



Bachelorgradsoppgave

Effekter av ruging på bakteriesamfunn på eggeskall hos Skjæra (*Pica pica*)

Effect of incubation on bacterial communities of eggshells in the Eurasian Magpie (*Pica pica*)

Elisabeth Lein Arnøy

BAC350

Bachelorgradsoppgave i Utmarksforvaltning

Avdeling for landbruk og informasjonsteknologi

Høgskolen i Nord-Trøndelag - 2015



Effekter av ruging på bakteriesamfunn på eggeskall hos Skjæra
(*Pica pica*)

Effect of incubation on bacterial communities of eggshells in the
Eurasian Magpie (*Pica pica*)

Av

Elisabeth Lein Arnøy



HINT

Bacheloroppgave i studieretning Utmarksforvaltning

Avdeling for landbruk og informasjonsteknologi

Høgskolen i Nord-Trøndelag.

Våren 2015

1. Forord

Dette er en Bacheloroppgave i utmarksforvaltning ved Høgskolen i Nord-Trøndelag som en avslutning på studiet, året 2015. I 2013 ble det formidlet en forespørsel av Magne Husby om å utføre feltarbeid i forbindelse med et Skjæreprosjekt, som gikk ut på å ta ulike prøver og analyser av både egg, skjæreunger og adferd hos skjæra. Denne oppgaven ga meg mulighet for å få være med på å forskning, og bidro til en meget interessant, lærerik og krevende vår/sommer under feltarbeidet 2013. Skriveprosessen i etterkant gav mange interessante analysesvar.

Jeg vil gjerne få takke Håvard Wiggen for god hjelp med de vanskeligste trærne, alle eierne som lot oss få bruke sine eiendommer med skjærereir. Ingvild Buran for lån og tilordning av utstyr til prøvetakinger. Takk til Sang-im Lee (Universitetet i Seoul) for analyser av bakterieprøvene, og for samarbeidet for øvrig. Jeg vil også få takke Nils Henrik Skum for samarbeidet, Ole-Petter Smørsgård og John Erik Lein for korrekturlesing.

Til slutt vil jeg få takke min veileder Magne Husby for meget god hjelp gjennom hele denne prosessen med både utførelser i felt og skrivningen av denne Bacheloroppgaven.

2. Sammendrag

Bakterier og sopp på eggeskall hos ville fugler kan spille en viktig rolle for embryovekst og overlevelse. Det er derfor interessant om ruging har en effekt på bakteriefloraen og sopp-samfundet på eggeskall. Det har tidligere blitt vist at ruging senker tettheten av patogene bakterier. Dette kan skje ved å introdusere ikke-patogene bakterier via reirmateriale med evne til å holde tettheten av patogene bakterier nede. Hunnfuglen kan også ha ikke-patogene bakterier på fjærdrakten for å holde tettheten av de patogene bakteriene nede. Denne undersøkelsen gikk ut på å finne ut om ruging har en effekt på bakterietettheten på eggeskall hos skjæra i Norge, som kan ha et kaldere klima enn der andre undersøkelser er gjennomført. Det ble også sett på om det er forskjeller fra urbant og ruralt, noe som ikke har blitt gjort tidligere. Det ble tatt bakterieprøver av til sammen 35 naturlige reir og 8 kontrollreir. Prøvene ble tatt på rugedag 3 (starten av rugetiden) og rugedag 18 (mot slutten av rugetiden).

Det var høyere tetthet av de patogene bakteriene *Ecoli* og *Pseudomonas* i starten av rugetiden urbant enn ruralt. Tetthet av disse to bakteriene økte i løpet av rugetiden ruralt i motsetning til urbant. Testene viser at det er mindre tetthet av *Bacillus* urbant enn ruralt mot slutten av rugetiden. *Bacillus* som er en ikke-patogen bakterie har en evne til å holde tettheten av patogene bakterier som *Ecoli* og *Pseudomonas* nede. *Candida* (sopp) har en klar nedgang i løpet av av rugetiden på begge områder, samtidig som at tettheten var signifikant høyere på egg i kunstige reir enn i naturlige reir i starten av rugetiden. Dette tyder på at rugingen også har en effekt på sopp. Videre ble det ikke funnet noen sammenheng med bakterietetthet og eggtap/ungetap. Jeg antar at kaldere klima i Norge bidrar til generelt lavere bakterivekst og dermed mindre behov for å redusere bakterieveksten sammenlignet med reir i varmere klima.

3. Abstract

Bacterias and fungus on wild birds eggshells, plays an important role for the survival and growth of the embryo. This is why it is interesting to find out if incubation has an effect on bacterial and fungoral loads. Earlier studies indicates that incubation lowers the density of phatogenic bacterias. This can occur by introducing non-phatogenic bacterias from nest components which has an ability to hold the density of phatogenic bacterias low. The female bird can also have non-phatogenic bacterias on her plumage, this is also for holding the density of phatogenic bacterias low. This study was to find out if incubation has an effect on bacterial and fungoral loads in Norway, which could have a colder climate than where the previous studies took place. Analyzes about differences between rural and urban areas was also a part of this study, and this has never before been analyzed. Bacterial tests was taken with 35 natural nests and 8 control nests. The tests was taken on incubation-day 3 (at the beginning of the incubation) and day 18 (at the end of the incubation).

There was a higher density of the phatogenic bacterias Ecoli and Pseudomonas on the urban area, compared to the rural, in the beginning of the incubation period. The density of these two phatogenic bacterias increased closer to the end of incubation on the rural area compared to urban area. The tests shows that there is a lower density of the non-phatogenic bacteria Bacillus on the rural area compared to the urban area at the end of the incubation period. Bacillus has an ability to lower the density of phatogenic bacterias as for example Ecoli and Pseudomonas. Candida (fungus) has a clear decline in the end of the incubation on both areas, while the density was significantly higher on eggs in the controll nests compared to the eggs in the natural nests in the beginning of the incubation period. This shows that incubation also has an effect on fungus on eggshells. Further in the studies, there was not found any context of bacteria-density and egg/chick loss. I suppose that colder climate in Norway could contribute to generally lower bacterial growth, and because of this it could be a lesser need of reduction on bacterial density compared to nests found in hotter climate.

4. Innholdsfortegnelse

1. Forord.....	3
2. Sammendrag	4
3. Abstract	5
5. Innledning	7
6. Materialer og metoder.....	9
6.1. Studieområdet	9
6.2. Feltarbeidet	10
6.3. Statistikk	14
7. Resultat	15
7.1. Endringer av alle bakterier i naturlige reir fra rugedag 3 til 18, urbant og ruralt samlet 15	
7.2. Forskjeller av bakterietetthet på rugedag 3, mellom urbant og ruralt område.....	15
7.3. Forskjeller av bakterietetthet på rugedag 18, mellom urbant og ruralt område.....	17
7.4. Endringer av bakterietetthet fra rugedag 3 til 18 urbant og ruralt	17
7.5. Forskjeller i bakterietetthet mellom naturlige og kunstige reir	20
8. Diskusjon	21
8.1. Endring i tettheten av bakterier og sopp fra Rugedag 3 til 18, alle naturlige reir	21
8.2. Endring av tettheten av bakterier og sopp på rugedag 3 mellom urbant og ruralt område	23
8.3. Forskjeller i tetthet av bakterier og sopp på rugedag 18 mellom urbant og ruralt område	23
8.4. Endring av tettheten av bakterier og sopp fra rugedag 3 til 18 urbant	24
8.5. Endring av tetthet av bakterier og sopp fra rugedag 3 til 18 ruralt.....	24
8.6. Forskjeller av bakterietetthet mellom naturlige og kunstige reir på rugedag 3	25
8.7. Analysemetodene.....	26
9. Litteratur	28
10. Websider.....	29

5. Innledning

Reir hos ville fugler kan holde et mangfold av bakterier og sopp som kan ha stor betydning for overlevelse for embryo i eggene hos disse fuglene. Noen av bakteriene kan være patogene for et embryo, siden dette er i et så tidlig stadie av utviklingen. Det har blitt studert og konkludert med at fjær, brukt som redemateriale, har antibiotiske funksjoner mot negative bakterier. Dette reverserer mengden av de negative bakteriene på eggeskallet, som igjen minsker risikoen for embryodød. Fuglenes redebygging og rugeoppførsel er godt kjent som tilpassninger for å forsørge gode forhold for vekst og overlevelse av avkom (Lee *et al.* 2014).

Det er blitt forsket på om foreldre, som en komplementær tilnærming for å kontrollere kolonisering av patogene bakterier, bidrar til en økning av ikke-patogene bakterier. Disse skal bidra til å hemme veksten, og skape eksklusjon via konkurranse til disse patogene undergruppene. Dette vil være en strategi for å øke sjansene for at embryo overlever, og for videreføring av gener til nye generasjoner. Selv om det muligens er små undergrupper av bakterier som har denne evnen, er man enig i at hovedårsaken for hemmingen av disse patogene bakteriene er rugingen (Grizard *et al.* 2014).

Teoriene har enda ikke blitt undersøkt i Norge, og de fleste andre undersøkelser har vært gjennomført i mer tempererte områder. Norge har et kaldere klima, og vi vet at skjæra ikke bruker fjær som et reirkomponent til byggingen her.

Formålene med oppgaven

Ved å ta bakterieprøver av skjæreegg i starten av rugetiden og mot slutten av rugetiden, vil jeg best finne ut om ruging har en effekt på negative bakterier på skjæreegg i Norge. Den samme type gjennomføring blir samtidig gjort i Sør-Korea, som vi også har et samarbeid med. Gjennom å sende prøvene til Sør-Korea, og få analysesvarene av bakterietettheten sendt tilbake, vil jeg finne ut:

- Om det er forskjeller i tetthet av bakterier mellom urbane (Trondheim) og rurale (Skatval) omgivelser på 3 rugedag
- Forskjeller av tetthet i bakterier mellom urbane og rurale omgivelser på 18 rugedag
- Forskjeller fra rugedag 3 til 18, innenfor urbane omgivelser

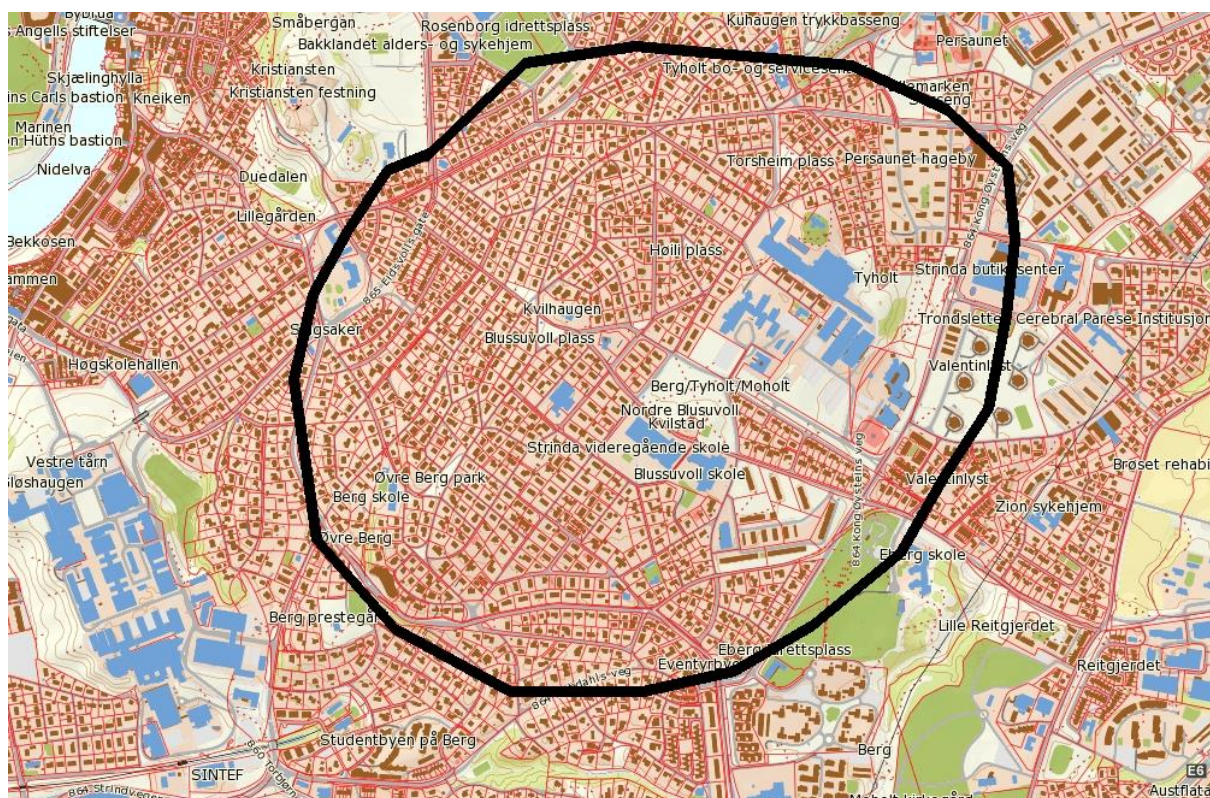
- Og forskjeller fra rugedag 3 til 18, innenfor rurale omgivelser
- Samt om kontrollreir og naturlige reir har forskjeller i bakterietetthet fra rugedag 3 til rugedag 18

Det har ikke blitt gjort slike analyser i Norge, og ingen andre studier har før sammenlignet rurale omgivelser med urbane omgivelser.

6. Materialer og metoder

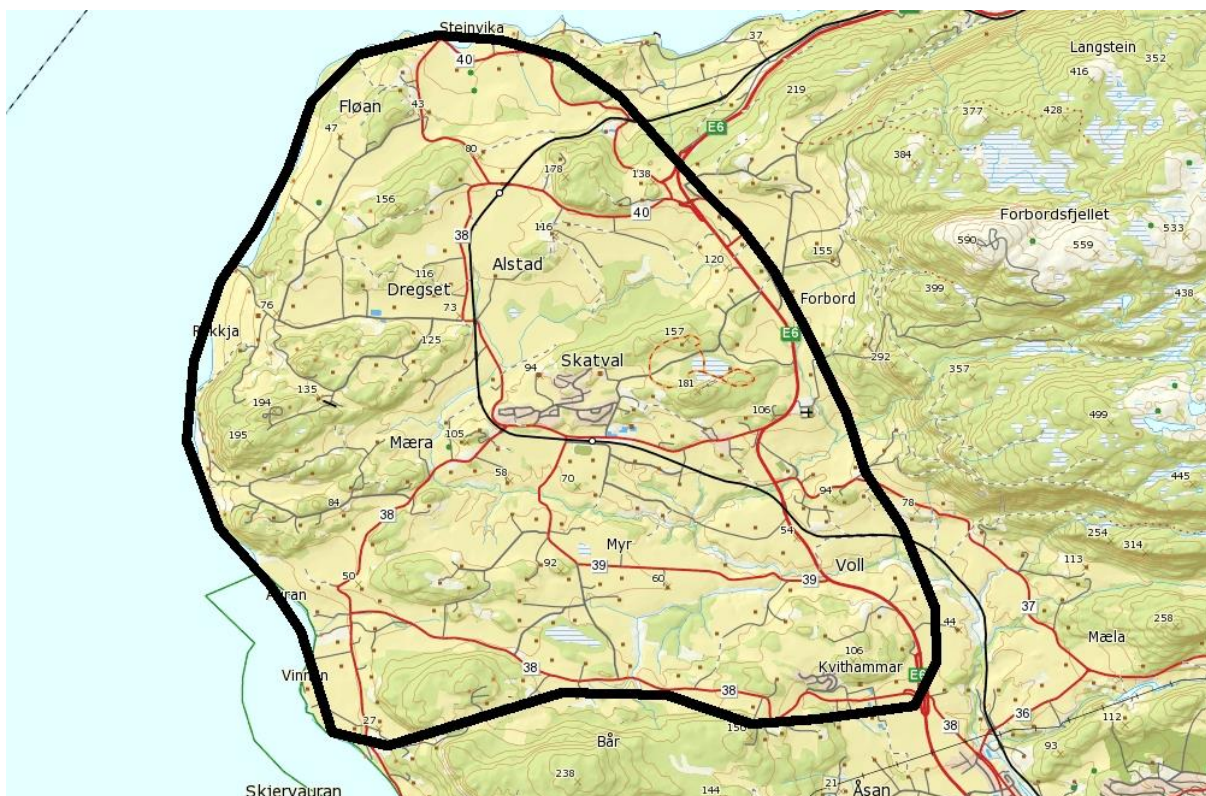
6.1. Studieområdet

Det ble tatt utgangspunkt i 23 skjærereir på Tyholt i Trondheim, midt-Norge (EU89, UTM-sone 33. E:271766.916, N: 7040823.21) i 2013. Tyholt og omegn er områder hvor det stort sett er tettbebygde. Hvor det, for nesten hvert hus, er en hage med egnede trær for skjærereir. Her var det en stor blanding av trær, hvor gran og furu stort sett dominerte for skjæra. Her finnes stor aktivitet av mennesker som går turer med hunder og mange hager har kompostbinger ute i hagen hvor det er lett tilgjengelig for skjæra.



Figur 1: Undersøkelingsområde på Tyholt i Trondheim, hentet fra norgeskart.no

På Skatval ble det tatt utgangspunkt i 24 skjærereir rundt på forskjellige gårder og hus, Midt-Norge (EU89, UTM-sone 33. E: 0292524.24 , N: 7049135.73) i 2013. Skatvals området er i hovedsak preget av landlige områder med mange jorder og gårder, noen små tettbebygde klynger på enkelte områder. Her er trærne ganske høye og tilgangen på føde blir i hovedsak fra jorder, gress-sletter og kompost osv. fra mennesker. Her dominerer også gran- og furutrær som skjæras prefererte reirtrær.



Figur 2: Undersøkellesområdet på Skatval vest for E6 og nord for Fylkesvei 38 (fra norgeskart.no)

6.2. Feltarbeidet

Nesten alle reir var lokalisert ved starten av byggingen i mars/april, og ble besøkt flere ganger iløpet av reirbyggeperioden for observasjon av fremgangen. Klatreseler med festetau og kroker ble brukt for sikring oppe ved reirene. Dette sikret at begge armene ble ledig for prøvetaking. I et medbringt verktøysbelte var det påmontert sprayflaske med 70% ethanol, tuber med buffer og sterile bomullspinner. På eggleggingsdag 3 ble det tatt bakterieprøver av ett egg i hvert reir. Ett egg blir som regel lagt hver dag fra 1 eggleggingsdag. Noen dager før klekking (Når eggene var ca. 18 dager), ble alle reir besøkt en gang til for ny bakterieprøve inkludert eggmåling, dette for å senere se om bakteriefloraen på eggeskallene hadde endret seg iløpet av rugeperioden. Ved utførelse av bakterieprøver ble det brukt engangshansker og 70% ethanol for sterilisering av hanskene før henting av egg i reirene. Det ble utøvd forsiktighet ved henting for å ikke komme i kontakt med reirmaterialet rundt, dette for å minske risikoen for uønskede bakterier på prøvene.

Tabell 1: Antall reir det ble tatt bakterieprøver av.

	Antall kontrollreir	Antall reir 3 dag	Antall reir 18 dag
Trondheim (urban)	4	23	20
Skatval (rural)	4	24	24

Når et tilfeldig egg ble tatt ut av reiret, ble det brukt en steril bomullspinne som var dyppet forsiktig i en bufferløsning med steril sodium fosfat buffer (0.2 M; pH 7.2) fra en 1.5ml tube, (hele bomullet skulle være fuktig av bufferen). Hele egget ble sveipet før bomullspinnen ble knekt av for å tilpasses tuben, deretter satt tilbake i bufferen og toppen skrudd på. Tuben ble merket med reirnummer og hvilken rugedagdag, 3 eller 18, i forløpet. Egget ble markert med et kraftig kryss på toppen med permanent tusj for at merket skulle holde ut rugeperioden, dette for å være sikker på at det samme egget ikke skulle bli tatt ved prøve nr 2 i samme reir. På rugedag 18 ble prosessen fra rugedag 3 gjentatt, deretter merking av tuben med reirnummer og rugedag 18. Alle tuber med prøvene i ble oppbevart i en kjøleboks med kjøleelementer under feltarbeidet. Etter endt feltdag ble de lagt i en fryser hvor de ble oppbevart ved -20 C° til prøvene skulle sendes til Korea for analyse. Det ideelle hadde vært -50 C°, men tilgang til slik frysekapasitet var ikke tilgjengelig.

Analysene ble gjort i Sør-Korea med både kulturbaserte metoder, kvantitative PCR og 16S rRNA gen pyrosekvensering.

For å finne antallet bakterier per mm², ble det målt lengde og bredde med skyvelær, for beregning av eggets areal.



Bilde 1: Ulike skjæreegg som viser at overflaten kan ha ulikt areal, dette viser viktigheten av målingen.

Kontrollgruppen ble håndtert av Magne Husby, hvor det ble laget 4 kontrollreir i Trondheim og 4 på Skatval. Dette ble gjort ved eggleggingstidspunkt for skjærene. Kontrollreirene besto av gammelt reirmaterie fra gamle brukte reir, tatt ut med sterile engangshansker. Dette ble lagt i bur og materialet ordnet så likt som et skjærereir som mulig. To vaktel egg ble brukt som kontrollegg og lagt midt i reirkoppen. Bakterieprøver på kontrolleggene ble utført med samme metode som skjæreeggene.

Innsamlingen og prøvetakingen ble gjort i samarbeid med Nils Henrik J. Skum, hvor Nils og jeg hadde hvert vårt område. Ett urbant område og ett ruralt område på ca. 4 mils avstand fra hverandre, slik at den genetiske forskjellen ikke skulle være for stor. Det ble utført de samme tester og prøvetakinger på begge områdene. Nils tok prøver på Skatvals området (ruralt). Mitt studieområde var Tyholt i Trondheim (urbant).



Bilde 2: Bilde av skjæreunge, 3-4 dager etter klekking



Bilde 3: Skjæreunge mot tiden for å forlate redet (18-20 dager etter klekking)

Tabell 2: Oversikt over bakterier og sopp som undersøkes her.

Norsk navn	Latinsk navn	Natur
Ecoli	Escherichia coli	Patogen
Pseudomonas	Pseudomonas syringae	Patogen
Bacillus (Basiller)	Bacillus subtilis	Ikke-Patogen
Candida	Candida albicans	Sopp (Patogen)

6.3. Statistikk

Den eneste fordelingen mellom tetthet av bakterier i de ulike reirene som var normalfordelt, var Bacillus, like før klekking (18 dager). En Shapiro-Wilk test ($P=0,111$) og inspeksjon av histogram, normal Q-Q plott og box plott tilfredsstillt kravet til normalfordeling (Shapiro & Wilk 1965; Razali & Wah 2011). Samme konklusjon ga også test på Skewness 0,520 ($SE=0,778$), noe som gir z-verdier på hhv. 1,307 og -0,549. Dette er innenfor verdiene -1,96 og +1,96 som viser normalfordeling (Cramer 1998; Cramer & Howitt 2004; Doane & Seward 2011). Tilsvarende tester på alle de andre bakterieartene både etter 3 dager og 18 dager viste at her var antall bakterier ikke normalfordelt. F.eks. ga Shapiro-Wilk test ($P<0,001$), Skewness 1,670 ($SE=0,398$) og Kurtosis 2,422 ($SE=0,778$), noe som er langt utenfor kravet til normalfordeling. Det er derfor brukt ikke-parametriske tester på alle analyser av antall bakterier. Dette er tester som ikke stiller krav til fordelingen av materialet.

Analysene ble utført i SPSS programmet (IBM Statistics 21). Hvor signifikansnivå på 5% ($P<0,05$). Alle tester er tohalet.

7. Resultat

7.1. Endringer av alle bakterier i naturlige reir fra rugedag 3 til 18, urbant og ruralt samlet

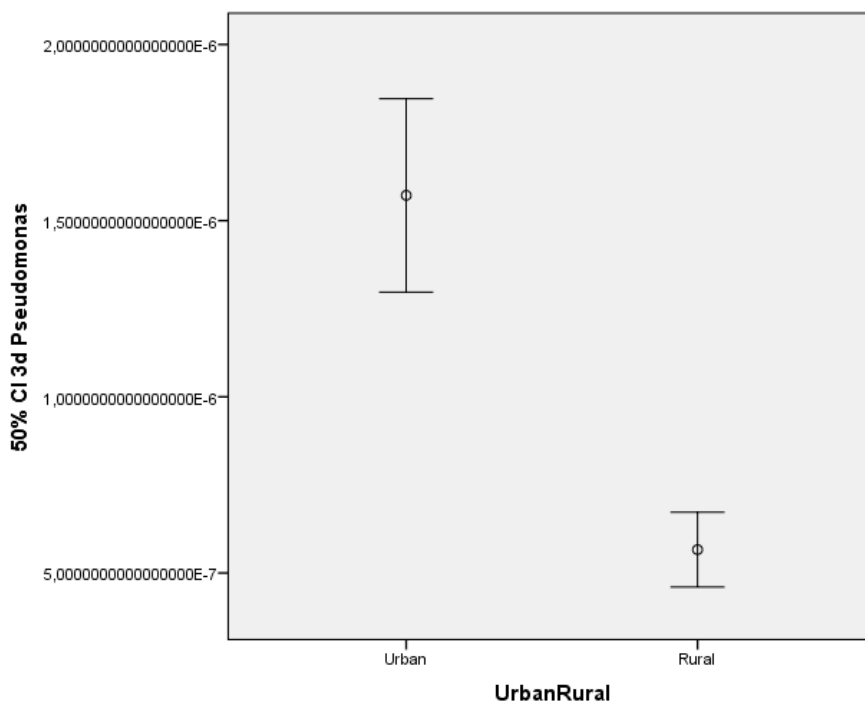
Det ble funnet en signifikant nedgang i *Candida* mellom rugedag 3 og 18 med (Wilcoxon Signed Ranks Test: $z=-4,406$, $p<0,001$) hvor nedgangen ble funnet på analyser fra rugedag 3 til rugedag 18.

I tillegg ble det funnet en tendens til nedgang i *Bacillus* mellom 3 og 18 dagers ruging med (Wilcoxon Signed Ranks Test: $z=-1,736$, $p=0,083$). Fra rugedag 3 til 18 av analysene.

Hos de andre bakteriene og sopp som undersøkes her var det ingen signifikante endringer fra 3 til 18 dager.

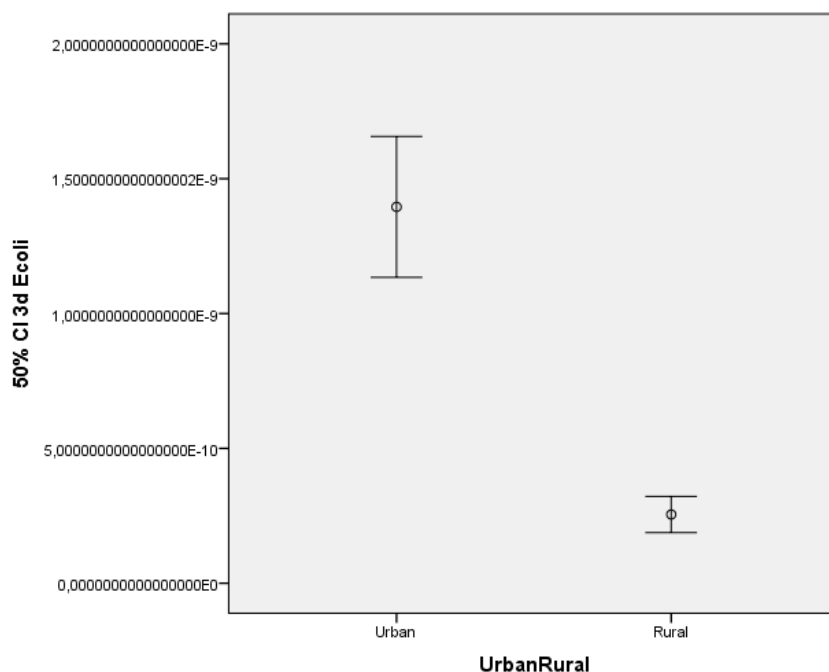
7.2. Forskjeller av bakterietetthet på rugedag 3, mellom urbant og ruralt område

Analysene viser at det er signifikant lavere tetthet av bakterien *Pseudomonas* ruralt enn hva det er urbant (Mann-Whitney U test: $z=-2,649$, $p=0,008$).



Figur 3: Pseudomonas mellom Trondheim og Skatval, rugedag 3 på 35 naturlige reir. Signifikant mindre av bakterien på Skatval (Mann-Whitney U-test: $z=-2,649$, $p=0,008$).

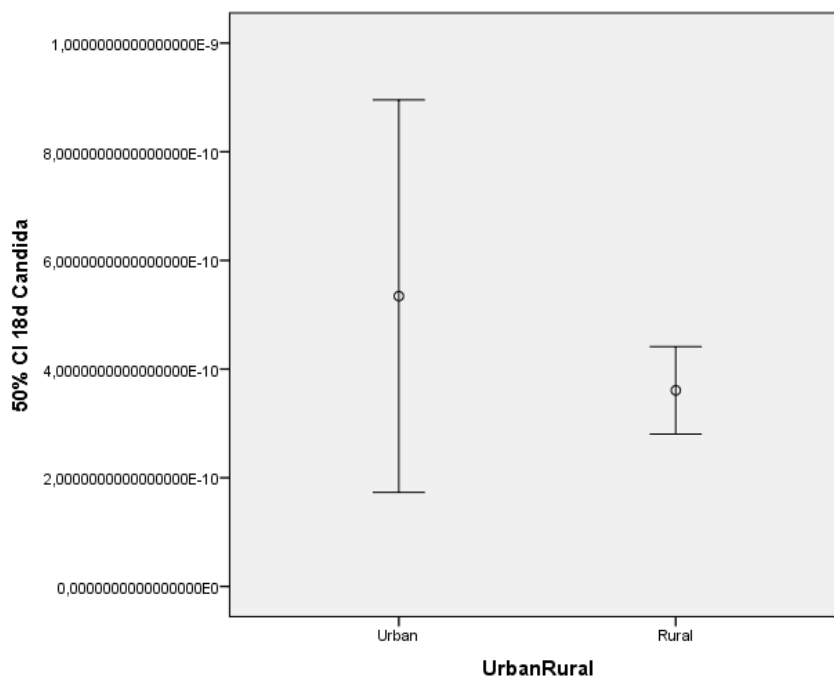
Det er funnet mindre tetthet av bakterien Ecoli på prøvene fra ruralt område enn fra prøvene urbant, med en signifikans (Mann-Whitney U test: $z=-2,997$. $p=0,003$).



Figur 4: Ecoli mellom Trondheim og Skatval, rugedag 3 med 35 naturlige reir. Signifikant mindre av Ecoli i Skatval enn i Trondheim. (Mann-Whitney U test: $z=-2,997$. $p=0,003$).

7.3. Forskjeller av bakterietetthet på rugedag 18, mellom urbant og ruralt område

Med signifikans viser analysene at det er mindre tetthet av Candida ruralt enn urbant på rugedag 18 (Mann-Whitney U test: $z=-2,094$. $p=0,036$).

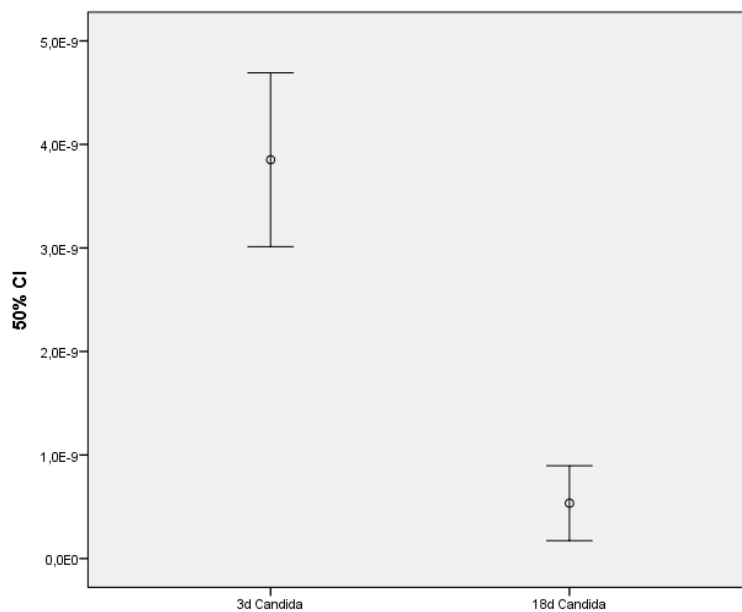


Figur 5: Candida på rugedag 18 mellom Trondheim og Skatval, med 35 naturlige reir. Signifikant mindre Candida på Skatval med (Mann-Whitney U-test: $z=-2,094$. $p= 0,036$).

Vi ser en tendens til signifikans nedgang av bakterien Bacillus mot slutten av rugetiden på begge områder samlet. (Mann-Whitney U test: $z=-1,109$. $p=0,068$). Vi ser også at det er lavere tetthet av denne bakterien ruralt enn urbant mot slutten av rugetiden.

7.4. Endringer av bakterietetthet fra rugedag 3 til 18 urbant og ruralt Trondheim:

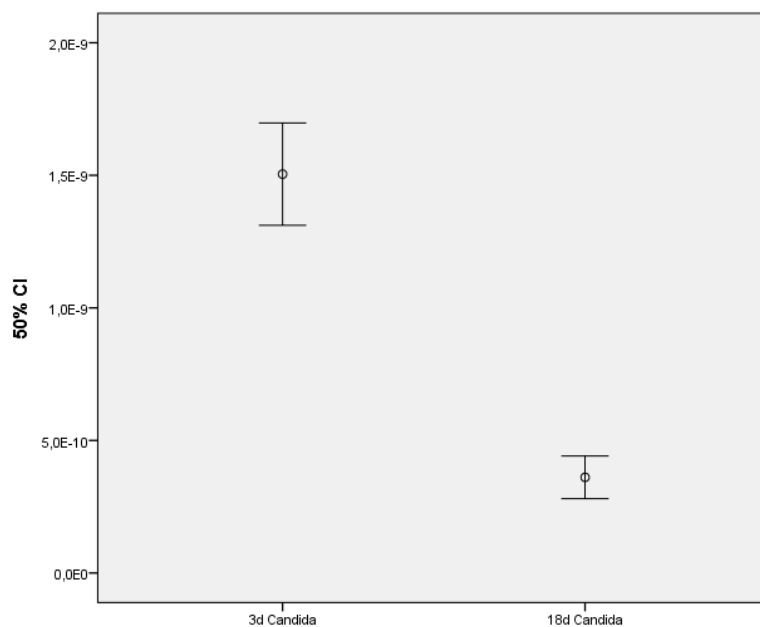
I Trondheim(urbant) ble det funnet tydelig lavere tetthet av Candida fra rugedag 3 til rugedag 18, med signifikans (Wilcoxon Signed Rank test: $z=-3,179$. $p=0,001$).



Figur 6: Candida i Trondheim fra rugedag 3 til rugedag 18, med 19 naturlige reir. Signifikant mindre Candida i rugedag 18. (Wilcoxon Signed Rank test: $z=-3,179$, $p=0,001$).

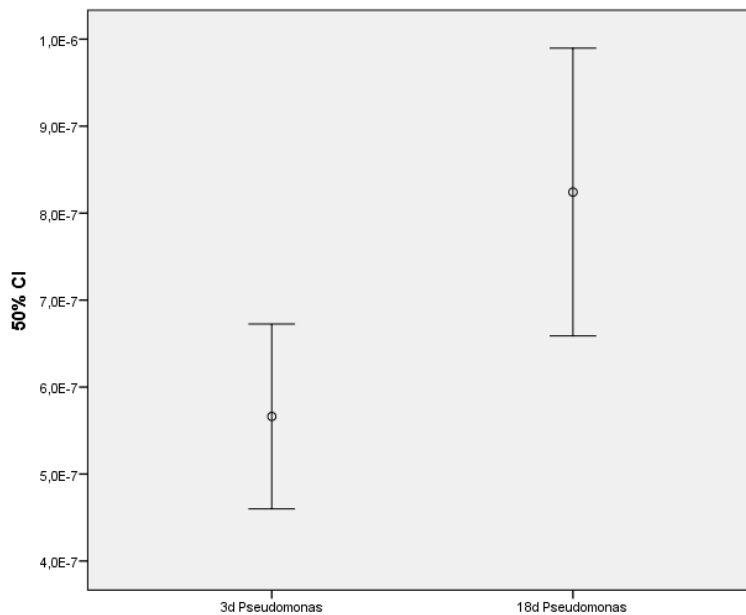
Skatval:

På Skatval(ruralt) var det også en signifikant nedgang i tetthet av Candida fra rugedag 3 til rugedag 18 (Wilcoxon Signed Rank test: $z=-2,947$, $p=0,003$).



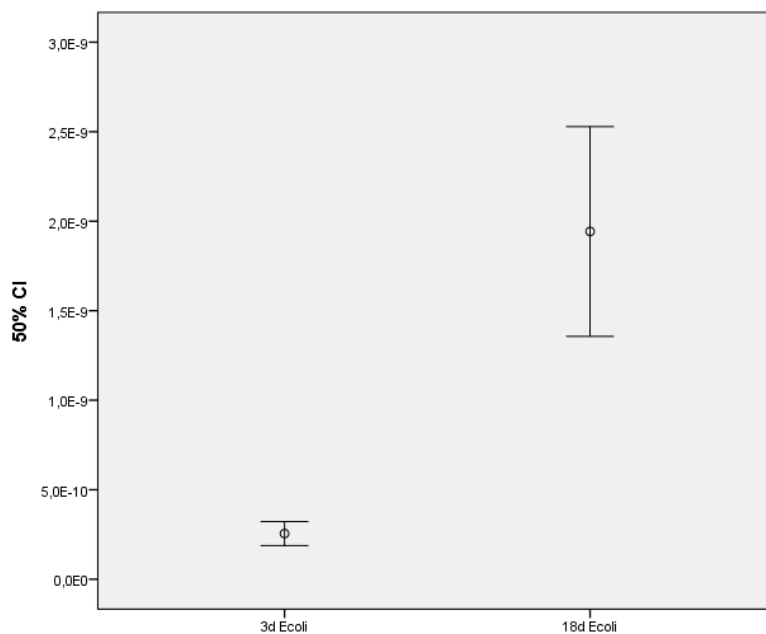
Figur 7: Candida i Skatval fra rugedag 3 til rugedag 18, med 14 naturlige reir. Signifikans med mindre Candida på rugedag 18 (Wilcoxon Signed Rank test: $z=-2,947$, $p=0,003$).

Med en signifikans, viser prøvene at bakterien *Pseudomonas* får en oppgang i tettheten ruralt fra rugedag 3 til rugedag 18 (Wilcoxon Signed Rank test: $z=-2,017$, $p=0,044$).



Figur 8: *Pseudomonas* i Skatval fra rugedag 3 til rugedag 18, med 14 naturlige reir. Signifikant oppgang på rugedag 18. (Wilcoxon Signed Rank test: $z=-2,017$. $p=0,044$).

Samtidig viser prøvene at det også ruralt er en oppgang av tetthet på *Ecoli* bakterien fra rugedag 3 til rugedag 18, med signifikans. (Wilcoxon Signed Rank test: $z=-2,482$, $p=0,013$).



Figur 9: *Ecoli* i Skatval fra rugedag 3 til rugedag 18, med 14 naturlige reir. Signifikant oppgang av *Ecoli* på rugedag 18. (Wilcoxon Signed Rank test: $z=-2,482$. $p=0,013$).

7.5. Forskjeller i bakterietetthet mellom naturlige og kunstige reir

Tettheten av *Candida* avtok signifikant fra rugedag 3 til 18 i kontrollreirene (Wilcoxon Signed Ranks test: $z=-2,252$, $p=0,012$), mens det ikke var signifikant endring for noen av de andre bakterier/sopp mellom rugedag 3 og 18.

Tabell 3: Bakterietetthet (antall pr mm^2 , enhet 10^{-10}) av kontrollreir på begge områder.

	Rugedag 3		Rugedag 18	
	Snitt	SD	Snitt	SD
Alle bakterier	2086057	3387481	5646200	9738304
<i>Candida</i>	6644	18448	0,01	0,002
<i>Pseudomonas</i>	8705	9029	24432	29976
<i>Ecoli</i>	35	77	20	21
<i>Bacillus</i>	171	241	404	610

Tabell 4: Oppsummering av endringene i de ulike bakteriene og sopp. BL betyr by sammenlignet med land, NA er alle naturlige reir, NB er alle naturlige reir i by, NL er alle naturlige reir på landet, KN er kunstige sammenlignet med naturlige reir, og KR betyr kontrollreir. + betyr mer av den første i en sammenligning, eller en økning fra 3 til 18 dager, og – er motsatt.

	3dg	18 dg	Endring 3-18 dg
<i>Candida</i>		BL +	NA – NB – NL – KN + KR +
<i>Pseudomonas</i>	BL +		NL +
<i>Ecoli</i>	BL +		NL +
<i>Bacillus</i>			BL +

8. Diskusjon

8.1. Endring i tettheten av bakterier og sopp fra Ruggedag 3 til 18, alle naturlige reir

Jeg fant at det var en nesten signifikant nedgang i bakterien *Bacillus* fra ruggedag 3 til ruggedag 18, hvor alle naturlige reir fra både Trondheim og Skatval var med (35 reir). Dette avviker fra Lee et al. sine resultater (Lee *et al.* 2014), hvor man ser at det er en klar signifikant vekst av den samme bakterien fra ruggedag 3 til ruggedag 18. *Pseudomonas* og *Bacillus* er konkurrenter om ressurser som nitrat og glukose. Dermed kan det ha blitt en vekst i *Bacillus* hos Lee's analyser grunnet utkonkurrering (Lee *et al.* 2013). Det er ikke til å se bort i fra at temperatur, luftfuktighet og andre redematerialer spiller inn på resultatene på ulike måter. Mange av disse elementene kan være ulike mellom Norge og Sør-Korea siden det er ulikt klima, hvor Sør-Korea har et varmere klima og Norge et kaldere klima. Videre i rapporten har det blitt fundert på om det kan være en tredje årsak til stigning av *Bacillus* mot slutten av rugetiden. Dette er en hypotese om at fjær som en komponent til reirmaterialet kan være en årsak til innført *Bacillus* på eggeskall. Siden Skjære i Norge ikke bruker fjær som komponenter i redebyggingen sin (Husby in prep), kan det støtte Koreas rapport om at fjær som reirkomponent er med på å lage en vekst av bakterien *Bacillus*. Av samme grunn blir det kanskje heller ikke vekst av *Bacillus* i Norge. Konkurransen mellom *Pseudomonas* og *Bacillus* er også en mulig årsak, som nevnt tidligere. Det krever nærmere studier for å finne ut mer om dette.

I Korea ble det også funnet at den totale bakteriediversiteten på eggeskall av skjære økte, og at tettheten ble redusert på egg som blir ruget (Lee *et al.* 2014). I en studie av rørsangeregg ble det imidlertid funnet at bakterier ikke fikk lavere tetthet ved ruging, inkludert en nedgang i potensielt skadelige Gram-negative bakterier (Brandl *et al.* 2014). I rapporten fra Sør-Korea ble det vist at det ikke var endringer i egg som ikke har blitt ruget på. Også interessant var det at den Gram-positive bakterien *Bacillus* ble mer dominant. Og at *Pseudomonas*, som inkluderer eggeskalls-patogener, var signifikant redusert etter ruging som nevnt tidligere (Lee *et al.* 2014). Disse resultater kan fortelle oss at det på ruging i tempererte områder kan fremme veksten av harmløse bakterier på eggeskallsoverflaten.

Det kan se ut som at reirkomponenter har innvirkning på bakterietetthet og diversitet. I en studie av Peralta-Sanchez et al, med låvesvalereir, finner vi at upigmenterte hvite fjær i reirene indikerte effekt på bakterier på eggeskall, og at det i slutten av rugetiden viste en lavere bakterietetthet på eggeskall i reir med hvite fjær enn i reir hvor det har blitt eksperimentert med svarte fjær (Peralta-Sanchez *et al.* 2010). Dette kan støtte studiene om grupperte bakterieforsamlinger i reirkomponenter.

Brandl et al, påviste for første gang at ruging er assosiert med en full utryddelse av skadelige hemolytiske bakterier (Brandl et al. 2014). Dette forsterker hypotesen om at rugingen fra hunnfuglen har en effekt på sammensetning og tetthet av bakterier.

I en studie gjort med lerkeegg, har det blitt funnet at tidligere assosiasjoner om at fuktighet spiller stor rolle for infeksjoner i eggeskall kan være misforstått. Men at temperatur er en mye bedre indikator på antimikrobiell-protein aktivitet. De fant ut at lysosomaktiviteten, (lysosom bryter blant annet ned bakterier), var høyest i egg fra varmere og mer aride (tørre) områder, noe som forteller at det kan være en høyere bakterietetthet i eggeskallene i slike områder (Horrocks *et al.* 2014).

Jeg fant signifikant nedgang i tettheten på *Candida* fra rugedag 3 til 18. En studie av Grizard et al. konkluderer med at nedgangen av *Candida* funnet i deres analyser av dynamikken i bakterie og soppfunn forbundet med eggeskall og ruging, mulig hadde sammenheng med reduksjon av soppens generelle tetthet. Dette kan ikke forklares nærmere siden det tidligere ikke har blitt forsket på sopp forbundet med eggeskall og ruging. (Grizard *et al.* 2014).

Grunnene til en så stor og merkbar nedgang i Norge er vanskelig å si noe om. Det er tidligere for få studier angående temaet sopp og eggeskall. *Candida albicans* er en vanlig gjærsopp som forekommer i både mennesker (fordøyelsessystemet) og noen dyr, ofte forekommende i trakten (svelget) hos fugler. Områder for smitte er drikkevann, avfallsplasser, utslipp og generelt forurensede miljøer. Det rapporteres sjelden om denne sykdommen hos ville fugler, og forekommer oftest hos dyr i fangenskap og tamfugl. Jfr (Friend 1999). Dette kan kanskje ha sin årsak i oppfølging og kontroll av tamfugl kontra villfugl. Siden de økonomiske konsekvenser med villfugl er små, er det ikke interessant nok til å bruke ressurser på å overvåke disse på samme måte.

8.2. Endring av tettheten av bakterier og sopp på rugedag 3 mellom urbant og ruralt område

Jeg fant at det var en signifikant mindre tetthet av *Pseudomonas* ruralt enn hva det var urbant på rugedag 3. *Pseudomonas* er en bakterie som er i slekt med jord- og vannbakterier som finnes i dette miljøet. Den kan ved anledning kolonisere seg. Noen *Pseudomonas* bakterier er kjent for å være svært motstandsdyktige ovenfor antibiotika. Disse bakterier finnes også naturlig i tarmen. Dette forteller oss at bakterien kan komme fra både jord, vann og tarm i dette tilfellet. Den større tetthet av *Pseudomonas* urbant, kan forbindes med en større tetthet av menneskelig aktivitet med tanke på at mange har hunder som legger igjen avføring i gresset. Skjæra oppholder seg ofte i gresset for å lete etter føde (Husby In Prep). Bakteriens tilstedeværelse i jord og vann kan være lik både urbant og ruralt. At hundeavføring er avgjørende for at *Pseudomonas* har større tetthet urbant enn ruralt, er det vanskelig å konkludere med uten videre undersøkelser på dette området. En årsak kan jo være som beskrevet over, at *Pseudomonas* har hatt en større konkurransesuksess enn *Bacillus*, og dermed fått vokst mer fritt i disse tilfellene.

Det ble også funnet signifikant mindre tetthet av *Ecoli* ruralt enn urbant på rugedag 3. Dette kan ha den samme årsaken som jeg beskrev ved *Pseudomonas*, at det er en større tetthet av mennesker i byen hvor flere går med hundene sine på de samme områdene og grøntfleckene som finnes i området. I dette tilfelle Tyholt. Hundeavføringen kan feste seg på skjæras fjærdrakt og føres videre inn til reiret. En annen grunn som at *Bacillus* ikke er like konkurransedyktig som *Pseudomonas*, og *Pseudomonas* overtar mer plass, kan også være en mulighet.

8.3. Forskjeller i tetthet av bakterier og sopp på rugedag 18 mellom urbant og ruralt område

På rugedag 18 fant jeg en signifikant mindre tetthet av *Candida* ruralt enn hva det var i urbant.

Her kan man tro at det kommer fra, som nevnt tidligere, menneskelig avfall som skjæra utnytter seg av ganske ofte. Tyholt er et sted hvor det er tett med hus og menneskelig aktivitet og hvor det er flere hager som har komposthauger. Kanskje kan dette være en mulig kilde til at det er registrert høyere tetthet av candida urbant enn hva det ble registrert ruralt (Friend 1999).

8.4. Endring av tettheten av bakterier og sopp fra rugedag 3 til 18 urbant

Jeg fant at tettheten av soppen Candida avtok signifikant fra rugedag 3 til 18 urbant. Det ble i samme område funnet en tendens til nedgang i Ecoli fra rugedag 3 til 18. Skjærehunnen holder seg mest i reiret hele rugetiden, og blir da matet av hannen (Husby In Prep). Det gjør at hunnen holder seg mer borte fra avfallshauger, gress med hundeeskrementer og jordkomposter fra hager med matavfall i. Dette kan ha noe å si for nedgangen av tettheten i Candida og Ecoli. Skjæra er altetere, og all slags mat bringes og leveres til hunnen direkte. Overføring av bakterier og sopp er mest trolig fra hannens fjær over til hunnens fjær. Nebb og fjær kan overføre bakterier og sopp til eggene når hunnen vender på eggene under ruging og pusser fjærdrakten sin. Det kan også tenkes at soppen finnes fra innvendig i fuglen (trakten). Og Ecoli fra tarmen hos hunnen. Det vil på tross av spekulasjonene rundt, være en mindre risiko med overførsel av Ecoli og Candida til eggene når hunnen ligger i ro i rugeperioden. Dermed kan man se på resultatene at tettheten minsker i rugeperioden. Samtidig har vi Bacillus som kan være en liten medhjelper i å holde tettheten av Pseudomonas og Ecoli nede med sine konkurrerende evner.

8.5. Endring av tetthet av bakterier og sopp fra rugedag 3 til 18 ruralt

Det ble også funnet en signifikant nedgang i Candida fra rugedag 3 til 18 ruralt. Denne signifikante verdien var ikke like stor som den urbant, og dette er mest sannsynlig grunnet at det likevel er en lavere tetthet av denne arten ruralt. Færre kompostbinger kan også være en årsak her.

Videre ble det på ruralt område funnet en signifikans, hvor prøvene viser en oppgang i tettheten av *Pseudomonas* fra rugedag 3 til 18. Mens i urbant område var det ingen signifikans på denne bakterien. På ruralt område fant jeg at *Bacillus* har en svak nedgang, eller står på stedet hvil på rugedag 18, dette kan sees på i likhet med arbeidet fra Lee et al, hvor det beskrives at *Pseudomonas* og *Bacillus* konkurrerer om ressurser som nitrat og glukose (Lee et al. 2014). Det kan tenkes at *Pseudomonas* har utkonkurrert bakterien *Bacillus* med tanke på ressursene de har tilgjengelige og at det derfor slår ut slik i resultatene.

Det er en oppgang i bakterien *Ecoli* fra rugedag 3 til 18 ruralt. I urbant område viser det en svak nedgang av *Ecoli*-tetthet på rugedag 18 i forhold til ruralt område. Mulige årsaker kan være at *Bacillus* ikke hadde noen oppgang på ruralt område i rugeperioden, hvor *Pseudomonas* får mer plass til å vokse sammen med *Ecoli*. Med tanke på at *Bacillus* er en bakterie som ofte kan holde tettheten av patogene bakterier nede, kan det derfor sees en sammenheng med at *Pseudomonas* og *Ecoli* vokser mer her. En annen men mere sannsynlig grunn er gjødslingen av jorder i dette området. Den inneholder både *Ecoli* og *Pseudomonas*, og skjæra leter ofte etter føde på jorder. Rugingen foregår omtrent på samme tid som vårens første gjødslinger. Hovedgrunnen for en så stor økning av både *Ecoli* og *Pseudomonas* og det at *Bacillus* ikke vokser, vil da mest sannsynlig være grunnet gjødslingen. Om dette er årsaken til den ikke-voksende tendensen av *Bacillus*, kan man ikke konkludere med siden det er gjort så få studier på dette området tidligere. En annen grunn, nevnt tidligere, er at skjæra i Norge ikke bruker fjær som reimateriale. Dermed tilføres kanskje ikke *Bacillus* i like stor grad som det gjør i for eksempel Sør-Korea hvor de bruker fjær som reirkomponent. Her viser testene at tettheten av *Bacillus* går opp i rugeperioden.

8.6. Forskjeller av bakterietetthet mellom naturlige og kunstige reir på rugedag 3

En analyse av bakterietetthet i 35 naturlige reir oppmot tetthet i 8 kunstige reir, viser at det er signifikant mindre av *Candida* i naturlige reir ved rugedag 3, altså fuglene synes å kunne redusere tettheten av *Candida*. Utviklingen fra rugedag 3 til 18 viser det samme.

Hverken eggtaf eller ungetaf korrelerte signifikant ved bakterietetthet. Skjæra trenger kanskje ikke å bruke fjær som reirkomponent om det generelt er lavere tetthet av bakterier og sopp i Norge.

8.7. Analysemetodene

Den mest brukte metoden for å estimere bakterietetthet fra eggeskall er en kulturbasert metode, men det er blitt diskutert om det er metoder som egner seg bedre til dette formålet. En rapport av Lee et al, som studerer forskjellene mellom den tradisjonelle kultur-baserte metoden, og den nye PCR metoden ved å bruke *Escherichia coli* (E.coli) bakterien som testbakterie, forteller at PCR etimater av bakteriell tetthet var 10 ganger høyere enn kulturbaserte estimer. Og at den kulturbaserte metoden feilet i å finne bakterier på lavere tettheter (Lee *et al.* 2013). Men med forbehold om mulige feilberegninger og «left-censored» data gjør at konklusjonen alikevel forteller oss at begge metoder kan brukes til studier av faktorer som har effekter på bakterietettheter, men at den PCR baserte metoden kan ha en evne til å fange opp lavere bakterietetthet enn den kulturelle metoden.

Mens i en rapport gjort av Grizard et al, som tok for seg effekten av stryke-teknikken (med bomullspinner), og metoden som omhandler å ta prøver fra knuste eggeskallsbiter, viste at prøveteknikken påvirket utfallet av resultatene. Strykemethoden, som er mye brukt, førte til en lavere DNA ekstraksjonseffektivitet og forutsatte ulike profiler av bakteriesamfunn enn de som var basert på knuste eggeskallsbiter (Grizard *et al.* 2014). Som vi ser fra noen av de nevnte rapportene her, er det mange måter å kunne teste for bakterietettheten og diversiteten.

Testene vi tok ble sendt til Sør-Korea for analysering. Analysene som ble utført var:

- Kvantativ PCR. For å vurdere den totale bakterietettheten ble kvantitativ PCR gjennomført ved å bruke det ekstraherte DNAet fra testene med en qPCR maskin, og et universalt sett (primere) av bakterier.
- 16S rRNA gen pyrosekvensering og data prosessering. Ekstrahert DNA ble forsterket ved hjelp av primere for å nå V1 og V3 regionen av 16S rRNA (Lee et al. 2014).

Som med andre prøver og eksperiment må man ta høyde for feilberegninger og feilmarginer. Også her kan vi ha noen av dem. Mulige feil her kan for eksempel være:

For mye bufferløsning på bomullspinnen ved sveiping, som fører til at eggets overflate får et temperaturfall som igjen kan ha en negativ effekt på eggets levedyktighet. Andre feil kan være at de sterile engangshanskene berører for mye av reirmateriale eller andre ting rundt, som kan påføre egget bakterier som egentlig ikke var der fra før. Prøvene kan ha ligget feil, for eksempel for varmt over for lang tid, eller at toppen ikke har blitt skrudd ordentlig igjen. Alt dette er menneskelige feil, men som vi har prøvd å være ytterst forsiktige med.

I mine funn ser man at skjæra ikke bruker fjær som en del av reirforingen, og at dette kan være fordi det ikke trengs, grunnet lave temperaturer i Norge. Lavere temperaturer fører til mindre tetthet av bakterier som det også ble konkludert med i arbeidet til Horrocks et al, Hvor det forklares at lysosomaktiviteten var høyest i egg fra varmere og tørrere områder (Horrocks *et al.* 2014). Dette forteller oss at det kan være høyere bakterietetthet på eggeskall i slike områder. Tiltak som å tilføre fjær som redemateriale for å tilføre *Bacillus* er muligens ikke nødvendig for å holde den negative bakterietettheten nede. Kanskje holder det med hunnens egen fjærdrakt under ruging i Norge.

9. Litteratur

- Brandl, H.B., van Dongen, W.F.D., Darolova, A., Kristofik, J., Majtan, J. & Hoi, H. (2014) Composition of Bacterial Assemblages in Different Components of Reed Warbler Nests and a Possible Role of Egg Incubation in Pathogen Regulation. *Plos One*, 9.
- Cramer, D. (1998) *Fundamental statistics for social research*. Routledge, London.
- Cramer, D. & Howitt, D. (2004) *The SAGE dictionary of statistics*. SAGE, London.
- Doane, D.P. & Seward, L.E. (2011) Measuring skewness. *Journal of Statistics Education*, 19, 1-18.
- Friend, M. (1999) Fungal diseases (Field manual of wildlife diseases). *Wildlife Disease and Zoonotics*, 12, 126-138.
- Grizard, S., Dini-Andreote, F., Tieleman, B.I. & Salles, J.F. (2014) Dynamics of bacterial and fungal communities associated with eggshells during incubation. *Ecology and Evolution*, 4, 1140-1157.
- Horrocks, N.P.C., Hine, K., Hegemann, A., Ndithia, H.K., Shobrak, M., Ostrowski, S., Williams, J.B., Matson, K.D. & Tieleman, B.I. (2014) Are antimicrobial defences in bird eggs related to climatic conditions associated with risk of trans-shell microbial infection? *Frontiers in Zoology*, 11.
- Lee, W.Y., Kim, M., Jablonski, P.G., Choe, J.C. & Lee, S.I. (2014) Effect of Incubation on Bacterial Communities of Eggshells in a Temperate Bird, the Eurasian Magpie (*Pica pica*). *Plos One*, 9.
- Lee, W.Y., Lee, K.H., Chun, J., Choe, J.C., Jablonski, P.G. & Lee, S.I. (2013) Comparison of a culture-based and a PCR-based methods for estimating bacterial abundance on eggshells, with comments on statistical analyses. *Journal of Field Ornithology*, 84, 304-315.
- Peralta-Sanchez, J.M., Møller, A.P., Martin-Platero, A.M. & Soler, J.J. (2010) Number and colour composition of nest lining feathers predict eggshell bacterial community in barn swallow nests: an experimental study. *Functional Ecology*, 24, 426-433.
- Razali, N.M. & Wah, Y.B. (2011) Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *Journal of Statistical Modelling and Analytics*, 2, 21-33.
- Shapiro, S.S. & Wilk, M.B. (1965) An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52, 591-611.

10. Websider

- <http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1012&context=zoonoticpub>
- <http://www.lommelegen.no/artikkel/hemolytisk-uremisk-syndrom-hus>
- <http://omhelse.no/menneskekroppen/celler/cytoplasma/organelle/lysosomer/>