloeoides	Proteobacteria	99 %
10	212	Alpha proteobacterium	Proteobacteria	99 %
11	41	Xanthomonas albilineans	Proteobacteria	85 %
12	354	Sphingobacteriaceae bacterium	Bacteroidetes	99 %
13	57	Pedobacter daejeonensis	Bacteroidetes	99 %
14	526	Beta proteobacterium	Proteobacteria	95 %
15	40	Pelobacter sp.	Proteobacteria	90 %
16	227	Agrobacterium tumefaciens	Proteobacteria	99 %

Träckproverna

Från de klonbibliotek som skapats från träckproverna valdes 31 transformanter ut för sekvensering. De sekvenser som erhöles var olika de sekvenser som finns i databaserna. Matchning av sekvenserna mot sekvensdatabasen med hjälp av BLAST visade att bara fyra sekvenser av 31 testade sekvenser hade över 93 % likhet med sekvenser i databasen. 61 % av sekvenserna som BLAST föreslog närmast släktskap med var olika arter av Firmicutes, 32 % var olika arter av Bacteroidetes och 7 % var Spirochaetes. I tabell 6 visas de mest sannolika matchningarna (BLAST första träff) och procentuell likhet med bästa BLAST träff, samt vilket fylum bakterien tillhör. De vanligaste bakterierna i många av träckproverna hörde till släktet *Prevotella* och ordningen Clostridiales (Bilaga 2).

Tabell 6. Sekvensresultat från 16S klonbiblioteket för träckproverna

Träckprov	TRF storlek (HaeIII)	BLAST Bästa träff	Phylum	Max identitet
17	247	Porphyromonadaceae bacterium	Bacteroidetes	80 %
18	307	Rumen bacterium		84 %
19	63	Ruminococcus flavefaciens	Firmicutes	85 %
20	256	Order Clostridiales	Firmicutes	91 %
21	262	Eubacterium oxidoreducens	Firmicutes	88 %
22	271	Clostridium ramosum	Firmicutes	83 %
23	272	Ruminococcus sp.	Firmicutes	90 %
24	262	Prevotella sp	Bacteroidetes	90 %
25	262	Prevotella sp	Bacteroidetes	89 %
26	270	Clostridiales bacterium	Firmicutes	89 %

27	31	Pyrphyromonadaceae	Bacteroidetes	87 %
28	254	Eubacterium oxidoreducens	Firmicutes	85 %
29	31	Bacteroidaceae	Bacteroidetes	89 %
30	227	Treponema sp.	Spirochaetes	91 %
31	316	Clostridiales	Firmicutes	93 %
32	161	Fibrobacter succinogenes	Firmicutes	91 %
33	263	Clostridiales bacterium	Firmicutes	90 %
34	271	Roseburia faecis	Firmicutes	94 %
35	223	Lachnospiraceae	Firmicutes	90 %
36	259	Prevotella shahii	Bacteroidetes	88 %
37	299	Ruminococcaceae	Firmicutes	94 %
38	88	Bacteroidetes bacterium	Bacteroidetes	91 %
39	299	Ruminococcaceae	Firmicutes	92 %
40	236	Clostridiales bacterium	Firmicutes	89 %
41	237	Mogibacterium	Firmicutes	90 %
42	126	Cytophaga sp.	Bacteroidetes	82 %
43	261	Clostridium sp.	Firmicutes	91 %
44	274	Clostridium bolteae	Firmicutes	95 %
46	259	Prevotella	Bacteroidetes	87 %
47	127	Prevotellaceae	Bacteroidetes	86 %
48	272	Clostridium saccharolyticum	Firmicutes	94 %

Diskussion

Hästar utfodras med många olika fodermedel. Hur olika fodermedel påverkar hästens mikrobiella ekosystem i mag- och tarmkanalen och vidare hur det påverkar hästens välbefinnande är intressant att veta med dagens ökande intresse för djurens välfärd. Hästar är grovtarmsjäsnare med ett komplex mikrobiellt ekosystem anpassat för betning av foder med högt fiberinnehåll och lågt energiinnehåll. För att i framtiden kunna veta och jämföra hur olika fodermedel påverkar och förändrar det mikrobiella ekosystemet i hästens mag- och tarmkanal är det av intresse att även veta hur ekosystemet ser ut hos hästar utfodrade med ett naturligt anpassat foder. En större förståelse för hästens biologi och tarmflora kan vara väsentligt för att kunna undvika och behandla tarmsjukdomar.

Syftet med detta projekt var att undersöka årstidsvariationen och den individuella variationen av normala tarmfloran hos hårt tränade travhästar utfodrade med en grovfoderbaserad diet.

I den multivariata analysen av T-RFLP data (PCoA) kunde man inte se någon tendens till att hästarna individuellt klustrade ihop (figur 2). Man kunde däremot se att olika provtillfällen gav upphov till ett klustringsmönster bland proverna (figur 3). Proverna från första till sista provtillfället spred sig från övre högra hörnet till det vänstra nedre hörnet. Prover som samlats in under de första provtillfällena (oktober till november 2010) klustrade i det övre högra hörnet i plotten och i det vänstra nedre hörnet klustrade proverna som samlats in från maj 2011 till oktober 2011. Det är möjligt att förändringen kan bero på en utveckling av tarmfloran. Hästarna var endast ca 1,5 år vid provstarten och ett år äldre vid sista provtillfället. Men man kan även tänka sig att fodret spelar en stor roll för detta resultat. Under vinterhalvåret har dieten endast bestått av inplastat foder i form av hösilage eller ensilage. Senare framåt våren och speciellt under sommaren kombinerade hästarna sin diet med gräs som växer ute i betesmarkerna. Hästarna gick på bete från maj till och med augusti. En längre studie, med träckprov analyserade från två år, hade kunnat visa om denna förändring i tarmfloran påverkats av att hästen gått på bete eller om det berodde på att tarmfloran utvecklats.

Likheten mellan provernas T-RFLP profiler varierade en hel del (figur 4). Även inom samma träckprov varierade profilerna och detta resultat understryker hur viktigt det är att homogenisera träckproverna inför analysen. Man skall dock inte glömma att endast ett fåtal dubletter analyserats och ett större provunderlag skulle ge ett säkrare resultat på hur stor variationen inom ett och samma prov är. Dagsvariationen visar på en bred variation men med ett generellt sett högre likhetsindex än månadsvariationen, årstidsvariationen samt årsvariationen. Årsvariationen visar på en bred variation inom de testade proven. Mikrofloras stabilitet inom varje individ varierade en hel del (Bild 5). Speciellt mycket varierade det för hästen HP och minst för hästen SP. Enligt Willing *et al.* (2009) visade en grovfoderdiet på en mer stabil mikroflora. Ostabiliteten i mikrofloran hos hästen SP kan till exempel tyda på någon invärtes infektion/sjukdom som varit svår att se då han inte visat några sjukdomsrelaterade symptom, sjukdom såsom parasitangrepp, magsår med mera. Man kan även spekulera ifall en mer varierad mikroflora stimulerar immunförsvaret och gör hästen mer tålig vid förändringar till exempel vid foderbyten.

Träckproverna har tagits inom 2 timmar efter att hästen tömt tarmen. Detta innebär att mikroorganismer från stallmiljön och luften kan ha hunnit kontaminera träckproverna. Sannolikheten att detta skulle påverka mikrofloras sammansättning är dock låg eftersom det naturligt redan finns så stora mängder bakterier i träck.

Totalt hittades 86 olika TRFer i träckproverna. För att kunna få reda på TRFernas identitet så skapades klonbibliotek. På grund av arbetets tids- och ekonomiska ramar så skapades endast två klonbibliotek med totalt 6 prover av de totalt 178 proverna som inkluderats för T-RFLP analysen. Detta bidrog till att alla TRFer inte hittades i klonbiblioteken. Med flera klonbibliotek hade förutsättningarna att kunna korrelera fler TRFer med sekvensdata varit bättre.

De flesta av sekvenserna från foderproverna kunde klassificeras till artnivå, vilket tyder på att databaserna innehåller information om vilka bakterier som finns i grovfoder. Däremot så kunde ingen av sekvenserna klassificeras till artnivå från träckproverna. Detta kan tyda på att hästens tarmflora är unik och inte så välstuderad. I en tidigare studie av Daly *et al.* (2001) kunde man inte identifiera mer än 11 % av bakterierna till artnivå, dvs. med en homologi på över 97 % mot kända arter, medan Willing *et al.* (2009) kunde identifiera en något större andel bakterier (27 %). I en annan studie av Yamano *et al.* (2008) hade endast 3,8 % av sekvenserna mer än 97,5 % homologi med referenssekvenserna i databaserna. Majoriteten av de närmaste databasträffarna kom inte från hästens tarmflora, utan från andra djur. Mer studier som leder till en större kännedom om vilka bakterier som finns i tarmfloran hos hästen behövs.

Den största delen av sekvensdatan dominerades av sekvenser klassificerade som Firmicutes. Precis som i tidigare studier har man funnit Firmicutes som det dominerande fylumet hos friska hästar (Costa *et al.*, 2012; Yamano *et al.*, 2008; Willing *et al.*, 2009). T-RFLP i kombination med kloning och sekvensering visade att mikrofloran i denna studie dominerades av *Prevotella* och Clostridiales. Dessa bakteriegrupper är ofta förekommande vid nedbrytning av fibrer.

Slutsats

Data från studien visade att mikrofloras sammansättning inte klustrar inom individ. Däremot verkar mikrofloras sammansättning vara beroende av årstiden då det fanns skillnader i TRF profilerna mellan prover insamlade under sommar respektive vinterhalvåret. Om detta beror på en utveckling av tarmfloran eller på grund av dieten, dvs. betet hästarna har fått i sig under sommarperioden, kan dock inte denna studie ge svar på. Sekvensdata dominerades av sekvenser klassificerade som Firmicutes. Många av sekvenserna kunde dock inte klassificeras på art-nivå vilket tyder på att hästens tarmflora ännu är relativt outforskad. T-RFLP i kombination med kloning och sekvensering visade att mikrofloran dominerades av bakteriegrupper tillhörande släktet *Prevotella* och ordningen Clostridiales. Fler studier med till exempel fokus på tarmflora, bakteriemängder och arter i hästens olika tarmdelar/träck, skillnader mellan olika dieter och tarmhälsa, mer kunskap om bakterierna som finns i hästens mag- och tarmkanal samt större databaser med högre säkerhet i bakteriesökningen behövs för att bättre kunna definiera hur sammansättningen av den normala tarmfloran ser ut hos hästar.

Referenser

- Al Jassmin, R. A. M., Scott, P. T., Trebbin, A. L., Trott, D., Pollit, C. C., (2005) The genetic diversity of lactic acid producing bacteria in the equine gastrointestinal tract. *FEMS Microbiology Letters* 248: 75-81.
- Bailey, S. R., Ballion, M.-L., Rycroft, A. N., Harris, P. A., Elliot, J. (2003). Identification of equine cecal bacteria producing amines in an *in vitro* model of carbohydrate overload. *Applied Environmental Microbiology* 69: 2087-2093.
- Berg, E. L., Fu, C. J., Porter, J. H., Kerley, M. S. (2005). Fructooligosaccharide supplementation in the yearling horse: Effects on fecal pH, microbial content and volatile fatty acid concentrations. *Journal of Animal Science* 83: 1549-1553.
- Clarke, L. L., Roberts, M. C., Argenzio, R. A. (1990). Feeding and digestive problems in horses. Physiologic responses to a concentrate meal. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice* 6(2): 433-450.
- Cohen, N. D., Gibbs, P. G., Woods, A. M. (1999). Dietary and other management factors associated with colic in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1999, 215(1): 53-60.
- Cohen, N. D., Carter, G. K. Mealey, R. H., Tayler, T. S. (1995). Medical management of right dorsal colitis in 5 horses: A retrospective study (1987-1993). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1995, Vol 9(4): 272-276.
- Costa, M. C., Arroyo, L. G., Allen-Vercoe, E., Stämpfli, H. R., Kim, P. T. Sturgeon, A., Weese, J. S. (2012). Comparison of the Fecal Microbiota of Healthy Horses and Horses with Colitis by High Throughput Sequencing of the V3-V5 Region of the 16S rRNA Gene. *PLoS ONE* 7(7):e41484.
- Daly, K., Stewart, V. S., Flint, H. J., Shirazi-Beechey, S. P. (2001). Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of colonized 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology* 38: 141-151.
- Dicksved, J. (2008) *Exploring the Human Intestinal Microbiome in Health and Disease*. Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Department of Microbiology, Uppsala.
- Drogoul, C., de Fombelle, A., Julliand, V. (2001). Feeding and microbial disorders in horses 2: effect of three hay: grain ratios on digesta passage rate and digestibility in ponies. *Journal of Equine Veterinary Science* 21: 487-491.
- de Fombelle, A., Julliand, V., Drogoul, C., Jacotot, E. (2001). Feeding and microbial disorders in horses : a-effects of an abrupt incorporation of two levels of barley in a hay diet on microbial profile and activities. *Journal of Equine Veterinary Science* 21: 439-445.
- de Fombelle, A., Varloud, M., Goachet, A.-G., Jacotot, E., Philippeau, C., Drogoul, C., Jullians, V. (2003). Characterization of the microbial and biochemical profile of the different segment of the digestive tract in horses given two distinct diets. *Animal Science* 77: 293-304.

- Frape, D. (2010). Equine nutrition and feeding. 4rd edition. Blackwell Publishing Ltd, Oxford.
- Gröndahl, A. (2011). Hästägarens kunskapsnivåer och attityder angående hästutfodring. SLU, Institutionen för husdjurens miljö och hälsa, Skara. Studentarbete 350.
- Hoffman, R. M., J. A. Wilson, D. S. Kronfeld, W. L. Cooper, L. A. Lawrence, D. Sklan, and P. A. Harris. 2001. Hydrolyzable carbohydrates in pasture, hay, and horse feeds: direct assay and seasonal variation. *J. Anim. Sci.* 79:500-506.
- Hudson, J. M., Cohen, N. D., Gibbs, P. G., Thompson, J. A. (2001). Feeding practices associated with colic in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, November 15, 2001, Vol 219, No 10. Page 1419-1425.
- Invitrogen life technologies (8 april 2004). Topo Ta Cloning®.
- Julliand, V., de Fombelle A., Drogoul C., Jacotot, (2001). Feeding and microbial disorders in horses: 3-Effects of three hay: grain ratios on microbial profile and activities. *Journal of Equine Veterinary Science* 21(11): 543-546.
- Julliand, V. (2005) Impact of nutrition on the gastro-intestinal tract in horses. Applied equine nutrition. 1th Equine Nutrition Conference, Hannover, Germany. 85-103.
- Julliand, V., de Vaux, A., Millet, L., Fonty, G. (1999). Identification of *Ruminococcus flavefaciens* as the predominant cellolytic bacteria species of the equine cecum. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3738-3741.
- Kern, D. L., Slyter, L. L., Weaver, J. M., Leffel, E. C., Samuelsons, G. (1973). Pony ceacum vs. steer rumen: The effect of oats and hay on the microbial ecosystem. *Journal of Animal Science* 37: 463-469.
- Legendre, P. Legendre, L. (1998). Ecological resemblance. In: *Numerical Ecology*, 2nd English edn., Elsevier Science, Amsterdam: 247-302.
- Milunovich, G. J., Trott, D. J., Burrell, P. C., van Eps, A. W., Thoenner, M. B., Blackall, L. L., Al Jassim, R. A. M., Mortin, J. M., Politt, C. C. (2005). Changes in equine hindgut bacterial populations during oligofructose-induced laminitis. *Environmental Microbiology* 8:885-898.
- Milunovich, G. J., Trott, D. J., Burrell, P. C., Croser, E. L., Al Jassim, R. A. M., Morton, J. M., Van Eps, A. W., Politt, C. C. (2007). Fluorescence *in situ* hybridization analysis of hindgut bacteria associated with the development of equine laminitis. *Environmental Microbiology* 9 (8) : 2090-2100.
- Osborn, A. M., Moore, R. M. Timmis, K. N. (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology* 2 (1): 39-50.
- Potter, G. D., F. F. Arnold, D. D. Householder, D. H. Hansen, and K. M. Brown. 1992. Digestion of starch in the small or large intestine of the equine. *Pferdeheilkunde* 1:107-111.

- Reeves, M. J., Salman, M. D., Smith, G. (1996). Risk factors for equine acute abdominal disease (colic): Results from a multi-center case-control study. *Preventive Veterinary Medicine*, Vol 26, issue 3-4, page 285-301.
- Sadet-Bourgeteau, S., V. Julliand. (2010). Equine microbial gastro-intestinal health. *European Assosiation for Animal Production* 128: 161-182.
- Tinker, M. K., White, N. A., Lessard, P., Thatcher, C. D., Pelzer, K. D., Davis, B., Carmel, D. K. (1997). Prospective study of equine colic incidence and mortality. *Equine veterinary Journal*, Vol 29, issue 6, page 448-453.
- Varloud, M., Fonty, G., Roussel, A., Guyonvarch, A., Julliand, V. (2007). Postprandial kinetics of some biotic and abiotic characteristics of the gastric ecosystem of horses fed a pelleted concentrate meal. *Journal of Animal Science* 85: 2508-2516.
- Willing. B., Vörös. A., Roos. S., Jones. C., Jansson. A., Lindberg. J.E. (2009) Changes in faecal bacteria associated with concentrate and forage-only diets fed to horses in training. *Equine vet. J.* 41, 908-914.
- QIAamp® DNA Stool Handbook (April 2010). Qiagen, Sample & Assay Technologies, andra upplagan, s. 15-18.
- Qiagen Qiaquick® spin handbook (Nov 2006). Qiaquick® Gel Extraktion Kit protocol. Qiagen, Sample & Assay Technologies.
- Yamano, H., S. Koike, Y. Kobayashi., H. Hata. (2008) Phylogenic analysis of hindgut microbiota in Hokkaido native horses compared to light horses. *Animal Science Journal* 79 (2): 232-242.
- Yuki, N., Shimazaki, T., Kushiro, A., Watanabe, K., Uchida, K., Yuyama, T., Morotini, M. (2000) Colonization of the stratified squamous epithelium of the non-secreting area of the horse stomach by *Lactobacilli*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5030-5034.

Bilaga 1

Foderprover tagna

1: 101119

3: 101219

4: 110119

5: 110318

6: 110518

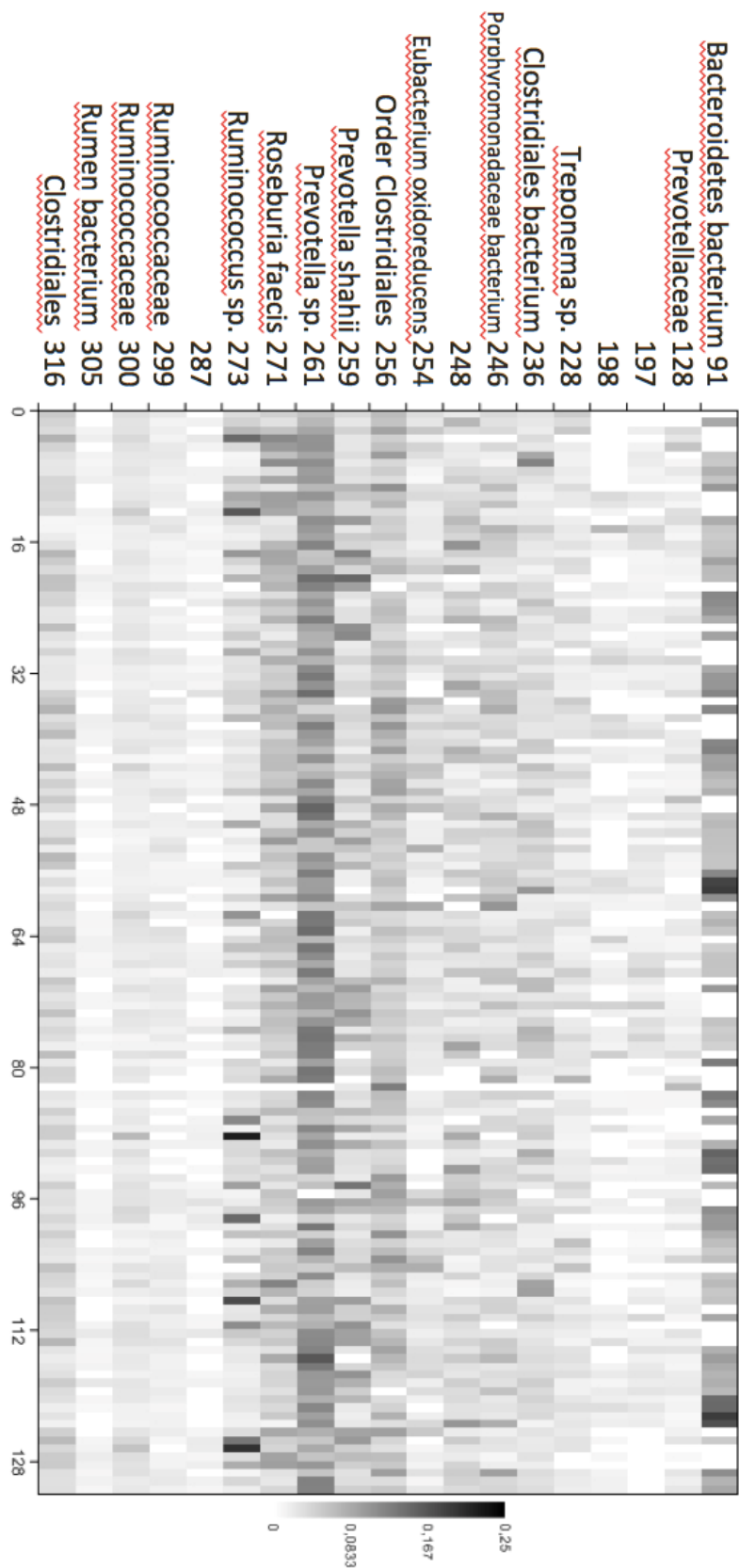
9: 111019

Tabell 1. Alla tillfällen när prov tagits för träckanalys. Totalt togs ett träckprov under tre efterföljande dagar från alla hästar. För samtliga hästar analyserades den tredje provdagens prov (markerat som 3 i tabellen) men för några av hästarna analyserades även prover från de två tidigare dagarna (markerat som 1 och 2 i tabellen). Dubbletter tog från några träckprov, dessa är understrukna, markerade med fet stil samt blåa i tabellen. X symboliserar att prov ej

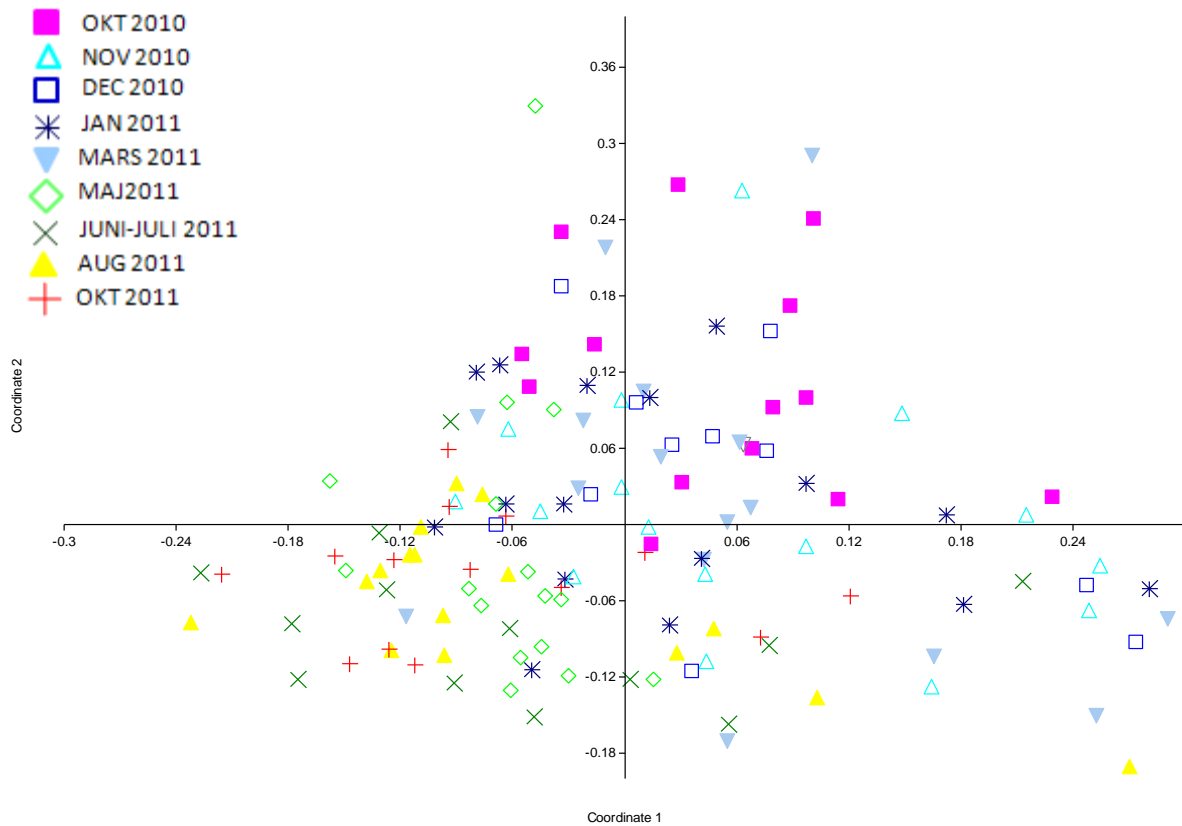
Provtillfälle		okt- 10	nov- 10	dec- 10	jan- 11	mar- 11	maj- 11	juni/juli - 11	aug- 11	okt- 11
Namn		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Fabian	FP	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Lasken	LP	3	3	X	3	3	3	X	3	3
Hjalmar	HP	3	3	X	3	3	3	3	3	3
Robert	RP	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Gypsy King	GK	3	3	X	3	3	3	3	3	3
Sunpower	SP	X	3	X	3	3	3	3	3	3
Gretzky	GR	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Gimli	GI	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Tor	AT	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Windy	W P	1 2 3	1 2 3	3	<u>3</u>	1 2 3	<u>1 2</u> 3	3	3	X
Be Mine	B M	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Mordor	M B	3	3	X	<u>3</u>	3	3	X	3	3
Mon Cheri	C	1 2 3	<u>1</u> 2 3	3	3	1 2 3	1 2 3	3	3	3
Glory Days	GD	1 2 3	1 2 3	3	<u>3</u>	1 2 3	1 2 3	3	3	3
Groggen (Gin Tonic)	GT	1 2 <u>3</u>	1 2 3	3	3	1 2 3	1 2 3	3	3	3
Golden Eye	GE	3	3	3	3	3	3	X	3	3

Bilaga 2

Bilden visar en heatmap över de T-RFLP profiler som detekterades inom intervallet 50-617 baspar och som förekom i mer än 50 % i träckproverna. TRFernas identitet (bakterienamnen) är baserade på korrelationer med data från kloning och sekvensering. Varje kolumn representerar en TRF och varje rad ett prov. Färgskalan representerar den relativa förekomsten av TRFerna där mörkare färg representerar en högre relativ mängd. Figuren visar att de vanligaste bakterierna i hästens bakterieflora är *Prevotella* och *Clostridiales*.



Bilaga 3



Principal Coordinate Analysis (PCoA) plot för T-RFLP profiler från hästräck insamlade vid olika tidpunkter. Varje symbol motsvarar ett prov (en T-RFLP profil). I plotten har olika tidpunkter för provtagning olika symboler och färg.

I denna serie publiceras examensarbeten (motsvarande 15, 30, 45 eller 60 högskolepoäng) vid Institutionen för husdjurens utfodring och vård, Sveriges lantbruksuniversitet. Institutionens examensarbeten finns publicerade på SLUs hemsida www.slu.se.

In this series Degree projects (corresponding 15, 30, 45 or 60 credits) at the Department of Animal Nutrition and Management, Swedish University of Agricultural Sciences, are published. The department's degree projects are published on the SLU website www.slu.se.

Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap
Institutionen för husdjurens utfodring och vård
Box 7024
750 07 Uppsala
Tel. 018/67 10 00
Hemsida: www.slu.se/husdjur-utfodring-varld

*Swedish University of Agricultural Sciences
Faculty of Veterinary Medicine and Animal
Science
Department of Animal Nutrition and Management
PO Box 7024
SE-750 07 Uppsala
Phone +46 (0) 18 67 10 00
Homepage: www.slu.se/animal-nutrition-management*