

Kandidatnummer 10010, 10012 og 10018

Kartlegging av mikrobiom i geitemelk ved 16s rRNA metagenomikk analyse

BTA3002 Bacheloroppgave for Bioteknologi

Bacheloroppgave i Bioteknologi

Veileder: Ann-Kristin Tveten

Medveileder: Wietze Kuipers

Mai 2023

Kandidatnummer 10010, 10012 og 10018

Kartlegging av mikrobiom i geitemelk ved 16s rRNA metagenomikk analyse

BTA3002 Bacheloroppgave for Bioteknologi

Bacheloroppgave i Bioteknologi
Veileder: Ann-Kristin Tveten
Medveileder: Wietze Kuipers
Mai 2023

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for biologiske fag Ålesund



Kunnskap for en bedre verden

Forord

Arbeidet med denne bacheloroppgaven ble utført som avsluttende oppgave ved studieprogrammet bioteknologi ved NTNU i Ålesund, institutt for biologiske fag. Den ble gjennomført i tidsrommet januar til mai 2023 på NTNUs bioteknologiske laboratorium på Campus Ålesund.

Problemstillingen ble i første omgang utformet av ekstern veileder og oppdragsgiver, Wietze Kuipers, sammen med et gruppe medlem.

Vi ønsker å rette en takk til vår veileder Ann-Kristin Tveten, førsteamanuensis ved institutt for biologiske fag, for oppfølging ved laboratoriearbeid og oppgaveskriving. I tillegg er vi takknemlig for bistand fra Wietze, som har gitt oss god veiledning, motivasjon og vist oss hvor viktig dette arbeidet er for geitemelkproduksjon globalt.

Det har til tider vært krevende arbeid, men læringsutbyttet for oppgaven har til gjengjeld vært stort, og vi vil ha stor nytte av denne kunnskapen til videre studier og senere i arbeidslivet.

Sammendrag

Denne bacheloroppgaven i bioteknologi utforsker potensialet til 16s rRNA sekvensering som verktøy i arbeid med kartlegging av det bakterielle mikrobiomet i tankmelk fra geit. Målet med oppgaven var å identifisere dominerende takson (hovedsakelig på genus nivå), og å lete etter mulige korrelasjoner mellom mikrobiomets sammensetning og bakterietall fra bactocount (Bentley Instruments). Forskningen involverte en kombinasjon av gårdsbesøk, laboratoriarbeid med påfølgende bearbeiding av sekvenseringsdata og litteratursøk. Gårdsbesøkene ble gjort i forbindelse med prøveinnsamling over en periode på 16 uker, hvor det ble innhentet 43 tankmelkprøver ved 22 ulike tidspunkt i perioden etter at dyrene var kommet ned fra utmarksbeite høsten 2022. Laboratoriarbeidet omfattet bearbeiding av melkeprøvene for tillaging av barcode-bibliotek med påfølgende sekvensering med Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific) hvorav ni prøver ga vellykkede resultater. Sekvensdata ble kvalitetssikret og identifisert i Ion Reporter, og videre bearbeiding av resultatene ble gjort i Microsoft Excel. Resultatene av denne studien viser at 16s rRNA sekvensering gir et innblikk i den totale sammensetningen og mengden av bakterier i geitemelk, der vi fant at de dominerende genus i prøvene totalt og på tvers av prøvetidspunkt var *Corynebacterium* og *Pseudomonas*; i tillegg til varierende grad av *Atopostipes*, *Facklamia*, *Psychrobacter*, *Staphylococcus* og *Jeotgalicoccus*. Videre viste resultatene at den mikrobielle samfunnsstrukturen rett etter utmarksbeite hadde større diversitet og bar preg av tilstedeværelsen til flere genus uten at noen av disse kan ansees som spesielt dominerende, i motsetning til prøver tatt gjennom inneførsingsperioden hvor det var en mer stabil sammensetning av hvilke genus som var til stede samt hvilke av disse som dominerte; og dette gikk igjen i de resterende prøvene. Tidsdimensjonen spilte en viktig rolle i denne studien og var en begrensende faktor, da tiden mellom prøvene var lang nok til at flere faktorer kan ha påvirket den bakterielle sammensetningen og bakterietallet; noe som medførte utfordringer rundt indentifisering av årsak og virkning hva angår økning i bakterietall. Likevel kom vi frem til at den prøven i settet med lavest kvalitet (høyest bactocount) var dominert av *S. warneri*, som vi antar kan være årsaken til det høye bakterietallet for denne prøven. For de resterende prøvene er det vanskelig å si noe om korrelasjon mellom sammensetning og bakterietall, videre studier med større antall prøver over en lengre periode med kortere tidsintervaller kan være fordelaktig for å utforske dette forskningsspørsmålet videre.

Et annet poeng er at vi i vår studie undersøkte mikrobiomet med den tradisjonelle metoden Operational Taxonomic Unit (OTU) på familie-, genus- og speciesnivå. For framtidige studier tror vi det vil være interessant å gå dypere ved bruk av Amplicon Sequence Variants (ASV) på stamme-nivå, for å identifisere mindre variasjoner i bakterienes genom, noe som kan gi et mer detaljert bilde av sammensetningen til det mikrobielle samfunnet, og de faktiske aktørene. Eksempelvis er det slik at ulike bakterier i samme genus kan ha svært ulike egenskaper, og mellom ulike stammer av samme species vil det også kunne være betydelige forskjeller. Samlet sett gir denne oppgaven viktig innsikt i potensialet til 16s rRNA sekvensering som analysemetode for å få en dypere innsikt i-, og forståelse av det mikrobielle samfunnet i tankmelk fra geit. Ved å identifisere de spesifikke mikrobielle species som er til stede til ulike tider, kan produsenter bedre forstå faktorer som påvirker melke kvaliteten og utvikle strategier for å optimalisere produksjonen. Visse bakterier er assosiert med forbedret melkekvalitet, mens andre i motsetning knyttes til forringelse og redusert holdbarhet på melk og melkeprodukter. Ved å forstå hvilke species som er til stede og når, om disse er assosiert med forbedret kvalitet eller forringelse, og slik arbeide mot å forstå den mikrobielle økologien til geitemelk, kan bønder optimalisere produksjonspraksisene, forbedre melkekvaliteten og sikre sikkerheten til produktet sitt.

Abstract

This bachelor's thesis in biotechnology explores the potential of 16s rRNA sequencing as a tool for mapping the bacterial microbiome in goat bulk milk. The aim of the thesis was to identify dominant taxa (primarily at the genus level) and to search for potential correlations between microbiome composition and bacterial counts from bactocount (Bentley Instruments). The research involved a combination of farm visits, laboratory work, subsequent processing of sequencing data, and literature searches. The farm visits were made in connection with sample collection over a period of 16 weeks, after the animals had returned from grazing in the autumn of 2022. The laboratory work involved processing of the milk samples to create a barcode library, followed by sequencing with Ion Torrent PGM (ThermoFisher). Sequence data were identified in Ion Reporter, and further processing of the results was done in Excel (Microsoft). The results of this study show that 16s rRNA sequencing provides insight into the total composition and quantity of bacteria in milk, where we found that the dominant genera across sampling points were *Corynebacterium* and *Pseudomonas*, in addition to varying degrees of *Atopostipes*, *Facklamia*, *Psychrobacter*, and *Jeotgalicoccus*. The results showed that the microbial community structure immediately after grazing had greater diversity and was characterized by the presence of several genera, none of which were particularly dominant, unlike during the feeding period where there was a more stable composition of which genera were present and which ones dominated. This pattern was consistent in the remaining samples. The time dimension played an important role in this study and was a limiting factor, as the time between samples was long enough for several factors to have affected the bacterial microbiota and bacterial count, which posed challenges in identifying cause and effect regarding increases in bacterial count. However, we found that the sample with the lowest quality in the set was dominated by *S. warneri*, which we believe could be the cause of the high bacterial count for this sample. For the remaining samples, it is difficult to say anything about the correlation between composition and bacterial count, and further studies with a larger number of samples over a longer period with shorter time intervals may be advantageous to explore this research question further. An additional point is that our study examined the microbial composition using the traditional Operational Taxonomic Unit (OUT) method at the family, genus, and species levels. For future studies, we believe it would be interesting to go deeper by using Amplicon Sequence Variants (ASV) at the strain level to identify minor variations in bacterial genomes, which could provide a

more detailed picture of the microbial community and the actual actors involved. For example, different bacteria in the same genus can have very different properties, and there can also be significant differences between different strains of the same species. Overall, this study provides important insights into the potential of 16s rRNA sequencing as an analytical method to gain a deeper understanding of the microbial community in goat tank milk. By identifying the specific microbial species present at different times, producers can better understand factors that affect milk quality and develop strategies to optimize production. Certain microbes are associated with improved milk quality, while others are linked to deterioration and reduced shelf life of milk and dairy products. By understanding which species are present and when, whether they are associated with improved quality or deterioration, and thus working towards understanding the microbial ecology of goat milk, farmers can optimize production practices, improve milk quality, and ensure the safety of their product.

Innholdsfortegnelse

FORORD	1
SAMMENDRAG	2
ABSTRACT	4
INTRODUKSJON	8
INNLEDNING	8
PROBLEMSTILLING OG AVGRENSNINGER	9
TEORI	10
GENERELT OM PRODUKSJONEN	10
GEITEMELK	11
<i>Kvalitetsparametere</i>	12
MIKROORGANISMER I GEITEMELK	13
<i>Oversikt over normalflora og patogene bakterier</i>	15
UTFORDRINGER MED LAGRING OG KVALITET	16
<i>Biofilm</i>	16
<i>Temperatur og pH</i>	17
<i>Faktorer som påvirker melk</i>	18
<i>Faktorer relatert til dyret</i>	18
PÅVISNINGSMETODER INNENFOR MELKEKVALITET	20
<i>Dyrkning av bakterier på næringsmedium</i>	20
<i>Bakterietall – Bactocount</i>	20
<i>Celletall – Somatic Cell Count</i>	21
METAGENOMIKK 16S AMPLIKON SEKVENSERING	22
MATERIALER OG METODER	23
INNHEMING AV PRØVEMATERIALE	23
TRANSPORT OG LAGRING.....	23
EKSTRAKSJON AV BAKTERIECELLER FRA MELK.....	23
DNA ISOLERING.....	24
AMPLIFISERING AV 16S rDNA FRAGMENTER	24
LIBRARY PREP.	24
<i>Templat preparering</i>	25

SEKVENSERING – ION TORRENT PGM.....	25
BEHANDLING AV RÅDATA	25
RESULTAT	26
MIKROBIOM	28
BAKTERIETALL.....	30
DISKUSJON	31
BEGRENSNINGER	35
FRAMTIDIGE ASPEKTER	36
KONKLUSJON.....	37
LITTERATURLISTE.....	38
VEDLEGG.....	42
1.DNA ISOLERING.....	42
2.AMPLIFISERING 16S rDNA.....	46
3.LIBRARY PREP. AV 16S AMPLIKON	53
4.BACTOCOUNT VERDIER	60
5.PRØVEUTTAK	61
6.DNA KONSENTRASJON MÅLT MED QUBIT ETTER DNA ISOLERING (SIDE 1 AV 2).....	62
6. FORTSETTELSE DNA KONSENTRASJON MÅLT MED QUBIT ETTER DNA ISOLERING (SIDE 2 AV 2)	63
7.UTREGNING FORTYNNING TIL AMPLIFISERING.....	64
8.QUBIT KONSENTRASJON FØR SEKVENSERING	65
9.RESULTAT BAKTERIER FAMILIENIVÅ	66
10.RESULTAT BAKTERIER GENUSNIVÅ	67
11.RESULTAT BAKTERIER SPECIESNIVÅ (SIDE 1 AV 2)	68
11.FORTSETTELSE RESULTAT BAKTERIER SPECIESNIVÅ (SIDE 2 AV 2)	69

Introduksjon

Innledning

Melk er en del av kostholdet til 6 milliarder mennesker på verdens basis, der de fleste av disse bor i utviklingsland. Geitemelk er en viktig kilde til meieriprodukter i mange regioner i verden, inkludert Norge. Melken er essensiell for ysting og produksjon av ost, og er ellers sett på som verdifull på grunn av et gunstig næringsinnhold med blant annet fett, vitaminer og mineraler (1, 2). I Norge er kvaliteten på geitemelk som kommer til Tine SA sine meierier i verdenstoppen. Det er satt kvalitetskrav med høy terskel for hvilken melk som kan leveres og brukes til videre foredling. Næringsinnholdet blir analysert når tankbilen skal hente melken på gårdene, men også når den ankommer meieriet. Tine har satt kvalitetsparameter med fokus på blant annet bakterier og somatiske celler, som skal hindre videre bruk av melk med for stor forekomst av mikroorganismer. Disse parameterne sikrer at melka ikke endrer sine egenskaper, noe som kan føre til kassering av melken (3, 4).

Melkeprøver blir analysert i henhold til standardiserte kvalitetsmål ved bruk av flowcytometer og dyrkningsmetoder. Analysene ved bruk av flowcytometer gir resultat i form av antall celler, men sier lite om disse cellene er patogene eller en del av normalt mikrobiom i geitemelk. Dyrkningsmetodene gir derimot resultat med forbehold om at man vet hva man leter etter. En stor del av bakteriene i melk fra geit og ku er dyrkbare, og tidligere studier har basert identifisering på kulturavhengige metoder. Det er imidlertid ikke mulig å få en total oversikt over alle mikroorganismene i samfunnet uten bruk av kulturuavhengige metoder. I følge *Nema et al.* er den beste dekingen til kulturavhengige metoder knapt 1-10 % av den totale bakteriepopulasjonen i et gitt miljø. Derfor er kartlegging av mikrobiom i geitemelk essensielt for å kunne si noe om hva som påvirker melkekvaliteten, og hvilke bakterier som forårsaker uønsket bakterievekst (2, 5).

Mikrobiom i geitemelk spiller en rolle for å bestemme dens kvalitet og sikkerhet for konsumenten. Det er relativt lite kjent om den fullstendige sammensetningen og mangfoldet i norske gårder. Mye av den foreliggende vitenskapelige litteraturen setter mest fokus på kumelk, grunnet det faktum at kyr har blitt mer omfattende studert i forskningsmiljøer. Bakterietallet er nødvendig for at bonden skal ha kontroll og for å kunne levere melk med best mulig kvalitet. Flere leveringer av melk med et bakterietall over en gitt grenseverdi fører til at

bonden ikke lenger kan levere melken, og det kan føre til kassering av produsert melk og store konsekvenser økonomisk. Det er behov for å differensiere mellom normalflora og patogene bakterier, og det er mulig ved å benytte sekvenseringsteknikker som «Next Generation Sequencing» (NGS). NGS teknologiens utvikling innenfor gensekvensering har gjort det mulig å studere det mikrobielle samfunnet i melk, med bruk av blant annet 16S rRNA gensekvensering, som retter seg mot bevarte regioner i bakteriegenomet, for å kunne identifisere og kvantifisere med utgangspunkt i taksonomi (6).

Problemstilling og avgrensninger

Målet med denne oppgaven var å kartlegge mikrobiomet i geitemelk tatt fra en gitt prøveperiode, ved bruk av 16S rRNA amplikonsekvensering. Primært var formålet å identifisere dominerende bakterielle takson og deres relative forekomster i tankmelk fra geit, sekundært ønsket vi å se etter sammenheng mellom bactocount og sammensetning; og til sist å sannsynliggjøre opphavet til dominante takson dersom mulig.

Teori

Generelt om produksjonen

Et gjennomsnittlig geitebruk har en besetning på rundt 120 dyr, der omtrent 90 av dem er melkegeiter og 20-30stk er ungdyr. Melkegeitene er mellom 1-4 år gamle, og ungdyrene er forrige års kje. Antall dyr varierer etter hvor man er i sesongen. Rasen er norsk melkegeit, som er en blanding av norske lokalraser og fransk alpin. På grunn av ønske om forbedret melke kvalitet ble det på 1960-tallet avlet bort de norske lokale rasene, og fransk alpin ble blandet inn til å bli det som i dag heter norsk melkegeit (7).

Gårdsbruket følger geitas naturlige syklus, med kjeing i mars, og de kjeer i en samlet flokk. Geitene melkes dermed for fullt, der de oppstalles i et fjøs med talle som underlag. I juni sendes de på setra der de blir melket med et tilsvarende melkeanlegg som nede på gården. Her går de på utmarksbeite og blir hentet for melking to ganger om dagen. I september blir de hentet ned til gården igjen, der de melkes på samme måte som oppe på setra, men med to forskjellige melketanker. Inne får de grovfôr, og det gis relativt lite kraftfôr (ca. 8 hg/dag). Det tilvennes gradvis til grovfôr og kraftfôr når de kommer ned fra setra, for å unngå brå overgang for vom miljøet til ensidig fôring. I oktober blir en bukk sluppet løs sammen med melkegeitene i brunstperioden som er på 3 uker. Melkeproduksjonen stoppes i januar, ved å gå fra melking to ganger om dagen til kun én melking om dagen. Ved melkestopp tar det rundt 18 timer til melkeproduksjonen i juret avtar. Avsiningsperioden er på 2 måneder og drektighetstiden er på rundt 5 måneder. Geitene som er 4 år blir sendt til slakt, slik at rundt 25% av besetningen blir skiftet ut med påsatt ungdyr.

I melkeanlegget blir melken fraktes ved hjelp av et vakuumsystem til en avkjølt melketank (3-4°C), via syrefaste rør og gjennom et filter som skiftes ut før hver melking. Melken i tanken blir rørt regelmessig og avkjølt helt til tankbilen kommer og henter den. Melkeanlegget vaskes med konsentrert base, med en temperatur på rundt 60°C, da basen ikke vil kunne drepe mikroorganismer ved temperaturer under 40°C. Melketanken har et eget system for vasking som er uavhengig vasking av melkeanlegget. Her skjer vasking ved bruk av syre og base, som tankbilsjåføren starter med en gang tanken er tømt for melk.

Rutiner ved hygiene under melking er ansett som god, da de blir vasket med pH nøytral såpe og klut, og det tidvis brukes engangshansker. Jurene blir også prøvemelket før hovedmelkingen ved hvert stell. Grunnen til at de prøvemelkes først er på grunn av antatt opphopning av epitelceller som samler seg nede ved speneåpningen, noe som kan påvirke melke kvaliteten (8). Det antas at generell helse til dyrene er god, da det gjennomsnittlige celledtallet ligger under 500×10^3 (se teori «Celledtall»). Om det oppstår tegn til sykdom på dyr som kan påvirke melke kvaliteten, blir disse melket utenfor melkeanlegg for å hindre eventuell spredning og kontaminering.

Geitemelk

Generelt kan en si at geitemelk er et rikt næringsmiddel med høyt innhold av vann og næringsstoffer. Melken inneholder i gjennomsnitt 12,2 % tørrstoff og 87,8% vann. Det gjennomsnittlige innholdet av tørrstoff er 3,8 % lipid, 3,5 % protein, 4,1 % laktose og 0,8 % aske. Den har mer lipid, protein og aske enn kumelk, men mindre laktose. Det er i tillegg forskjeller i både lipid-, protein- og karbohydratsammensetning sammenlignet med kumelk. Geitemelk ligger i området nøytral til svakt sur mellom pH 6,5-6,8. Kvalitativt er den kjemiske sammensetningen konstant, men kvantitativt er det store variasjoner som påvirkes av en rekke faktorer (ev. kombinasjoner av disse) deriblant rase, fôringsregime, laktasjonsstadium og jurhelse (9-11). Se avsnitt «faktorer som påvirker melk».

Det høye nærings- og vanninnholdet, sammen med en nær nøytral pH gjør at mange bakterier kan vokse i melk. Selv små forskjeller i sammensetning kan ha en betydelig effekt på det mikrobielle mangfoldet. Noen av næringsstoffene er direkte tilgjengelige for mikroorganismene, mens andre kan gjøres tilgjengelige gjennom andre populasjoners metabolisme i form av metabolitter (4).

Kvalitetsparametere

Samlet sett er kvalitetsparametere til rå melk viktige for å sikre at melken er trygg for konsum og egnet for bruk i ulike meieriprodukter, og brukes til å vurdere om produktet oppfyller forhåndsbestemte kvalitetsstandarder og spesifikasjoner. I Norge er kvalitetsparametere for melk regulert av Mattilsynet, men også spesifisert av de som driver med foredling av melk og melkeprodukter til humant konsum. I Tine SA har de et eget kvalitetsregelverk for geitemelk. Det benyttes flere parametere for å måle kvalitet, deriblant innhold av: kjemiske komponenter (tørrestoff, med minimums grense for fett- og proteininnhold), medisinerester (antibiotika), (endo)sporer, urea, celletall og bakterietall (12).

Celletall (SCC)

Celletall, eller somatiske celler, er et mål på antall hvite blodlegemer i melka, som kan gi en indikator på infeksjonsnivå i juret. Celletall over 1,4 -1,7 mill $\times 10^3$ er ikke akseptert, noe som fører til kassering av geitemelken. Mange studier viser at SCC i geitemelk sammenlignet med SCC i kumelk, generelt sett er høyere og viser større variasjon. Dette kan til dels skyldes fysiologiske forskjeller i melkesekresjon, hvor ku har mesokrin- og geit har apokrinmelkesekresjon (hvor epitelceller og cytoplasmiske partikler fra de melkeproduserende cellene skilles ut med melka) (13, 14).

Totalt bakterietall (TBC)

Melk av tilfredsstillende kvalitet (her med hensyn til bakterietall) inndeles i fire klasser, avhengig av antall enkeltbakterier pr. ml melk. Den høyeste kvaliteten er elitemelk ($BC \leq 100\ 000$) som gir tillegg for ekstra god kvalitet. Den nest høyeste er 1. klasse (101 000-150 000) og ansees som standardkvalitet, noe som verken gir tillegg eller trekk. 2. klasse (151 000-175 000) og 3. klasse ($BC > 175\ 000$) er anset som henholdsvis dårlig og svært dårlig kvalitet, hvorav begge medfører trekk (se tabell 1). Dårligere melk blir kassert (13, 15).

Tabell 1: Viser grenseverdiene for celletall, bakterietall, frie fettsyrer (FFA) og andel tørrstoff, relatert til de fire ulike kvalitetsklassene for geitemelk i TINE (TINE, 2020) (13).

	Elitemelk	1. klasse	2. klasse	3. klasse
Celletall (SCC/mL)	≤1 200 000	1 201 000 -1 400 000	1 401 000 -1 750 000	>1 750 000
Bakterier (antall/mL)	≤ 100 000	101 000 – 150 000	151 000 – 175 000	>175 000
FFA* (mmol/L)	≤ 1,1	1,2 - 1,4	1,5 – 1,7	>1,7
Tørrstoff**	Tillegg for >11%, trekk for <11% TS.			

*Ekstra pristillegg for <1,0 mmol/L FFA. **Summen av innholdet av protein, fett og laktose i melken.

Tabell 2: Normaliserte verdier (\log_{10} bakterier/ml) for antall bakterier fra tabell 1.

	Elite	1.Klasse	2.Klasse	3.Klasse
Bakterier (antall/ml)	≤ 100 000	101-150 000	151-175 000	>175 000
Bakterier (\log_{10} antall/ml) \approx	≤ 5,00	5,00-5,18	5,18-5,24	>5,24

Mikroorganismer i geitemelk

Sammensetningen av mikroorganismer i tankmelk reflekterer hendelser som finner sted i besetningen og rutiner knyttet til melking (15). De mikroorganismene som finnes i melken kommer generelt sett fra selve dyret, introduseres under melking eller introduseres via melkeanlegget. I *Koop et al.* sin studie belyses minst tre kilder som bidragsyttere til bakterier i tankmelk, og disse er dyrets jur, miljøet i fjøset og melke-anlegget (16, 17). De største bidragsytterne er antatt å være spene/jur hud, deretter miljørelaterte kilder.

Bakterier som *Lactobacilli* med teknologisk relevans for osteproduksjon har blitt isolert fra spener og tankmelk, men er ikke funnet i miljøet. I motsetning har «miljørelaterte» bakterier funnet i tankmelk for det meste også blitt funnet i fjøsmiljøet. Som nevnt av *Sun et al.* finnes det lite tilgjengelig kunnskap om hvilken påvirkning ulike gårdsbruk (med hensyn på gårdsfaktorer som driftstype, habitat/fjøs, fôringspraksis, melke- og hygienerutiner) har på strukturen i det mikrobielle samfunnet i tankmelk. Deres studie fokuserte riktignok på kuhold i motsetning til vår studie på geitehold, men deres hypotese var at bakterietall og mikrobiom i tankmelk ble påvirket av faktorer som rase, teknologi (mekanisering og automasjon) og husningstype (15).

En har også sett i ulike studier på geitemelk at den vanligvis er dominert av blant annet Lactic Acid Bacteria (LAB), som er en gruppe anaerobe bakterier som fermenterer laktose til laktat, og har høy toleranse mot lav pH. Dette er bakterier fra genus som *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostic*, *Enterococcus* og *Streptococcus* sp.. En har også funnet at psykotrofe populasjoner (her nevnes *Pseudomonas*) utgjør en av hovedkomponentene i mikrobiomet. Disse etableres særlig når melken oppbevares kjølig og kan forårsake forringelse. Populasjoner av LAB og psykotrofe dominerer, med innslag av noen ikke-LAB genus, samt ulike sopp- og muggarter; som utgjør til sammen normalfloraen i geitemelk (4, 18). I tilfeller med aktiv mastitt i besetningen vil dette reflekteres i mikrobiomet og en vil finne igjen denne typen bakterier i melka (se avsnitt om jurhelse).

F. Zhang, et al. gjorde bakteriologiske funn da de i 2017 sekvenserte V3 og V4 regionene i 16S rRNA genet ved bruk av metagenomikk analyse. De analyserte geitemelk fra Guanzhong- og Saanen geiter i Kina. Resultatet fra deres analyse viste at geitemelken inneholdt en dominerende rekke/phylum av *Proteobacteria*. Genus som var mest dominerende i melkeprøvene var mesofile patogener som *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* og *Stenotrophomonas*. Prøvene inneholdt også probiotiske bakterier som blant annet Lactic Acid Bacteria (LAB) (17). Andre studier som f.eks. *Quigley et al.* beskrev funn av bakterier som ikke er assosiert med tidligere funn innenfor sekvensering av geitemelk. Et stort antall patogene bakterier som blant annet *Corynebacterium* og *Brachybacterium* ble funnet, i tillegg til halofile bakterier som *Jeotgalicoccus*, *Salinicoccus*, *Dietza*, *Exiguobacterium*, *Ornithinicoccus* og *Hahella* (4).

Mange opportunistiske bakterier kan eksistere som en del av det normale mikrobielle samfunnet, og er ikke sykdomsfremkallende under normale forhold; men kan bli patogene når forholdene tillater det. Disse bakteriene kan dra nytte av et svekket immunforsvar eller mangel på konkurranse fra andre mikroorganismer, slik at de kan vokse og spre seg. Normalflorabakteriene spiller en viktig rolle i å forhindre overvekst av skadelige bakteriestammer, men kan også bidra til sykdom når virulensgenene deres aktiveres eller dominansen forstyrres (19).

Oversikt over normalflora og patogene bakterier

Tabell 3 viser en oversikt over det som ansees som normalflora og patogene bakterier i geitemelk. Normalflora listen er tatt fra ulike studier som hadde som formål å undersøke mikrobiologisk innhold i geitemelk, mens lista over patogene er tatt fra Tine sin liste over mastittbakterier.

Tabell 3: Liste over normalflora og mastitt/patogene bakterier i geitemelk, samt hvilke kilder de kan stamme fra (*1, 4 og 20, **21).

Normalflora/probiotika*	Patogene**
<i>Aerococcus</i> (fjøsmiljø)	<i>Acinetobacter sp.</i> (fjøsmiljø)
<i>Aquabacterium</i> (vann)	<i>Aerococcus viridians</i> (fjøsmiljø)
<i>Barchyobacterium</i> (fjøsmiljø)	<i>Arcobacter cryaerophilus</i> (dyr og mennesker)
<i>Bifidobacterium</i> (fordøyelsessystemet)	<i>Bacillus anthraci</i> (jord og dyr)
<i>Deinococcus</i> (i melk)	<i>Bacillus sp</i> (jord og vann)
<i>Enterococcus sp.</i> (i melk)	<i>Citrobacter sp.</i> (tarm dyr/menneske)
<i>Kocuria</i> (fjøsmiljø)	<i>Clostridium sp.</i> (tarm, jord)
<i>Lactobacillus</i> (i melk)	<i>Corynebacterium sp.</i> (fjøsmiljø, mikroflora til dyr/mennesker)
<i>Lactococcus</i> (i melk)	<i>Enterobacter sp.</i> (urinveiene og luftveiene)
<i>Leuconostoc</i> (involvert i fermentering av melk)	<i>Eschericha-Shigella</i> (kun menneske)
<i>Leukobacter</i> (i melk)	Koagulase negative stafylokokker (KNS) (i melk)
<i>Methylibium</i> (fjøsmiljø)	<i>Listeria monocytogenes</i> (fordøyelsen)
<i>Microbacterium</i> (fjøsmiljø)	<i>Micrococcus</i> (hud, melk, fjøsmiljø, jord og vann)
<i>Ochrobacterium</i> (fjøsmiljø)	<i>Myroides odoratus</i> (ulike kroppsvæsker, fjøsmiljø)
<i>Pantoea</i> (fjøsmiljø)	<i>Pseudomonas sp.</i> (fjøsmiljø)
<i>Paracoccus</i> (i melk)	<i>Staphylococcus aureus</i> (luftveier, hud)
<i>Pediococcus</i> (i melk)	<i>Staphylococcus caprae</i> (hud, jur)
<i>Propionibacterium</i> (fjøsmiljø)	<i>Staphylococcus epidermis</i> (hud, slimhinner)
<i>Pseudoclavibacter</i> (fjøsmiljø)	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (hud)
<i>Sphingomonas</i> (fjøsmiljø)	<i>Staphylococcus simulans</i> (hud)
<i>Streptococcus</i> (i melk)	<i>Staphylococcus warneri</i> (hud)
<i>Weissella</i> (i melk)	<i>Streptococcus</i> (i melk)

Utfordringer med lagring og kvalitet

Biofilm

Tilstedeværelsen av biofilmdannende bakterier på utstyrsoverflater i meieriindustrien kan ha negative effekter på sikkerheten og kvaliteten til melk og melkeprodukter. Forurensning av meieriprodukter er ofte forbundet med dannelse av biofilmer på overflater i melketransportrør, melkebeholdere og annet utstyr. Når bakterier fra biofilmen løsner kan de forurense melken som passerer gjennom disse overflatene. Godt etablerte biofilmer er svært utfordrende å fjerne med tradisjonelle vaskemidler, som ikke penetrerer den ekstracellulære matriksen som beskytter cellene. Det er derfor logisk å fokusere på forebygging av biofilmdannelse. Per i dag er det ingen slike midler på markedet, men anbefalingen er å vaske og desinfisere ofte før eventuelle bakterier kan feste seg til overflatene. Det forskes i midlertidig på utviklingen av forebyggende midler, såkalte antimikrobielle belegg som skal endre hydrofobitet og ruhet, og dermed sørge for å hindre at bakterier fester seg på overflater i anlegg eller tank (22). Miljøet som organismene lever i har stor betydning, deriblant tilgang til organisk materiale. Eksempelvis vil høyt fett- og protein innhold virke beskyttende på bakterier, og medføre høyere overlevelseshastighet ved bruk av kjemiske forbindelser som er ment å drepe bakteriene. Dette er spesielt uttalt i biofilmer hvor slimlaget beskytter bakteriene ytterligere mot biocider (23).

Biofilm kan dannes på andre overflater, blant annet på slimhinner i kroppen. I tilfelle av melkeproduksjon, antas det at melken er steril når den befinner seg i det melkeproduserende vevet i juret, som er epitelcellene i melkealveolene. Deretter går melken til det ikke-melkeproduserende vevet, som består av melkeganger samt melke- og spenekammere. Her kommer melken i kontakt med slimhinner, som inkluderer Fürstenbergs rosett - en slimhinnefold som ligger mellom melkekammeret og spenekammeret. Overflaten av disse slimhinnene gir mulighet for bakterier med evne til å danne biofilm å feste seg (16, 24, 25).

Faktorer relatert til anlegg

For meieriindustrien er biofilmdannelse et fundamentalt problem, da melk inneholder et bredt spekter av mikroorganismer som kan forårsake forurensning. Selv om nyetablerte biofilmer er dannet av bakterier som ikke nødvendigvis påvirker melke kvalitet, kan det likevel være et habitat for patogener som f.eks. *Pseudomonas*. Weber *et al.* sin studie der de så på biofilmdannelse i melkeanlegg, fant ulike bakterier ved ulike steder i anlegget ved svabertesting, og deretter analyse med kulturavhengig og kultur uavhengige analyser. Det ble funnet biofilm av *Pseudomonas* og *Staphylococcus* på plastikkdeler av anlegget. Størrelsen på biofilmen blir omtalt som TMC (total microbial count) og er et mål på antall kolonier per cm². Det var spesielt høy TMC ved stativene til melkeorganene og slanger som hele tiden er under fuktige eller våte forhold som favoriserer bakterievekst. Studiet omtaler også godt etablerte biofilmer som er vanskelige eller umulige å fjerne ved standard rengjøring ved bruk av syre og base. TMC var i tillegg lavere inne i rørsystemet enn åpningene mot det ytre miljø, noe som kan forklares ved at det er mindre oksygen og kan begrense vekst, men samtidig er en fordel for anaerobe bakterier som blant annet LAB. I tillegg er dette et vakuumsystem som drar inn mye luft fra miljøet og som kan dra inn mulig forurensning. I andre studier som Weber *et al.* refererte til, ble det funnet at blant annet *Corynebacterium* var assosiert med jur hud, mens for eksempel *Staphylococcus* var mer vanlig i miljøet (15, 26).

Temperatur og pH

Bakterievekst er sterkt påvirket av temperatur, derfor kan rask nedkjøling (kort tid etter melking) hemme veksten av mange bakterietyper i betydelig grad. Dette gjelder derimot ikke psykotrofe bakterier slik som genus *Pseudomonas* som har evnen til å vokse under 4°C. Disse bakteriene kan produsere varmeresistente enzymer som ikke inaktiveres under pasteurisering, noe som øker risikoen for nedstrøms proteolytisk og lipolytisk forringelse av melkeprodukter (15, 17).

Når det gjelder pH trives de fleste bakterier best rundt pH 7, men de fleste kan vokse i ett område på 2-3 pH-enheter. Tilstedeværelsen av anaerobe bakterier som bruker fermentering som primær energikilde vil kunne senke pH-nivået i sine omgivelser, siden de gjennom sin metabolske aktivitet skiller ut organiske syrer. Et eksempel på dette er melkesyrebakterier (LAB) som produserer melkesyre, ved å senke pH-nivået kan de gjøre miljøet mindre gunstig for andre bakterier, og er en av grunnene til at fermentering blir brukt for å preservere ulike

næringsmidler. Det er som tidligere nevnt slik at lave temperaturer vil medføre at metabolismen til de fleste bakterier hemmes i betraktelig grad, og dette gjelder også melkesyrebakterier (LAB), i tillegg til ulike toksinproduserende bakterier (gjelder ikke psykrofile og psykotrofe) som ved lave temperaturer verken vil være i stand til å vokse eller produserer toksiner (23).

Faktorer som påvirker melk

Gårdsfaktorer

Noen typer gårdsfaktorer som kan påvirke kvaliteten på tankmelk er kort oppsummert: type drift (automatisk melkesystem med robot, båsfjøs, løsdrift) og generelt grad av mekanisering og automasjon, miljø/habitat (husningstype, innendørsklima, underlag), melke- og hygiene rutiner (bruk av kjemisk agens under spenepreparering, fullstendig tørking etter vask av spener, bruk av syre og/eller base til vask av melkeanlegg), fôringsregime (type fôr vil ha betydning for mikrobiotaen i tarmen, og har implikasjoner for dyrets helse generelt så vel som for sammensetningen av melken) (15).

Faktorer relatert til dyret

Sammensetningen av geitemelk kan variere avhengig av en rekke faktorer, noe som vil ha innvirkning på melkekvaliteten. Det kan være store forskjeller i flere viktige bestanddeler og fysiske parametere, slik som proteiner, lipider, mineraler, vitaminer og fettmicellestørrelse m.m. Noen av faktorene som nevnes er rase, jurlhelse, laktasjonsstadium, sesong og miljøforhold (2, 9, 11).

Rase

Det norske geiteholdet er dominert av rasen Norsk melkegeit, som stammer fra en sammenslåing av lokale geiteraser og noen utenlandske raser. På grunn av avlsarbeidet fra 1960-årene er forskjellene mellom de lokale geitene visket ut, og det er nå en felles populasjon av melkegeit i Norge (7). Geitens genotype har innvirkning på melkens sammensetning, et eksempel på dette er genetiske polymorfismer på kaseinets loci som påvirker utskillelsen av kasein. Det finnes mange alleliske genotyper, og deres frekvens varierer med rase. Kasein utgjør hovedandelen av proteininnholdet i geitemelk, og sammensetning av type og mengde kasein er derfor svært viktig (11).

Jurhelse

Mastitt er et betydelig problem i husdyrhold, med stafylokokker som den vanligste årsaken i Norge (gjelder ku) (10). Disse kan påvirke melke kvaliteten, og forårsake infeksjon. Disse er ansett som uønskede og har derfor blitt satt fokus på. Studier har vist at den mest isolerte bakterien som har forårsaket mastitt er *Non- Aureus Staphylococci* (NAS), som vokser rundt spenekanalen til lakterende dyr som ku og geit (1). Også *Staphylococcus aureus* i *Enterobacteriaceae* familien, *Mycoplasma sp.*, *Pseudomonas* eller *Bacillus sp.* er involvert i tilfeller av mastitt. Når det gjelder bakterier som forårsaker sykdom og infeksjon er disse sistnevnte ofte påvist. Man deler stafylokokker inn i to kategorier når det er snakk om mastitt; koagulase negative -og positive stafylokokker. KNS er den vanligste isolerte bakterietypen i geitemelk. *S. aureus*, som er mest omtalt i melkekvalitet hos ku, er koagulase positive stafylokokker. Koagulase er et ekstracellulært protein som er viktig i patogenesen til infeksjonen. Det er disse som er mer patogene sammenlignet med koagulase negative stafylokokker (KNS) (18, 20). Nyere forskning antyder at biofilmdannelse av stafylokokker er viktig for sykdomsutvikling. Det er også mulig at andre mastittbakterier, som streptokokker og *E. coli*, kan bli påvirket av deres evne til å produsere biofilm. Redusering av biofilmdannelse i juret kan føre til reduksjon av mastitt, som er den mest tapsgivende dyresykdommen i Norge. Dette kan gi økonomiske fordeler og bidra til bærekraftig landbruk ved å redusere bruken av antibiotika (24).

Laktasjonsstadium

Kumelk varierer lite i sammensetning grunnet helårsavl, mens geitemelk produseres gjennom sesongbasert avl, som medfører at det skjer endringer i sammensetningen etter sesong; mot slutten av ammingen/laktasjon avtar laktoseinnholdet mens mengden av de andre bestanddelene (lipid, protein og mineraler) øker (9).

Årstidsvariasjon

I studiet til *Quigley et al.* ble det også funnet ulike species som dominerte under ulike årstider. Prøver fra vinteren inneholdt mest *Lactococcus* og *Pseudomonas*, prøver fra sommeren dominerte *Pantoea spp.* og *Klebsiella*, mens prøvene fra høsten inneholdt *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter* og diverse sopparter. Genus som *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* er funnet i både menneske, ku, sau og geit. *Quigley et al.*

merket seg disse forskjellene som tyder på påvirkning fra vær og fôrskifte, men det påpekt at en dypere forståelse kunne oppnås ved bruk av NGS (1, 4, 20).

Påvisningsmetoder innenfor melke kvalitet

Forskning innenfor geitemelk har bidratt til å gi en bedre forståelse for hva melken inneholder av makromolekyler og mikroorganismer. I senere tid har det vært mer fokus på å undersøke hvilke uønskede patogener som finnes, og hvordan dette påvirker videre foredling av melken. I tillegg til sykdomsfremkallende mikroorganismer er det også nyttig å undersøke hva som er akseptabelt nivå av antall bakterier uten at det påvirker melkekvaliteten. I Norge starter prosessen med kontrollering og analysering allerede fra tankbilsjåføren henter melka på gårdene. Det sendes en melkeprøve til to ulike melkekvalitetslaboratorier for kjemiske og bakterielle analyser (27).

Dyrkning av bakterier på næringsmedium

En metode for påvisning av bakterier i komplekse miljø som geitemelk, er bruk av fenotypisk metode som dyrkning på næringsmedium. Dette krever bruk av medium som favoriserer vekst av spesifikke bakterier, og på den måten kan man inkubere prøver og bruke resultat videre til enten telling av bakteriekolonier, se på generell melkekvalitet eller detektere spesifikke patogener. Denne metoden blir ofte brukt til å bestemme antibiotika følsomhet, detektering av blant annet koagulase negative – eller positive stafylokokker, samt dyrkning av andre bakterier som er av interesse. Det kreves også videre biokjemiske og statistiske analyser for å kunne validere og verifisere resultatene (4).

Bakterietall – Bactocount

I 2016, begynte melkekvalitetslaboratorier i Norge å ta i bruk en raskere og mer effektiv metode for analyse (28). Instrumentet som ble tatt i bruk var Bentley Bactocount IBC (Bentley Instruments). Dette er et flowcytometer som brukes i dag av blant annet Tine SA for å sikre at melk som leveres til meieriene ikke inneholder for høyt antall bakterier. Bactocount instrumentet kan telle antall enkeltbakterier ved å bruke et fargestoff som farger celler med DNA. Fargestoffet farger både somatiske celler og bakterier, så for å kunne skille de fra hverandre utsetter man prøven for mekanisk stress som lyserer de somatiske cellene. Da kan melka sendes gjennom infrarød stråling som har bestemte bølgelengder. Disse treffer en sensor som gir et signal i form av et absorpsjonsspekter. Spekteret brukes da til å bestemme

antall bakterier i prøven. Resultatet blir oppgitt som antall celler $\times 10^3$ pr ml melk, og legges inn i Geitekontrollen (27, 29).

Celletall – Somatic Cell Count

All melk som ankommer meieriet analyseres også for celletall (SCC, «somatic cell count»). Dette er den mest anvendte metoden for å kunne dokumentere melke kvalitet. Det telles antall celler per millimeter melk ved bruk av flowcytometri. Det tilsettes fargestoff for å farge cellens DNA, så de somatiske cellene kan detekteres. Siden geiter har apokrin melkesekresjon vil cytoplasmiske celler bli med i melkeprøven. Disse telles ikke med i celletallet når det benyttes DNA baserte analysemetoder. Leukocytene vil derimot bli detektert, og gir da en indikasjon på at et høyt celletall kan tilsa infeksjon i juret. Et høyt celletall kan indikere jurbetennelse forårsaket av en bakterieinfeksjon, men dette er ikke en kvalitetsparameter som alene kan bestemme innholdet av bakterier (27). Målinger fra Geitekontrollen viser at vanlige celletall er 400×10^3 , men de få prøvene med svært høye verdier trekker gjennomsnittet opp, som viser et gjennomsnitt på 920×10^3 . Det er viktig å ha flest dyr under 800×10^3 i første laktasjon, slik at de tåler bedre kritiske perioder som kan gi høyere celletall. Celletall påvirkes også etter hvor dyrene er i laktasjonen og etter alder. De eldre dyrene har ofte et stabilt høyt celletall, så derfor er det anbefalt å utrangere dyr som er eldre enn 4 år (30).

Metagenomikk 16s amplikon sekvensering

Metagenomikk 16s amplikon sekvensering (Figur 1) gir muligheten til å kartlegge den bakterielle sammensetningen som er i geitemelk. Her vil en ved hjelp av barcodes kunne skille mellom familie, genus og species for hver enkelt av prøvene. På denne måten vil det være mulig å se etter sammenhenger mellom mikrobiologisk-innhold i melk og bactocount verdi for hver enkelt av prøvene. Dette peker også *Zhang et al.* på som et poeng i sin studie, da såkalte Viable but nonculturable (VBNC) bakterier er vanskelig å detektere med tradisjonelle dyrkningsmetoder, og derfor ansees metagenomikk som en god og effektiv måte for å identifisere det totale mikrobiomet i geitemelk (17).



Figur 1: Arbeidsflyten av Metagenomikk 16s amplikon sekvensering (31-33).

Materialer og metoder

Innhenting av prøvemateriale

Prøvene som ble brukt i forsøkene ble tatt fra melketanken til forsøkgården. Hver 6. dag, kvelden før tankbilen hentet melken, ble prøvene tatt, fra melk med en gjennomsnittstemperatur på 4°C. Tanken har periodevis røring av melka, så den var skrudd på noen minutter før prøvetaking, for å sikre at melka ikke har skilt seg. Prøvene ble innhentet aseptisk, med steriliserte prøverør og engangspipetter. Det ble tatt 2 prøverør slik at vi fikk to paralleller av hvert prøveuttak. Prøverørene ble merket med dato og initialer på prøvetaker. De ble lagt i fryseren fortløpende (-22°C). Prøvetakingen ble gjennomført på en periode på 16 uker, fra 9. september til 29. desember 2022 (se vedlegg 5). Dette er perioden fra midten og mot slutten av geitenes laktasjonssyklus.

Transport og lagring

Da prøvene skulle tas med på laboratoriet for DNA isolering, ble de fraktet fra gården til NTNU i en kjølebagg med fryseelement, slik at prøverørene holdt seg fryste hele veien, som var på 1,5 time. De ble lagt i fryseren på laboratoriet så raskt som mulig.

Ekstraksjon av bakterieceller fra melk

Melkeprøvene (n=43) ble tatt ut av fryseren for tining, først i kaldt vannbad og så i romtemperatur på benk. Bakteriecelle ble separert fra de andre komponentene i melka ved å overføre 10 ml av prøven til falconrør og sentrifugert ved 6000 rpm i 10 min, før supernatanten ble helt av. Prøvene hadde vært fryst i en lengre periode og fett i prøvene hadde derfor fått en annen molekylvekt, noe som medførte dårlig separasjon – med cellepellet full av fett. Dette ble løst ved å tilsette 10 ml PBS, vortexet og sentrifugerte i nye 10 min ved 6000 rpm. For noen av prøvene gikk det greit å helle av supernatanten i en rask bevegelse, men for de prøvene hvor dette ikke var mulig (pga. fetthinne på toppen) ble en pipette brukt til å stikke hull på fetthinnen hvorpå supernatanten ble pipettert ut. 100 µl av hver cellepellet ble overført til hvert sitt eppendorf-rør med lokk.

DNA isolering

DNA ble ekstrahert med «Dneasy blood and tissue kit» (Quiagen), standard protokoll (se vedlegg 1). 100 µl cellepellet ble lysert med 180 µl ATL buffer og 20 µl proteinase, og inkubert ved 56 °C i 1 time. Etter inkubering ble prøven tilsatt 200 µl AL buffer og 200 µl 96% EtOH, vortexet før – mellom- og etter. DNA ble bundet til membranfilter i Dneasy spin-kolonne og sentrifugert (1 min 8000 rpm). Vasket DNA i to omganger ved romtemperatur, først med 500 µl AW1 Buffer (sentrifugert ved 8000 rpm i 1 min) deretter med 500 µl AW2 Buffer (sentrifugert ved 13 000rpm i 4 min, endring fra prosedyre punkt 6.) Eluerte DNA i fra spinnkolonne i to omganger ved bruk av 100µl AE Buffer, inkubert (1min RT) og sentrifugert (1 min 8000 rpm). Påviste DNA med Qubit dsDNA HS fluorometer (4.0) før prøvene ble fryst (se vedlegg 6).

Amplifisering av 16S rDNA fragmenter

16S rDNA fragmenter ble amplifisert med «Ion 16S Metagenomics kit» (ThermoFisher), standard protokoll (se vedlegg 2). Målte konsentrasjon med Qubit dsDNA HS fluorometer (4.0), fortynnet med ddH₂O (se vedlegg 7) og valgte en parallell fra hvert tidspunkt. Utførte to reaksjoner for hver prøve, en for hvert primersæt i PCR strips med 6 µl (3ng) templat DNA, samt en negativ kontroll med vann, og kjørte PCR. De amplifiserte fragmentene ble rensset med bruk av 54 µl «AMPure XP beads» på magnetstativ, disse ble vasket i to omganger med 200 µl 70% EtOH, som ble fjernet etter hver vask. Lufttørket beads på magnetstativ i ca. 5 min. Eluerte ved å resuspenderte AMPure XP beads i 20 µl ddH₂O, inkuberte (2 min RT). 15 µl supernatant ble overført til nye rør og fryst.

Library prep.

For tillagning av barcode biblioteket ble «NEB Library kit» (New England BioLabs Inc.) og «Ion Xpress Barcode» adaptere 10-31 (Thermo Fisher) brukt, standard protokoll (se vedlegg 3). Konsentrasjon til alle prøvene ble målt med Qubit fluorometer, og fortynnet. Til «end repair» ble 12 µl sammenslåtte amplikon overført til PCR strips, sammen med 13,5 µl ddH₂O, 3 µl 5X end repair buffer og 1,5 µl end repair buffer, inkubert i 20 min ved 25°C, 10 min ved 70°C, deretter 4°C. Tilsatte følgende til alle prøvene: 5 µl 10X ligase buffer, 1,5 µl Ion P1 adapter, 9 µl nukleasefritt vann, 3 µl DNA ligase, 0,5 µl Nick repair polymerase. Deretter 1 µl Ion Xpress barcode (en for hver prøve), totalt 50 µl i hver brønn, og kjørt med følgende

termiske sykluser: 25°C i 15 min, 65°C i 5 min, kjølt ned til 4°C. De amplifiserte fragmentene ble rensert med bruk av 90 µl AMPure XP beads på magnetstativ, disse ble vasket i to omganger med 200 µl 70% EtOH, som ble fjernet etter hver vask. Lufttørket beadsene i ca. 5 min. Eluerte ved å resuspenderte AMPure XP beads i 15 µl ddH₂O, inkuberte (2 min RT). 13 µl supernatant (uamplifisert bibliotek) ble overført til nye rør og fryst.

Biblioteket ble amplifisert med «Ion Plus Library kit» (ThermoFisher), standard protokoll. 13 µl uamplifisert bibliotek (ett rør for hver barkode) ble tilsatt 25 µl «Platinum PCR superMix High fidelity», 2 µl «Library Amplification Primer Mix», 10 µl ddH₂O. Totalt 50 µl i hver brønn, og kjørt med følgende termiske sykluser: 98°C i 30 sek, deretter 13 sykluser med; 10 sek ved 98°C, 30 sek ved 58°C, 30 sek ved 65°C. Til slutt 65°C i 5 min, og kjølt ned til 4°C. For å rense det amplifiserte barcode biblioteket ble 45 µl AMPure XP beads tilsatt biblioteket (50 µl), blandet med pipette og inkubert (5 min RT), pulse-spin, plassert på magnetstativ i 3 min før supernatant ble fjernet, hvorpå beadsene ble lufttørket i ca. 5 min. Biblioteket ble vasket i to omganger med 200 µl 70% EtOH, som ble fjernet etter hver vask. Eluerte ved å resuspendere AMPure XP beads i 18 µl ddH₂O, inkuberte (2 min RT). Vortexet kraftig og ventet til beadsene var samlet og væsken klar. Overførte så 15 µl supernatant (barcode bibliotek) til nytt rør. Sjekket konsentrasjon med Qubit dsDNA HS fluorometer (4.0) (se vedlegg 8) og la i fryser.

Templat preparering

Biblioteksfragmentene ble separert og amplifisert med emulsjons PCR etter standard prosedyre for templat preparering. Det ble brukt OT₂ for anriking av bibliotek og ES for rensing før PGM. Dette ble utført av laboratorieansvarlig.

Sekvensering – Ion Torrent PGM

Sekvenseringen ble utført med standard prosedyre ved bruk av «Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit» av laboratorieansvarlig.

Behandling av rådata

Behandlingen av rådata ble utført ved standard prosedyre med bruk av Ion Reporter for kvalitetssikring av sekvenser og taksonomisk identifisering på familie-, genus- og

speciesnivå, ved å sammenligne sekvenserings resultatene med databaser (GreenGenes, daSilva NGS og ThermoFisher) over kjente sekvenser. Videre bearbeiding av resultatene ble utført i Microsoft Excel.

Resultat

DNA ble isolert og påvist fra 43 tankmelkprøver. Av disse hadde 22 prøver høy nok DNA konsentrasjon til å kunne brukes videre til amplifisering og bibliotekstillaging.

Kvalitetskontroll av biblioteket viste til at ikke alle prøvene var av god nok kvalitet til sekvensering, så 9 av 22 prøver var vellykkede, og sekvensene ble kvalitetssikret og identifisert med Ion Reporter. I sekvenserings dataene for disse prøvene var det totalt 89 taksonomiske familier, 98 genus og 111 species representert. Av disse var 16 genus godt representert (som vist i figur 3), hvorav de følgende 7 genus utgjorde kjernen av mikrobiomet: *Corynebacterium*, *Facklamia*, *Atopostipes*, *Jeotgalicoccus*, *Psychrobacter*, *Pseudomonas* og *Staphylococcus*. Antallet bakterier (bactocount) er hentet fra melkekontrollen, analysert med flowcytometri (Bentley Bactocount IBC) ved et melkekvalitetslaboratorium i Norge.

Tabell 4: Viser oversikt over bakterietallet i hver av de analyserte prøvene, siste kolonne viser log10 av bakterieantallet pr. ml avrundet til to desimaler. Bactocount verdier er tatt fra Geitekontrollen (se vedlegg 4).

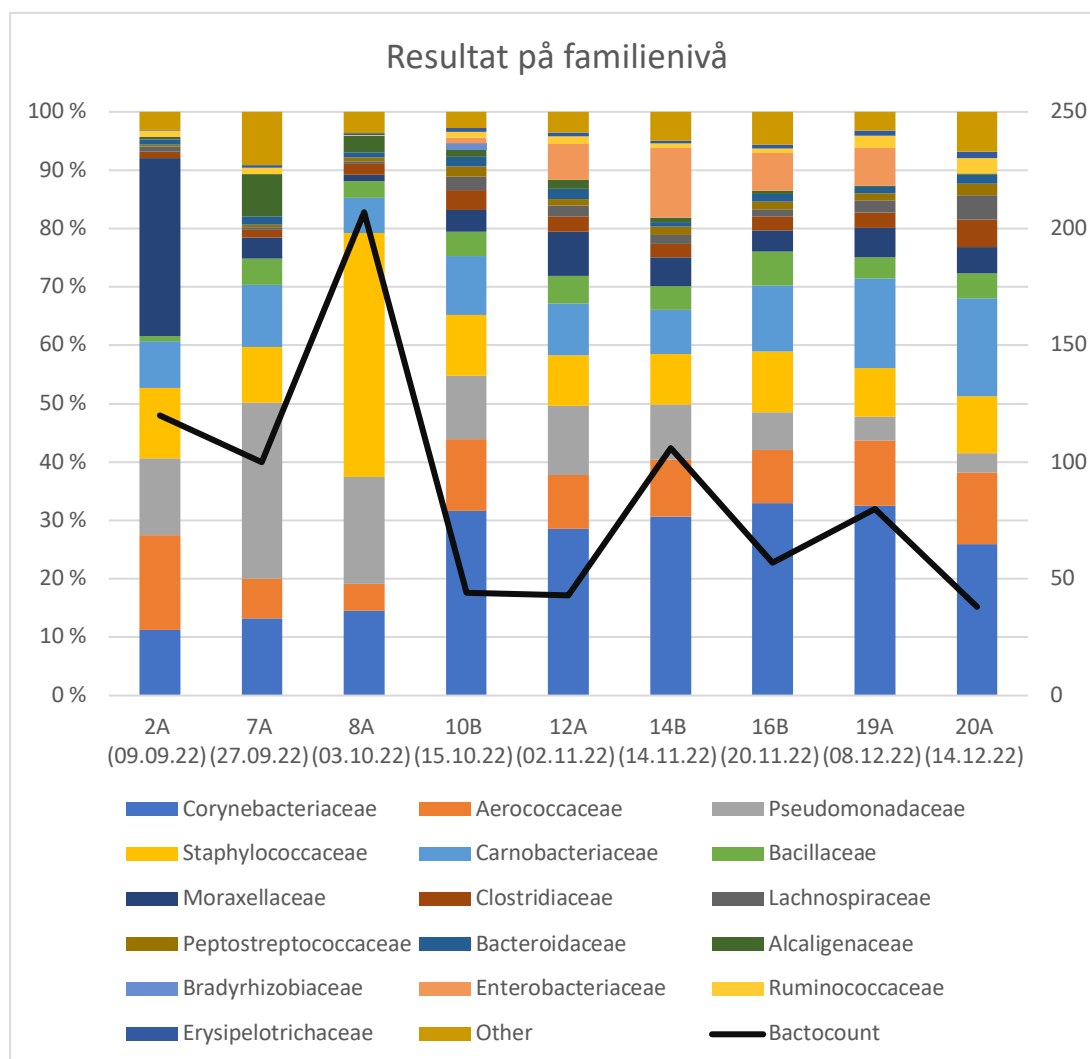
Prøve dato	Prøve ID	Bactocount TBC (antall bakterier/ml)	Normalisert verdi ($\approx \text{Log}_{10}$ antall bakterier/ml)
09.09.22	2A	120 000	5,07
27.09.22	7A	100 000	5,00
03.10.22	8A	207 000	5,32
15.10.22	10B	44 000	4,64
02.11.22	12A	43 000	4,63
14.11.22	14B	106 000	5,00
20.11.22	16B	57 000	4,75
08.12.22	19A	80 000	4,90
14.12.22	20A	38 000	4,57

Tabell 5: Viser oversikt over bakterier fra våre resultat som omtales i Tine sin liste over mastittbakterier (*26), og annen utvalgt litteratur (**1, 4, 20).

Genus (Species)	Tines referanseliste*	Litteratur**
<i>Acinetobacter</i>	Patogen/mastitt	Patogen/mastitt
<i>Aerococcus</i>	Patogen/mastitt	Patogen og normalflora
<i>Alkalibacterium</i>	-	-
<i>Atopostipes</i>	-	Normalflora
<i>Butyrivibrio</i>	-	-
<i>Clostridium (disporicum)</i>	Patogen/mastitt	Patogen/mastitt
<i>Corynebacterium (callunae)</i>	Patogen/mastitt	Patogen/mastitt
<i>Facklamia</i>	-	-
<i>Flaviflexus</i>	-	-
<i>Halomonas</i>	-	-
<i>Jeotgalicoccus (sp.)</i>	-	-
<i>Oligella</i>	-	-
<i>Pseudomonas (sp., pertucinogena, caeni)</i>	Patogen/mastitt	Patogen/mastitt
<i>Psychrobacter (sp.)</i>	Patogen/mastitt	Patogen/mastitt
<i>Salinimicrobium</i>	-	-
<i>Sphingomonas</i>	-	Normalflora
<i>Staphylococcus (warneri)</i>	Patogen/mastitt	Patogen/mastitt
<i>Streptococcus</i>	Patogen/mastitt	Patogen og normalflora
<i>Turicibacter (sanguinis)</i>	-	-
<i>Yaniella</i>	-	-

Mikrobiom

Diagrammet i figur 2 illustrerer den bakterielle sammensetningen til hver prøve, med fokus på de bakteriene med høyest prosentandel. *Moraxellaceae*, *Aerococcaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Staphylococcaceae*, *Corynebacteriaceae* og *Carnobacteriaceae* er det de mest dominerende familiene. Referert til vedlegg 9 kan man se på prøve 2A at det er like mye av de nevnte familiene (gjennomsnittlig 4,0%), unntatt *Moraxellaceae*, med en andel på 30%. I prøve 7A endres sammensetningen mye der *Pseudomonadaceae* dominerer (29%), og i 8A er det *Staphylococcaceae* (41%) som utgjør en stor del av sammensetningen. Prøve 10B til 20A har en relativt stabil og lik sammensetning, der *Corynebacteriaceae* dominerer.



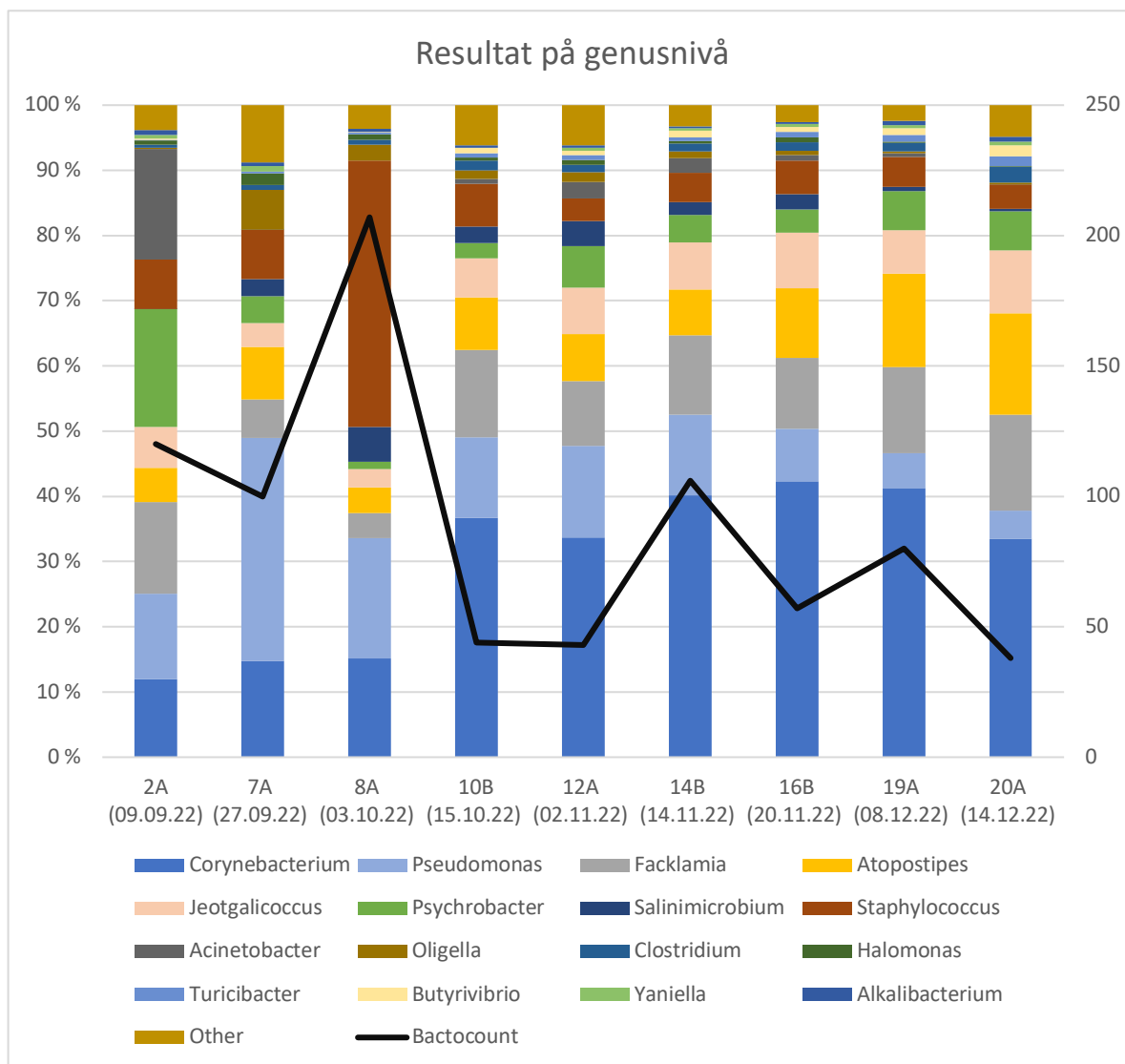
Figur 2: Stolpediagram som viser resultat på familienivå, med % andel på Y-aksen til venstre, og én stolpe for hvert prøveuttak med dato. Den svarte grafen illustrerer bactocount, med verdier for antall

celler $\times 10^3$ pr ml på Y-aksen på høyre side. Hver farge representerer familier og mengden av disse i hver prøve.

På genusnivå er det *Corynebacterium* og *Pseudomonas* som dominerer, mens andre genus som *Staphylococcus*, *Atopostipes*, *Facklamia*, *Psychrobacter* og *Jeotgalicoccus* er til stede i varierende grad (se vedlegg 10). På figur 3 ser vi at det er stor variasjon i den mikrobielle sammensetningen. Spesielt er det de tre første prøvene (2A, 7A og 8A) som det er størst variasjon på. De har mye lavere prosentandel av *Corynebacterium* i forhold til de påfølgende prøvene. På diagrammene over ser vi at det er andre genus som dominerer.

For 2A er det flere som har høy andel; *Psychrobacter* (ca. 17,5%), *Acinetobacter* (ca. 16,6%), *Facklamia* (ca. 13,7%), *Pseudomonas* (ca. 12,7%) i tillegg til *Corynebacterium* (11,7%).

For prøve 7A er det derimot kun *Pseudomonas* med ca. 33,8% som dominerer samt *Corynebacterium* med ca. 14,5%. I 8A er både *Pseudomonas* og *Corynebacterium* også til stede i en relativ høy grad med 18,5% og 15,1%, men blir overskygget av nivået med *Staphylococcus* som ligger på 40,8%. Deretter er det 6 prøver som har relativt liten variasjon. 10B til 20A har en nokså stabil sammensetning av bakterier. Det er *Corynebacterium* som dominerer i alle prøvene, med en andel på rundt 33-42%. I prøvene 10B, 12B og 14B er det observert at *Pseudomonas* har relativt lik mengde på 12-14%, og lik mengde *Atopostipes* på 7-8%. I de siste tre prøvene, 16B, 19A og 20A er det derimot motsatt, med 4-8% *Pseudomonas* og 10-15% *Atopostipes*.



Figur 3: Stolpediagram som viser resultat på genusnivå, med % andel på Y-aksen til venstre, og én stolpe for hvert prøveuttak med dato. Den svarte grafen illustrerer bactocount, med verdier for antall bakterier $\times 10^3$ pr ml på Y-aksen på høyre side. Hver farge representerer genus og mengden av disse i hver prøve.

Bakterietall

Totalt antall bakterier pr. ml tankmelk varierte mellom log 4,57 til 5,32/ml gjennom prøveperioden. Verdiene er oppført i tabell 4, og illustrert med svart graf i figur 2 og 3, som viser resultatene av sekvensering på henholdsvis familie- og genusnivå. Ser en på prøvene i kronologisk rekkefølge er det størst variasjon mellom den tredje prøven (8A) og den siste prøven (20A) i prøvesettet, med en variasjon på log 0,75/ml. Ser en på de siste seks prøvene er det antydning til at bakterietallet stabiliseres (i takt med mikrobiomets sammensetning), med unntak av relativt små hopp i prøve 14B og 19A; denne observerte stabiliseringen er spesielt synlig i prøvene 4 (10B), 5 (12B), 7 (16B) og 8 (20A).

Med tanke på bakterietall er det som tidligere nevnt prøve 8A (log 5,32/ml) og 20A (log 4,57/ml) som har størst variasjon. 8A er dominert av *Staphylococcus*, og har i tillegg en betydelig andel av *Pseudomonas*. I motsetning har prøve 20A liten andel av både *Staphylococcus* og *Pseudomonas*, men er dominert av *Corynebacterium* og varierende innhold av genus *Facklamia*, *Atopostipes*, *Jeotgalicoccus* og *Psychrobacter*; som er til stede i betydelig mindre grad i 8A.

Diskusjon

I dette studiet har vårt fokus vært å utforske det bakterielle samfunnet i tankmelk fra en gård som driver med produksjon av geitemelk. Det har blitt samlet prøver i perioden september til desember 2022. Primært var formålet med oppgaven å lære mer om sammensetningen på tvers av ulike bakterielle takson, men vi ønsket også å undersøke om det var noen korrelasjon mellom sammensetning og bakterietall.

Gjennom prøveperioden var det sju genus som dominerte mikrobiomet. Tre av disse er oppført i listen over mastittbakterier (se tabell nr. 5 i resultat). Dette gjelder *Pseudomonas*, *Staphylococcus* og *Corynebacterium*. I tillegg var det også en stor andel *Acinetobacter* i en av prøvene (2A), og denne bakterien finnes også i listen over mastittbakterier. *Quigley et al.* har funnet større mengder av bakterier som samsvarer med flere av våre funn. De viser til genus som *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* og *Jeotgalicoccus*, som også er av større omfang i geitemelkprøvene (4). I Sun et al. sin studie der de så på hvordan melkeanlegg og rutiner ved melking påvirker mikrobiom i tankmelk på ku, fant de at de mest dominerende genus var *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Streptococcus* og *Staphylococcus*, noe som stemmer godt overens med våre resultat. Dette er riktignok en studie på kumelk, men både geitemelk og kumelk går gjennom lignende system og blir utsatt for relativt like forhold (15).

I vår studie har vi observert tre betydningsfulle funn i sammenheng med den tidsmessige dynamikken i mikrobiomet i tankmelk. For det første har vi observert at den største variasjonen i sammensetningen av mikrobiom oppstår mellom tidlige og senere prøver. De tre første prøvene viser betydelig større variasjon i sammensetningen sammenlignet med de seks siste prøvene. Årsaken til denne variasjonen kan trolig tilskrives påvirkning fra flere

forskjellige faktorer, som slår ut ulikt i de respektive prøvene, deriblant endringer i miljøforhold og helsestatus hos (noen få av) dyrene. Tidligere prøver kan ha blitt påvirket av flere miljøfaktorer, mens stabiliteten i senere prøver kan reflektere at det i fjøsmiljøet er mer kontrollerte forhold. For det andre observerte vi en ekstrem høy forekomst av *Staphylococcus* i prøve 8A, noe som skiller seg betydelig fra de andre prøvene. Til slutt, selv om det generelle bakterieinnholdet var stabilt over tid, ble det observert en nedgang i bakterietallene, som imidlertid økte igjen i prøve 14B og 19A; denne økningen kan ansees som forholdsvis lav, men er likevel av interesse.

I første prøve (2A) ser vi ingen spesifikke genus som utmerker seg, men at flere er til stede i relativt like store prosentandeler, med *Psychrobacter*, *Acinetobacter*, *Facklamia*, *Pseudomonas* og *Corynebacterium* (fra rundt 12-18%, se vedlegg 10). Her har geitene nettopp kommet inn fra utmarksbeite, hvor vi antar at dyrene har blitt utsatt for frie miljøfaktorer, hvor eksempelvis mye nedbør kan medføre ett rikere mikrobiom (som vanligvis befinner seg lenger ned i jordsmonnet), i tillegg til det faktum at de spiser mye mer variert enn i inneførsperioden. Vi tror at dette er en medvirkende grunn til den observerte variasjon (som er relativt stor) mellom bakteriesamfunnets sammensetning i starten versus slutten av perioden. Med unntak av prøve 2A og 8A, klassifiseres de resterende 7 av 9 prøvene som elitemelk (\log_{10} bakterier/ml $\leq 5,00$). 2A er den første prøven i settet og klassifiseres som 1. Klasse melk, som vil si at bakterietallet også her er lavt. I motsetning til de andre prøvene ligger 8A på et problematisk høyt antall bakterier, med $\log 5,32$ /ml, og er den av prøvene som utmerker seg mest med hensyn på bakterietall i henhold til de foreliggende kvalitetskravene.

I prøve 8A ble det gjort funn av store mengder *Staphylococcus*, på genusnivå med 40,8% av den totale sammensetningen, som i hovedsak er representert med *S. warneri*. Dette er den eneste prøven med høyt nivå av denne bakterien på speciesnivå, som tyder på at dette er en isolert hendelse som har påvirket melken. Etter mistanke om mastitt, i forkant av denne bactocount verdien ble det tatt speneprobe på 2 geiter. De fikk påvist KNS (*S. warneri*). Disse ble ikke melket i anlegget, og man ser på neste prøve at bakterietallet har gått betraktelig ned (nedgang på $\log 0,68$ /ml). Et svært høyt innhold av *S. warneri* i melken gir grunn til å tro at bakteriene kom fra disse dyrene, og at en eller begge trolig bidro til det høye bakterietallet. Dyrenes helse med tanke på hvor de er i laktasjonssyklusen, i tillegg til rutiner for god jurhelse kan være faktorer som påvirker sammensetningen av bakterier i melken. Fra selve dyret nevnes det at bakterier som befinner seg på juret kan bli overført til melken. Ifølge teori

om *S. warneri* trives disse bakteriene på hudflora hos dyr og mennesker, så det er grunn til å tro at bakterien kan ha kommet inn spenekanalen og dermed forårsaket infeksjon (34).

Sammensetningen endres i neste prøve, da 7A er den eneste prøven som hovedsakelig er dominert av *Pseudomonas* (34%). *Corynebacterium* er også godt representert, med en andel på 14,5%. Resultatene viser at sammensetningen i prøve 7A er forholdsvis lik som i de siste 6 prøvene, med unntak av høyere andel *Pseudomonas*. Bakteriesammensetningen fra prøve 10B til 20A er som nevnt i resultat relativt stabil, der *Corynebacterium* dominerer i noe varierende grad. Det er mindre nivå av *Pseudomonas*, Dette kan tyde på at mikrobiomet allerede er i ferd med å stabilisere seg, med bakgrunn i at miljøet har vært stabilt over tid. Siden *Pseudomonas* er psykotrof vil den kunne vokse i lave temperaturer, slik som i tank og- melkeanlegg. Det er ikke usannsynlig at det kan være en biofilm i anlegget, forårsaket av blant annet *Pseudomonas* og *Corynebacterium*. Disse er gode biofilmdannere, og eventuell løsning av biofilm som blir med i melketanken kan være en grunn til forhøyet bakterietall. Med tanke på den stabile sammensetningen er det grunn til å tro at en biofilmdannelse kan være en sentral påvirkning av mikroorganismer i tankmelken. Sett sammen med teori er *Pseudomonas* og *Corynebacterium* genus som kan stamme fra kilder som er sentrale i en geitefjøs, blant annet jord og vann, så det er grunn til å tro at denne har blitt introdusert i melkeanlegget fra det ytre miljø (33, 35).

Som nevnt i teori om biofilm så er godt etablerte biofilmer svært vanskelig å fjerne, vanlig vask av tank og anlegg med syre og base vil nødvendigvis ikke være nok for å fjerne en biofilm som allerede er etablert, og denne vil derfor kunne fortsette å påvirke resultat selv etter «vanlig» vask. Siden prøvene er tatt sent i laktasjon vil det være økt innhold av protein og fett, med nedgang i laktose. Dette påvirker også motstandsdyktigheten bakterier i biofilm da protein og fett kan virke beskyttende (10). En teori kan da være at bakterier med evnen til å vokse ved lave temperaturer har dannet en beskyttende biofilm slik at de mesofile bakteriene kan beskyttes mot temperaturer i tanken, eller blir beskyttet av motstandsdyktigheten til for eksempel *Pseudomonas* som kan være resistent mot tradisjonell vasking av anlegg. Både *Sun et al.* og *Weber et al.* beskrev hvordan biofilm kan oppstå i melkeanlegg og melketank med kumelk, og de detekterte en større mengde av *Pseudomonas*, *Corynebacterium* og *Staphylococcus* i deres tankmelkprøver og svaberprøver fra anlegg og tank (15, 26). Dette er genus som også er detektert i større mengder i våre prøver. Det er derfor grunn til å tro at våre resultat kan tyde på det samme som disse studiene konkluderte med, at det mest sannsynlig er

en biofilmdannelse i melkeanlegg eller melketank, for eksempel ved områder som er utfordrende å vaske tilstrekkelig.

Det er også mulig at det kan ha blitt dannet biofilm i slimhinnene i juret, noe som kan være skyldig til spredning av bakterier til melka. Det er kjent at biofilmer kan dannes i en rekke ulike miljøer hvor det finnes fuktighet, næring og en overflate å feste seg til, og slimhinner kan ansees som et slikt miljø (24, 25). Endring i bakteriesammensetning kan også skje ved melking, da melkeprosedyrer og rutiner kan variere. Implikasjoner dette kan ha, kan være for eksempel mengder luft som kommer inn fra melkeorganet og kan forurense, eller tidsbruk mellom vask og påsetting av melkeorgan, som kan føre til at normalflora på utsiden av juret løsner opp og blir med inn i spenekoppen. Også varierende bruk av engangshansker kan være en faktor, da eksterne bakterier fra huden til den som melker kan overføres til spenen. Melkeanlegget et vakuumsystem med tidvis tilførsel av luft fra det ytre miljøet. Det er derfor mulig at bakterier fra fjøsmiljøet kan komme inn og forurense melken. *Weber et al.* konkluderte at blant annet hygiene rundt vasking og tørking av jur, og utfordringer rundt vasking av spesifikke deler av anlegget kunne ha en sammenheng med biofilmdannelsen som studiet påviste (26).

I denne studien har tidsdimensjonen spilt en viktig rolle i den forstand at lange intervaller mellom prøvetidspunkt kan ha påvirket vår evne til å oppdage spesifikke trender, ettersom det i dette tidsrommet kan være flere faktorer som påvirker bakteriesammensetningen. Selv om svært høyt bakterietall ofte kan indikere mastitt, vil en med tettere prøver kunne se om økningen vedvarer over tid, noe som vil være tilfelle dersom det er en aktiv infeksjon i besetningen; samt se fra sekvenseringsdata hvilke aktører som er til stede. Kontaminasjon fra miljø og anlegg vil antakeligvis føre til mer tilfeldige svingninger, eksempelvis dersom en har biofilm i systemet som tidvis løsner og kontaminerer melken. Det ville trolig vært større mulighet for å tolke resultatene opp mot årsaker knyttet til stigning i bakterietall med tettere prøveintervaller. Basert på våre resultater er det derfor vanskelig å si noe om korrelasjon mellom mikrobiomets samfunnsstruktur og økning i bakterietall.

Begrensninger

I løpet av vår analyse møtte vi noen utfordringer med å oppnå vellykkede sekvenseringsresultater for alle prøvene i studien vår. Den store variasjonen i DNA konsentrasjon fra prøve til prøve gjorde det vanskelig å kunne sekvensere på lik linje. Av denne grunn ble det nødvendig å fortynne prøvene i varierende grad. Dette er en ekstra faktor som kan påvirke resultatet.

Under DNA isoleringen støtte vi på et problem med å oppnå fullstendig separasjon av cellepelletten fra fettfraksjonen, dette førte til at vi i noen tilfeller måtte fortynne prøvene med PBS i flere omganger. Det skal ikke ha noen påvirkning på videre sekvensering eller på resultatet, men er en faktor som må tas hensyn til; kanskje særlig med tanke på eventuell videre/fremtidig forskning kan det være nødvendig å ta en vurdering av prøveforberedelsesmetoden for å sikre en bedre separasjonsprosess. Ved å sammenligne resultatene vi har fått med prøvene som ble sekvensert ser vi at det er en andel mindre prøver der resultatene er gode nok til å se nærmere på. Av denne grunn har det vært vanskeligere å se korrelasjoner mellom prøvene. Ved mulighet hadde enkelte prosesser blitt gjort om igjen for optimalt resultat, men på grunn av tidsbegrensningen ved arbeid med bacheloroppgave har ikke dette vært mulig.

En annen utfordrende faktor var mistanke om marin innblanding ved funn av bl.a. *Aliidiomarina taiwanensis*. Prøvene ble sekvensert ved samme med marine prøver, og det har derfor forekommet marin innblanding i resultatene. For å begrense risikoen for at mulig forurensing fra disse prøvene skulle påvirke vår analyse av sekvenseringsdataene, forsøkte vi å ekskludere åpenbart marine arter fra datasettet. Denne prosessen viste seg dog for å være problematisk da flere av artene som i første omgang så ut til å være marin, viste seg at de hadde blitt isolert fra melkeprøver tidligere som overraskende funn.

Derfor har vi basert våre resultater på det totale datasettet, noe som medfører en risiko for at enkelte takson kan være feilrepresenterte. Flere av bakterieslekter som kan finnes i melkeprøver, er også mulige å finne i marine miljø. Derfor kan verdier ved enkelte være noe høyere enn den reelle verdien da det er mulig at noe er overført fra RAS prøvene. Det har likevel medført noe usikkerhet rundt enkelte av våre resultater da bakterier er funnet både i marine miljø og geitemelkprøver, fordi de kan ha blitt overført fra RAS prøvene.

En begrensning er mangelen på informasjon som finnes på flere bakterier på genusnivå. Eksempel på disse er blant annet *Jeotgalicoccus* og *Facklamia*. *Jeotgalicoccus* er ikke tidligere assosiert med geitemelk, men er godt representert i våre resultater samt har det blitt funnet som overraskende funn av *Qugley et al.* *Facklamia* er en annen genus som er godt representert i prøven, men som det finnes lite forskning på. Det er derfor viktig at det forekommer mer forskning på flere bakterier som er til stede i melk, slik at det er mulig å vite om hvordan funn av disse genus påvirker melke kvaliteten.

Framtidige aspekter

For å få bedre forståelse av studiet kreves det videre forskning som går over en lengre periode. En slik forskning kan gjør det mulig å få en oversikt over ulike faktorer som faktisk påvirker sammensetningen ved ulike årstider. Ved bruken av kortere intervaller mellom analyserte prøver vil det bli lettere å kunne observere trender ved variasjon i sammensetning av mikrobiom i sammenheng med bactocount. Et annet aspekt som kan være nyttig videre er å undersøke flere gårdsbruk, slik at det blir en overordnet oversikt over hvordan forskjellige typer gårdsdrift kan påvirke sammensetning. I tillegg til mer forskning på interessante bakterier hvor der per nå foreligger lite tilgjengelig kunnskap, etter det vi har klart å finne, slik som hvilken påvirkning tilstedeværelsen av *Facklamia* og *Jeotgalicoccus* kan ha i melk; som påvirkende faktor for kvalitet og sammensetningen av det mikrobiologiske samfunnet i melka. Vi anser det derfor som viktig at videre forskning fortsetter å bruke molekylærbiologiske metoder som NGS for å oppnå en mye bedre forståelse enn ved tradisjonelle dyrkningsmetoder. At det benyttes sekvensering ved videre forskning vil også kunne gi innsikt i den totale sammensetning av bakterier som påvirker melke kvaliteten. Det vil også gi innsikt i bakterier som tidligere ikke er assosiert med melkeprøver, samt gi en forståelse om hvordan VBNC- bakterier kan påvirke melke kvaliteten.

Konklusjon

Problemstillingen i denne oppgaven var primært å identifisere dominerende bakterielle takson og deres relative forekomster i tankmelk fra geit, sekundært ønsket vi å se etter sammenheng mellom bactocount og sammensetning; og til sist å sannsynliggjøre opphavet til dominante takson dersom mulig. Ved bruk av sekvenserings plattformen Ion Torrent PGM og programvaren Ion Reporter fikk vi sekvensert det bakterielle innholdet i ni prøver fra ulike tidspunkt. Resultater fra sekvenseringen viser at det er sju genus som utgjør kjernen av mikrobiom i tankmelk fra geit, og at det er stor forskjell i bakterie sammensetningen mellom prøver tatt rett etter utmarksbeite og prøver tatt lenger ut i inneførsperioden. Videre vurderte vi resultatene slik at det potensielt kan være snakk om to mulige kontaminasjonskilder basert på undersøkelser av de tre prøvene med høyest bakterietall, som vi hypotetiserer kan stamme fra mastitt og biofilm; henholdsvis forårsaket av *Staphylococcus warneri* og psykotrofe biofilmdannende bakterier som *Pseudomonas*. Basert på vår studie er det vanskelig å konkludere med hvilke bakterier som generelt er skyld i tidvis økning i bakterietall, blant annet på grunn av lavt antall prøver med store tidsintervaller mellom prøvetidspunkt. Resultatene viser at miljøfaktorer kan påvirke sammensetningen av mikrobiom i tankmelk, og at det sannsynligvis er biofilm i anlegget/tanken som tidvis løsner, men videre forskning kreves for å kunne si mer om hvordan dyr og biofilm påvirker melke kvalitet og bakterietall. NGS analyse av geitemelk kan gi en dypere innsikt i den tidvise dynamikken i mikrobiomet, ved en større og mer omfattende studie vil det sannsynligvis være mulig å identifisere spesifikke takson (eller kombinasjoner av flere) som kan forbindes med økt bakterietall, noe som vil gagne fremtidens geitemelk produsenter så vel som meieribransjen; som begge har som hovedformål å levere melk av den beste kvalitet.

Litteraturliste

1. Polveiro RC, Vidigal PMP, de Oliveira Mendes TA, Yamatogi RS, da Silva LS, Fujikura JM, et al. Distinguishing the milk microbiota of healthy goats and goats diagnosed with subclinical mastitis, clinical mastitis, and gangrenous mastitis. *Frontiers in Microbiology*. 2022;13. Tilgjengelig fra <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.918706/full>
2. Kumar, H. Yadav, D. Kumar, N. Nutritional and nutraceutical properties of goat milk- A review. *ResearchGate*. 2016;69(5):513-7. Tilgjengelig fra https://www.researchgate.net/profile/Devbrat-Yadav/publication/301693090_Nutritional_and_nutraceutical_properties_of_goat_milk_-_A_review/links/580ddddd608ae1551f0b19ff4/Nutritional-and-nutraceutical-properties-of-goat-milk-A-review.pdf
3. Tine. Årsrapport 2021 [Internett]. Hentet 13.04.23. Tilgjengelig fra <https://www.tine.no/om-tine/TINE-aarsrapport-2021-digital.pdf>
4. Quigley L, O'Sullivan O, Stanton C, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF, et al. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*. 2013;37(5):664-98. Tilgjengelig fra <https://academic.oup.com/femsre/article/37/5/664/541439>
5. Nema V. The Role and Future Possibilities of Next-Generation Sequencing in Studying Microbial Diversity. London, United Kingdom:2019. 611-30 p. Tilgjengelig fra <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128148495000344>
6. Raats D, Offek M, Minz D, Halpern M. Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. *Food Microbiology*. 2011;28(3):465-71. Tilgjengelig fra <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21356452/>
7. Holene, AC. Geit [Internett]. NIBIO. Hentet 13.04.23. Tilgjengelig fra <https://www.nibio.no/tema/mat/husdyrgenetiske-ressurser/bevaringsverdige-husdyrraser/geit>
8. Ueland, D. *Naturbruk VG1*. Bergen: Fagbokforlaget; 2020. s. 83-86.

9. Park Y.W. 2007: Park YW, Juárez M, Ramos M, Haenlein GFW. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*. 2007;68(1):88-113. Tilgjengelig fra <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448806002549?via%3Dihub#aep-article-footnote-id9>
10. Fernández A.B. (2019). Chemical Composition of Goat Milk: Revisión Bibliográfica. *Archives of Veterinary and Animal Sciences* 1. Tilgjengelig fra <https://escientificpublishers.com/chemical-composition-of-goat-milk-revision-bibliografica-AVAS-01-0007>
11. Park Y. Park, Y.W. 2010. Goat Milk: Composition, Characteristics. *Encyclopedia of Animal Science*. W.G. Pond and N. Bell, eds. 2nd Edition. Taylor and Francis. CRC Press. Boca Raton, FL. In Press. 2010. Tilgjengelig fra https://www.researchgate.net/publication/283526517_Park_YW_2010_Goat_Milk_Composition_Characteristics_Encyclopedia_of_Animal_Science_WG_Pond_and_N_Bell_eds_2nd_Edition_Taylor_and_Francis_CRC_Press_Boca_Raton_FL_In_Press
12. Tine. Parametere for melkekvalitet [Internett]. Hentet 25.04.23. Tilgjengelig fra <https://medlem.tine.no/melk>
13. Gustavsen, EØ. Somatiske celler i geitemelk og betydning for produktkvalitet hos Feta-type ost [Masteroppgave]. NMBU; 2022. Tilgjengelig fra https://nmbu.brage.unit.no/nmbu-xmlui/bitstream/handle/11250/3013309/Feta-type%20ost%2015.05_Elise%20Gustavsen.pdf?sequence=1&isAllowed=y
14. Kuchtík J, Šustová K, Sýkora V, Kalhotka L, Pavlata L, Konečná L. Changes in the somatic cells counts and total bacterial counts in raw goat milk during lactation and their relationships to selected milk traits. *Italian Journal of Animal Science*. 2021;20(1):911-7. Tilgjengelig fra <https://doi.org/10.1080/1828051X.2021.1913077>
15. Sun L, Lundh Å, Höjer A, Bernes G, Nilsson D, Johansson M, et al. Milking system and premilking routines have a strong effect on the microbial community in bulk tank milk. *Journal of Dairy Science*. 2022;105(1):123-39. Tilgjengelig fra <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030221009693?via%3Dihub>
16. Koop G, Nielen M, Van Werven T. Diagnostic tools to monitor udder health in dairy goats. *Veterinary Quarterly*. 2012;32(1):37-44. Tilgjengelig fra <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01652176.2012.675634>

17. Mattilsynet. Kartlegging av alternative barrierer for produksjon av melkebaserte produkter produsert av ikke-varmebehandlet melk. SNT Arbeidsrapport 2. [Internett]. NLH; 2003. Tilgjengelig fra <https://www.mattilsynet.no/mat-og-drikke/matproduksjon/melk-og-meieriprodukter/alternative-barrierer>
18. Zhang F, Wang Z, Lei F, Wang B, Jiang S, Peng Q, et al. Bacterial diversity in goat milk from the Guanzhong area of China. *Journal of Dairy Science*. 2017;100(10):7812-24. Tilgjengelig fra <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030217307774>
19. Biology Online. Opportunistic pathogen [Internett]. 2022. Hentet 25.04.23. Tilgjengelig fra <https://www.biologyonline.com/dictionary/opportunistic-pathogen>
20. Hernández-Saldaña OF, Valencia-Posadas M, de la Fuente-Salcido NM, Bideshi DK, Barboza-Corona JE. Bacteriocinogenic Bacteria Isolated from Raw Goat Milk and Goat Cheese Produced in the Center of México. *Indian J Microbiol*. 2016;56(3):301-8. Tilgjengelig fra <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4920766/>
21. Tine. Oversikt over mastittbakterier [Internett]. Hentet 18.04.23. Tilgjengelig fra <https://medlem.tine.no/melk/bakterier/oversikt-over-mastittbakterier-copy>
22. Friedlander A, Nir S, Reches M, Shemesh M. Preventing Biofilm Formation by Dairy-Associated Bacteria Using Peptide-Coated Surfaces. *Front Microbiol*. 2019; 10:1405. Tilgjengelig fra <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6608603/>
23. Tronsmo A. Innføring I mikrobiologi. Oslo: Universitetsforlaget; 2016.
24. Langsrud, S. Strategi Senter for biofilmforskning [Internett]. Wordpress. 18.06.10 [Hentet 25.04.2023]. Tilgjengelig fra <https://biofilmforskning.wordpress.com/>
25. Ferneborg S.: jur i Store norske leksikon på snl.no. [Hentet 29. april 2023] Tilgjengelig fra <http://snl.no/jur>
26. Weber M, Liedtke J, Plattes S, Lipski A. Bacterial community composition of biofilms in milking machines of two dairy farms assessed by a combination of culture-dependent and -independent methods. *PLoS One*. 2019;14(9): e0222238. Tilgjengelig fra <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6738651/>

27. Tine. Slik analyserer vi melka [Internett]. Hentet 13.04.23. Tilgjengelig fra <https://medlem.tine.no/melk/slik-analyserer-vi-melka>
28. Lindheim, D. Sølverød, L. Lunn, K, Kjus, E. Totalantall bakterier i tankmelk. Norsk Sau og geit, NSG. 2016;(5): 1-3. Tilgjengelig fra https://www.fag.nsg.no/default.cfm?sok_dyreslag_id=2&sok_fagomrade_id=4&sok_tekst=&sok_artikkel_id=295
29. Håland, M. Mikrobiell kvalitet av melk gjennom verdikjeden – med fokus på *Bacillus cereus* [Masteroppgave]. NMBU; 2017. Tilgjengelig fra https://nmbu.brage.unit.no/nmbu-xmlui/bitstream/handle/11250/2455374/H%c3%a5land_2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y
30. Inglingstad RA. Celletall i geitemelk [Internett]. Tine; 2020 [oppdatert 13. april 2021]. Tilgjengelig fra <https://medlem.tine.no/fag-og-forskning/celletall-i-geitemelk>
31. Gane, A. Cytiva life sciences [Internett]. Cytiva: 2018. Fundamentals of NGS sample preparation. Tilgjengelig fra <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/news-center/next-generation-sequencing-sample-preparation-guide-10001>
32. Gupta N, Verma VK. Next-Generation Sequencing and Its Application: Empowering in Public Health Beyond Reality. Microbial Technology for the Welfare of Society. 2019 Sep 13; 17:313–41. Tilgjengelig fra <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7122948/>
33. Introduction to Ion Reporter™ Software. Iontorrent. ThermoFisher Scientific. [Internett, hentet 11.mai 2023]. Tilgjengelig fra <https://ionreporter.thermofisher.com/ionreporter/help/GUID-4A207E04-2113-4633-968D-4B7A65A1D64A.html>
34. Plummer PJ, Brooks KMS, Edmondson MA. 15 - Diseases of the mammary gland. In: Pugh DG, Baird AN, Edmondson MA, Passler T, editors. Sheep, Goat, and Cervid Medicine (Third Edition). St. Louis: Elsevier; 2021. p. 385-404. Tilgjengelig fra <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/staphylococcus-warneri>
35. BacDive. Global Core Biodata Resource [Internett]. Hentet 25.04.23. Tilgjengelig fra <https://bacdive.dsmz.de/>

Vedlegg

1.DNA isolering

PROSEDYRE:

AKT 0002: DNA isolering

Formål

Hensikten med prosedyren er å standardisere og kvalitetssikre DNA isolering

Omfang

Prosedyrens gyldighetsområde; DNA isolering med DNeasy kit fra Qiagen.

Bakgrunnsinformasjon

DNeasy (Qiagen):

Ferdig kit beregnet på å isolere DNA. Baserer seg på affiniteten nukleinsyrene får til en kolonne membran ved tilsetning av ulike buffere. Nukleinsyrene felles fra membran etter flere rensingstrinn ved å tilsette 96% EtOH.

Notes before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
- Redissolve any precipitates in Buffer AL and Buffer ATL.
- Add ethanol to Buffer AW1 and Buffer AW2 concentrates.
- Equilibrate frozen tissue or cell pellets to room temperature.
- Preheat an incubator to 56°C.
- Refer to the handbook for pretreatment of fixed tissue, insect, bacterial, or other material.

Utstyr og reagenser

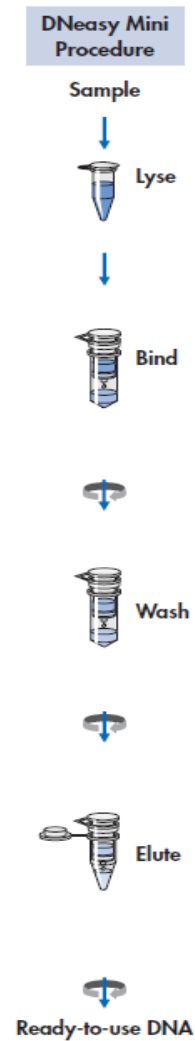
DNeasy Blood & Tissue Kit	(50)	(250)
Catalog no.	69504	69506
Number of preps	50	250
DNeasy Mini Spin Columns (colorless) in 2 ml Collection Tubes	50	250
Collection Tubes (2 ml)	100	500
Buffer ATL	10 ml	50 ml
Buffer AL*	12 ml	54 ml
Buffer AW1 (concentrate)**	19 ml	95 ml
Buffer AW2 (concentrate)**	13 ml	66 ml
Buffer AE	22 ml	2 x 60 ml
Proteinase K	1.25 ml	6 ml
Handbook	1	1

* Contains a chaotropic salt. Not compatible with disinfecting agents containing bleach. See page 8 for safety information.

** Buffer AW1 and Buffer AW2 are supplied as concentrates. Add ethanol (96-100%) according to the bottle label before use to obtain a working solution.

** Contains sodium azide as a preservative.

Analyseprinsipp



Prøvemateriale

Protocol: Pretreatment for Gram-Negative Bacteria

This protocol is designed for purification of total DNA from Gram-negative bacteria, such as *E. coli*. The protocol describes the preliminary harvesting of bacteria before DNA purification.

Important points before starting

- See “Quantification of starting material”, page 17, for details of how to collect and store samples, and how to determine the number of cells in a bacterial culture.
- This pretreatment protocol has not been thoroughly tested and optimized for high-throughput DNA purification using the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit. As a general guideline, we recommend to decrease the amount of starting material when using this protocol with the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit.

Procedure

1. Harvest cells (maximum 2×10^9 cells) in a microcentrifuge tube by centrifuging for 10 min at $5000 \times g$ (7500 rpm). Discard supernatant.
2. Resuspend pellet in 180 μ l Buffer ATL.
3. Continue with step 2 of the protocol “Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol)”, page 29.

Arbeidsbeskrivelse

2. Add 20 μ l proteinase K. Mix thoroughly by vortexing, and incubate at 56°C until the tissue is completely lysed. Vortex occasionally during incubation to disperse the sample, or place in a thermomixer, shaking water bath, or on a rocking platform. Lysis time varies depending on the type of tissue processed. Lysis is usually complete in 1–3 h or, for rodent tails, 6–8 h. If it is more convenient, samples can be lysed overnight; this will not affect them adversely.

After incubation the lysate may appear viscous, but should not be gelatinous as it may clog the DNeasy Mini spin column. If the lysate appears very gelatinous, see the “Troubleshooting Guide”, page 47, for recommendations.

Optional: If RNA-free genomic DNA is required, add 4 μ l RNase A (100 mg/ml), mix by vortexing, and incubate for 2 min at room temperature before continuing with step 3.

Transcriptionally active tissues such as liver and kidney contain high levels of RNA, which will copurify with genomic DNA. For tissues that contain low levels of RNA, such as rodent tails, or if residual RNA is not a concern, RNase A digestion is not necessary.

3. Vortex for 15 s. Add 200 μ l Buffer AL to the sample, and mix thoroughly by vortexing. Then add 200 μ l ethanol (96–100%), and mix again thoroughly by vortexing.

It is essential that the sample, Buffer AL, and ethanol are mixed immediately and thoroughly by vortexing or pipetting to yield a homogeneous solution. Buffer AL and ethanol can be premixed and added together in one step to save time when processing multiple samples.

A white precipitate may form on addition of Buffer AL and ethanol. This precipitate does not interfere with the DNeasy procedure. Some tissue types (e.g., spleen, lung) may form a gelatinous lysate after addition of Buffer AL and ethanol. In this case, vigorously shaking or vortexing the preparation is recommended.

4. Pipet the mixture from step 3 (including any precipitate) into the DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube (provided). Centrifuge at $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) for 1 min. Discard flow-through and collection tube.*
5. Place the DNeasy Mini spin column in a new 2 ml collection tube (provided), add 500 μl Buffer AW1, and centrifuge for 1 min at $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm). Discard flow-through and collection tube.*
6. Place the DNeasy Mini spin column in a new 2 ml collection tube (provided), add 500 μl Buffer AW2, and centrifuge for 3 min at $20,000 \times g$ (14,000 rpm) to dry the DNeasy membrane. Discard flow-through and collection tube.

It is important to dry the membrane of the DNeasy Mini spin column, since residual ethanol may interfere with subsequent reactions. This centrifugation step ensures that no residual ethanol will be carried over during the following elution.

Following the centrifugation step, remove the DNeasy Mini spin column carefully so that the column does not come into contact with the flow-through, since this will result in carryover of ethanol. If carryover of ethanol occurs, empty the collection tube, then reuse it in another centrifugation for 1 min at $20,000 \times g$ (14,000 rpm).

7. Place the DNeasy Mini spin column in a clean 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube (not provided), and pipet 200 μl Buffer AE directly onto the DNeasy membrane. Incubate at room temperature for 1 min, and then centrifuge for 1 min at $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) to elute.

Elution with 100 μl (instead of 200 μl) increases the final DNA concentration in the eluate, but also decreases the overall DNA yield (see Figure 2, page 21).

8. **Recommended:** For maximum DNA yield, repeat elution once as described in step 7.

This step leads to increased overall DNA yield.

A new microcentrifuge tube can be used for the second elution step to prevent dilution of the first eluate. Alternatively, to combine the eluates, the microcentrifuge tube from step 7 can be reused for the second elution step.

Note: Do not elute more than 200 μl into a 1.5 ml microcentrifuge tube because the DNeasy Mini spin column will come into contact with the eluate.

Feilkilder

Pipettering feil

Forurensning

Utfelling av reagenser

Bruk av feil reagenser

2. Amplifisering 16S rDNA

PROSEDYRE:

AKT 0005 16S metagenomikk amplifisering av mikroorganismer i komplekse miljø

Formål

Hensikten med prosedyren er å standardisere og kvalitetssikre 16S rDNA amplifisering av mikroorganismer i komplekse miljø

Omfang

Prosedyren omfatter amplifisering av 16s rDNA fragmenter som skal brukes videre til NGS – 16s rRNA metagenomikk

Bakgrunnsinformasjon

Ion 16S Metagenomics Kit

Metagenomics research is made easier with next-generation sequencing. With this culture-free sequencing method, you can get genus- and species-level taxonomic results in less than 3 days. The Ion 16S™ Metagenomics Kit uses two primer pools to amplify seven hypervariable regions (V2, V3, V4, V6, V7, V8, and V9) of bacterial 16S rRNA. The amplified fragments can then be sequenced on either the Ion S5™ or the Ion PGM™ Systems, and analyzed using the Ion 16S metagenomics workflow in Ion Reporter™ Software (Figure 1).

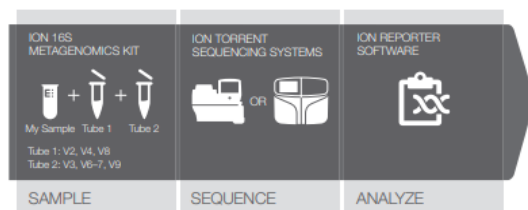


Figure 1. Integrated, cost-effective, scalable 16S rRNA sequencing workflow for the Ion Torrent sequencing systems, with a rapid workflow from library to analyzed results. Following library construction and template preparation, 400 bp sequencing runs are completed in as little as 4 hours. BAM files produced with Torrent Suite™ Software are automatically analyzed, annotated, and taxonomically assigned in the Ion Reporter Software 16S metagenomics workflow.

Benefits of the Ion 16S Metagenomics

Solution include:

- Use starting material from direct samples without culture, mixed culture, or pure culture
- Comprehensive primer sets allow for accurate detection and identification of a broad range of bacteria, down to the genus or species level
- Flexibility—primer sets provided as two pools allow for separate analyses using individual pools
- Primers can also be barcoded
- Integrated workflow/end-to-end solution
- Fast analysis with Ion Reporter Software using premium curated Applied Biosystems™ MicroSEQ™ ID 16S rRNA database and curated Greengenes database

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Workflow

The required Ion kit is listed next to the applicable step(s).

Prepare amplicons

Amplify the 16S hypervariable regions



Purify the amplification products (in a PCR plate or tubes)



Calculate DNA input for library preparation



Prepare the library

End repair and purify pooled amplicons



Ligate and nick-repair



Purify the adapter-ligated and nick-repaired DNA



Determine library concentration



Proceed to template preparation



Sequence the library

Ion 16S™ Metagenomics Kit (Cat. no. A26216)

Ion Plus Fragment Library Kit
(Cat. no. 4471252)

Ion Universal Library Quantitation Kit
(Cat. no. A26217)

Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit
(Cat. no. A27739)

Ion PGM™
Hi-Q™ Sequencing Kit
(Cat. no. A25592)

Utstyr og reagenser

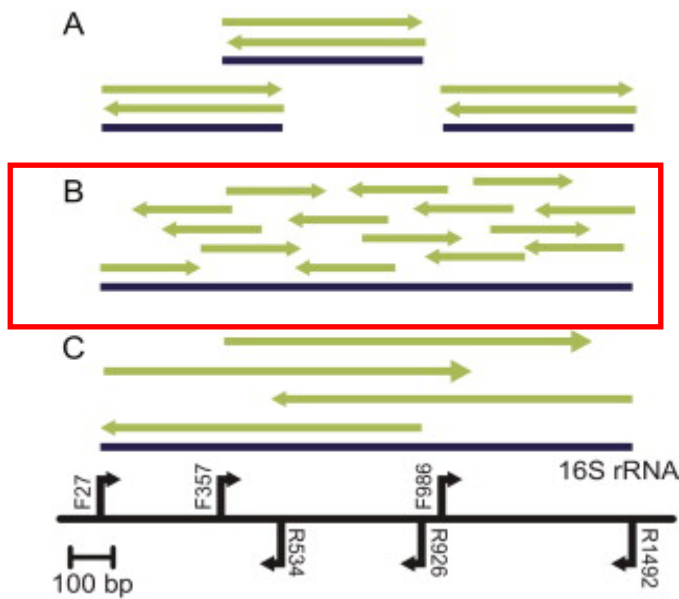
Kit contents

Table 1 Ion 16S™ Metagenomics Kit (Cat. no. A26216)

Component	Part no. ^[1]	Cap color	Quantity	Volume	Storage conditions
2X Environmental Master Mix	4401975	Orange	2 tubes	0.8 mL per tube	Shipped at -20°C. After first use, store at 2-8°C if used frequently, otherwise store at -20°C.
DNA Dilution Buffer	4405587	Clear	1 bottle	7.0 mL	Protect the 2X Environmental Master Mix from light.
16S Primer Set V2-4-8 (10X)	100026495	Green	1 tube	300 µL	Store at -15 to -25°C.
16S Primer Set V3-6, 7-9 (10X)	100026496	Blue	1 tube	300 µL	
Negative Control	362250	White	1 tube	1.0 mL	
<i>E. coli</i> DNA control (30 µg/mL)	4458450	Red	1 tube	40 µL	Store at -15 to -25°C. Store separately from other reagents to prevent cross-contamination.

^[1] Provided for identification purposes; the parts cannot be ordered separately from the kit.

Analyseprinsipp



Figur 1 Diagram of the PCR amplicons sequenced using “454” (A), Ion Torrent (B), and Sanger sequencing (C). Blue lines represent PCR amplicons, and green arrows represent the sequencing read and direction (modified from [4]). The black line represents the 16S rRNA gene. The black arrows indicate the PCR primer direction labeled with the primer name. Primers were previously used in used by the Human Microbiome Project Jumpstart Consortium Group [3]. All PCR amplicons overlap to give full coverage of the 16 rRNA gene with the exception of “454” (A) where a 40bp was not targeted by the PCR primers.

Kvalitetskontroll

Analysen skal kvalitetssikres ved bruk av ren DNA prøve fra *E. coli* som positiv kontroll og negativ kontroll bestående av ddH₂O tilsatt reaksjonsmiksen for å kontrollere at ikke miksen er forurenset eller danner interne bindinger.

Prøvemateriale

Prøvematerialet skal være rensed DNA etter protokoll AKT0001. Prøvene skal oppbevares ved -20° C

Prepare amplicons

Important sample preparation and amplification guidelines

- Prepare genomic DNA using your method of choice.
- See the table for recommended DNA input amounts and number of PCR cycles; you can increase or decrease the number of PCR cycles as needed depending on your DNA input amount and sample complexity.

IMPORTANT! Minimize the number of amplification cycles to avoid over-amplification, production of concatemers, and introduction of PCR-induced errors.

- Include a positive and negative amplification control for each PCR run.
- Review Appendix C, “Good laboratory practices for PCR and RT-PCR”.

Note: Throughout the user guide, “room temperature” is 22–24°C.

Table 6 PCR amplification guidelines

Sample	DNA input amount for amplification reaction ^[1]	No. amplification cycles
Pure microbial DNA (including positive control)	1–3 ng	18
Samples with large amounts of non-microbial DNA ^[2]	1–2 µL extracted DNA	25

^[1] 1–3 ng of microbial DNA input provides sufficient amplified material for library preparation, and allows you to avoid reamplifying the library before the template preparation and sequencing steps.

^[2] Recommended if non-microbial DNA makes it difficult to assess the microbial DNA content. See Appendix A, “Troubleshooting” for details.

Arbeidsbeskrivelse

1. Thaw all Ion 16S™ Metagenomics Kit reagents and keep on ice.
2. For each sample, prepare two reactions (one for each of the 2 primer sets). Include one positive and negative control per PCR run. Before you pipet each reagent, vortex for 5 seconds and pulse-spin the reagent tube.

Component	Tube A	Tube B	Negative control
2X Environmental Master Mix	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
16S Primer Set (10X) (V2-4-8)	1,5 µL		
16S Primer Set (10X) (V3-6, 7-9)		1,5 µL	1,5 µL
DNA template	6 µL	6 µL	
Negative Control (water)			6 µL
Totalt	15 µL	15 µL	15 µL

3. Place the tubes or plate in the thermal cycler and run the following program:

Stage	Temperature	Time
Hold	95°C	10 min
Cycle 18–25 cycles ^[1]	95°C	30 sec
	58°C	30 sec
	72°C	20 sec
Hold	72°C	7 min
Hold	4°C	∞ ^[2]

^[1] See "Important sample preparation and amplification guidelines" on page 10.

^[2] Remove samples within 24 hours and continue to next step or store at -20°C for up to 2 weeks.

4. (Optional) If samples contain non-microbial DNA, confirm the presence of PCR products (use a Bioanalyzer® instrument or 2% agarose gel) before you continue to the purification step. If no PCR products are present, see Appendix A, "Troubleshooting".

Feilkilder

Forurensing av mastermiks

Denaturert DNA

Lav enzymaktivitet

Resultatvurdering og videre arbeid

Resultater vurderes ved bruk av Qubit 4.0. Positive prøver skal bearbeides før videre analyse.

Cleanup of amplified 16s s fragments

1. Add 54 μl (1.8X volume) of AMPure XP Beads to the sample (30 μL) and mix by pipetting up and down.
2. Incubate for 5 minutes at room temperature.
3. Pulse spin the tube and place in a magnetic rack for approximately 2–3 minutes until the beads have collected to the side of the tube and the solution is clear. Carefully remove and discard the supernatant without disturbing the beads.
5. Keep the tube on the magnet and add 200 μl freshly prepared 70% ethanol. Incubate at room temperature, for 30 seconds, and carefully remove and discard the supernatant.
6. Repeat step 5 once for a total of two washes. Be sure to remove all visible liquid after the second wash. If necessary, briefly spin the tube/plate, place back on the magnet and remove traces of ethanol with a p10 pipette tip.
7. Keeping the tube in the magnetic rack, with the cap open, air dry the beads for up to 5 minutes at room temperature.

Caution: Do not over-dry the beads. This may result in lower recovery of DNA target. Elute the samples when the beads are still dark brown and glossy looking, but when all visible liquid has evaporated. When the beads turn lighter brown and start to crack, they are too dry.

8. Remove the tube from the magnet. Resuspend the beads in 20 μl of sterile 0.1X TE (volume may be adjusted for specific gel-based size selection protocol). Incubate for 2 minutes at room temperature.
9. Pulse-spin the tube and return to the magnet, until the beads have collected to the side of the tube and the solution is clear.
10. Transfer approximately 15 μl (or desired volume) of the supernatant to a clean tube, being careful not to transfer any beads.

3. Library prep. av 16S amplikon

PROSEDYRE:

AKT0006 Library prep 16s amplified fragments

Formål

Hensikten med prosedyren er å standardisere og kvalitetssikre biblioteks tillaging for 16s amplifiserte fragment for NGS metagenomikk

Omfang

Prosedyren gjelder for DNA prøver som er amplifisert ved bruk av AKT0005 16s metagenomikk amplifisering av mikroorganismer i komplekse miljø

Bakgrunnsinformasjon

The NEBNext Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent is suitable when mechanical methods, such as Covaris® acoustic shearing, are preferred for fragmentation of input DNA. The components and protocol for this kit have been optimized for the volumes and concentrations of DNA sheared by mechanical methods, and the kit is compatible with input amounts from 10 ng - 1µg, with a workflow time of under 2 hours and ~12 min. hands-on time.

Utstyr og reagenser

The Library Set Includes

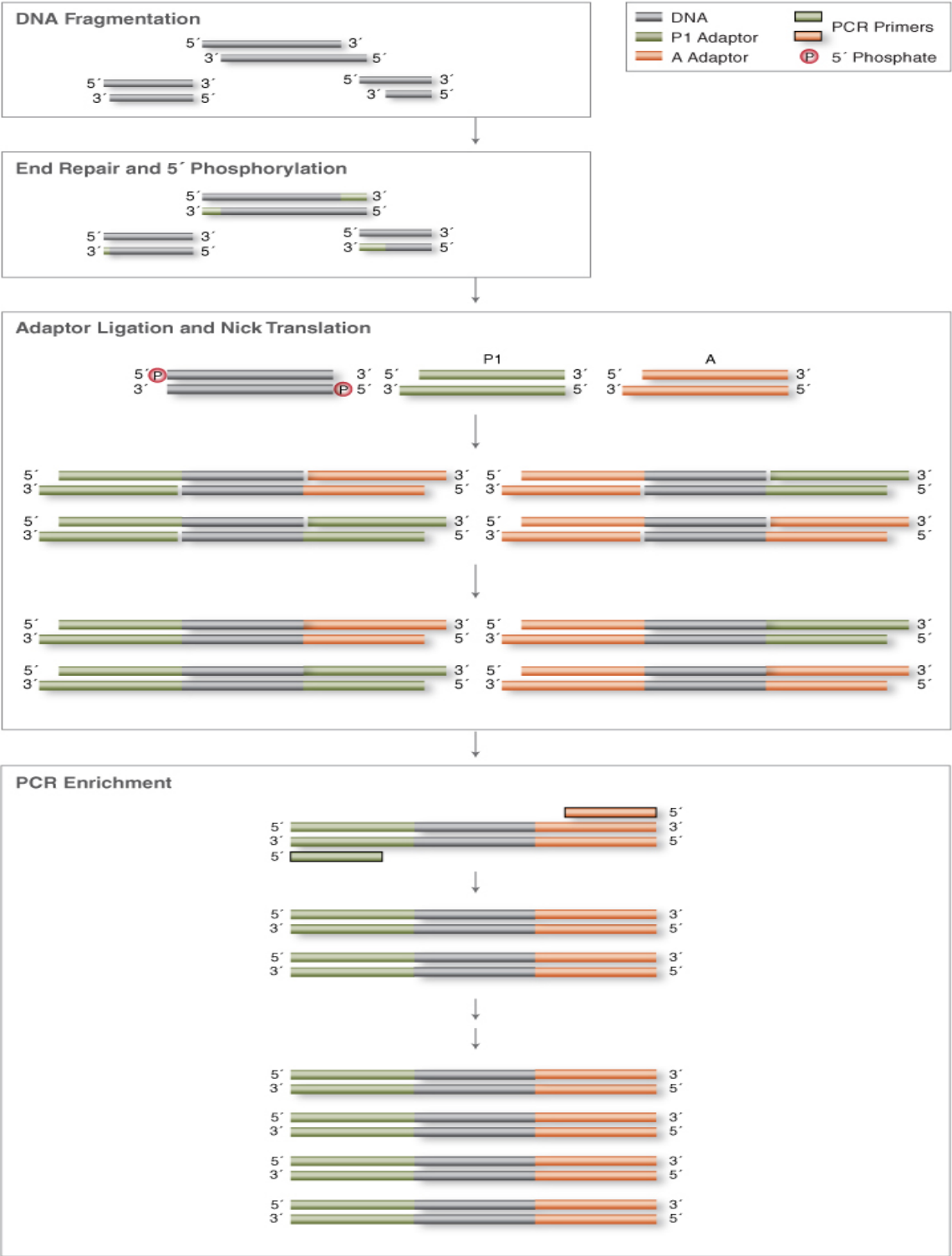
The volumes provided are sufficient for preparation of up to 50 reactions (NEB #E6270L). All reagents should be stored at -20°C.

- (green) NEBNext End Repair Enzyme Mix
- (green) NEBNext End Repair Reaction Buffer
- (red) T4 DNA Ligase
- (red) Bst 2.0 WarmStart DNA Polymerase
- (red) T4 DNA Ligase Buffer for Ion Torrent
- (red) NEBNext DNA Library Adaptors for Ion Torrent
- (blue) NEBNext DNA Library Primers for Ion Torrent
- (blue) NEBNext Q5 Hot Start HiFi PCR Master Mix
- (white) TE Buffer (0.1X)

Required Materials Not Included

- 80% Ethanol (freshly prepared)
- Agencourt® AMPure® XP Beads (Beckman Coulter, Inc. #A63881)
- Size selection materials [E-Gel® (Life Technologies, Inc.) or AMPURE XP Beads etc.]
- NEBNext® Magnetic Separation Rack (NEB #S1515)

Analyseprinsipp



Kvalitetskontroll

Basic Qubit® Fluorometric Quantitation Protocol

1. Prepare dye Working Solution in a plastic tube.

- Use 200 µL of buffer for every sample.
- Use 1 µL of dye for every sample.
- Mix by vortexing.

2. Aliquot 190 µL of Working Solution into two assay tubes for standards

3. Add 10 µL of each Standard to an assay tube and mix by vortexing.

4. Aliquot 180–199 µL of Working Solution into assay tubes for samples.

- The assays tolerate 1–20 µL of sample per tube.
- The final volume in each tube after adding sample should be 200 µL.

5. Add 1–20 µL of each sample to an assay tube and mix by vortexing.

6. Incubate 2 minutes

7. Read the results in the Qubit® 4.0 Fluorometer.

Based on the calculated library concentration, determine the dilution that results in a concentration of ~100 pM:

Average amplicon size	Concentration in ng/mL (~100 pM)
140 bp	9
175 bp	11
225 bp	15
275 bp	18
375 bp	24

For example, with a FFPE-compatible 125–175 bp design (avg. 225 bp with adapters):

- The library concentration is 450 ng/mL.
- The dilution factor is 450 ng/mL divided by 15 ng/mL = 30.
- Therefore, 10 µL of library that is mixed with 290 µL of Low TE (1:30 dilution) yields approximately 15 ng/mL (~100 pM).

Prøvemateriale

Hvilket prøvemateriale og prøveglass som skal brukes. Her kan også behandling av prøven komme med.

Arbeidsbeskrivelse

1. End repair

NEB library kit and Ion Xpress Barcode adapters 1-16 kit (Cat.no. 4471250) was used to make the library and purify the barcoded library product.

1. Load the following components in a tube and mix thoroughly by pipettor:

Components	Volume
Pooled amplicons	12 µl
Nuclease free water	13,5 µl
5X end repair buffer	3 µl
End repair enzyme	1,5 µl
Total volume	30 µl

2. Incubate for 20 minutes at 25°C followed by 10 minutes at 70°C, hold at 4°C.

2. Nick ligate and barcode adapter

1. Load the following components to the sample in a PCR tube to make the barcoded library, using the Ion Xpress Barcode Adapters 1-16 kit (Cat.no. 4471250):

Components	Volume
DNA (sample from 1)	30 µl
10X ligase buffer	5 µl
Ion P1 adapter (barcoded libraries)	1,5 µl
Ion Xpress barcode X (one for each sample)	1 µl
Nuclease-free water	8,5 µl
DNA ligase	3 µl
Nick repair polymerase	1 µl
Total volume	50 µl

IMPORTANT: Be careful not to cross-contaminate when handling barcode adapters. When making a barcoded library, use both Ion P1 adapter and the desired Ion Xpress Barcode X.

2. When all the reagents are added to the sample, place the tubes in a thermal cycler with the following program:

Stage	Temperature	Time
Hold	25 °C	15 min
Hold	65 °C	5 min
Hold	4 °	∞ *

*=This is not a stopping point, continue with the procedure.

Cleanup of adapter ligated fragments

1. Add 90 µl (1.8X volume) of AMPure XP Beads to the sample (30uL) and mix by pipetting up and down.
2. Incubate for 5 minutes at room temperature.
3. Pulse spin the tube and place in a magnetic rack for approximately 2–3 minutes until the beads have collected to the side of the tube and the solution is clear. Carefully remove and discard the supernatant without disturbing the beads.
5. Keep the tube on the magnet and add 200 µl freshly prepared 70% ethanol. Incubate at room temperature, for 30 seconds, and carefully remove and discard the supernatant.
6. Repeat step 5 once for a total of two washes. Be sure to remove all visible liquid after the second wash. If necessary, briefly spin the tube/plate, place back on the magnet and remove traces of ethanol with a p10 pipette tip.
7. Keeping the tube in the magnetic rack, with the cap open, air dry the beads for up to 5 minutes at room temperature.

Caution: Do not over-dry the beads. This may result in lower recovery of DNA target. Elute the samples when the beads are still dark brown and glossy looking, but when all visible liquid has evaporated. When the beads turn lighter brown and start to crack, they are too dry.

8. Remove the tube from the magnet. Resuspend the beads in 20 µl of sterile 0.1X TE (volume may be adjusted for specific gel-based size selection protocol). Incubate for 2 minutes at room temperature.
9. Pulse-spin the tube and return to the magnet, until the beads have collected to the side of the tube and the solution is clear.

10. Transfer approximately 15 μl (or desired volume) of the supernatant to a clean tube, being careful not to transfer any beads.

3 Amplify library

Ion Plus fragment library kit can be used to amplify the library.

1. Load the following reagents to the tube containing the library:

Components	Volume
Un- amplified library from C2	13 μl
Platinum PCR superMix High Fidelity	25 μl
Library Amplification Primer Mix	2 μl
ddH₂O	10 μl
Total volume	50 μl

2. Place PCR tubes into a thermal cycler and run the following program:

Stage	Step	Temperature	Time
Holding	Denature	98 °C	30 sec
12 cycles (50 ng of input)	Denature	98 °C	10 sec
	Anneal	58 °C	30 sec
	Extend	65 °C	30 sec
Holding	-	65 °C	5 min
Holding	-	4 °C	Hold for up to 1 hour

Cleanup of adapter ligated fragments

1. Add 45 μl (0.9 X volume) of AMPure XP Beads to the sample (30 μL) and mix by pipetting up and down.
2. Incubate for 5 minutes at room temperature.
3. Pulse spin the tube and place in a magnetic rack for approximately 2–3 minutes until the beads have collected to the side of the tube and the solution is clear. Carefully remove and discard the supernatant without disturbing the beads.

5. Keep the tube on the magnet and add 200 μ l freshly prepared 70% ethanol. Incubate at room temperature, for 30 seconds, and carefully remove and discard the supernatant.

6. Repeat step 5 once for a total of two washes. Be sure to remove all visible liquid after the second wash. If necessary, briefly spin the tube/plate, place back on the magnet and remove traces of ethanol with a p10 pipette tip.

7. Keeping the tube in the magnetic rack, with the cap open, air dry the beads for up to 5 minutes at room temperature.

Caution: Do not over-dry the beads. This may result in lower recovery of DNA target. Elute the samples when the beads are still dark brown and glossy looking, but when all visible liquid has evaporated. When the beads turn lighter brown and start to crack, they are too dry.

8. Remove the tube from the magnet. Resuspend the beads in 20 μ l of sterile 0.1X TE (volume may be adjusted for specific gel-based size selection protocol). Incubate for 2 minutes at room temperature.

9. Pulse-spin the tube and return to the magnet, until the beads have collected to the side of the tube and the solution is clear.

10. Transfer approximately 15 μ l (or desired volume) of the supernatant to a clean tube, being careful not to transfer any beads.

Feilkilder

End repair mislykket

For høy konsentrasjon av DNA

Lav enzymaktivitet

Clean up feil

Resultatvurdering

Basic Qubit® Fluorometric Quantitation Protocol – prøver med verdi over 4ng/ml ansees for å være av god kvalitet.

4.Bactocount verdier

Tabell 5: Oversikt over bactocount og celletall som er målt av Tines melke kvalitetslaboratorium.

Tomme rader ved bactocount betyr at det har gått for lang tid fra melkeprøven ble tatt til den ankom laboratoriet, og ble dermed ikke analysert for bakterietall.

Dato	Bactocount (10 ³ per ml)	Celletall (10 ³ per ml)
07.09.2022	132	650
13.09.2022	111	720
16.09.2022	115	720
19.09.2022	164	780
22.09.2022	126	640
25.09.2022	187	750
28.09.2022	100	610
04.10.2022	207	700
07.10.2022	168	660
10.10.2022	69	560
13.10.2022	83	510
16.10.2022	44	590
22.10.2022		600
25.10.2022	82	630
28.10.2022	94	770
31.10.2022	60	670
03.11.2022	43	630
06.11.2022	80	550
09.11.2022	97	640
12.11.2022		560
15.11.2022	106	480
18.11.2022	52	490
21.11.2022	57	530
24.11.2022	62	450
27.11.2022	71	450
30.11.2022	85	520
03.12.2022		420
06.12.2022	107	370
09.12.2022	80	480
12.12.2022	92	450
15.12.2022	38	240
18.12.2022	77	530
21.12.2022	88	500
27.12.2022	85	720

5.Prøveuttak

Tabell 6: Oversikt over prøveuttak bestående av dato og antall prøverør som ble tatt per uttak, samt bactocount verdier fra Geitekontrollen (Tine). Tomme rader ved Bactocount betyr at det har gått for lang tid fra melkeprøven ble tatt til den ankom laboratoriet, og ble dermed ikke analysert for bakterietall.

Dato	Antall rør	Bactocount
06.09.2022	1x10ml	132
09.09.2022	2x10ml	120
12.09.2022	2x10ml	111
15.09.2022	2x10ml	115
18.09.2022	2x10ml	164
21.09.2022	2x10ml	126
27.09.2022	2x10ml	100
03.10.2022	2x10ml	207
09.10.2022	2x10ml	69
15.10.2022	2x10ml	44
21.10.2022	2x10ml	57
27.10.2022	2x10ml	71
02.11.2022	2x10ml	43
08.11.2022	2x10ml	97
14.11.2022	2x10ml	106
20.11.2022	2x10ml	57
26.11.2022	2x10ml	71
02.12.2022	2x10ml	
08.12.2022	2x10ml	80
14.12.2022	2x10ml	38
20.12.2022	2x10ml	88
29.12.2022	2x10ml	85
22 prøvedatoer	43 prøverør	

6.DNA konsentrasjon målt med Qubit etter DNA isolering (side 1 av 2)

Tabell 7: Tabellen viser en oversikt over DNA konsentrasjon målt med Qubit dsDNA HS fluorometer (4.0) etter DNA isolering

Prøvedato	Prøve id	Original sample cons. (ng/mL)	Tube cons. (ng/ml)
06.09.22	1	8120	203
09.09.22	2A	9360	234
09.09.22	2B	1704	42,6
12.09.22	3A	6400	160
12.09.22	3B	5840	146
15.09.22	4A	6400	160
15.09.22	4B	1548	38,7
18.09.22	5A	2720	68
18.09.22	5B	1080	27
21.09.22	6A	5160	129
21.09.22	6B	428	10,7
27.09.22	7A	7880	197
27.09.22	7B	640	16
03.10.22	8A	30500	305
03.10.22	8B	2260	56,5
09.10.22	9A	16160	404
09.10.22	9B	10240	256
15.10.22	10A	10960	274
15.10.22	10B	23600	590
21.10.22	11A	3084	77,1
21.10.22	11B	18600	186
14.11.22	12A	17440	436
14.11.22	12B	5760	144

6. Fortsettelse DNA konsentrasjon målt med Qubit etter DNA isolering (side 2 av 2)

Prøvedato	Prøve id	Original sample cons. (ng/mL)	Tube cons. (ng/ml)
27.10.22	13A	13680	342
27.10.22	13B	15840	396
02.11.22	14A	11960	299
02.11.22	14B	24000	600
08.11.22	15A	12280	307
08.11.22	15B	10600	265
20.11.22	16A	19120	478
20.11.22	16B	10560	264
26.11.22	17A	7720	193
26.11.22	17B	2140	53,5
02.12.22	18A	2036	50,9
02.12.22	18B	2984	74,6
08.12.22	19A	18760	469
08.12.22	19B	2800	70
14.12.22	20A	11640	291
14.12.22	20B	21600	540
20.12.22	21A	4880	122
20.12.22	21B	15000	375
29.12.22	22A	1088	27,2
29.12.22	22B	22000	550

7.Utregning fortynning til amplifisering

Tabell 8: Tabellen viser utregning for fortynning av prøvene til amplifisering.

Prøve id	Qubit konsentrasjon (pg/ml)	Fortynning	Kons. etter fortynning	DNA (ml)	ddH ₂ O (ml)	Sluttkonsentrasjon (pg/ml)
1	7380	0	7380	2	4	14760
2A	10600	1/2	5300	2,5	3,5	13250
3B	5550		5550	2,5	3,5	13875
4A	7370		7370	2	4	14740
5A	2830	0	2830	4,5	1,5	12735
6A	3160	0	3160	4	2	12640
7A	9360	1/2	4680	3	3	14040
8A	30200	1/5	6040	2	4	12080
9A	15100	1/3	5033	2,5	3,5	12582,5
10B	37800	1/6	6300	2	4	12600
11B	31600	1/5	6320	2	4	12640
12A	16500	1/3	5500	2,5	3,5	13750
13A	13500	1/2	6750	2	4	13500
14B	56800	1/9	6311	2	4	12622
15B	19800	1/3	6600	2	4	13200
16B	25800	1/4	6450	2	4	12900
17A	9360	1/2	4680	3	3	14040
18A	1880	0	1880	6	0	11280
19A	22400	1/4	5600	2,5	3,5	14000
20A	12000	1/2	6000	2	4	12000
21A	4690	0	4690	3	3	14070
22B	27200	1/4	6800	2	4	13600

8. Qubit konsentrasjon før sekvensering

Tabell 9: Tabellen viser en oversikt over DNA konsentrasjon målt med Qubit dsDNA HS fluorometer (4.0) etter bibliotekstillaging, før sekvensering.

Prøve id	Prøvedato	Qubit kons. før sekvensering (ng/ml)	Barcode adapter nr.
1	06.09.2022	202	10
2A	09.09.2022	314	11
3B	12.09.2022	246	12
4A	15.09.2022	87	13
5A	18.09.2022	191	14
6A	21.09.2022	1520	15
7A	27.09.2022	679	16
8A	03.10.2022	194	17
9A	09.10.2022	639	18
10B	15.10.2022	147	19
11B	21.10.2022	219	20
12A	14.11.2022	375	21
13A	27.10.2022	180	22
14B	02.11.2022	174	23
15B	08.11.2022	111	24
16B	20.11.2022	47	25
17A	26.11.2022	56	26
18A	02.12.2022	418	27
19A	08.12.2022	464	28
20A	14.12.2022	271	29
21A	20.12.2022	457	30
22B	29.12.2022	4620	31

9.Resultat bakterier familienivå

Tabell 10: Oversikt over resultat fra sekvensering; bakterier på familienivå som var mest representert i prosentandel av den totale mengden.

Familie	09.09.22 (2A)	27.09.22 (7A)	03.10.22 (8A)	15.10.22 (10B)	02.11.22 (12A)	14.11.22 (14B)	20.11.22 (16B)	08.12.22 (19A)	14.12.22 (20A)
<i>Aerococcaceae</i>	15,949	6,435	4,453	11,772	8,563	9,696	9,122	11,007	12,19
<i>Alcaligenaceae</i>	0,496	6,859	2,776	1,140	1,423	0,830	0,478	0,189	0,234
<i>Bacillaceae</i>	0,915	4,291	2,776	3,948	4,403	4,036	5,736	3,576	4,160
<i>Bacteroidaceae</i>	0,865	1,358	0,824	1,571	1,602	0,764	1,349	1,139	1,448
<i>Bradyrhizobiaceae</i>	0,000	0,000	0,000	1,054	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Carnobacteriaceae</i>	7,862	10,101	5,877	9,622	8,222	7,507	11,353	15,016	16,573
<i>Clostridiaceae</i>	1,135	1,241	1,81	3,207	2,473	2,239	2,441	2,601	4,62
<i>Clostridiales Family XIII. Incertae Sedis</i>	0,396	0,467	0,285	0,633	1,156	0,888	0,489	0,803	1,129
<i>Corynebacteriaceae</i>	10,936	12,573	14,225	30,179	26,641	30,469	33,142	31,784	25,60
<i>Enterobacteriaceae</i>	0,059	0,000	0,000	1,000	5,695	11,849	6,499	6,325	0,000
<i>Erysipelotrichaceae</i>	0,096	0,467	0,376	0,647	0,59	0,454	0,598	0,866	1,098
<i>Halomonadaceae</i>	0,805	1,864	0,803	0,435	0,789	0,421	0,757	0,172	0,063
<i>Lachnospiraceae</i>	0,854	0,435	0,478	2,269	1,697	1,574	1,241	2,034	4,127
<i>Lactobacillaceae</i>	0,194	0,624	0,224	0,399	0,328	0,277	0,330	0,408	0,399
<i>Micrococcaceae</i>	1,222	1,499	0,153	0,471	1,055	0,773	0,700	0,412	0,639
<i>Moraxellaceae</i>	29,708	3,422	1,017	3,585	7,071	4,929	3,642	4,913	4,460
<i>Peptostreptococcaceae</i>	0,260	0,409	0,651	1,622	1,086	1,334	1,326	1,109	2,018
<i>Porphyromonadaceae</i>	0,079	0,635	1,108	0,316	0,049	0,000	0,000	0,000	0,028
<i>Pseudomonadaceae</i>	12,777	28,593	17,895	10,302	11,069	9,399	6,470	3,971	3,260
<i>Ruminococcaceae</i>	1,007	0,995	0,112	0,913	1,276	0,756	0,837	1,996	2,621
<i>Staphylococcaceae</i>	11,776	9,064	40,864	9,982	8,088	8,618	10,488	8,153	9,655

10.Resultat bakterier genusnivå

Tabell 11: Oversikt over resultat fra sekvensering; bakterier på genusnivå som var mest representert i prosentandel av den totale mengden.

Genus	09.09.22 (2A)	27.09.22 (7A)	03.10.22 (8A)	15.10.22 (10B)	02.11.22 (12A)	14.11.22 (14B)	20.11.22 (16B)	08.12.22 (19A)	14.12.22 (20A)
<i>Acinetobacter</i>	16,606	0,025	0,000	0,797	2,503	2,248	0,794	0,541	0,042
<i>Aerococcus</i>	2,215	0,089	0,000	0,072	0,089	0,000	0,000	0,058	0,315
<i>Alkalibacterium</i>	0,714	0,552	0,436	0,383	0,38	0,298	0,333	0,616	0,718
<i>Atopostipes</i>	5,130	7,918	3,910	8,092	7,151	6,980	10,636	14,043	15,207
<i>Butyrivibrio</i>	0,176	0,000	0,131	0,815	0,637	0,978	0,756	0,973	1,614
<i>Clostridium</i>	0,433	0,675	0,795	1,482	1,152	1,197	1,346	1,342	2,407
<i>Corynebacterium</i>	11,709	14,575	15,095	36,603	33,451	39,892	42,074	40,649	32,735
<i>Facklamia</i>	13,756	5,859	3,855	13,312	9,832	12,14	10,764	13,018	14,364
<i>Flaviflexus</i>	0,182	0,970	0,000	0,000	0,278	0,157	0,144	0,213	0,076
<i>Halomonas</i>	0,678	1,759	0,86	0,396	0,728	0,348	0,741	0,173	0,042
<i>Jeotgalicoccus</i>	6,136	3,618	2,843	5,935	7,092	7,154	8,519	6,575	9,455
<i>Oligella</i>	0,131	6,034	2,429	1,346	1,519	1,051	0,635	0,259	0,281
<i>Pseudomonas</i>	12,734	33,853	18,525	12,33	13,952	12,325	7,96	5,251	4,26
<i>Psychrobacter</i>	17,583	4,141	1,089	2,382	6,336	4,176	3,545	5,965	5,882
<i>Salinimicrobium</i>	0,035	2,596	5,337	2,468	3,783	2,029	2,275	0,587	0,406
<i>Sphingomonas</i>	0,000	0,025	0,000	0,176	0,339	0,405	0,506	0,622	1,090
<i>Staphylococcus</i>	7,397	7,475	40,819	6,516	3,431	4,389	5,163	4,531	3,596
<i>Streptococcus</i>	0,000	0,000	0,000	0,045	0,050	0,000	0,000	0,674	0,691
<i>Turicibacter</i>	0,077	0,289	0,250	0,712	0,684	0,618	0,794	1,048	1,515
<i>Yaniella</i>	0,562	0,825	0,000	0,000	0,513	0,399	0,446	0,461	0,562

11.Resultat bakterier speciesnivå (side 1 av 2)

Tabell 12: Oversikt over resultat fra sekvensering; bakterier på speciesnivå som var mest representert i prosentandel av den totale mengden.

Species	09.09.22 (2A)	27.09.22 (7A)	03.10.22 (8A)	15.10.22 (10B)	02.11.22 (12A)	14.11.22 (14B)	20.11.22 (16B)	08.12.22 (19A)	14.12.22 (20A)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2,762	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Acinetobacter hwoffii</i>	8,997	0,000	0,000	0,510	0,810	1,420	0,390	0,212	0,000
<i>Aerococcus urinaeequi</i>	4,269	0,179	0,000	0,282	0,270	0,000	0,000	0,000	0,177
<i>Aliidiomarina taiwanensis</i>	0,000	1,585	2,092	1,144	0,132	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Atopostipes suicloacalis</i>	2,951	3,596	0,450	3,449	3,169	3,095	5,879	8,787	8,505
<i>Corynebacterium callunae</i>	5,318	6,403	0,000	14,220	20,659	26,597	23,153	29,562	19,428
<i>Corynebacterium testudinoris</i>	0,730	0,206	0,000	0,528	0,856	1,479	0,963	2,847	2,709
<i>Jeotgalicoccus coquinae</i>	2,028	1,127	0,000	2,446	3,617	5,087	5,099	4,084	4,949
<i>Jeotgalicoccus halotolerans</i>	4,057	0,944	1,668	4,664	2,787	3,924	4,214	2,652	4,923
<i>Jeotgalicoccus psychrophilus</i>	4,203	2,002	0,424	3,731	4,987	5,166	7,284	4,261	7,683
<i>Jeotgalicoccus sp.</i>	0,000	0,650	2,145	4,840	2,181	2,504	2,159	1,096	0,861
<i>Oligella ureolytica</i>	0,269	6,101	0,000	1,162	2,273	1,972	1,119	0,619	0,544
<i>Pseudomonas caeni</i>	0,146	17,474	9,611	9,468	6,963	5,343	6,400	6,825	4,417

11.Fortsettelse resultat bakterier speciesnivå (side 2 av 2)

Species	09.09.22 (2A)	27.09.22 (7A)	03.10.22 (8A)	15.10.22 (10B)	02.11.22 (12A)	14.11.22 (14B)	20.11.22 (16B)	08.12.22 (19A)	14.12.22 (20A)
Pseudomonas chlororaphis	0,037	1,695	0,000	0,493	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Pseudomonas libanensis	0,037	1,837	5,984	1,285	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Pseudomonas pertucinogena	5,830	4,814	1,562	1,795	3,287	3,095	2,393	1,043	0,595
Pseudomonas sp.	8,655	24,258	12,470	13,939	9,578	7,650	8,143	5,269	4,949
Psychrobacter sp.	28,192	7,301	1,933	8,113	16,700	13,210	11,160	14,958	16,466
Roseovarius mucosus	0,000	0,495	0,768	0,299	0,415	0,000	0,000	0,000	0,000
Staphylococcus equorum	1,623	0,261	0,000	2,130	2,358	4,614	3,954	1,344	1,810
Staphylococcus warneri	6,995	5,497	59,518	10,084	1,884	2,524	4,318	4,738	3,025
Turicibacter sanguinis	0,076	0,440	0,000	1,426	1,311	1,341	1,925	2,316	3,088

