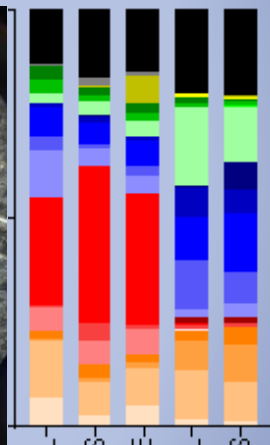
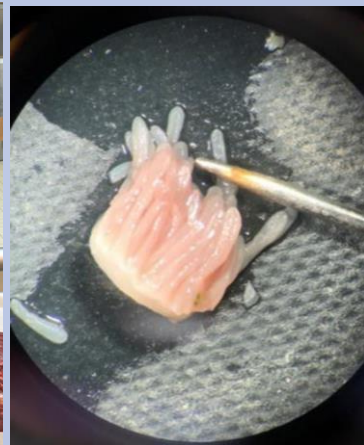




DANMARKS
JÆGERFORBUND

KØBENHAVNS
UNIVERSITET



FORDØJELSESSYSTEMETS ANATOMI OG BAKTERIOLOGI HOS EUROPÆISKE RÅDYR (*Capreolus capreolus*)

BIDRAGYDERE

Anne Sofie Hammer, Københavns Universitet

Carsten Riis Olesen, Danmarks Jægerforbund

Martin Iain Bahl, DTU FOOD

Lars Andresen, Københavns Universitet

Michelle Lauge Quaade, Københavns Universitet

Oliver Lykke Honoré, Københavns Universitet

Lena Rabjerg, Danmarks Jægerforbund

Frederikke Foged, Københavns Universitet

Nicoline Skandov, Københavns Universitet

Ulrik Ørskov, Københavns Universitet

Mia Albert, Københavns Universitet

Pernille Pedersen, Københavns Universitet

Benedicte Kragh, Københavns Universitet

Jesper Skelbæk Berntsen, Københavns Universitet

Caroline Elisabeth Berner, Københavns Universitet

INDHOLD

Bidragydere	1
1 Baggrund	3
2 Opsummering af resultater og konklusioner	4
3 Introduktion	7
3.1.1 Rådyret er en ruminant	7
3.1.2 Adgang til foder	7
3.1.3 Sæsonbetinget fødevalg	7
3.1.4 Vommens anatomiske udformning hos rådyr	7
3.1.5 Mikrobiel sammensætning af tarmen har betydning for drøvtyggerens forbrænding.....	8
4 MATERIALER.....	10
5 RESULTATER OG DISKUSSION	10
5.1.1 Sygdomsforekomst og parasitologiske undersøgelser	10
5.1.2 Vompapillernes sæsonvariation hos danske rådyr.....	12
5.1.3 Rådyrs fødevalg belyst ud fra vomprøver fra nedlagte dyr	13
5.1.4 Adgang til foder og indflydelse på fordelingen af næringsstoffer i vommen.....	16
5.2 Rådyrets vom- og tarmmikrobiota.....	17
5.2.1 Mikrobiota metodestudier	17
5.2.2 Forskelle på phylum-niveau.....	18
5.2.3 Forskelle i den mikrobielle sammensætning i vom og tarm.....	19
5.2.4 Forskelle på genus-niveau	19
5.2.5 Geografiske forskelle i den mikrobielle sammensætning i vom og tarm	21
5.2.6 Næringsstoffers indflydelse på den mikrobiotiske sammensætning	23
5.2.7 Den mikrobielle sammensætning i tarmen hos dyr med sygdom.....	25
6 Litteraturliste.....	28

1 BAGGRUND

Denne rapport samler de nyeste resultater fra forskning vedrørende fordøjelsessystem og føde for dansk råvildt (*Capreolus Capreolus*). Projektet er udført i perioden 2018-2020 som et samarbejde mellem Danmarks Jægerforbund, DTU FOOD og forskningsgruppen for Smådyr og Vildtpatologi under sektion for Patobiologi på Institut for Veterinær- og Husdyrvidenskab på Københavns Universitet. Projektet har været finansieret af forskningsbevillinger fra Miljøstyrelsen og 15. Juni Fonden.

Formålet med denne undersøgelse har været at øge forståelsen for rådyrets tarmøkologi, herunder øge viden om hvilke mikroorganismer, der forekommer i rådyrets mave og tarm, og samtidig undersøge effekten af rådyrs adgang til foder på mave- og tarmkanal og den mikrobielle sammensætning og dermed være med til at danne grundlag for vidensbaseret vildtforvaltning.

En del af de præsenterede resultater er udarbejdet i forbindelse med specialeprojektet; "Mikrobiota pilotstudie og det danske råvildts ruminale slimhindeoverfladeareal i relation til sæson, udfodring, vægt og sygdom" af Jesper Skelbæk Berntsen og Ulrik Ørskov, der afsluttede deres speciale på veterinærstudiet i 2019 (Vejledere Anne Sofie Hammer og Carsten Riis Olesen).

Rapporten fremlægger resultater og inddrager anden litteratur, dels for at øge læserens forståelse for de undersøgte problematikker, og dels for at sætte resultater i perspektiv til tidligere forskning på området. Rapporten er udarbejdet i et sprog, som søger at øge tilgængeligheden af de fundne resultater for borgere interesseret i den danske vildtforvaltning, men som ikke har umiddelbare forkundskaber inden for det veterinære eller biologiske felt. Hertil har det dog været nødvendigt at foretage visse afvejninger for stadig at bevare en retvisende ordlyd.

Undersøgelsen er baseret på materiale fra jagtskudte rådyr. Vi vil gerne takke jægere i alle de involverede områder for deres store hjælp og tålmodighed i forbindelse med prøveindsamlinger. Mads Flinterup takkes for kommentering af manuskriptet til rapporten.

2 OPSUMMERING AF RESULTATER OG KONKLUSIONER

Dette afsnit opsummerer projektets mest væsentlige resultater og konklusioner.

Undersøgelsen tyder på en generelt høj sundhedsstatus i maver og tarmkanal hos de undersøgte dyr i alle områder. Generelt er der i alle områder, der indgik i undersøgelsen, påvist meget få dyr med sygdomsmæssige forandringer i formaver, løbe og tarmkanal hos raske jagtskudte rådyr. Kun i ganske få dyr, der blev nedlagt i forbindelse med almindelig jagtmæssig aktivitet, er der påvist milde sygdomsmæssige fund i vom og tarmkanal.

Blandt de dyr der indgik i undersøgelsen havde i alt 17 dyr sygdomsmæssige forandringer. Ud af disse dyr havde 6 meget milde og formodentlige ubetydelige lejlighedsfund og 5 dyr havde tegn på diarre og afmagring. Hovedparten af dyrene med diarre var fra Fyn. Hvor syge dyr indgår i analyserne er det angivet. Det var i øvrigt ikke muligt at påvise en højere andel af sygdomsmæssige fund hos jagtskudte dyr med adgang til udlagt foder, sammenlignet med dyr der ikke havde adgang til foder.

Ved parasitologisk undersøgelse af 58 dyr fra 3 områder blev især påvist gastrointestinale parasitter (hyppigst Strongylide og Capillaria-æg). Massiv forekomst af parasitter blev kun påvist hos raske dyr og ingen af de undersøgte syge dyr havde sygdomsmæssige fund, der tyder på massive/alvorlige parasitinfektioner i lever, formaver, løbe eller tarm. Der er generelt påvist meget stor individuel variation i parasitologiske fund (både hvad angår arter og antal), men der er i de undersøgte områder ikke fundet indikationer på, at arter eller antal er påvirket af geografiske forhold eller fodring. Der er heller ikke påvist flere parasitter eller andre arter hos syge dyr (herunder dyr med råvildtsyge) eller hos dyr med adgang til foder. Denne undersøgelse tyder heller ikke på, at parasitinfektion er den udløsende årsag til diarre og afmagring hos de fynske rådyr. Dette underbygges både af de generelt varierende parasitologiske fund, hvor de syge dyr ikke skiller sig ud, hverken når det gælder arter påvist eller patologiske fund der kan relateres til parasitinfektioner i de syge dyr. Andre mulige årsager, som endnu er uafklarede, kunne være enteropatogene virusinfektioner.

Slimhindens overflade i vommen blev undersøgt hos adulte og raske danske rådyr (n=63), som var inddelt i 6 kategorier efter årstid (forår, efterår og vinter) og dyr med adgang til udlagt korn og majskeer (kornfodrede eller ikke-kornfodrede). Dyrene blev opdelt i kornfodrede og ikke-kornfodrede ud fra, om vi ved fødeanalyser finder korn og majskeer i materiale fra dyrets vom. Undersøgelsens resultater viste, at ændringen i struktur og ydre form på papillerne gennem sæsonerne, samt ændringen i vommens slimhindeoverfladeareal både er markant og signifikant. Overfladearealet er størst om foråret, mindre i efteråret og mindst om vinteren. I vintersæsonen så vi desuden en signifikant positiv sammenhæng mellem dyr med adgang til foder og et større overfladeareal af vom slimhinden. Undersøgelsen tyder på, at hvor rådyr har adgang til udlagt foder kan det udgøre en betydelig del af dyrenes energioptag i vinterperioden.

Undersøgelsen af vom og tarm mikrobiota blev indledt med et metodestudie, hvor forskellige indsamlings- og analysemetoder blev sammenlignet. Vi sammenlignede indledningsvist to metoder til prøveudtagning med henblik på at foretage prøveindsamling fra vildtlevende rådyr. Ved prøveudtagningsmetode 1. colon-metoden - blev et cirka 20 cm. langt stykke af tyktarm (colon) indsamlet i en prøvebeholder og nedfrosset. Efterfølgende blev tarmindehold udtaget fra tarmstykket. Ved prøveudtagningsmetode 2. colon indholds-metoden - udtages colon indhold direkte i et prøverør i felten. Sidstnævnte metode er mere tidskrævende i felten og stiller et højere krav til hygiejnemæssige forhold (rene handsker, underlag og sterile

engangsredskaber til udtagningen), og den er derfor mindre velegnet, hvis jægere skal udtage prøver i forbindelse med almindelig jagt. Til gengæld er det ikke nødvendigt at optø prøven i forbindelse med udtagning i laboratoriet. Sidstnævnte metode er derfor mere skånsom for prøven. Undersøgelsens resultater viste at colon-metoden resulterer i en signifikant lavere α -diversitet ved shannon-indeks: 125mg: $p < 0,01$ og 50mg: $p = 0,05$ og artsrigdommen (antal observerede amplicon typer [ASV]): 125mg og 50mg: $p < 0,05$. Dog finder vi også, at selvom der er signifikant forskel på prøveudtagningsmetoden, er forskellen ikke særlig stor, jf. en meget høj grad af korrelation mellem de to metoder for både Shannon diversitets indeks ($r = 0,97$) og for artsrigdom ($r = 0,95$). Begge metoder vurderes derfor at være anvendelige, men hvis metoderne kombineres i undersøgelser, skal man være opmærksom på eventuel sampling bias. Til de prøver, der indgik i mikrobiota studier i dette projekt (bortset fra dobbelte prøver, der indgik i metodestudiet), har vi anvendt den mere skånsomme colon indholds-metode ved indsamling. Der blev indledningsvist også sammenlignet to analysemetoder til mikrobiota analysen, hvori der indgik forskellig mængde prøvemateriale. Vi fandt, at de to prøvestørrelser ikke medførte signifikant forskel i resultater, hvorfor der i fremtidige mikrobiota-undersøgelser af råvildtets colon-indhold kan anvendes den mindste og mindre arbejdskrævende prøvestørrelse.

Undersøgelser af mikrobiota i vom og colon omfattede prøver fra i alt 85 rådyr, heraf 17 dyr med sygdomsmæssige forandringer. Undersøgelserne har bidraget med ny viden om den mikrobielle sammensætning i tarmen hos rådyr. Viden om den mikrobielle sammensætning i vom og tarm hos raske rådyr er et nødvendigt grundlag for at kunne fortolke bakteriologiske fund i tarmen hos syge rådyr og afdække sygdomsmæssige sammenhænge. Uden kendskab til hvad der er normalfund, vil det ikke været muligt at afgøre, om eventuel påviste bakterier kan være relateret til sygdom.

Ved at sammenligne data fra denne undersøgelse med tidligere publicerede artikler fandt vi, at colon-mikrobiota hos europæisk råvildt adskiller sig fra den, der er beskrevet hos sibiriske råvildt både på række (phylum)- og slægt (genus)-niveau. Endnu større adskillelse sås ved sammenligning af europæiske rådyr med wapitihjorte, nordamerikanske elge og malkekvæg. Undersøgelsen bekræfter tidligere studier, at rådyr har deres egen vom og tarm mikrobiota, som er forskellig fra den man ser hos andre arter. Undersøgelsen viser også mere overraskende, at der inden for danske rådyrpopulationer tilsyneladende er tydelige geografiske forskelle i vom og tarm mikrobiota. Her var der en tydelig opdeling i forhold til prøvetagningslokalitet for vom prøver, som indikerer at dyrenes mikrobiota i nogen grad kan sammenkædes med lokalitet.

I de efterfølgende analyser har vi undersøgt sammenhænge mellem mikrobiel sammensætning i vom og tyktarm og koncentrationen af en række næringsstoffer fundet i dyrene med fokus på råprotein (FP), ikke-fordøjeligt fiber (NDF), samt kunstigt foder (AF). Den mest tydelige sammenhæng fandt vi for råprotein, hvor vi så at mikrobiota sammensætningen i både vom og colon generelt er mere ens for dyr med hhv. lav, mellem og højt råprotein indhold end på tværs af disse grupper. På Bornholm er der påvist laveste niveauer af råprotein, hvilket er foreneligt med at rådyrene ikke havde adgang til udbragte fodermidler som korn og majs-kerner og, at disse heller ikke fandtes ved de udførte fødeanalyser (på nær hos et enkelt dyr).

Nogle dyr, særligt fra Fyn, udviste symptomer på diarré eller havde på anden måde sygdomsmæssige forandringer der indikerede sygdom i mave og tarmsystemet. Disse dyrs mikrobiota ser tilsyneladende ud til at gruppere sig samlet, særligt for prøver taget fra vommen. Da det største antal syge dyr (diarre m.m.) blev indsamlet på Fyn, sammenlignede vi mikrobiota i dyr fra Fyn med alle andre dyr. Her fandt vi at kun slægten *Anaerovibrio spp.* adskilte de to grupper med signifikant højere relativ forekomst af

denne slægt i vom-indhold i dyr fra Fyn sammenlignet med de andre lokaliteter. I Colon fandt vi ved direkte sammenligning (Man Whitney test) også en signifikant forskel for *Anaerovibrio spp.* *Anaerovibrio* er lipolytiske bakterier der nedbryder triglycerider og hydrolysater af triglycerider. *Anaerovibrio spp.* er i litteraturen beskrevet som en vom og tarmbakterie der kan have mulig effekt på stofskiftet, samt kan have en negativ effekt på vægtøgning og give diarre hos grise. Det er desuden beskrevet hos får og malkekvæg, at niveauer af *Anaerovibrio spp.* i vom mikrobiota kan stige som følge af tilpasning til en letfordøjelig, kornholdig diæt.

Konklusivt er der ikke påvist resultater eller tendenser i analyseresultaterne, der tyder på, at diarre og afmagring hos de fynske rådyr kan relateres til en generel ubalance i den mikrobielle sammensætning i mave eller tarmkanal hos dyrene, men der er nogen fælles karakteristika hos syge dyr og dyr fra Fyn, især niveauet af bakterien *Anaerovibrio spp.* som er interessante at undersøge nærmere.

3 INTRODUKTION

3.1.1 Rådyret er en ruminant

Rådyret er en drøvtygger eller ruminant ligesom eksempelvis kvæg, hvilket vil sige at den fordøjer sin føde i 2 trin, først ved at indtage føde og dernæst gylpe det op, tygge det igen og synke det igen. Fødedele, som er delvist nedbrudt af vommens fordøjelsesprocesser, kan separeres og nedbrydes yderligere, når drøvtyggeren igen bearbejder det i mundhulen. Drøvtygningen foregår uden for de aktive ædeperioder, når dyret hviler sig, og kan vare fra ganske kort tid, hvis føden er let fordøjelig og fattig på fibre, til at vare timer, hvis føden er tungt fordøjeligt og med højt fiberindhold. Mikroorganismer i rådyrets formave og tarmsystem nedbryder cellulose til næringsstoffer, som rådyret kan leve af. Sammenlignet med større domesticerede drøvtyggere er rådyrene ikke så effektiv i sin nedbrydning af cellulose (Hofmann, 1989). Rådyret tilhører en gruppe af drøvtyggere, der kaldes "browsere", og ligesom elgen har rådyret et meget selektivt indtag af føde med høj næringsværdi og lavere fiberindhold (Claus et. al, 2008, Hofmann, 1989).

3.1.2 Adgang til foder

Gennem rapporten anvender vi betegnelserne: "rådyr med adgang til foder" og "rådyr uden adgang til foder" ud fra det enkelte dyrs fødevalg belyst ved analyser af vomindholdet. Alle rådyr der indgår i undersøgelsen, er nedlagt i vintermånederne hvor det er vores vurdering, at adgang til korn- og majskeer alene er sket som følge af, at mennesker har udbragt dette foder med formålet at fodre fasaner eller hjortevildtet. Det er vores antagelse, at dyr der indgår i dette materiale, som ikke har korn- eller majskeer i vomindholdet, ikke har haft adgang til foder.

3.1.3 Sæsonbetinget fødevalg

Fra begyndelsen af planternes vækstsæson har rådyr adgang til naturligt forekommende letfordøjeligt føde.

Modsat er der i vinterhalvåret ikke naturligt adgang til større mængder af letfordøjelig føde, og rådyrene må derfor indtage føde, der grundet det højere celluloseindhold er sværere at nedbryde (Holand et. al, 1998). Studier på rådyrets fødevalg i vinterhalvåret i forskellige lande har vist, at rådyr i Polen æder op til 90 forskellige plantearter, mens resultater fra Finland og Storbritannien viste hhv. 17 og 11 planterarter. I Finland så man desuden, at rådyrenes fødevalg varierede fra år til år afhængigt af snedækkets tykkelse (Pekka, 1980). Desuden vil rådyrene i vinterperioden dække op til 20% af deres energibehov med opbyggede energireserver i kroppen (Holand et. al, 1998).

3.1.4 Vommens anatomiske udformning hos rådyr

Hos rådyret såvel som hos andre drøvtyggere danner overfladevævet i dyrets vom såkaldte papiller, som er små udposninger, der kan øge det absorberende overfladeareal 16-38 gange i forhold til vommens grundareal uden papiller (Robbins, 1993, Hoppe et. al, 1977), og er dermed afgørende for hvor meget næring der kan optages.

Biota-producerede flygtige fedtsyrer er en meget vigtig energikilde og kan udgøre så meget som 75% af en drøvtyggers energiforsyning (Soest, 1994). Fedtsyrerne optages gennem papillernes overflade, hvis størrelse tilpasses efter behovet for optag. Nogle foderemner vil stimulere papillerne til at blive længere, mens andre vil gøre dem kortere. Indtager drøvtyggeren fødeemner, som fører til en øget produktion af flygtige fedtsyrer som smørsyre og propansyre, stimuleres blodtilførslen og celledelingen i papillerne. Dette fører til vækst af papiller, og vommens overfladeareal vil dermed øges sammen med

næringsoptaget. Da andelen af biota-producerede fedtsyrer vil afhænge af de indtagne fødeemner, og da fødeemnerne varierer i kvalitet med sæsonen, vil vompapillerne også ændre sig i størrelse alt efter årstiden (Hofmann, 1989). Et studie fra 2008 viser desuden, at rådyr har en mere ensartet størrelse og fordeling af papillerne de forskellige steder i vommen i sammenligning med muflonfåret, som også er en drøvtygger. Dette skyldes, at muflonfår i højere grad er grazere og indtager en større mængde græs med et større cellevægs- og tørstofindhold (fiberindhold) end rådyret, som er en selektiv browser (Clausen et al., 2008).

3.1.5 Mikrobiel sammensætning af tarmen har betydning for drøvtyggers forbrænding

I drøvtyggeren findes en bred vifte af mikroorganismer, såsom bakterier, svampe og protozoer, som alle indgår i et symbiotisk forhold med drøvtyggerværten, hvoraf bakterierne har den vigtigste rolle i nedbrydning af føde (Russell et al., 2001, Robbins, 1993). Disse bakterier producerer en række fibernedbrydende enzymer, som drøvtyggeren ikke selv kan producere, og nedbryder således planternes cellevægge bestående af cellulose, hemicellulose og lignin til let optagelige sukkerstoffer. De iltfrie forhold, der er i vommen, resulterer i en anaerob mikrobiel metabolisering, som fører til dannelse af biprodukter som propan- og smørsyre, der er flygtige fedtsyrer, som for drøvtyggeren er en meget værdifuld energikilde (Russell et al., 2001, Robbins, 1993).

Udover at mikrobiotaen muliggør optagelse af energi, der ellers var utilgængelig for drøvtyggeren, inhiberer den også proliferation af patogene bakterier i tarmen, syntetiserer vitaminer, der udnyttes af værten, bidrager til udviklingen af immunsystemet, stimulerer til produktionen af antimikrobielle stoffer og nedbryder toksiske stoffer i føden (Kim et al., 2018, Krause et al., 2013, Russell et al., 2001).

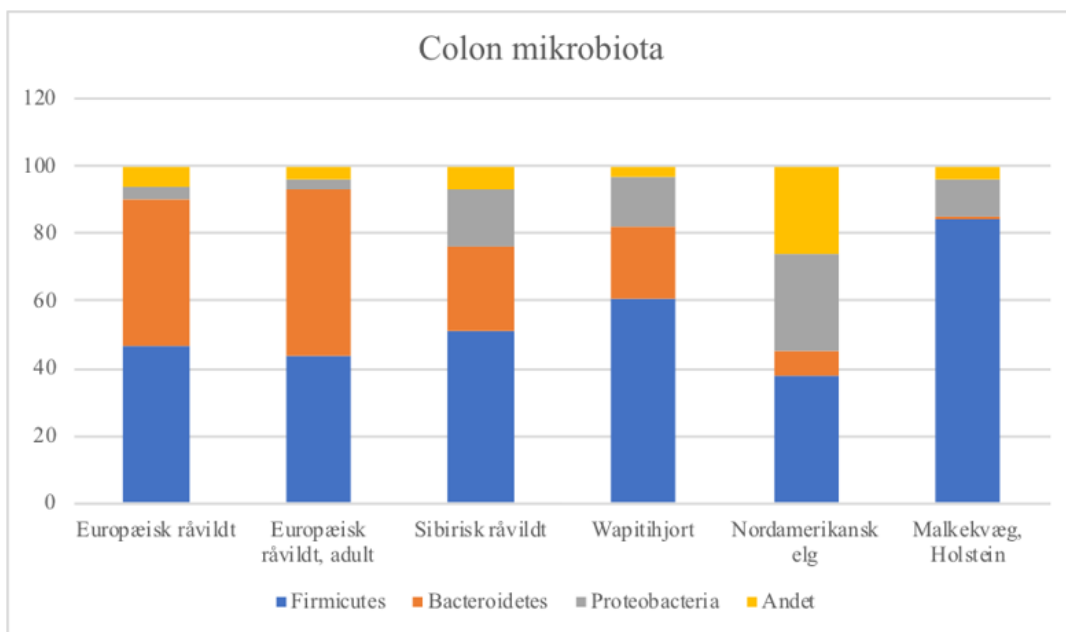
Drøvtyggere og deres mangfoldige mikroorganismer har gennem millioner af år udviklet deres symbiose, og da disse mikroorganismer er yderst kompetitive, er sammensætningen normalt ret stabil (Russell et al., 2001). Dog er der sket en ændring, siden mennesket begyndte at ændre de domesticerede drøvtyggers diæt til at indeholde mere korn og kraftfoder. Ændringen har effektiviseret produktiviteten hos drøvtyggerne, men har også medført en ændring af kompositionen af mikroorganismer i fordøjelseskanalen og kan bevirke et fald i vommens pH, hvilket kan medføre en række lidelser (Khafipour et al., 2016, Russell et al., 2001).

Der findes efterhånden en del studier på den bakterielle sammensætning hos drøvtyggere, der holdes som husdyr/produktionsdyr - såsom køer, får, rensdyr og sikahjorte (Castro-Carrera et al., 2014; Li et al., 2014, 2013; Sundset et al., 2007; Wu et al., 2012). Det er i øvrigt velbeskrevet, at den bakterielle samfund samt anatomien i drøvtyggers vom påvirkes af kosten (De Menezes et al., 2011; Fernando et al., 2010; Kong et al., 2010; Nelson et al., 2003). Undersøgelser af får tyder fx på, at forekomsten af bakterier i vom og blindtarm er forskellig for lam, der fodres med hvede og majs (Popova et al., 2013). Tilsvarende undersøgelser findes dog ikke for rådyr, og på trods af råvildtets store udbredelse, ved man kun relativt lidt om rådyrets mikrobiota i fordøjelseskanalen, og hvilken rolle de forskellige mikroorganismer spiller.

I forbindelse med jagt- og vildtforvaltning er det interessant at kende til sammensætningen af det danske råvildts tarmmikrobiota, samt hvilken indflydelse adgangen til kunstigt foder har for bestandens sundhed. Flere nyligt publicerede studier har undersøgt vilde drøvtyggers mikrobiota, men kun få har undersøgt den mikrobiotiske sammensætning hos det europæiske rådyr. Med prøver fra endetarmen af 11 nedlagte rådyr, og analyse ved såkaldt 16S rRNA gensekventering forsøgte vi at kortlægge sammensætningen af rådyrets mikrobiota.

Tidligere er der kun foretaget enkelte undersøgelser af mikrobiota på dyr der havde adgang til kunstigt foder og holdt under hegn. Hos 3 sibiriske rådyr fandt man, at *Firmicutes* (51,2%) og *Bacteroidetes* (39,4%) var de dominerende phyla (*Capreolus Pygargus*). Desuden fandt man, at mål for alpha-diversiteten, som beskriver diversiteten/mangfoldigheden af arter, inden for en prøve eller et dyr, var signifikant højere i tyktarmen end i vommen. I tyktarmen fandt man også uidentificerede bakterier af Enterobacteriaceae-familien, og at bakterierne *Succinivibrio* spp., og *Desulfovibrio* spp. var mere dominerende her end i andre dele af fordøjelseskanalen (Li et. al, 2014).

Et andet studie fra 2016 undersøgte forskelle i den mikrobiotiske sammensætning i vommen mellem <c, som er arter, der deler habitat (Khafipour et al., 2016). De to bakterielle phyla, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* viste sig ved analysen at være de dominerende i colon hos de to arter af rådyr samt hos wapitihjortene, mens elg har Firmicutes og proteobakterier og andre arter som dominerende. Dette kan overraske, da der eksisterer en vis lighed i fødevalg mellem elg og rådyr (på trods af forskellig kropsmasse). Elgens fødevalg kunne måske forventes at være lig råvildtets, og dermed også dens mikrobielle sammensætning i maver og tarmkanal. I stedet fandtes den overordnede mikrobiota på phylum-niveau i elgens colon mindre lig råvildtets end den af wapitihjorten, der klassificeres som "intermediate opportunistic mixed feeder" (Hofmann, 1989), hvilket betyder, at den både vil spise blade og græs. Desuden viste det sig interessant, at det europæiske råvildt har så stor en andel af Bacteroidetes ift. de andre arter, og ca. 4 gange færre proteobakterier end det Sibiriske råvildt.



Figur 3.1. Relativ fordeling af colon mikrobiota på phylum niveau hos hhv. europæisk råvildt (n=11), adult europæisk råvildt (n=5), sibirisk råvildt (n=3) (Li et al., 2014 a), koreanske wapitihjorte (n=4) (Kim et al., 2018), nordamerikansk elg (n=6) (Ishaq et al., 2012) og malkekvæg (n=6) (Mao et al., 2015).

Forskellene i den mikrobiotiske sammensætning kan vurderes ud fra parametre som habitat og fødevalg, samt på dyrenes forskellige fysiologi. Nogle studier viser ikke systematisk forskel i fødevalg arterne imellem, hvilket kan tyde på, at vommens fysiologi må være den mest sandsynlige årsag til forskelle i mikrobiotasammensætning (Østbye et. al, 2016). Et andet studie har dog fundet, at de tre arter kun direkte

deler 20-30% af deres fødeemner (Myserud, 2000), hvilket kan betyde, at det ikke kun er vommens fysiologi, der er en afgørende faktor, men også fødevalget. Hertil skal det dog nævnes, at metodetilgangen ved de forskellige analyser kan have stor indflydelse på resultatet (Khafipour et al., 2016). Det er derfor vanskeligt med sikkerhed at sige, hvori forskellene ligger.

Ser man på malkekvæg, er andelen af Firmicutes væsentlig mere markant end hos de andre drøvtyggere. Flere studier har vist, at overdreven fodring med korn øger den relative forekomst af Firmicutes over Bacteroidetes og ændrer altså ratioen mellem de to bakteriephyla hos kvæg (Li et. al, 2012, Mao et. al, 2013). Lignende studier er ikke fundet på de andre arter. Tager man i betragtning, at wapitihjortene, udover ad libitum hør, fik adgang til kraftfoder to gange dagligt svarende til 1,8% af kropsvægt. er det dog interessant, at disse, ligesom malkekvæget, har en højere andel Firmicutes.

4 MATERIALER

Der blev i alt udtaget data og prøver fra 128 rådyr. Blandt de dyr der indgik i undersøgelsen havde i alt 17 dyr sygdomsmæssige forandringer. Ud af disse dyr havde 6 meget milde og formodentlige ubetydelige lejlighedsfund og 5 dyr havde tegn på diarre og afmagring. Hovedparten af dyrene med diarre var fra Fyn. Hvor syge dyr indgår i analyserne, er det angivet. Det var i øvrigt ikke muligt at påvise en højere andel af sygdomsmæssige fund hos nedlagte dyr med adgang til udlagt foder, sammenlignet med dyr der ikke havde adgang til foder.

Kun dyr, hvor prøver kunne indsamles umiddelbart i forbindelse med aflivning og hvor vom og tarm ikke var skudt i stykker, som indgik i mikrobiota, vomvægs og vomindholdsundersøgelserne.

I analyser af vomindhold indgik kun de områder, hvorfra der var indsamlet flest dyr.

Det er i hvert enkelt afsnit angivet, hvor mange dyr der indgik i den pågældende undersøgelse og det er angivet, hvorvidt både raske og syge dyr indgik.

5 RESULTATER OG DISKUSSION

5.1.1 Sygdomsforekomst og parasitologiske undersøgelser

Sygdomsforekomsten vurderes lav blandt de undersøgte dyr efter undersøgelse af alle 4 maver samt af leveren. Hos de enkelte syge dyr er der blandt andet fundet tilbagedannelse af vompapiller, samt tegn på arvævsdannelse i vommen, hvilket kan være forårsaget af tidligere inflammation i vommen grundet acidose, også kaldet "sur vom". Desuden viste et dyr med skummende vomindhold tegn på såkaldt "trommesyge". Disse sygdomme kan opstå som følge af for højt indtag og/eller et pludseligt skifte til letfordøjelig føde. Ved "sur vom" kan indtagelse af øgede mængder letfordøjelig føde føre til vækst af organismer, der danner laktat, frem for dem, der danner de flygtige fedtsyrer. Laktatdannelsen vil få pH i vommen til at falde. En fiberrig føde vil modsat stimulere muskelsammentrækninger i vommen, samt ræbning, drøvtygning og spytksekretion, der alle modvirker forsurening (Russell et. al, 2001). Ved et pludseligt skifte til letfordøjelig føde vil der også ske et skifte i den mikrobiotiske sammensætning i vommen. Fra at være rig på de såkaldte gram-negative bakterier, der kan nedbryde cellulose, altså planternes fiberrige cellevægge, vil floraen skifte til at have en øget mængde gram positive bakterier,

som blandt andet streptococcus bovis og lactobacillus spp (Zachary et. al, 2012 a, Russell et. al, 2001). Et vinterdyr, der indtager meget føde med høj andel letfordøjeligt kulhydrat, vil derfor være dårligere til at udnytte det naturligt tilgængelige føde med højere fiberindhold. Streptococcus bovis producerer kortkædede fedtsyrer ved normal pH i vommen, men ved lavere pH skifter bakterien til at producere laktat, hvorved der opstår en selvforstærkende effekt med øget laktat produktion og lavere vom-pH som følge. En pH lavere end 5 kan lede til alvorlig inflammation i vommen, som kan føre til abnormal udseende og atrofi af vompapiller. Ved langsommere overgang til letfordøjeligt foder vil bakterierne Megaspaera elsdanii og Selenomonas kunne omdanne laktat til kortkædede fedtsyrer og dermed mindske faldet i pH og øge udvindingen af energi (Russell et. al, 2001, Zachary et. al, 2012 b). Hos drøvtyggere med adgang til en høj andel letfordøjeligt foder og lav andel grovfoder, vil der også ved svære tilfælde kunne ses tilbagedannelse af papiller og parakeratose (Zachary et. al, 2012 c), som er sygdom i vævets yderste lag.

Trommesyge kan udvikles ved indtagelse af fødekilder indeholdende letfordøjelige kulhydrater, og saponiner (sæbelignende stoffer). Det er en tilstand, hvor gas ikke kan forløses fra vommen som normalt gennem svælg eller endetarmsåbning, hvorved vommen bliver udspilet af gas. Der kan være forskellige årsager til trommesyge, men i relation til fodring skyldes det øget skumdannelse med høj overfladespænding, som blokerer for forbindelsen til spiserøret, hvorved gassen ikke kan slippe ud af vommen (Zachary et. al, 2012 a, Soest, 1994 a).

Hvis et dyr pludselig får adgang til store mængder letfordøjeligt føde som fx kraftfoder, giver det øget risiko for udvikling af trommesyge. Trommesyge kan være fatalt som følge af udspiling der presser mellemgulvet frem mod brystet og derved giver vejtrækningsproblemer samt nedsætter blodets tilbageløb til hjertet, hvilket kan føre til blodoverfyldning i organer og væv (Zachary et. al, 2012, Soest, 1994).

Selvom to syge dyr har patologiske forandringer, der er forenelige med et stort optag af letfordøjelig føde, har vi ikke kunne sige noget sikkert om disse årsagsforhold. Ligeledes ser det ud til, at de sygdomsmæssige forandringer hos de to dyr har en negativ sammenhæng med det ruminale slimhindeoverfladeareal. Igen kræver det dog undersøgelse af flere syge dyr, før en eventuel sammenhæng kan konkluderes.

Gastrointestinale sygdomme relateret til vomacidose (sur vom) eller alvorlige/massive parasitinfektioner vil ofte være forbundet med patologiske fund. Ved vomacidose/sur vom forårsaget af højt optag af letfordøjelig føde med højt energiindhold, kan der ses kroniske læsioner i vomvæggen i form af atrofi af vompapillerne, arvævsdannelse og inflammation (ruminitis).

Der er i denne undersøgelse ikke påvist læsioner i løben og kun få dyr med relativt milde kroniske læsioner i vom og tarmkanal. Ingen dyr havde patologiske fund, der kan relateres til massive/alvorlige parasitære infektioner i lever, formaver, løbe eller tarm. Undersøgelsen tyder på en generel høj sundhedsstatus i mave og tarmkanal hos de undersøgte dyr i alle områder, og uanset om de har haft adgang til foder eller ej.

Til sammenligning findes der hos domesticerede drøvtyggere meget hyppigere kroniske læsioner i tarmkanalen. Undersøgelser af voksne danske malkekøer undersøgt ved slagtning, tyder på, at kroniske læsioner i formaverne forekommer hos omkring 20% og løbesår hos 20-90%.

Ved parasitologisk undersøgelse blev der især påvist gastrointestinale parasitter (hyppigst Strongylide og Capillaria-æg). Ingen af de undersøgte dyr havde sygdomsmæssige fund, der tyder på massive/alvorlige parasitinfektioner i lever, formaver, løbe eller tarm. Der er generelt påvist meget stor individuel variation i parasitologiske fund (både hvad angår arter og antal af parasitter). Der er ikke i de undersøgte områder fundet indikationer på, at arter eller antal er påvirket af geografiske forhold eller fodring. Der er heller

ikke påvist flere parasitter eller andre arter hos syge dyr (herunder dyr med råvildtsyge) eller hos dyr med adgang til udlagt foder. Denne, og tidligere undersøgelser, tyder heller ikke på, at parasitinfektion er den udløsende årsag til diarree og afmagring hos de fynske rådyr. Dette underbygges både af de generelt varierende parasitologiske fund, hvor de syge dyr ikke skiller sig ud, hverken når det gælder arter påvist eller patologiske fund der kan relateres til parasitinfektioner i de syge dyr. Andre mulige årsager til diarree og afmagring, som endnu er uafklarede, kunne være enteropatoogene virusinfektioner.

5.1.2 Vompapillernes sæsonvariation hos danske rådyr

Viden om samspillet mellem føde, mikroorganismer og vommens anatomi er afgørende for forståelse af rådyrets ernæringsmæssige vilkår. Her kan viden om den årlige variation i størrelsen af rådyrets vompapiller hjælpe til en bedre forståelse for sæsonvariation i fødevalget.

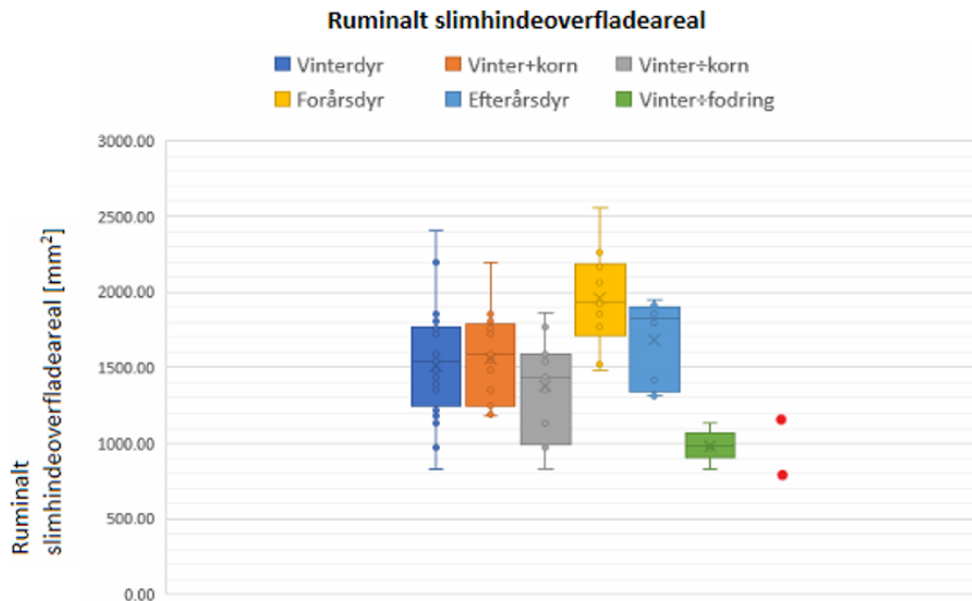
På den baggrund undersøgte man arealet på slimhindens overflade i vommen på 63 voksne og raske danske rådyr, inddelt i 6 kategorier efter årstid og fødevalg. Alene for 36 dyr nedlagt i vinterperioden blev fødevalget analyseret ud fra vomindhold. Disse dyr blev herefter delt op, alt efter om vi fandt korn- eller majs-kerner i dyrets vom eller ej. Hvor der ikke fandtes kerner eller dele af korn- eller majs karakteriserede vi dyrene som uden adgang til udlagt foder. Da prøverne med fødevalg er taget i månederne december og januar antager vi, at optagelse af naturligt forekommende spildkorn fra marker vil være yderst begrænset.

I studiet af vomslimhinde indgik 63 voksne og raske rådyr. Dyrene blev inddelt i følgende seks grupper:

- **Vinterdyr** ($n=39$), nedlagt i december og januar. Gruppen indeholder også grupperne "vinter+korn", "vinter÷korn", samt vinterdyr hvor der ikke er foretaget fødeanalyse.
- **Vinter+korn** ($n=21$), er dyr, hvor der i fødeanalysen er fundet korn.
- **Vinter÷korn** ($n=15$), er dyr hvor der i fødeanalysen ikke er fundet korn.
- **Forårsdyr** ($n=11$), er bukke nedlagt i maj måned. Ingen fødeanalyse for denne gruppe.
- **Efterårsdyr** ($n=8$), er dyr nedlagt i oktober og november. Ingen fødeanalyse for denne gruppe
- **Vinter÷foder** ($n=5$), er dyr nedlagt i januar i Statskovdistrikt på Bornholm, hvor der ikke fodres (senere verificeret ved fødeanalyser).

Undersøgelsens resultater indikerer, at udfordringen med korn og majs-kerner kan have forskellig betydning for vommens slimhindeoverfladeareal.

Resultaterne viser, at den varierende struktur og ydre form på papillerne gennem sæsonerne, samt ændringen i vommens slimhindeoverfladeareal, både er markant og signifikant. Overfladearealet er størst om foråret, mindre i efteråret og mindst om vinteren. Der er desuden en signifikant positiv sammenhæng mellem det, at dyrene har haft adgang til foder og at deres vom har et større slimhindeoverfladeareal om vinteren.



Figur 5.1. Variation i ruminalt slimhindeoverfladeareal hos rådyr ($n=65$) i relation til sæson, adgang til foder og sygdom. Boxplot viser 50% som kassen, samt øvre og nedre 25 % percentil ved stregerne uden for kassen. Streger gennem hver box repræsenterer medianen. X i hver box viser gennemsnitsværdien for gruppen. Røde prikker viser to slimhindeoverfladeareal hos 2 syge dyr fra Fyn med diarre og afmagring aflivet i vinterperioden. Som figuren viser ser de syge dyrs slimhindeareal ud til at være sammenfaldende med vinterdyr med adgang til ikke-naturligt foder og er derfor ikke afvigende fra hvad vi ville forvente. Figur fra Berntsen & Ørskov (2019)

Undersøgelserne viste, at forårsdyr har 25,5% større slimhindeoverfladeareal i vommen sammenlignet med vinterdyr med adgang til foder. Dette kan være et udtryk for, at rådyrene er i stand til at tilpasse sig den naturlige sæsonvariation i fødens kvalitet. Som koncentrat-selektierende type (Hofmann 1989), vil rådyret dog altid søge føde af bedst mulig kvalitet under forudsætning af at ressourcen er til rådighed i tilstrækkelige mængde. Det er uvist, hvor store mængder letfordøjelig føde vinterdyrene har haft adgang til og indtager. Alligevel ser det ud til at adgangen til foder påvirker slimhindearealet i vommen hos vinterdyrene. Her ses for vinterdyr, at dyr der havde optaget korn eller majs havde et 12,8% større slimhindeoverfladeareal ift. til dyr der ikke havde optaget korn eller majs, omend sammenhængen akkurat ikke er statistisk signifikant. Samtidig ses det, at vinterdyr nedlagt i Bornholms Statskovdistrikt hvor der ikke fodres har et væsentligt lavere slimhindeoverfladeareal end de andre grupper.

5.1.3 Rådyrs fødevalg belyst ud fra vomprøver fra nedlagte dyr

For at klarlægge dyrenes fødevalg anvendte vi en metode der i hovedtræk er baseret på Jensen (1968); Cederlund et al. (1980); Petersen (1998) og Nichols et. al. (2016). Så kort tid som muligt efter nedlægning (typisk < 1 time) blev mave- og tarmsystem udtaget fra det nedlagte dyr og alt indhold fra vommen overført til en plasticpose. Posen blev "masseret" for at blande materialet godt sammen, således at der efterfølgende kunne tages en repræsentativ prøve på op til 1 liter af vomindholdet. Prøverne blev opbevaret på frost ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ indtil undersøgelse.

Ved analyse af det optøede vomindhold blev der udtaget en prøve på 250 ml som blev skyllet i en sigte med maskevidde på 4x4 mm. Sigten med vom materialet blev ”pumpet” op og ned i et vandbad således, at alle partikler mindre end maskestørrelsen blev udvasket. Det frasorterede materiale mindre end 4x4 mm blev ikke gemt, men observeret for eventuelle usædvanlige forhold (ved at holde en sigte med 0,5x0,5 mm maskestørrelse under skyllevandet). Det sigtede materiale større end 4 mm blev, sammen med 1 l. vand hældt over i en sorteringskasse af hvid plast (60 x 40 cm) med feltinddelinger (10 x 10 cm) fordelt i et jævnt transparent lag, hvor en overordnet dækningsgrad og identificerede plantearter/plantegrupper kunne estimeres. Se figur 5.2.

Plantematerialet blev bestemt til art hvis muligt. Græsser blev dog i udgangspunktet karakteriseret under et som graminoider. Som standart anvendes luplampe og om nødvendigt stereolup når materialet artsbestemmes (artsbestemmelser refererer til K. Hansen (eds.) (1981): Dansk Feltflora og Johannes Lid (1985): Norsk, Svensk, Finsk Flora). Dækningsgrad vurderes i skala <1%, 1-5%, 10% og herefter i spring på 5%.

Under bearbejdningen blev materialet normaliseret i forhold til den enkelte prøves overordnede dækningsgrad og for overskueligheden skyld samlet under 7 grupper: græs, kerner og kornedele af korn og majs, roer, nåletræ-skud, løvtræ blade + skud + bog, urter og uidentificerbart materiale + rådyrhår.

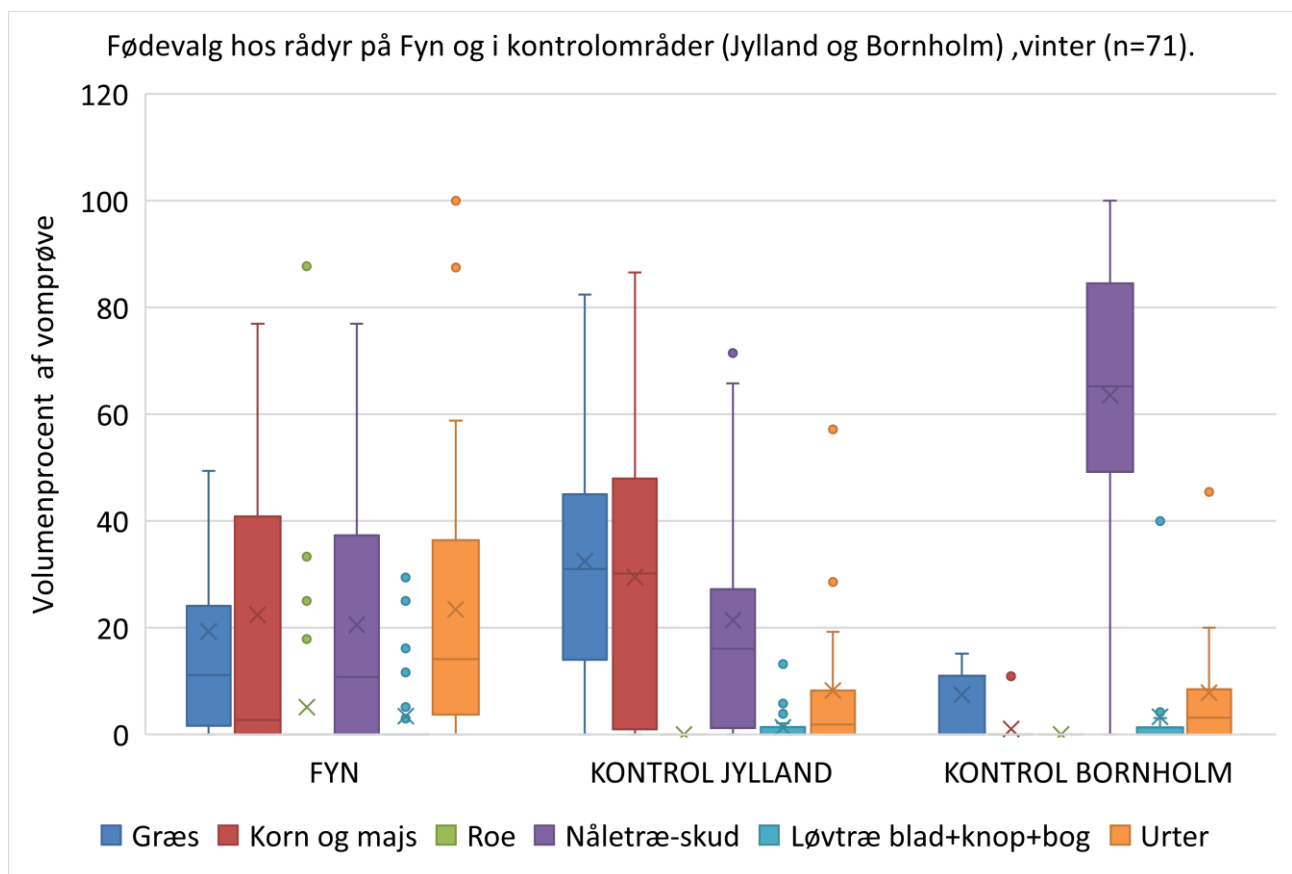
Makroskopiske undersøgelser af vom materiale fra en drøvtygger er ikke en eksakt videnskab. Det afgørende er at metoden kan identificere fødeemner af væsentlig betydning for dyret (ofte refereret til som plantearter/-grupper der udgør så store andele som 1/3 af den optagne føde; (P. Valentin Jensen 1967)).



Figur 5.2. Fødevalg bestemt ved analyser af vom materialet der udvaskes i et 4x4mm sold og fordeles jævnt i vandbad for artsidentifikation og bedømmelse af volumen%. Midterbilledet viser en vomprøve domineret af græsser og urter, mens der i billedet til venstre ses en prøve fra et dyr der bl.a. har optaget majs kerner.

5.1.3.1 Resultater

Ved tidligere undersøgelser er der også anvendt 4 x 4 mm sold, som umiddelbart virker som et grovkornet sold, men ved test fandt vi en høj grad af overensstemmelse mellem volumenprocenter for identificerede arter/artsgrupper for sorteringsfraktionerne >4x4mm, >3x3mm, samt >2x2mm. Materialet fra 71 nedlagte dyr fra Fyn og kontrolområder på Bornholm, Djursland og i Nordjylland viser først og fremmest, at der er markante individuelle forskelle mellem dyrene, hvilket også er kendt fra tidligere undersøgelser Jensen (1968); Cederlund et al. (1980); Petersen (1998) og Nichols et. al. (2016). For alle områder på Fyn er det almindeligt, at der fodres direkte eller indirekte på grund af store fasanudsætninger. Almindeligvis fodres der med hvede eller majs i december/januar hvor prøverne er taget. Enkelte steder ses dog optagelse af byg med de meget karakteristisk tungere nedbrydelige skaldele. Det er ikke alle dyr fra områder med adgang til foder som har optaget "kunstigt" foder forud for nedlægningen, hvilket kan være fordi adgangen til foder har været blokeret af artsfæller eller dådyr, alternativt at dyret har været i den del af sit homerange hvor foder ikke har været tilgængeligt. Enkelte dyr har optaget så store mængder korn og majskerne som lidt over 75 volumenprocent (vol%) af vomaterialet, men middelværdien for dyr fra Fyn ligger på 22 vol%. Alene for Bornholm ved vi med sikkerhed, at rådyr ikke har adgang til foder i statskovdistriktet, hvilket også viser sig ved at alle dyr, på nær et enkelt, ingen kunstige fodermidler havde optaget. Fødevalget hos rådyr på Bornholm adskiller sig væsentligt. De optager store andele skud og nåle fra nåletræer (middelværdi=64 vol%). Samme værdi i det Jyske og på Fyn er 21 vol%. De Bornholmske rådyr æder også markant mindre græs end rådyr i Jylland og på Fyn. Fynske rådyr skiller sig ud ved, på trods af adgangen til foder, at æde relativt store mængder urter (middelværdi 23 vol%).



Figur 5.3. Boxplot som viser middelværdi, kvartiler og outlayers for hvilke fødegrupper rådyr har optaget alt efter om de har levet på Fyn, i Jylland eller på Bornholm.

5.1.4 Adgang til foder og indflydelse på fordelingen af næringsstoffer i vommen

Der er foretaget analyser med henblik på at undersøge, om der kunne registreres ikke naturlige foderdele i vomindholdet, og om de i så fald havde indflydelse på fordelingen af forskellige næringsstoffer i rådyrenes vom. I alt 50 prøver er blevet analyseret på Eurofins Steins Laboratorium A/S for næringsindhold efter følgende metoder vist tabel 5.1. De 49 prøver er udvalgt fra områder hvor der indgik flest dyr, for at undgå for mange geografiske undergrupper.

Tabel 5.1. Analyser for næringsindhold

Mål	Metode
Råprotein %	EF 152/2009 / Kjeldahl (titrimetri) Råprotein (N*6,25)
Råfedt %	EF 152/2009 / Gravimetrisk Råfedt, syrehydrolyse
Vand %	EF 152/2009 / Gravimetrisk Vand i vare
Neutral Detergent Fiber %	ISO/CD 16472 / Enzymatisk - gravimetri

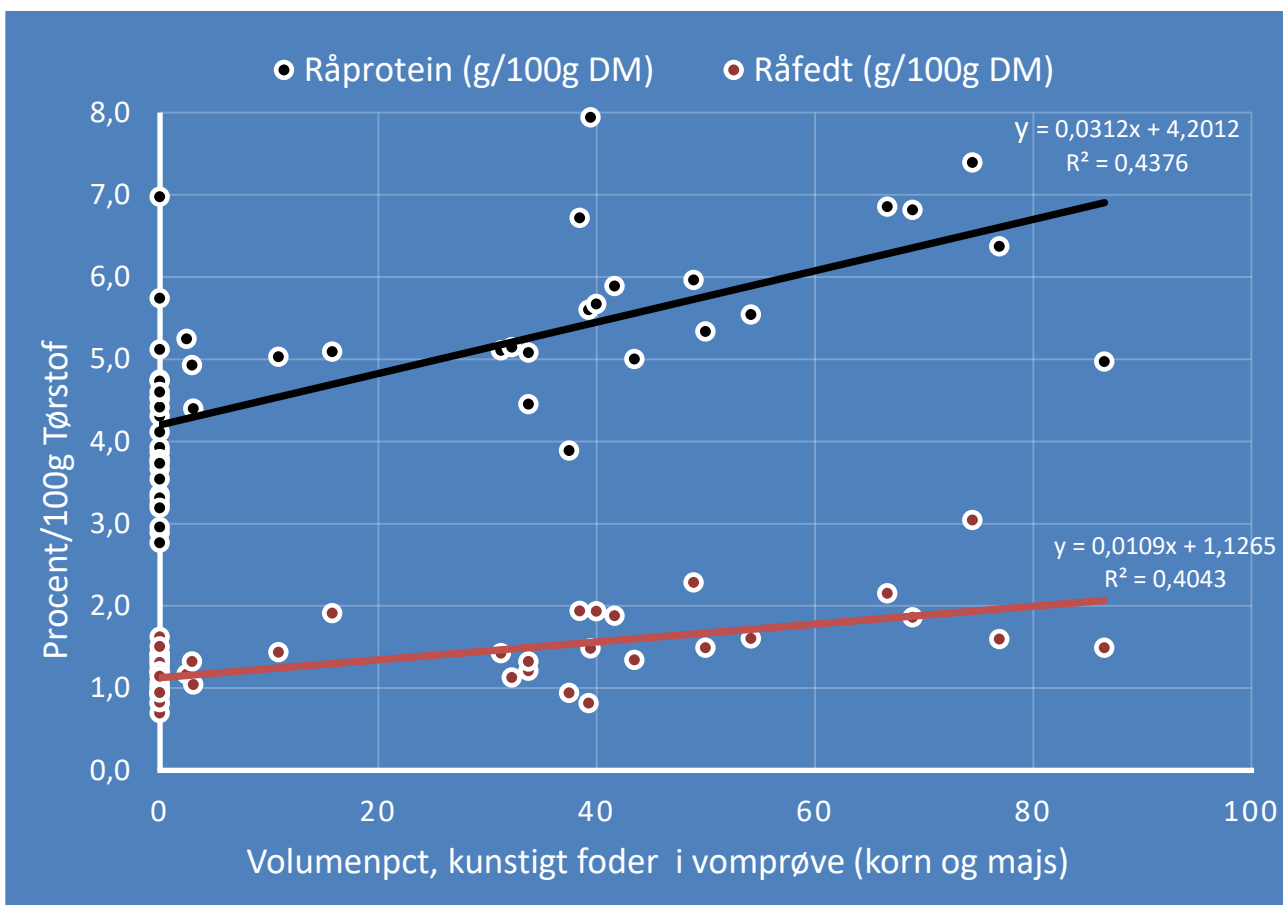
5.1.4.1 Resultater

Indholdet af næringsstoffer i den føde som det enkelte rådyr har optaget, afhænger tydeligt af hvor meget foder (korn og majs) det enkelte rådyr har haft adgang til. Resultaterne i figur 5.4. illustrerer signifikant stigende andel protein og fedt i vomaterialet på baggrund af stigende volumenprocent korn og majserner som dyret har optaget ($p < 0.01$ og $p < 0.05$, monovariansanalyse).

De dyr der ikke havde optaget udlagt korn og majs havde et lavere råprotein niveau centreret omkring 4,2 g/100g DM, mens de der havde optaget udlagt korn og majs, havde et råprotein niveau centreret omkring 6,0g/100g DM, hvilket giver en forskel på lidt over 40%.

Når de 3 variable for analyser af vomindhold (fiber, råfedt og råprotein) stilles op mod hinanden, var indholdet af råprotein den faktor der havde den stærkeste sammenhæng med adgangen til foder. Vores nuværende data tyder derfor på at råprotein kan være en god og objektiv forklarende variabel for adgang til foder. For råfedt var der ligeledes en sammenhæng, men her var samtidig et større overlap mellem råfedt data for dyr der havde adgang til foder og dyr der ikke havde. I forhold til næringsindholdet i de fleste af vinterens naturlige fødeemner er det forventeligt, at næringsindholdet i foderet stiger med optagelse af korn og majserner.

Det var ikke muligt at påvise en sammenhæng mellem adgang til foder og fiberindhold (non-digestible fiber g/100g DM) i vomindholdet ($p = 0.2272$), selv om man ville forvente at fiberindholdet ville falde når der optages letfordøjeligt kunstigt foder med begrænset indhold af fiberstoffer. En mulig forklaring på dette kan være, at en del dyr havde optaget byg som pga. ydre skaller har et højere fiberindhold end hvede og majs.



Figur 5.4. Indholdet af protein og fedtstoffer i rådyrs føde som funktion af optaget mængde af korn og majserner (Volumenprocent i vommateriale) $n=49$.

5.2 RÅDYRETS VOM- OG TARMMIKROBIOTA

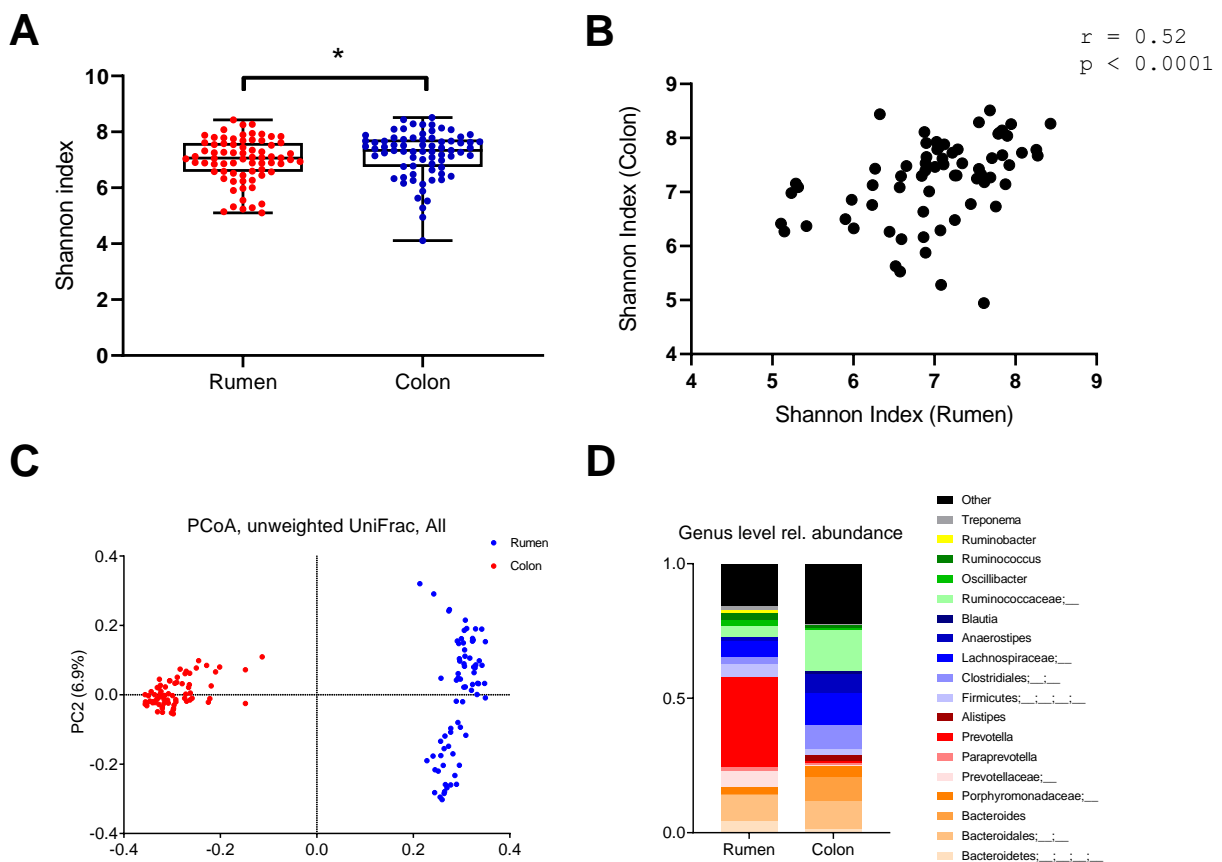
5.2.1 Mikrobiota metodestudier

Prøveudtagning i forbindelse med mikrobiotaundersøgelser udgør en særlig udfordring i forbindelse med prøveindsamling fra vildtlevende dyr. Undersøgelsen af vom og tarm-mikrobiota blev derfor indledt med et metodestudie, hvor forskellige indsamlings- og analysemetoder blev sammenlignet. Prøver til mikrobiotaundersøgelse skal udtages uden at de kontamineres med bakterier fra hænder eller omgivelser, og de skal hurtigt nedfryses på tøris eller flydende kvælstof, så den bakterielle vækst i prøven standses. Vi sammenlignede indledningsvist to metoder til prøveudtagning med henblik på at foretage prøveindsamling fra vildtlevende rådyr. Ved prøveudtagningsmetode 1. colon-metoden - blev et cirka 20 cm. langt stykke af colon indsamlet i en prøvebeholder og nedfrosset. Efterfølgende blev tarmindehold udtaget fra tarmstykket. Ved prøveudtagningsmetode 2. colonindholds-metoden - udtages colonindhold direkte i et prøverør i felten. Sidstnævnte metode er mere tidskrævende i felten og stiller et højere krav til hygiejnemæssige forhold (rene handsker, underlag og sterile engangsredskaber til udtagningen), og den er derfor mindre velegnet hvis jægere skal udtage prøver i forbindelse med almindelig jagt. Til gengæld er det ikke nødvendigt at optø prøven i forbindelse med udtagning i laboratoriet. Sidstnævnte metode er derfor mere skånsom for prøven. Undersøgelsens resultater viste at colon-metoden resulterer i en signifikant lavere α -diversitet ved shannon-indeks: 125mg: $p < 0,01$ og 50mg: $p = 0,05$ og ved ASV: 125mg og 50mg: $p < 0,05$. Dog finder vi også, at selvom der er signifikant

forskel på prøveudtagningsmetoden, er forskellen ikke særlig stor, jf. Spearman's korrelationskoefficienter $r=0,95$ for ASV og $r=0,97$ for Shannon index. Begge metoder vurderes at være anvendelige, men hvis metoderne kombineres i undersøgelser, skal man være opmærksom på at undgå for eksempel, at alle kontrolprøver udtages med den ene metode og caseprøver med en anden. Til de prøver der indgik i mikrobiotastudier i dette projekt (bortset fra dobbelte prøver der indgik i dette metodestudie) har vi anvendt den mere skånsomme colonindholds-metode ved indsamling. Der blev sammenlignet to analysemetoder til mikrobiotaanalysen, hvori der indgik forskellig mængde prøvemateriale. Vi fandt, at de to prøvestørrelser hhv. 50mg og 125mg giver ens mikrobiota-resultater, hvorfor der i fremtidige mikrobiota-undersøgelser af råvildtets colon-indhold kan anvendes den mindre arbejdskrævende 50mg prøvestørrelse.

5.2.2 Forskelle på phylum-niveau

Fra i alt 85 dyr blev udtaget prøver fra vom og tarm, som indgik i forskellige analyser på de indsamlede data i forhold til mikrobiota sammensætningen. Prøver indsamlet fra hhv. vom og colon fra i alt 85 rådyr fra forskellige lokaliteter blev analyseret for mikrobiel sammensætning ved såkaldt 16S rRNA gensekventering. Overordnet fandt vi en forholdsvis høj α -diversitet af bakteriearter i både vom og colon i de enkelte rådyr, hvor diversiteten i colon som forventet var en anelse højere ($p < 0,05$) end i vommen (Fig. 5.5A). Vi observerede en vis spredning på diversiteten i de enkelte dyr men samtidig en meget fin korrelation mellem diversitet i vom og colon, hvilket altså fortæller, at de dyr, der har højest diversitet i vommen, også har højest diversitet i colon (Fig. 5.5B). For at visualisere overordnede forskelle i bakteriesammensætningen (mikrobiota) mellem dyr (kaldet β -diversitet) beregnes en såkaldt



Figur 5.5. Overordnede forskelle mellem mikrobiel sammensætning i vom (rumen) og tyktarm (colon) hos danske vildtlevende rådyr ($n=85$).

afstandsmatrice mellem bakteriesamfundene i hver enkelt prøve. Disse afstande bliver så visualiseret så godt som muligt i det der kaldes et "Principal Coordinate Analysis" plot (PCoA). I et PCoA plot ordineres data her til 2 dimensioner, hvor man på x-aksen (PC1) og y-aksen (PC2) inkluderer så meget af den totale afstandsvariation som mulig. I et PCoA plot bliver hver enkelt prøve (bakteriesamfund) afbildet som en prik med en farve der her angiver om prøven er fra vommen eller colon. Hvis prikkerne ligger tæt på hinanden betyder det, at bakteriesamfundene er mere ens, end hvis de ligger langt fra hinanden.

5.2.3 Forskelle i den mikrobielle sammensætning i vom og tarm

PCoA plot analysen i Figur 5.1C afbilder de overordnede forskelle mellem bakteriesamfund i vommen og tyktarm (colon). Her ses en meget klar adskillelse mellem de to lokaliteter i fordøjelsessystemet. Hvis vi ser på den gennemsnitlige relative forekomst af de mest almindelige bakterielle slægter (genus) i prøverne er der tydeligvis også stor forskel (Fig. 5.1D). For eksempel ser vi en meget højere forekomst af *Prevotella* i vommen sammenlignet med colon.

5.2.4 Forskelle på genus-niveau

Ser man nærmere på den mikrobiotiske sammensætning på genus-niveau hos de europæiske og sibiriske råvildt samt hos wapitihjorte, findes visse sammenfald og variationer. Hvis vi sammenligner nogle af de mest prævalente genus, vi finder i colon fra danske råvildt (Tabel 5.2) med sibiriske råvildt, genfinder vi kun fire genus ud af syv (Tabel 5.3). Det er ikke det samme som, at de ikke forekommer, men det må antages, at genus i hvert fald er af lavere prævalens og mindre betydning hos de sibiriske sammenlignet med danske rådyr. Disse forskelle kan være drevet af forskelle i habitat, føde og genetiske faktorer (Østbye et. al, 2016 a, Guan et. al, 2017). Nogen af de bakterier der er forskellige fra de sammenlignede arter kan være potentielt sygdomsfremkaldende, herunder colibakterier, streptokokker og campylobakter. Viden om normal forekomst af disse bakterier hos raske dyr, er et nødvendigt grundlag for at fortolke bakteriologiske fund hos syge rådyr.

Tabel 5.2. Oversigt over nogen af de mest prævalente bakterier påvist hos raske jagtskudte rådyr (n=85).

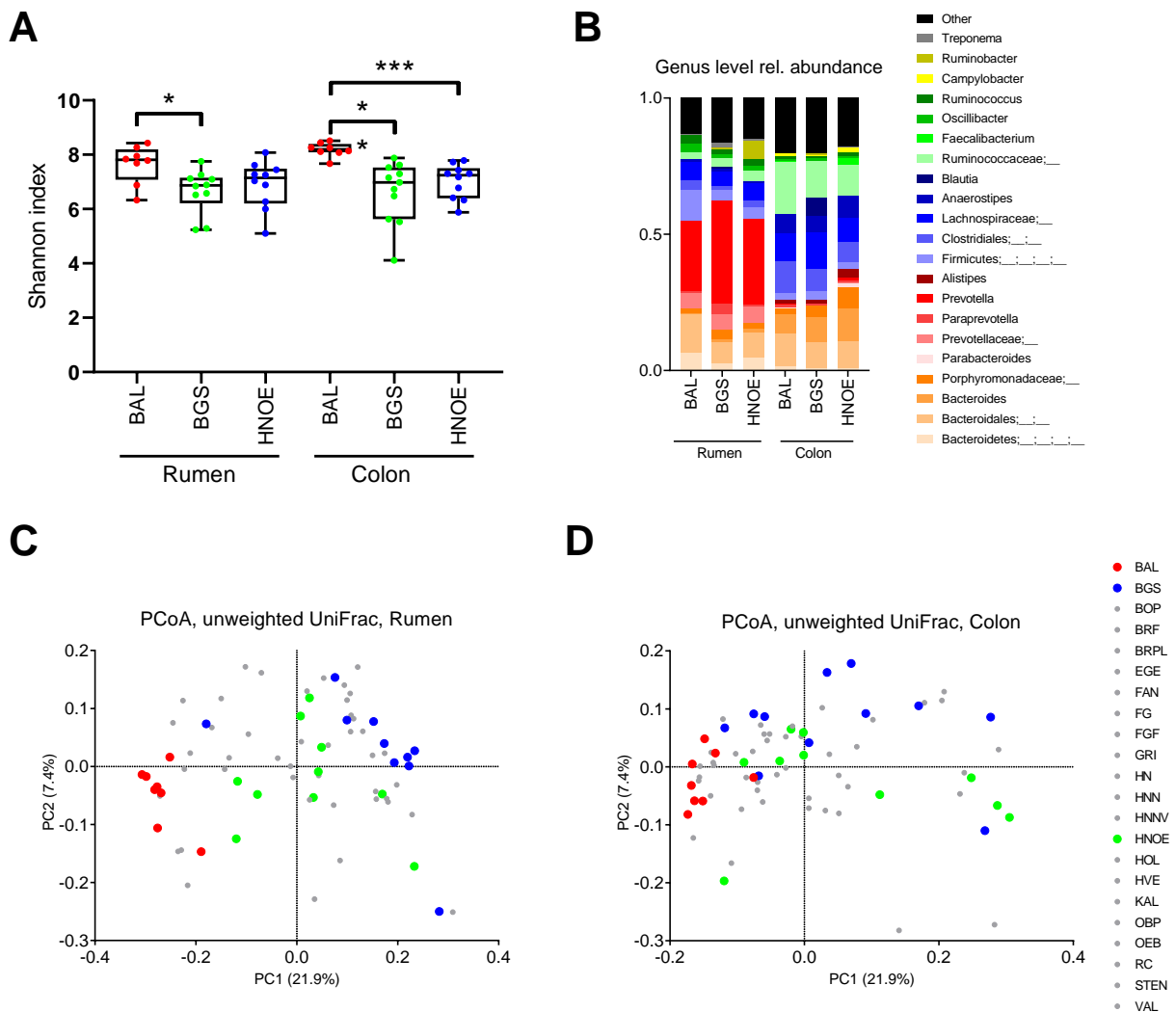
Bakteriel Taxonomi							
Domain	Bakterier						
Phylum	Bacteroidetes			Firmicutes			Proteobacteria
Class	Bacteroidia			Clostridia			Epsilonproteobacteria
Order	Bacteroidales			Clostridiales			Campylobacterales
Family	Bacteroidaceae	Rikenellaceae	Porphyomonadaceae	Oscillospiraceae	Ruminococcaceae	Lachnospiraceae	Campylobacteraceae
Genus	Bacteroides	Alistipes	Parabacteroides	Oscillibacter	Ruminococcus	Aerostipes	Campylobacter

Tabel 5.3. Mikrobiel sammensætning på genus-niveau hos raske jagtskudte dyr: europæisk rådyr (*Capreolus Capreolus*) i denne undersøgelse, sammenlignet med tidligere beskrevne fund hos sibiriske rådyr (*Capreolus pygargus*) og Elk/Wapitihjorte (*Cervus Canadensis*).

Kilde	Dette studie,	Li et al., 2014 a	Kim et al., 2018
Species	Europæiske rådyr	Sibiriske rådyr	Wapitihjorte
Phylum niveau	Firmicutes 47,1% Bacteroidetes 42,7% Proteobacteria 4,6% Andre 5,6%	Firmicutes ca. 51% Bacteroidetes ca. 25% Proteobacteria ca. 17% Andre ca. 7%	Firmicutes ca. 61% Bacteroidetes ca. 21% Proteobacteria ca. 15% Andre ca. 3%
Genus niveau De mest prævalente bakterier	<u>Bacteroidetes:</u> Bacteroides Alistipes Parabacteroides <u>Firmicutes:</u> Oscillibacter Ruminococcus Aerostipes <u>Proteobacteria:</u> Campylobacter	<u>Bacteroidetes:</u> Bacteroidesfundet Alistipes Parabacteroides <u>Firmicutes:</u> Oscillibacter Ruminococcus Aerostipes <u>Proteobacteria:</u> Campylobacter	<u>Bacteroidetes:</u> Bacteroides Alistipes <u>Firmicutes:</u> Ruminococcaceae Streptococcus Clostridium <u>Proteobacteria:</u> Escherichia Succinivibrio

5.2.5 Geografiske forskelle i den mikrobielle sammensætning i vom og tarm

Vi opdelte dernæst prøverne afhængig af, hvilken lokalitet de var indsamlet fra, og fokuserede i første omgang på de 3 lokaliteter, hvorfra der var indsamlet flest prøver, nemlig Almindingen på Bornholm (BAL, 8 dyr), Brattingsborg gods på Samsø (BGS, 13 dyr) og den østlige del af Hals Nørreskov i Vendsyssel (HNOE, 11 dyr). På baggrund af dette kunne vi se at den gennemsnitlige α -diversitet i de enkelte var betinget af lokalitet både i vommen og i colon, hvor vi så, at dyr fra BAL havde signifikant højere bakteriediversitet end dyr fra BGS og HNOE lokaliteterne (Fig 5.2A). Endvidere kunne vi se at strukturen af bakteriesamfundene også varierede afhængig af indsamlingslokalitet i både vom og colon (Fig 5.2B-D).

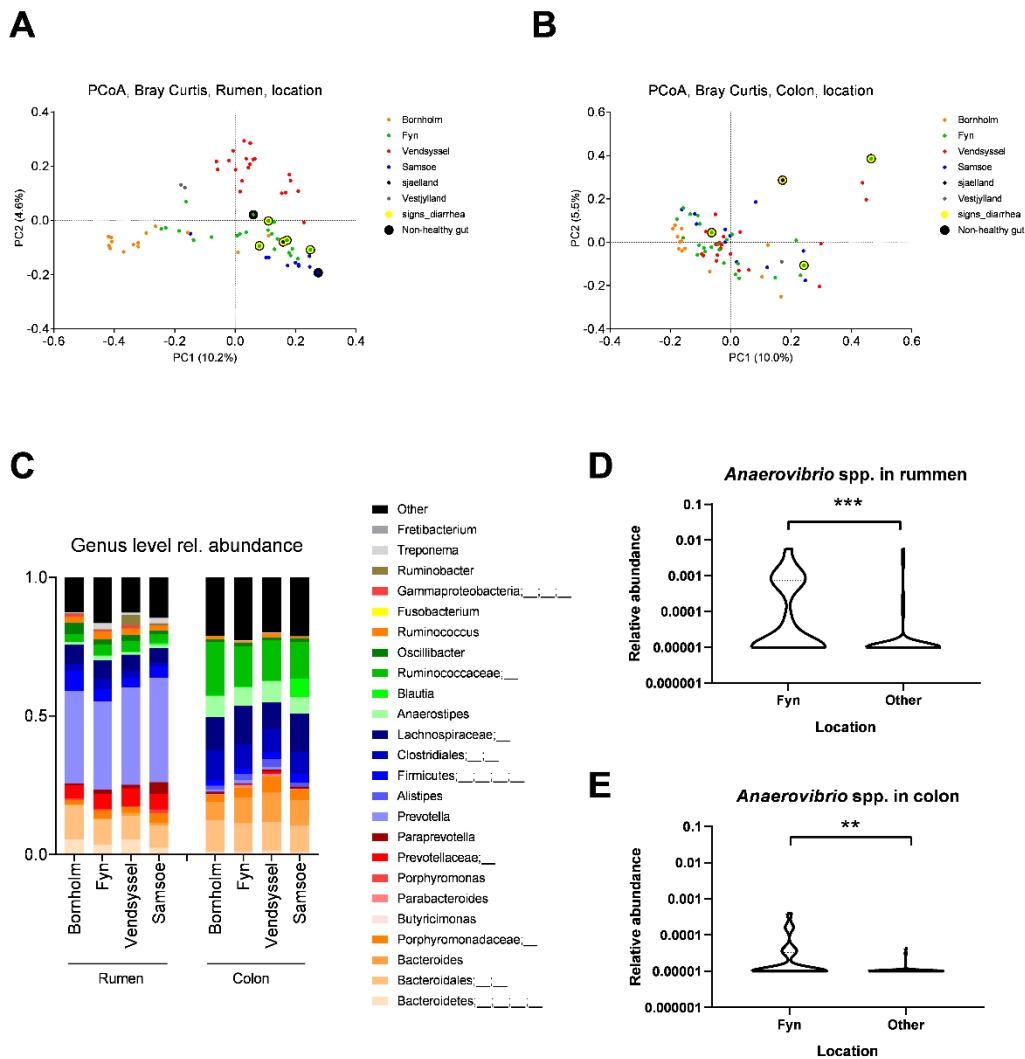


Figur 5.6. Undersøgelse af mikrobiel sammensætning i vom (rumen) og tyktarm (colon) hos vildtlevende rådyr fordelt på geografisk oprindelse. Almindingen på Bornholm (BAL, 8 dyr), Brattingsborg gods på Samsø (BGS, 13 dyr), østlige del af Hals Nørreskov i Vendsyssel (HNOE, 11 dyr).

Derefter så vi på mikrobiota sammensætningen i hhv. vommen og colon på alle dyrene sorteret efter landsdel (Fig 5.6A-B). Her var der en tydelig opdeling i forhold til prøvetagningslokalitet for vom prøver, som indikerer, at dyrenes mikrobiota i nogen grad kan sammenkædes med deres habitat. Nogle dyr, særligt fra Fyn, udviste symptomer på diarré eller på anden måde et ikke velfungerende tarmsystem. Disse enkelte dyr er fremhævet i figuren og lader i nogen grad til at gruppere særskilt fra de øvrige dyr, særligt for prøver taget fra vommen. Efterfølgende analyse af bakteriesammensætningen i de 4

lokaliteter med flest dyr (Bornholm, Fyn, Vendsyssel og Samsø) viste, at lokaliteterne, til trods for nogen forskelle (ovennævnte), i store træk havde ensartet mikrobiota-sammensætning (Fig 5.6C).

Da de fleste af de syge dyr (diarre m.m.) blev indsamlet på Fyn, sammenlignede vi mikrobiota i dyr fra Fyn med alle andre dyr. Her fandt vi, at kun slægten *Anaerovibrio spp.* adskilte de to grupper med signifikant højere relativ forekomst af denne slægt i vom-indhold i dyr fra Fyn sammenlignet med de andre lokaliteter efter korrektion for multiple testing (ANCOM analyse) (Fig 5.6D). I Colon fandt vi ved direkte sammenligning (Man Whitney test) også en signifikant forskel for *Anaerovibrio spp.* (Fig 5.6E). *Anaerovibrio spp.* er lipolytiske bakterier der udskiller extracellulær esterase for at nedbryde triglycerider og hydrolyser af triglycerider (Yohei et al., 2012; De et al., 2018). *Anaerovibrio spp.* er i litteraturen beskrevet som en vom og tarmbakterie der kan have mulig effekt på stofskiftet, herunder er beskrevet en negativ effekt på vægtøgning hos grise (He et al. 2016). Det er beskrevet hos får og malkekvæg, at niveauer af *Anaerovibrio spp.* i vom mikrobiota kan stige som følge af tilpasning til en letfordøjelig, kornholdig diæt (Abdelmegeid 2018). Høje niveauer af *Anaerovibrio spp.* i tarm mikrobiota er i en nyere undersøgelse blevet relateret til diarre hos grise (Yang 2019).

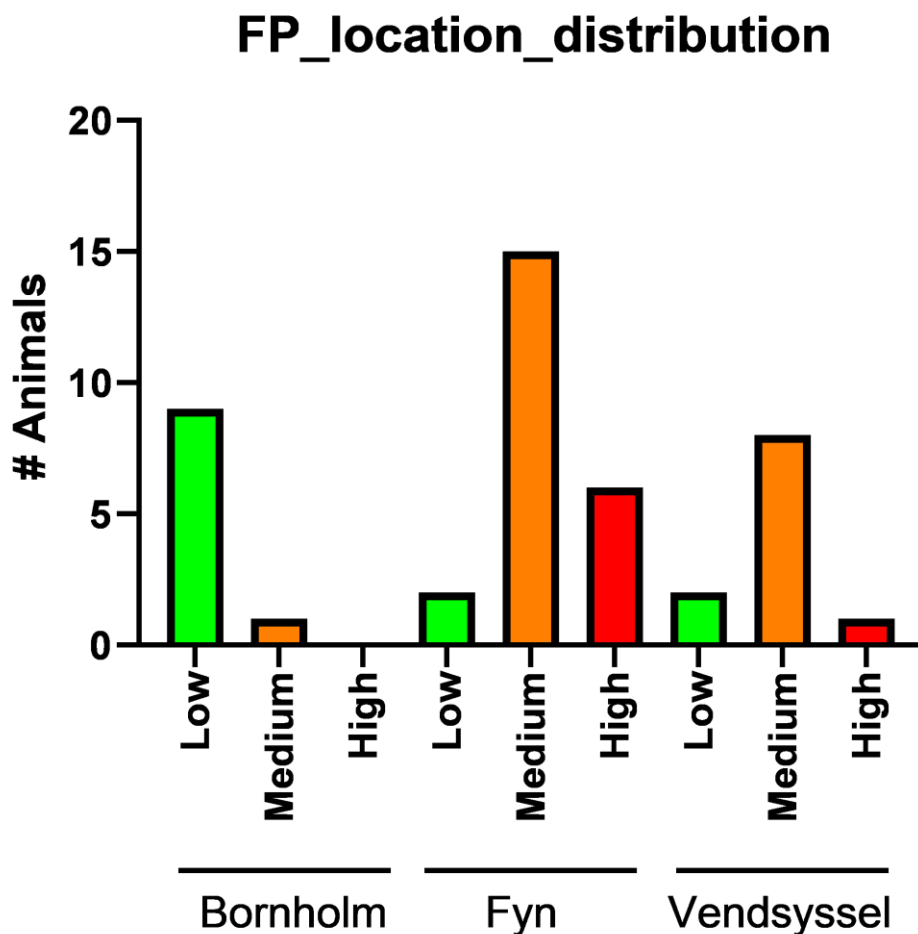


Figur 5.7. Mikrobiota sammensætningen i jagtskudte rådyr (n=85) opdelt efter landsdel i hhv. vommen og colon

5.2.6 Næringsstoffers indflydelse på den mikrobiotiske sammensætning

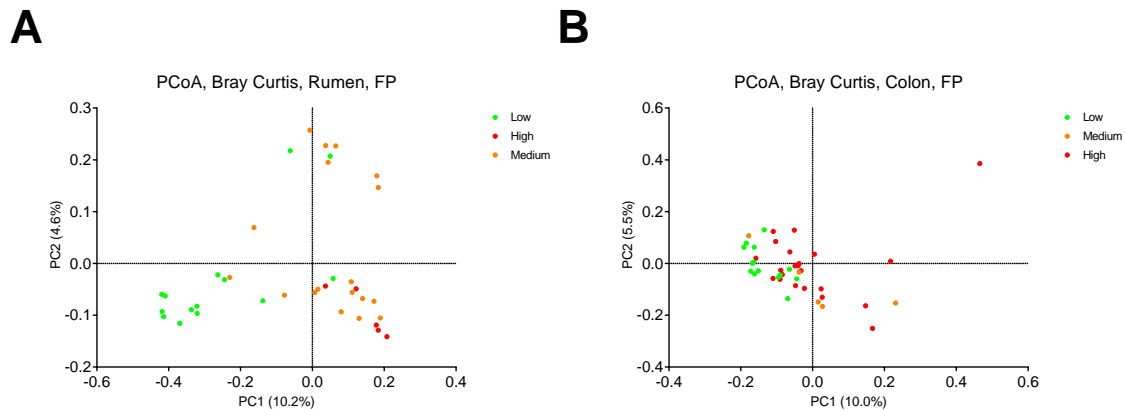
I de efterfølgende analyser har vi undersøgt sammenhænge mellem mikrobiel sammensætning i vom og tyktarm og koncentrationen af en række næringsstoffer fundet i dyrene: råprotein (FP), ikke-fordøjeligt fiber (NDF), samt ikke naturligt foder (artificial food, AF).

Den mest tydelige sammenhæng fandt vi for råprotein, hvor vi ser, at mikrobiel sammensætning i både vom og colon, generelt er mere ens for dyr med hhv. lav, mellem og højt råprotein indhold end på tværs af grupperne (Fig 5.9.A-B). Der er dog også en vis sammenhæng mellem råprotein indhold og lokalitet (figur 5.8), hvilket gør at det er svært at konkludere om det er råprotein niveau eller lokalitet der er bestemmende for bakteriesammensætningen.

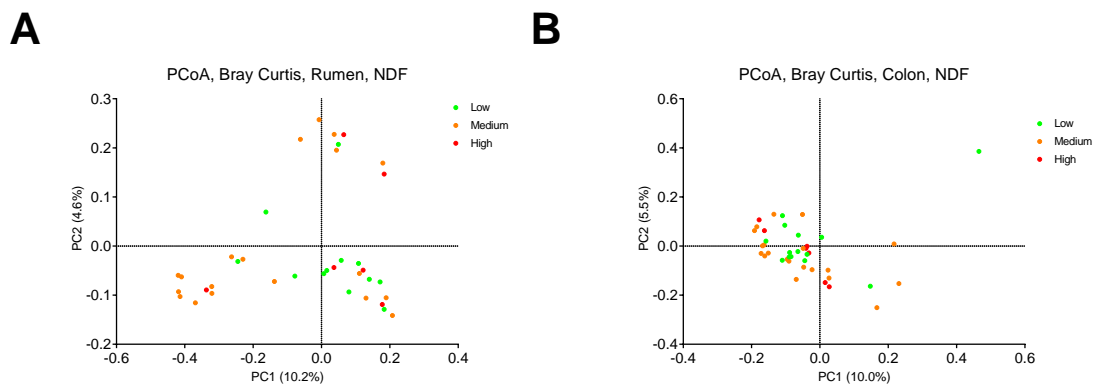


Figur 5.8. Variation i niveauer af råprotein målt i vomindhold udtaget fra jagtskudte rådyr i 3 områder: Bornholm, Fyn og Vendsyssel. Søjlerne viser antal dyr i hver råprotein niveau gruppe (# Animals) i de tre geografiske områder.

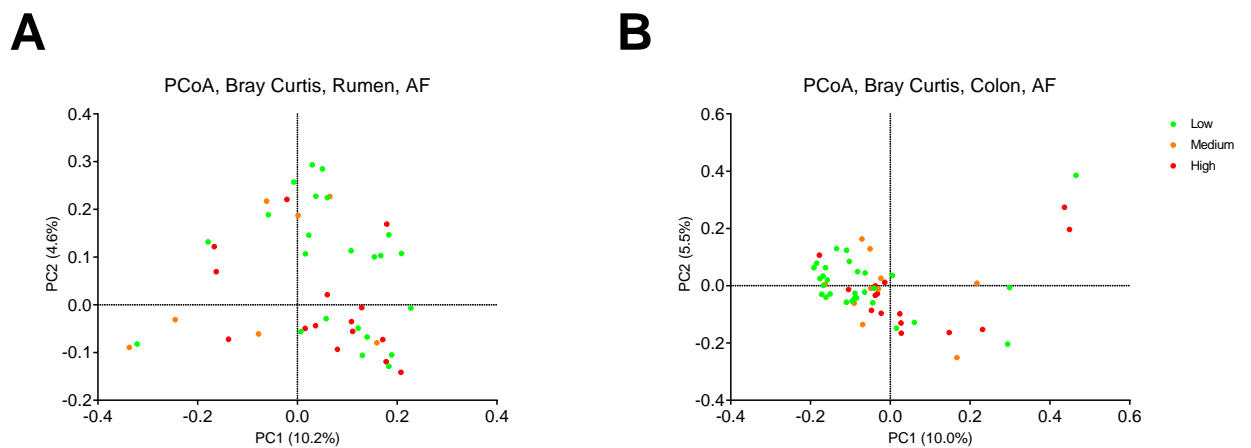
Tilsvarende ser der ud til at være en vis sammenhæng mellem ikke-fordøjeligt fiber (Figur 5.10) og adgang til foder (Figur 5.11), men igen er det svært at konkludere entydigt på disse observationer grundet de lokalitetsbestemte sammenhænge.



Figur 5.9. PcoA analyse af sammenhænge mellem mikrobiel sammensætning i vom og tyktarm og koncentrationen af råprotein (FP) i vomindholdet.



Figur 5.10. PcoA analyse af sammenhænge mellem mikrobiel sammensætning i vom og tyktarm og koncentrationen af ikke-fordøjeligt fiber (NDF) i vomindholdet.

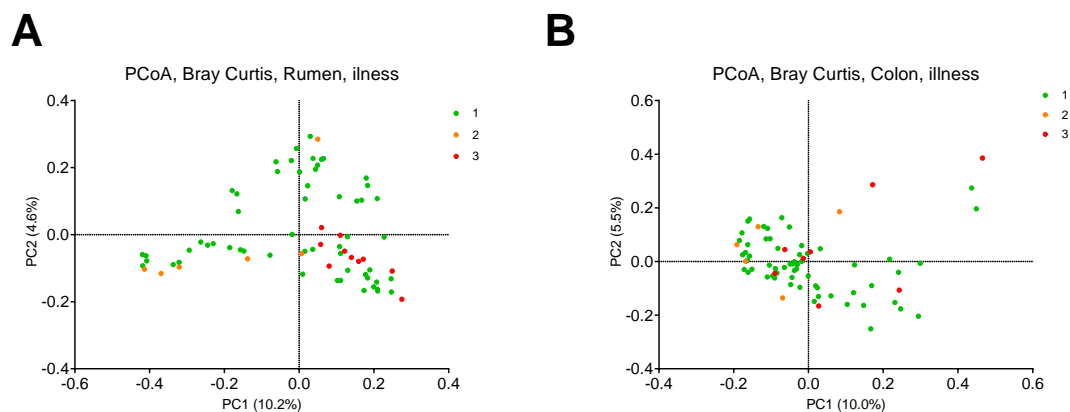


Figur 5.11. PcoA analyse af sammenhænge mellem mikrobiel sammensætning i A. vom (rumen) og B. tyktarmen (colon) hos rådyr og adgang til ikke-naturligt foder (artificial food, AF).

Når man ser alene på fordelingen inden for lokaliteter, eksempelvis Fyn (figur 5.7), ser det ud til at den samme tendens gør sig gældende. Det vil dog være nødvendigt med et større antal dyr for med sikkerhed for at eftervise dette inden for lokaliteterne. Samlet set tyder resultaterne altså på, at den mikrobielle sammensætning i rådyrets vom og tarm påvirkes af adgangen til foder.

5.2.7 Den mikrobielle sammensætning i tarmen hos dyr med sygdom

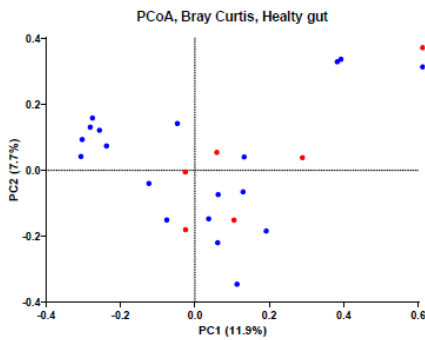
Alle dyrene blev også graderet i forhold til generel sygdomstilstand på en skala fra 1 til 3, (hvor 3 havde betydelige sygdomsmæssige fund, og 2 havde milde læsioner, som formodes at være af lidt eller ingen betydning) og igen sammenholdt med mikrobiota sammensætningen (Fig 5.12). Igen ser der ud til at være en vis sammenhæng mellem sygdom og mikrobiota, som er mest udtalt for vom mikrobiotaen. Der er en tendens til, at de mest syge dyr og dyr med mave og tarmsygdom grupperes samlet. Det er svært at lave en entydig konklusion, da der samtidig også indgår lokalitetsbestemte sammenhænge jf. Fig. 5.7A-B.



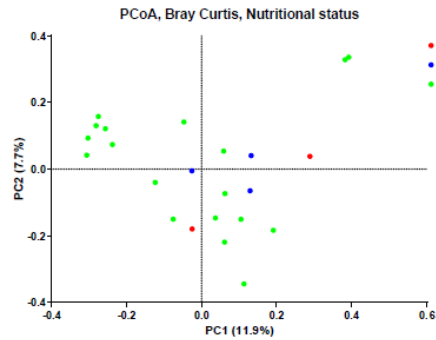
Figur 5.12. PcoA plot analyse af sammenhæng mellem mikrobiota i henholdsvis vom og tyktarm og sygdomsmæssige fund hos rådyr på Fyn. Dyrene blev graderet i forhold til generel sygdomsmæssige fund, hvor 3 havde betydelige sygdomsmæssige fund, og 2 havde milde læsioner, som formodes at være af lidt eller ingen betydning for dyret, og 1 var raske dyr uden sygdomsmæssige fund.

Fyn, rumen

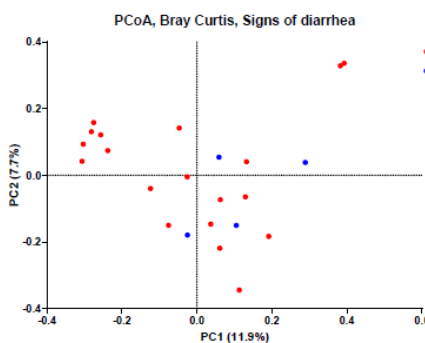
a



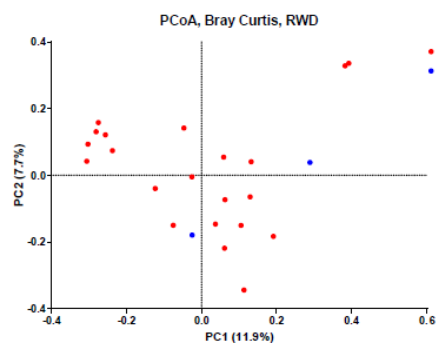
b



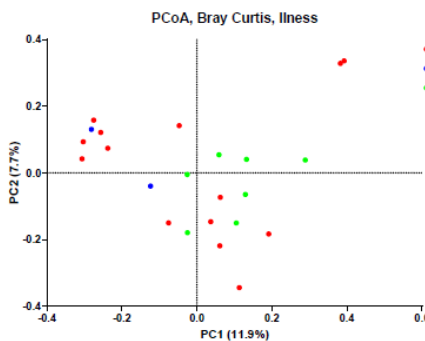
c



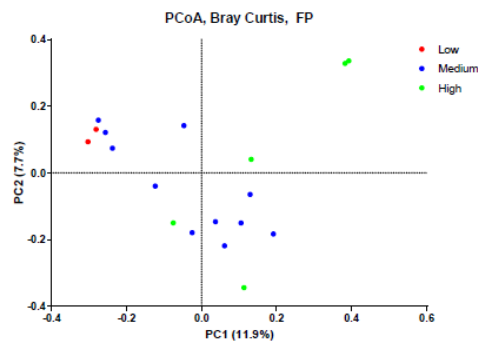
d



e



f

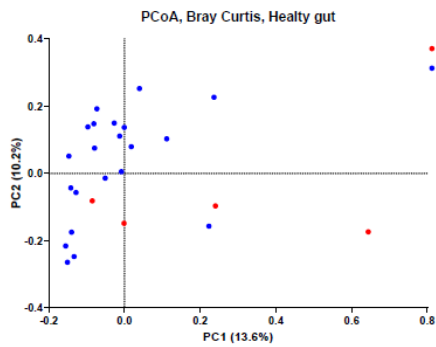


Figur 5.13. Sammenhæng mellem mikrobiel sammensætning i vommen hos fynske dyr og sygdomsmæssige fund. Sygdomsmæssige fund hos rådyrene fra Fyn blev graderet i forhold til:

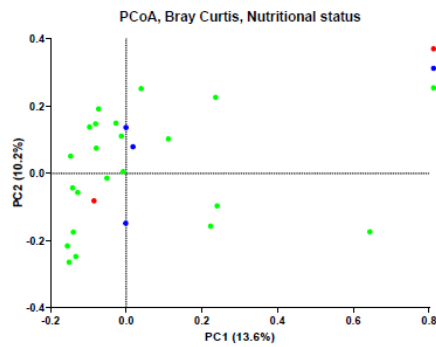
- Tarmsundhed (healthy gut), hvor 1 er normal og 0 er sygdomsmæssige fund med relation til mave og tarmkanal (eksempelvis diarre)
- Huld (nutritional status), hvor 3 er normal, 2 er let afmagret, og 1 er sygeligt afmagret
- Diarre (Diarrhea), hvor 1 er normal og 2 (blå) havde tegn på diarre karakteriseret ved tyndtflydende indhold i tyktarmen og fækal tilsmudsning på bagkroppen
- Sygdomsfund forenelige med råvildtsyge (Roeder Wasting and Diarrhea, RWD), karakteriseret ved sygelig afmagring og tegn på kronisk diarre.
- Sygdom (illness), hvor 3 havde betydelige sygdomsmæssige fund, og 2 havde milde læsioner, som formodes at være af lidt eller ingen betydning.
- PCoA analyse af sammenhænge mellem mikrobiel sammensætning i vommen hos fynske rådyr og koncentrationen af råprotein (FP) i vomindholdet

Fyn, colon

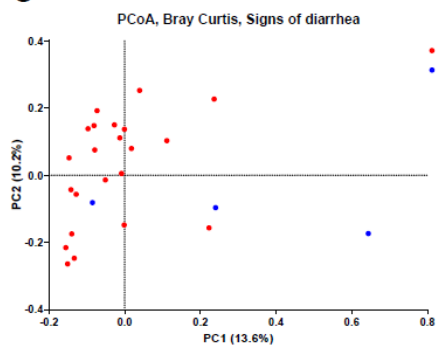
a



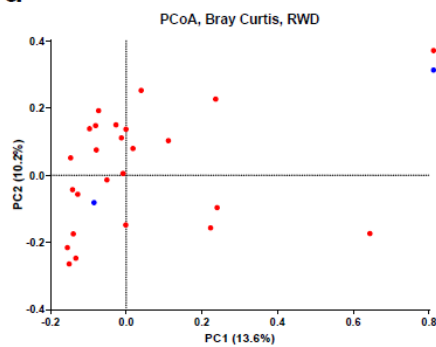
b



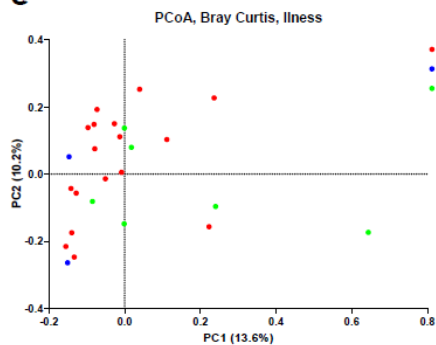
c



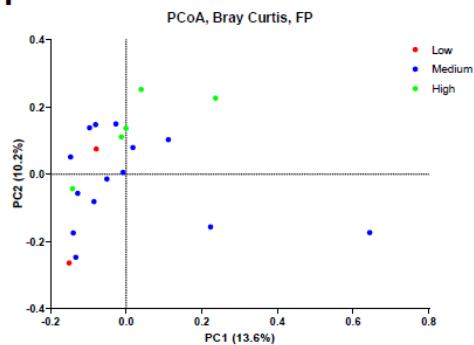
d



e



f



Figur 5.14. PCoA analyse af sammenhæng med mikrobielle fund i tyktarmen, hos rådyr fra Fyn graderet efterl:

- Tarmsundhed, hvor 1 er normal og 2 er sygdomsmæssige fund med relation til mave og tarmkanal (eksempelvis diarre).
- Huld, hvor 3 er normal, 2 er let afmagret, og 1 er sygeligt afmagret.
- Diarre, hvor 1 er normal, og 2 (blå) havde tegn på diarre karakteriseret ved tyndtflydende indhold i tyktarmen og fækal tilsmudsning på bagkroppen.
- Sygdomsfund forenelige med råvildtsyge (Roedeer Wasting and Diarrhea, RWD) karakteriseret ved sygeligt afmagring og tegn på kronisk diarre
- Sygdom (illness), hvor 3 var betydelige sygdomsmæssige fund, og 2 havde milde læsioner, som formodes at være af lidt eller ingen betydning.
- PCoA analyse af sammenhænge mellem mikrobiel sammensætning i tyktarmen hos fynske rådyr og koncentrationen af råprotein (FP) i vomindholdet.

Konklusivt er der ikke påvist resultater eller tendenser i analyseresultaterne, der tyder på, at diarre og afmagring hos de fynske rådyr kan relateres til en generel ubalance i den mikrobielle sammensætning i mave eller tarmkanal hos dyrene, men der er nogen fælles karakteristika herunder især niveauer af bakterien *Anaerovibrio spp.* som er interessante at se nærmere på. Denne og tidligere undersøgelser tyder heller ikke på at parasitinfektion er den udløsende årsag til sygdom. Dette underbygges både af de generelt varierende parasitologiske fund, hvor de syge dyr ikke skiller sig ud, hverken når det gælder antal eller art, samt af manglen på patologiske fund, der kan relateres til parasitinfektioner. Andre mulige årsager, som endnu er uafklarede, kunne være enteropatogene virusinfektioner.

6 LITTERATURLISTE

Abdelmegeid, M.K., Elolimy, A.A., Zhou, Z. *et al.* Rumen-protected methionine during the peripartal period in dairy cows and its effects on abundance of major species of ruminal bacteria. *J Animal Sci Biotechnol* 9, 17 (2018).

Berntsen J. S. & Ørskov, U. 2019: Mikrobiota pilotstudie og det danske råvildts ruminale slimhindeoverfladeareal i relation til sæson, udfodring, vægt og sygdom. Kandidatspeciale, KU.

Castro-Carrera, T., Toral, P.G., Frutos, P., McEwan, N.R., Hervás, G., Abecia, L., Pinloche, E., Girdwood, S.E., Belenguer, A., 2014. Rumen bacterial community evaluated by 454 pyrosequencing and terminal restriction fragment length polymorphism analyses in dairy sheep fed marine algae. *J. Dairy Sci.* 97, 1661–9. doi:10.3168/jds.2013-7243

Cederlund, G.; Ljungqvist, H. & Stålfelt, F. 1980: Foods of Moose and Roe deer at Grimsö in central Sweden. Results of Rumen Content Analyses. *Swedish Wildlife Research* vol 11, nr. 4, 1980 pp171-224.

Clauss, M.; Fritz, J.; Bayer, D.; Hummel, J.; Streich, W. J.; Südekum, K. H.; Hatt, J. M., 2008: Physical characteristics of rumen contents in two small ruminants of different feeding type, the mouflon (*Ovis ammon musimon*) and the roe deer (*Capreolus capreolus*), 112, 195–205.

De Menezes, A.B., Lewis, E., O'Donovan, M., O'Neill, B.F., Clipson, N., Doyle, E.M., 2011. Microbiome analysis of dairy cows fed pasture or total mixed ration diets. *FEMS Microbiol. Ecol.* 78, 256–265. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01151.x

Fernando, S.C., Purvis, H.T., Najjar, F.Z., Sukharnikov, L.O., Krehbiel, C.R., Nagaraja, T.G., Roe, B.A., De Silva, U., 2010. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7482–7490. doi:10.1128/AEM.00388-10

- Guan, Y.; Yang, H.; Han, S.; Feng, L.; Wang, T.; Ge, J., 2017: Comparison of the gut microbiota composition between wild and captive sika deer (*Cervus nippon hortulorum*) from feces by highthroughput sequencing. *AMB Express.*, 7.
- Hansen K. (eds.) 1981: *Dansk Feltflora*. Gyldendal 1981
- Holand, O.; Mysterud, A.; Wannag, A.; Linnell, J. D. C., 1998: Roe deer in northern environments : Physiology and behaviour.
- Holechek, J. I; Vavra, M. and Pieper, R.D. 1982: Botanical Composition Determination of Range Herbivore Diets: A Review. *Journal of Range Management* 35(3), May 1982. Pp 310-315.
- Hofmann, R. R., 1989: Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants : a comparative view of their digestive system ***, *Oecologia* 78: 443–457.
- Johnson, K.A., Johnson, D.E., 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73, 2483–2492.
- Jensen. P.V. 1968: Food selection of the Danish Red Deer (*Cervus elapus L.*) as Determined by examination of the Rumen Content. *Danish Review of Game Biology* Vol. 5 no 3. 1968, pp: 3-38.
- Khafipour, E.; Li, S.; Tun, H. M.; Derakhshani, H.; Moossavi, S.; Plaizier, J. C., 2016: Effects of grain feeding on microbiota in the digestive tract of cattle, 6, 13–19.
- Krause, D. O.; Nagaraja, T. G.; Wright, A. D. G.; Callaway, T. R., 2013: Board-invited review : Rumen microbiology: Leading the way in microbial ecology. *American Society of Animal Science*.
- Kim, J. H.; Hong, S. W.; Park, B. Y.; Yoo, J. G.; Oh, M. H., 2018: Characterisation of the bacterial community in the gastrointestinal tracts of elk (*Cervus canadensis*). *Springer Nature Switzerland*.
- Kong, Y., Teather, R., Forster, R., 2010. Composition, spatial distribution, and diversity of the bacterial communities in the rumen of cows fed different forages. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74, 612–622.
- Li, Z., Wright, A.D.G., Liu, H., Fan, Z., Yang, F., Zhang, Z., Li, G., 2015. Response of the rumen microbiota of sika deer (*Cervus nippon*) fed different concentrations of tannin rich plants. *PLoS One* 10, 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0123481
- Li, Z., Zhang, Z., Xu, C., Zhao, J., Liu, H., 2014. Bacteria and Methanogens Differ along the Gastrointestinal Tract of Chinese Roe Deer (*Capreolus pygargus*) 4, 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0114513
- Li, Z.P., Liu, H.L., Li, G.Y., Bao, K., Wang, K.Y., Xu, C., Yang, Y.F., Yang, F.H., Wright, A.-D.G., 2013. Molecular diversity of rumen bacterial communities from tannin-rich and fiber-rich forage fed domestic Sika deer (*Cervus nippon*) in China. *BMC Microbiol* 13, 1–12. doi:10.1186/1471-2180-13-151
- Li R.W., Connor E.E., Li C., Baldwin Vi R.L., Sparks M.E. 2012. Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomic tools. *Environ. Microbiol.* 14 (1):129–139.

Li, Z.; Zhang, Z.; Xu, C.; Zhao, J.; Liu, H.; Fan, Z.; Yang, F.; Wright, A. D. G.; Li, G., 2014a: Bacteria and methanogens differ along the gastrointestinal tract of Chinese roe deer (*Capreolus pygargus*). PLoS ONE., 9, 1–20.

Lid, J. 1985: Norsk, Svensk, Finsk Flora. Det Norske Samlaget 1985.

Mao S., Zhang R., Wang D., Zhu W. 2013. Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation on rumen microbiota in dairy cattle using pyrosequencing. *Anaerobe* 24:12–19.

Murray, B.Y.R.M., Bryant, A.M., 1976. Large Intestine of Sheep.

Marinucci M. T., A. Capecci, N. Riganelli, G. Acuti, C. Antonini, O. Olivieri 2005: Dietary preferences and ruminal protozoal populations in roe deer (*Capreolus capreolus*), fallow deer (*Dama dama*) and mouflon (*Ovis musimon*) ITAL.J.ANIM.SCI. VOL. 4 (SUPPL. 2), 401-403, 2005.

Nelson, K.E., Zinder, S.H., Hance, I., Burr, P., Odongo, D., Wasawo, D., Odenyo, A., Bishop, R., 2003. Phylogenetic analysis of the microbial populations in the wild herbivore gastrointestinal tract: Insights into an unexplored niche. *Environ. Microbiol.* 5, 1212–1220.

Nichols R.V., M Åkesson, P Kjellander 2016: Diet assessment based on rumen contents: A comparison between DNA metabarcoding and macroscopy. PloS one, 2016 - journals.plos.org

Myserud, A., 2000: Diet overlap among ruminants in Fennoscandia. *Oecologia* 2000, 124:130137

Pekka, H., 1980: Food Composition and Feeding Habits of the Roe Deer in Winter in Central Finland. *ACTA THERIOLOGICA* 25, 395–402.

Petersen, M.R. 1998: Botaniske analyser af vomprøver af rådyr (*Capreolus capreolus*) fra Borris Hede. Ms.Thesis. Botanisk institut Københavns Universitet. Sider 116.

Popova, M., Morgavi, D.P., Martin, C., 2013. Methanogens and methanogenesis in the rumens and ceca of lambs fed two different high-grain-content diets. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 1777–1786. doi:10.1128/AEM.03115-12

Robbins, C. T., 1993: *Wildlife Feeding and Nutrition* Second. Academic Press, Inc. a) s. 270 b) s. 268

Russell, J.B., Rychlik, J.L., 2008. That Alter Rumen Microbial Ecology 292, 1119–1122. doi:10.1126/science.1058830

Soest, P. J. Van, 1994: *Nutritional Ecology of The Ruminant* Second Edition. a) s. 250

Sundset, M.A., Præsteng, K.E., Cann, I.K.O., Mathiesen, S.D., MacKie, R.I., 2007. Novel rumen bacterial diversity in two geographically separated sub-species of reindeer. *Microb. Ecol.* 54, 424–438. doi:10.1007/s00248-007-9254-x

Tremaroli, V., Bäckhed, F., 2012. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 489, 242–249. doi:10.1038/nature11552

Wu, S., Baldwin, R.L., Li, W., Li, C., Connor, E.E., Li, R.W., 2012. The Bacterial Community Composition of the Bovine Rumen Detected Using Pyrosequencing of 16S rRNA Genes. *Metagenomics* 1, 1–11.

Yang Q, Huang X, Wang P, Yan Z, Sun W, Zhao S, Gun S. Yang Q Longitudinal development of the gut microbiota in healthy and diarrheic piglets induced by age-related dietary changes. , et al. *Microbiologyopen*. 2019 Dec;8(12):e923.

Zachary, J. F.; McGavin, M. D., 2012: Pathologic Basis of Veterinary Disease fifth edition. a) s. 343-52 b) s. 343-344 c) s. 344

Østbye, K.; Wilson, R.; Rudi, K., 2016: Rumen microbiota for wild boreal cervids living in the same habitat. *FEMS Microbiology Letters*. 363, 1–6.