Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

A composição de diferentes dietas e a idade de bezerros leiteiros afetam o
microbioma ruminal e intestinal

Gercino Ferreira Virgínio Júnior

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e
Pastagens

Piracicaba
2020

Gercino Ferreira Virgínio Júnior
Zootecnista

A composição de diferentes dietas e a idade de bezerros leiteiros afetam o microbioma
ruminal e intestinal

Orientadora:
Profa. Dra. **CARLA MARIS MACHADO BITTAR**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e
Pastagens

Piracicaba
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Virgínio Júnior, Gercino Ferreira

A composição de diferentes dietas e a idade de bezerros leiteiros afetam o microbioma ruminal e intestinal/ Gercino Ferreira Virgínio Júnior. - - Piracicaba, 2020.

122 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Diversidade microbiana 2. Genômica 3. Microbiota fecal 4. Saúde intestinal L. . I. Título

Aos meu pais, Gercino e Tereza, e a minha irmã e a minha sobrinha, Patricia e Ana Lis, por todo apoio e esforço para me ajudarem durante toda a jornada até a conquista deste título...

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre presente em minha vida, mesmo nos momentos mais difíceis.

À profª Carla M.M. Bittar pela orientação, dedicação, paciência, puxões de orelha, e pela amizade construída. Terminei o doutorado com a sensação de dever cumprido. Aprendi muito com a senhora. Serei sempre grato.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Departamento de Zootecnia pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Laboratório de Biotecnologia Depto. de Zootecnia, principalmente a Marcela, Pillar e Leticia, que sempre estiveram dispostas a me ensinar e me ajudar sempre que apareci meio desesperado no laboratório.

Ao prof. Luiz Coutinho e ao Horácio Montenegro pela colaboração nesta pesquisa.

Aos meus colegas de orientação pelo companheirismo, momentos de descontração na salinha e ajuda nos experimentos: Ana Paula, Ariany, Marina, Duda, Marcos, Giovana (Pumba), Cristiane, Sophia e Milaine.

À Idalina, por toda amizade e carinho ao longo desses quase quatro anos.

Aos estagiários do Clube de Criação de Bezerras, Potira, Mei-dent, Desbotada, Rafa, Bruneli, Fret, Seti palmos, Taka, Freskor, Anestezina, Amandinha, Derrotado, Falsiane, Iskorrega, pelo auxílio durante os experimentos, pelos momentos divertidos no bezerreiro e por toda a amizade. Não teria sido a mesma coisa sem vocês.

Aos estagiários externos, Graziela, Leticia, Malu, Larissa, José, Leticia e Gabi. Muito obrigado por tudo.

Aos amigos de Piracicaba, Rafael, Luis, Diego, July e Rodrigo. Obrigado por toda parceria e momentos agradáveis. Vocês foram muito importantes para mim em diversos momentos.

Aos meus colegas de pós-graduação, Ana Claudia, Juliane Hartmann, Giuliana Micai, Octávio Augusto, José Matheus, Rodrigo, Jessica Motta, Otávio Goulart, Nathalia Rubio, Juliana Assis, Izally, Fabricio, Candida Azevedo e Bruna Alves. Foi estressante, mas vocês tornaram tudo muito mais agradável e divertido.

Ao meu grande amigo Jairo Cordeiro. Palavras não são capazes de descrever o quanto sua amizade foi importante para mim. Muito obrigado mesmo.

À Camila Cunha por toda a paciência em ouvir meus áudios de socorro e sempre tirar minhas dúvidas. Quase 10 anos de amizade, né?

Aos amigos Ciça, Zé, Luana Rufino, Samara Rufino, Jarbas, Rodrigo Maia, Fernanda Lavinia, Tone, Yasmin, Eduardo, Luciane, Darmony, Anna Carolina, Marcola, Vanessa Paula, Malu potinho e Tayane, cada momento que partilhamos foi muito especial para mim.

À Paulinha, Claudinha, Octávio, Bruna, Jecona, Zé Matheus, Giu, Eduardo e a Candinha, sem dúvida, a vida em Piracicaba não teria sido a mesma sem vocês. Muito obrigado pela amizade, pelo carinho, pelos dias de “nildo às 19h”. Vocês tem um lugar especial no meu coração. “Uma vida sem amigos é como o céu sem estrelas, pois são eles que nos iluminam nos dias mais escuros.”

Aos meus antigos orientadores, prof. Eduardo Robson, prof^a Luciana Geraseev, prof. José Carlos Pereira e prof. Ricardo Vieira. Vocês foram essenciais por mais essa conquista. Muito obrigado por todo o ensinamento passado. Eu não seria o mesmo se não fosse por vocês.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão das bolsas de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo financiamento ao projeto de pesquisa (FAPESP 2017/13601-3).

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

Obrigado!

*“De tudo ficaram três coisas:
a certeza de que estamos sempre a começar,
a certeza de que é preciso continuar,
e a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...”*

*Portanto, devemos fazer
da interrupção um caminho novo,
da queda, um passo de dança,
do medo, uma escada,
do sonho, uma ponte,
e da procura, um encontro...”*

Fernando Sabino

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1. MICROBIOMA GASTRINTESTINAL	21
2.2. COLONIZAÇÃO MICROBIANA DO TRATO GASTRINTESTINAL.....	22
2.3. IMPORTÂNCIA DA MICROBIOTA PARA A FISIOLOGIA E SAÚDE DOS RUMINANTES	26
2.4. MICROBIOMA E DESENVOLVIMENTO RUMINAL EM BEZERROS	28
2.5. MICROBIOMA INTESTINAL EM BEZERROS LEITEIROS	32
2.6. DIETA COMO FATOR DE MANIPULAÇÃO DO MICROBIOMA GASTRINTESTINAL	34
3. MICROBIOMA RUMINAL E FECAL DE BEZERROS LEITEIROS ALIMENTADOS COM DIFERENTES NÍVEIS E FONTES DE FDN	49
RESUMO	49
ABSTRACT	50
3.1. INTRODUÇÃO	51
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	52
3.3. RESULTADOS	57
3.4. DISCUSSÃO	73
3.5. CONCLUSÃO	78
4. MICROBIOMA FECAL DE BEZERROS LEITEIROS ALIMENTADOS COM DIFERENTES DIETAS LÍQUIDAS	87
RESUMO	87
ABSTRACT	88
4.1. INTRODUÇÃO	89
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	91
4.3. RESULTADOS	94
4.4. DISCUSSÃO	104
4.5. CONCLUSÃO	107
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	119
APÊNDICES	121

RESUMO

A composição de diferentes dietas e a idade de bezerros leiteiros afetam o microbioma ruminal e intestinal

Em teoria, bezerros leiteiros nascem com o trato gastrointestinal estéril e durante o nascimento, inicia-se a colonização microbiana. A partir desse momento, a dieta torna-se um importante fator de manutenção da população microbiana, além de servir de substrato para a mesma. No entanto, pouco se sabe como diferentes dietas podem modificar o microbioma gastrointestinal em bezerros leiteiros durante a fase de aleitamento e desaleitamento. Com base nisso, dois estudos foram realizados. O primeiro estudou avaliou diferentes níveis e fontes de FDN no concentrado inicial. Foram utilizados 18 bezerros Holandeses, alimentados com um dos três tratamentos: 22FDN – concentrado convencional contendo 22% de FDN; 31FDN - concentrado com 31% de FDN, substituindo parte do milho por casca de soja; e 22Feno - concentrado convencional com 22% de FDN e feno coast cross a vontade. Foram alojados em gaiolas suspensas, sem cama até a 8ª semana de vida, desaleitados e depois alojados em abrigos do tipo tropical até a 10ª semana de vida. Foram avaliados o microbioma ruminal, nas semanas 2, 4, 6, 8 e 10, e o microbioma fecal nas semanas 0, 1, 2, 4, 8 e 10. O microbioma ruminal não mostrou diferenças em função da dieta, idade ou interação de ambos os fatores. O microbioma fecal foi afetado tanto pela idade quanto pela dieta. A inclusão de feno na dieta pode promover maior diversidade microbiana fecal. O segundo estudou avaliou diferentes dietas líquidas durante o aleitamento. Foram utilizados 15 bezerros Holandeses alimentados com uma das três dietas líquidas: leite integral, sucedâneo lácteo, e leite integral acidificado a pH 4,5 com ácido fórmico. Os animais foram alojados em abrigos tropicais, recebendo 6 litros de dieta líquida por dia, sendo desaleitados a partir da 8ª semana de vida, e alojados em abrigo coletivo a partir do desaleitamento. O microbioma fecal foi avaliado nas semanas 0, 1, 2, 4, 8 e 10. A diversidade microbiana foi afetada pela idade e dieta. A diversidade foi crescente a partir da semana 1. O leite promoveu maior diversidade microbiana fecal em comparação as demais dietas, além de promover o crescimento de bactérias benéficas e comensais no intestino. No entanto, após os animais deixarem de receber as dietas líquidas e serem alojados em conjunto, o microbioma fecal desses animais convergiu para uma maior similaridade.

Palavras-chave: Diversidade microbiana; Genômica; Microbiota fecal; Saúde intestinal.

ABSTRACT

The composition of different diets and the age of dairy calves affect the ruminal and intestinal microbiome

In theory, dairy calves are born with a sterile gastrointestinal tract and at birth, microbial colonization begins. From that moment on, the diet becomes an important factor for maintaining the microbial population, in addition to serving as a substrate for growth. However, it is necessary to know how different diets can modify the gastrointestinal microbiome in dairy calves during the pre-weaning and weaning phase. Based on that, two studies were performed. The first study evaluated different levels and sources of NDF in the starter concentrate. Eighteen Holstein calves were used, fed with one of three treatments: 22NDF - conventional starter concentrate containing 22% NDF; 31NDF – starter concentrated with 31% NDF, replacing part of the corn with soybean hull; and 22Hay - conventional concentrate with 22% NDF and coast cross hay at will. The animals were housed in suspended not-bedded cages, until the 8th week of life, weaned and then housed in tropical shelters until the 10th week of life. The rumen microbiome was evaluated at weeks 2, 4, 6, 8 and 10, and the fecal microbiome at weeks 0, 1, 2, 4, 8, and 10. The ruminal microbiome had no differences depending on diet, age, or interaction of both factors. The fecal microbiome was affected by both age and diet. The supply of hay in the diet can promote greater fecal microbial diversity. The second studied evaluated different liquid diets during the pre-weaning phase. Fifteen Holstein calves fed one of the three liquid diets were used: whole milk, milk replacer, and whole milk acidified to pH 4.5 with formic acid. The animals were housed in tropical shelters, receiving 6 liters of liquid diet per day, being weaned after the 8th week of life, and housed in a collective shelter from weaning. The fecal microbiome was evaluated at weeks 0, 1, 2, 4, 8, and 10. Microbial diversity was affected by age and diet. Diversity increased from week 1. Whole milk promoted greater fecal microbial diversity compared to other diets, in addition to promoting the growth of beneficial and commensal bacteria in the feces. However, after the animals stopped receiving liquid diets and were housed together, the fecal microbiome of these animals converged towards greater similarity.

Keywords: Microbial diversity; Genomics; Fecal microbiota; Intestinal health.

1. INTRODUÇÃO

A colonização microbiana inicial no trato gastrointestinal (TGI) desempenha papel importante na maturação do sistema endócrino, imunológico da mucosa e do sistema nervoso central, influenciando fortemente e apoiando a saúde e o bem-estar dos animais jovens (Badman et al., 2019). Dessa forma, é de grande importância conhecer e caracterizar a colonização microbiana ao longo do TGI, para uma maior compreensão das interações hospedeiro-microbioma durante a fase de aleitamento e seus impactos na saúde e produção durante toda a vida do animal.

A caracterização da microbiota no TGI de bezerros tem focado principalmente nas comunidades bacterianas no rúmen e nas fezes (Uyeno et al., 2010; Li et al., 2012; Oikonomou et al., 2013; Rey et al., 2014; Dill-McFarland et al., 2017). Esse foco ocorre em grande parte pelo interesse primário no rúmen, como principal órgão de fermentação, e à natureza não invasiva da amostragem fecal, que funciona como bom representante da microbiota intestinal.

O tipo de alimento oferecido aos bezerros afeta a estrutura da microbiota gastrointestinal, uma vez que fornece diferentes substratos às comunidades bacterianas (Maslowski e MacKay, 2011; Li et al., 2012; Klein-Jöbstl et al., 2014; Rey et al., 2014; Guzman et al., 2015; Kasparovska et al., 2016). A microbiota ruminal é a comunidade microbiana proeminente no trato gastrointestinal de ruminantes. Este ecossistema finamente regulado é o que torna possível aos ruminantes utilizarem energia proveniente de material vegetal fibroso (não digestível para outros animais), fermentá-lo e produzir compostos como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), além de proteína microbiana (Biscarini et al., 2018)

No entanto, durante o período de aleitamento, a dieta líquida é o principal alimento fornecedor de energia e proteína, as quais alcançam o intestino delgado (Górka et al., 2011), servindo também de substrato para os microrganismos. Os microrganismos que colonizam o intestino delgado podem contribuir para a homeostase intestinal (Yu et al., 2012; Sommer e Bäckhed, 2013), estimular o sistema imunológico e melhorar o desenvolvimento do epitélio intestinal (Sommer e Bäckhed, 2013; Malmuthuge et al., 2015). Assim, estes processos podem ser afetados não só pelos microrganismos como também pelo tipo de substrato disponível.

Há evidências crescentes de que as populações estabelecidas no início da vida do animal podem persistir até a vida adulta, exercendo efeitos fisiológicos, metabólicos e imunológicos, o que sugere um grande potencial de 'programar' o microbioma do animal adulto e potencialmente o desempenho do animal (Abecia et al., 2013; Malmuthuge et al., 2015). No entanto, a janela de tempo em que o ecossistema é mais sensível à alteração ainda é desconhecida (Abecia et al., 2018). Entender a colonização pelos diferentes grupos microbianos, principalmente as bactérias, ajudaria a projetar estratégias de intervenção eficientes para manipular a colonização microbiana no início da vida.

Embora muita pesquisa tenha sido realizada ao longo do último meio século investigando a composição do ecossistema microbiano, principalmente o ruminal (Hungate, 1947; Lengemann; Allen, 1955; Bryant et al., 1958; Zirolecki e Briggs, 1961; Poe et al., 1971; Anderson et al., 1987; Fonty et al., 1987; Fonty et al., 1989), ainda faltam informações quantitativas sobre a comunidade microbiana e como ela é afetada pela dieta (Broadway et al., 2012). Na verdade, para que seja possível modular a microbiota gastrointestinal, primeiramente é necessário conhecer como esta é modificada pelas diferentes dietas e pela idade do animal. No entanto, ainda são escassas as informações a respeito dos efeitos de diferentes manejos alimentares em idades mais jovens sobre o microbioma de bezerros leiteiros.

Portanto, o objetivo com o presente trabalho foi entender se diferentes composições de dieta sólida e dieta líquida, além da idade dos animais, podem modificar o microbioma gastrointestinal durante o período de aleitamento e pós-desaleitamento de bezerros leiteiros.

Referências

- Abecia, L., A.I. Martín-García, G. Martínez, C.J. Newbold, and D.R. Yáñez-Ruiz. 2013. Nutritional intervention in early life to manipulate rumen microbial colonization and methane output by kid goats postweaning¹. *J. Anim. Sci.* 91:4832–4840.
- Abecia, L., G. Martínez-Fernandez, K. Waddams, A.I. Martín-García, E. Pinloche, C.J. Creevey, S.E. Denman, C.J. Newbold, and D.R. Yáñez-Ruiz. 2018. Analysis of the Rumen Microbiome and Metabolome to Study the Effect of an Antimethanogenic Treatment Applied in Early Life of Kid Goats. *Front. Microbiol.* 9:1–14.

- Anderson, K.L., T.G. Nagaraja, J.L. Morrill, T.B. Avery, S.J. Galitzer, and J.E. Boyer. 1987. Ruminal microbial development in conventionally or early-weaned calves. *J. Anim. Sci.* 64:1215–1226.
- Badman, J., K. Daly, J. Kelly, A.W. Moran, J. Cameron, I. Watson, J. Newbold, and S.P. Shirazi-Beechey. 2019. The Effect of Milk Replacer Composition on the Intestinal Microbiota of Pre-ruminant Dairy Calves. *Front. Vet. Sci.* 6:1–9.
- Biscarini, F., F. Palazzo, F. Castellani, G. Masetti, L. Grotta, A. Cichelli, and G. Martino. 2018. Rumen microbiome in dairy calves fed copper and grape-pomace dietary supplementations: Composition and predicted functional profile. *PLoS One* 13:e0205670.
- Broadway, P.R., T.R. Callaway, J.A. Carroll, J.R. Donaldson, R.J. Rathmann, and B.J. Johnson. 2012. Evaluation of the Ruminal Bacterial Diversity of Cattle Fed Diets Containing Citrus Pulp Pellets. *Agric. Food Anal. Bacteriol.* 2:297–308.
- Bryant, M.P., N. Small, C. Bouma, and I. Robinson. 1958. Studies on the Composition of the Ruminal Flora and Fauna of Young Calves. *J. Dairy Sci.* 41:1747–1767.
- Dill-McFarland, K.A., J.D. Breaker, and G. Suen. 2017. Microbial succession in the gastrointestinal tract of dairy cows from 2 weeks to first lactation. *Sci. Rep.* 7:40864.
- Fonty, G., P. Gouet, J.P. Jouany, and J. Senaud. 1987. Establishment of the microflora and anaerobic fungi in the rumen of lambs. *J. Gen. Microbiol.* 133:1835–1843.
- Fonty, G., P. Gouet, and J.M. Nebout. 1989. Development of the cellulolytic microflora in the rumen of lambs transferred into sterile isolators a few days after birth. *Can. J. Microbiol.* 35:416–422.
- Górka, P., Z.M. Kowalski, P. Pietrzak, A. Kotunia, W. Jagusiak, and R. Zabielski. 2011. Is rumen development in newborn calves affected by different liquid feeds and small intestine development?. *J. Dairy Sci.* 94:3002–3013.
- Guzman, C.E., L.T. Bereza-Malcolm, B. De Groef, and A.E. Franks. 2015. Presence of Selected Methanogens, Fibrolytic Bacteria, and Proteobacteria in the Gastrointestinal Tract of Neonatal Dairy Calves from Birth to 72 Hours. *PLoS One* 10:e0133048.
- Hungate, R.E. 1947. Studies on Cellulose Fermentation: III. The Culture and Isolation for Cellulose-decomposing Bacteria from the Rumen of Cattle. *J. Bacteriol.* 53:631–45.

- Kasparovska, J., M. Pecinkova, K. Dadakova, L. Krizova, S. Hadrova, M. Lexa, J. Lochman, and T. Kasparovsky. 2016. Effects of Isoflavone-Enriched Feed on the Rumen Microbiota in Dairy Cows. *PLoS One* 11:e0154642.
- Klein-Jöbstl, D., E. Schornsteiner, E. Mann, M. Wagner, M. Drillich, and S. Schmitz-Esser. 2014. Pyrosequencing reveals diverse fecal microbiota in Simmental calves during early development. *Front. Microbiol.* 5:622.
- Lengemann, F.W., and N.N. Allen. 1955. The Development of Rumen Function in the Dairy Calf I. Some Characteristics of the Rumen Contents of Cattle of Various Ages. *J. Dairy Sci.* 38:651–656.
- Li, R.W., E.E. Connor, C. Li, R.L. Baldwin VI, and M.E. Sparks. 2012. Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomic tools. *Environ. Microbiol.* 14:129–139.
- Malmuthuge, N., P.J. Griebel, and L.L. Guan. 2015. The Gut Microbiome and Its Potential Role in the Development and Function of Newborn Calf Gastrointestinal Tract. *Front. Vet. Sci.* 2:36.
- Maslowski, K.M., and C.R. MacKay. 2011. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat. Immunol.* 12:5–9.
- Oikonomou, G., A.G.V. Teixeira, C. Foditsch, M.L. Bicalho, V.S. Machado, and R.C. Bicalho. 2013. Fecal Microbial Diversity in Pre-Weaned Dairy Calves as Described by Pyrosequencing of Metagenomic 16S rDNA. Associations of *Faecalibacterium* Species with Health and Growth. *PLoS One* 8:e63157.
- Poe, S.E., D.G. Ely, G.E. Mitchell, W.P. Deweese, and H.A. Glimp. 1971. Rumen development in lambs. I. Microbial digestion of starch and cellulose. *J. Anim. Sci.* 32:740–743.
- Rey, M., F. Enjalbert, S. Combes, L. Cauquil, O. Bouchez, and V. Monteils. 2014. Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning is sequential. *J. Appl. Microbiol.* 116:245–257.
- Sommer, F., and F. Bäckhed. 2013. The gut microbiota — masters of host development and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* 11:227–238.
- Uyeno, Y., Y. Sekiguchi, K. Tajima, A. Takenaka, M. Kurihara, and Y. Kamagata. 2010. An rRNA-based analysis for evaluating the effect of heat stress on the rumen microbial composition of Holstein heifers. *Anaerobe* 16:27–33.

- Yu, L.C.-H., J.-T. Wang, S.-C. Wei, and Y.-H. Ni. 2012. Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 3:27.
- Ziolecki, A., and Briggs, C.A.E.. 1961. The microflora of the rumen of the young calf: ii. source, nature and development. *J. Appl. Bacteriol.* 24:148–163.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Microbioma gastrointestinal

O microbioma gastrointestinal é denso e geneticamente complexo, representado por diversas espécies de bactérias, protozoários, fungos, archaeas metanogênicas e bacteriófagos (Miron et al., 2001), os quais possuem muitas diferenças funcionais e filogenéticas. Atualmente, estima-se que mais de 5.000 espécies habitam o TGI de ruminantes (Henderson et al., 2015).

A colonização microbiana é influenciada por uma gama de fatores, os quais podem auxiliar tanto na entrada de microrganismos benéficos, quanto de microrganismos patobiontes. No entanto, poucos são os estudos direcionados ao entendimento da colonização microbiana no TGI.

O animal tem o primeiro contato com microrganismos durante o nascimento, pois durante a gestação, a barreira placentária impede que estes tenham contato com o feto. No momento do parto, o TGI do neonato é rapidamente colonizado por uma comunidade microbiana abundante e diversificada (Jami et al., 2013).

A distinção entre microrganismos indígenas (autóctones) e transitórios (alóctones) em estudos de colonização e desenvolvimento da microbiota gastrointestinal é fundamental para a compreensão ecológica da colonização, sucessão e mecanismos de interação entre microrganismos intestinais e seu hospedeiro (Mackie et al., 1999). Esta distinção é difícil, especialmente em neonatos, pois sua microbiota ainda não está bem estabelecida, com muitos microrganismos sendo transitórios.

Espécies alóctones são, muitas vezes, oriundas da dieta ou água, do ambiente ou de outro compartimento do TGI (Savage, 1977). Alguns microrganismos patobiontes são autóctones no ecossistema intestinal e podem viver em harmonia com o hospedeiro. Ou seja, há equilíbrio da microbiota benéfica com a potencialmente prejudicial, situação denominada de eubiose. Somente quando o ecossistema sofre algum tipo de perturbação, ou disbiose, esses microrganismos podem se sobrepor e causar doenças (Mackie et al., 1999). Além disso, uma determinada espécie microbiana pode ser autóctone para um compartimento, mas alóctone para outro, ao qual ela normalmente passa depois de ser eliminada de seu habitat nativo (Dubos et al., 1965; Savage, 1977).

As bactérias são responsáveis por aproximadamente metade do material genético microbiano no rúmen (Nagaraja, 2016), podendo representar uma porção ainda maior em outros compartimentos do TGI. Dentre os microrganismos ruminais, as bactérias são as mais bem estudadas pela sua diversidade funcional e filogenética, e à facilidade de análise (Clemmons et al., 2019).

No geral, os filos bacterianos dominantes no TGI são Firmicutes e Bacteroidetes, sucedidos em abundância por Proteobacteria, Tenericutes e Actinobacteria (Myer et al., 2015). Em nível de gênero, *Prevotella* é mais comum, potencialmente pela ampla gama de capacidades funcionais de espécies, incluindo atividades celulolíticas, amilolíticas e fibrolíticas (Avguštin et al., 1997; Stevenson e Weimer, 2007; Bekele et al., 2010).

2.2. Colonização microbiana do trato gastrointestinal

Os ruminantes jovens nascem com o TGI imaturo e estéril (Taschuk e Griebel, 2012). A colonização do TGI é um processo dinâmico, com considerável flutuação durante o início da vida do animal. Os processos relacionados ao estabelecimento do microbioma são complexos, envolvem sucessão microbiana, assim como interações entre os microrganismos e o animal, o que resulta em populações densas e estáveis habitando regiões específicas no TGI.

Do ponto de vista ecológico, a colonização gastrointestinal do neonato representa a montagem de uma nova comunidade microbiana (Costello et al., 2012). A comunidade microbiana no TGI de bezerros neonatos é dominada pelos filos Proteobacteria (53%), seguido por Firmicutes (18%), Actinobacteria (20%) e Bacteroidetes (6%), mas o processo de colonização é bastante dinâmico e dependente de inúmeros fatores (Malmuthuge e Guan, 2016).

Alguns autores sugerem que eventos no pré-parto podem influenciar a colonização do TGI (Ley et al., 2005; Cannon et al., 2010; Dominguez-Bello et al., 2010). Fatores externos como a microbiota materna, o tipo de parto, o ambiente, o colostro, as dietas líquida e sólida, além de tratamento com antibióticos durante o início da vida também afetam a colonização (Penders et al., 2006). Fatores ligados ao hospedeiro como o pH luminal, o tempo de retenção alimentar e mecanismos de defesa imunológica, além da própria microbiota, como a adesão, mecanismos de sobrevivência sob gradiente de oxigênio e mecanismos para obtenção de nutrientes a partir do hospedeiro também afetam a colonização (Adlerberth e Wold, 2009).

Fontes de inóculo de microrganismos são as mais diversas. No entanto, a dieta e a frequência de fornecimento são os fatores mais importantes para o estabelecimento e manutenção da estabilidade das populações microbianas (Fonty et al., 1987), pois além de servirem como vias de inoculação dos microrganismos para o TGI, servem também como substrato para seu crescimento. Entretanto, pouco se sabe sobre as interações microbiota-hospedeiro que ocorrem durante o início da vida dos ruminantes e se essas interações influenciam o desempenho e a saúde do animal.

Um estudo recente mostrou quais seriam as principais fontes de microrganismos iniciais no intestino em cordeiros, quando se compara animais que mamavam diretamente em sua mãe ou eram alimentados com mamadeiras. O estudo mostrou que em cordeiros aleitados pela mãe, a microbiota intestinal inicial apresentava maior correspondência com aquela presente nas tetas (43%) e do ambiente (28%), enquanto que cordeiros alimentados por mamadeira foram mais semelhantes aos microrganismos da vagina (46%), do ar ambiente (31%) e do piso do curral de ovelhas (12%) (Bi et al., 2019).

O primeiro contato com microrganismos ocorre durante a passagem do animal pelo canal do parto, quando são expostos às espécies colonizadoras pioneiras, como as bactérias do gênero *Lactobacillus*. Além disso, serótipos de *Escherichia coli* foram encontrados após o nascimento, tanto na cavidade oral dos neonatos quanto nas fezes das mães, o que implica que durante o parto natural, há passagem dos microrganismos fecais das mães para os filhotes (Bettelheim et al., 1974; Brook et al., 1979).

Menos de 20 minutos após o nascimento, archaeas (*Methanobrevibacter spp.*, *M. mobile* e *M. votae*), bactérias fibrolíticas (*F. succinogenes*, *R. flavefaciens* e *P. ruminicola*), e *Geobacter spp.* (filo Proteobacteria) foram detectados no TGI e fezes de bezerros. Isso sugere que esses organismos começam a colonizar o TGI assim que o animal nasce, durante o parto ou mesmo antes do nascimento (Guzman et al., 2015).

O fornecimento de colostro acelera a colonização bacteriana no intestino delgado do bezerro. Bezerros que receberam colostro fresco, atingiram uma densidade bacteriana total de 10^{10} cópias do gene 16S rRNA/g de amostra às 12 horas de vida, enquanto os bezerros que não receberam colostro atingem apenas 10^8 cópias do gene 16S rRNA/g de amostra (Malmuthuge et al., 2015a). Além disso, o fornecimento de colostro pode resultar em maior prevalência de *Bifidobacterium* no intestino delgado durante as primeiras 12 horas de vida

(Malmuthuge et al., 2015a). No entanto, Fischer et al. (2018) observaram maior abundância desse gênero com o fornecimento de colostro logo após o nascimento. Esse aumento da prevalência pode explicar a incidência reduzida de infecções entéricas (Godden et al., 2012), indicando que o colostro desempenha um papel fundamental no estabelecimento de um TGI saudável.

Os anaeróbios facultativos, como *Streptococcus* e *Enterococcus*, são conhecidos colonizadores iniciais que servem para converter o TGI em um ambiente completamente anaeróbico (Adlerberth e Wold, 2009; Jami et al., 2013). As bactérias estritamente anaeróbicas se estabelecem e dominam a comunidade nos primeiros dias após o nascimento (Jami et al., 2013), e aumentam conforme a idade do animal (Anderson et al., 1987; Fonty et al., 1987).

Essas mudanças na microbiota gastrointestinal são dinâmicas nas primeiras 12 semanas de vida, e incluem o aparecimento de novas espécies como *Ruminococcus flavefaciens* e espécies de *Fibrobacter* e o desaparecimento de espécies de *Bifidobacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* (Uyeno et al., 2010). Alguns grupos de microrganismos benéficos podem estar presentes no TGI muito antes do fornecimento da dieta sólida, como *Bacteroides*, *Prevotella* e *Ruminococcus* (Dias et al., 2018), conhecidos por estarem envolvidos na degradação de fibras e amido (Mao et al., 2015) e que são comumente identificados em ruminantes adultos (de Oliveira et al., 2013; Myer et al., 2015).

As archaeas são difíceis de detectar em fezes de bezerros com duas e quatro semanas, e os fungos aparecem uma semana após o nascimento, mas abaixo da detecção até o desaleitamento (Fonty et al., 1987). Esses microrganismos se estabelecem após a colonização bacteriana no rúmen, pois a atividade bacteriana modifica o ambiente ruminal, por meio de processos fermentativos (Fonty et al., 1987). Uma vez que as bactérias se estabelecem, as archaeas proliferam usando hidrogênio disponível para reduzir o dióxido de carbono a metano (Janssen e Kirs, 2008).

No TGI, os fungos são os primeiros a se unirem fisicamente aos substratos fibrosos e liberam substratos da matriz de lignina da parede celular da planta (Akin e Borneman, 1990). A colonização ruminal por fungos depende, também, da presença de fibra na alimentação do bezerro, mas não está totalmente estabelecida no intestino até que a fibra seja abundante, o que ocorre, provavelmente, em algum momento após o desaleitamento.

Já a colonização de protozoários ciliados depende do contato com outros ruminantes adultos, sendo que esses podem ser detectados nas primeiras semanas de vida do bezerro (Dehority, 1998). Entretanto, a colonização é mais tardia em comparação às bactérias, pois os protozoários são sensíveis ao pH ruminal mais baixo, característico em bezerros em aleitamento em decorrência do escape de leite e consequente fermentação láctica (Oliveira et al., 2007). Se o contato com ruminantes adultos for estabelecido, as populações de protozoários se desenvolvem entre 15 a 20 dias de idade (Fonty et al., 1988). O rápido estabelecimento de protozoários exige uma população bacteriana bem estruturada, pois estas estabelecem características físico-químicas favoráveis no ambiente ruminal (Fonty et al., 1988), além de serem fonte de compostos nitrogenados para o crescimento dos mesmos (Williams e Coleman, 1997).

A microbiota gastrointestinal está em constante mudança à medida que os bezerros aumentam o consumo de dieta sólida e são em algum momento desaleitados, com eventual estabelecimento da comunidade microbiana madura (Meale et al., 2016; Dill-McFarland et al., 2017). O desenvolvimento de uma microbiota diversa no jovem ruminante estabelece o ecossistema e inicia o processo de digestão fermentativa no animal (Fonty et al., 1991). A falha em estabelecer um microbioma saudável, pode resultar em distúrbios intestinais e má função imunológica (Czarnecki-Maulden, 2008).

Ao analisar a mudança na composição bacteriana no rúmen de bezerros leiteiros, Rey et al. (2014) observaram que nos primeiros dias de nascimento, o retículo-rúmen foi dominado por bactérias anaeróbias consumidoras de lactose, principalmente do filo Proteobacteria. Uma vez que a alimentação sólida foi introduzida quatro dias após o nascimento, a abundância de Bacteroidetes aumentou significativamente. Em nível de gênero, muitos microrganismos de interesse e importância em adultos também tiveram sua abundância relativa alterada, como *Prevotella*, que passaram de uma abundância média de aproximadamente 11% para mais de 40%. As mudanças nas abundâncias bacterianas, assim como a mudança nas funções das mesmas, provavelmente é o resultado de modificação da dieta, desenvolvimento ruminal e o ambiente fermentativo em geral.

Firmicutes e Bacteroidetes se estabelecem gradualmente e eventualmente se tornam as bactérias predominantes à medida que o bezerro se desenvolve e consome mais alimentos sólidos (Ley et al., 2008; Malmuthuge et al., 2015b). Assim, quando se inicia o

desaleitamento, os ruminantes já abrigam as principais populações microbianas que caracterizam os ruminantes adultos, como bactérias estritamente anaeróbicas e celulolíticas, archaeas, fungos e protozoários ciliados.

Uma melhor compreensão de como o microbioma neonatal é estabelecido e mantido ajudará a esclarecer sua função no desenvolvimento do sistema imune da mucosa (Taschuk e Griebel, 2012), e também poderá ajudar a projetar abordagens, com o objetivo de promover o desenvolvimento do rúmen.

2.3. Importância da microbiota para a fisiologia e saúde dos ruminantes

Os ruminantes estabelecem relações simbióticas com diferentes microrganismos anaeróbios, os quais são capazes de degradar e metabolizar diferentes nutrientes, como carboidratos fibrosos, não fibrosos e proteínas. Essa simbiose ocorre porque principalmente o ambiente ruminal é adequado para o estabelecimento e desenvolvimento dos microrganismos, enquanto estes, por meio da fermentação dos componentes da dieta, disponibilizam amônia, aminoácidos, vitaminas e AGCC para o animal (Hungate, 1966).

Os microrganismos ruminais produzem precursores glicogênicos, lipogênicos e aminogênicos que participam ou regulam o metabolismo energético e proteico em bovinos (Hungate, 1975), e fornecem ao animal hospedeiro em torno de 70 e 60% de sua necessidade diária de energia e proteína, respectivamente, por meio da fermentação (Flint e Bayer, 2008; Yeoman; White, 2014). Por isso, estudos sobre a microbiota em ruminantes sempre tiveram como foco principal o microbioma ruminal, a fim compreender os efeitos sobre a produção de carne e leite (Malmuthuge et al., 2015b).

Porém, nos últimos anos o microbioma intestinal tem ganhado espaço entre as pesquisas com ruminantes, com foco principal sendo o efeito de diferentes dietas. A microbiota intestinal é de particular importância, pois seu número de genes é 100 vezes maior que o genoma humano, além de conferir traços fisiológicos cruciais que o organismo não seria capaz de desenvolver por conta própria (Gill et al., 2006; O'Hara e Shanahan, 2006; Xu et al., 2007; Neish, 2009).

Apesar dos numerosos estudos com humanos e ratos relatarem a importância da microbiota intestinal precoce na saúde futura do hospedeiro, poucos são os trabalhos que buscam entender o papel da colonização intestinal no desenvolvimento do TGI e/ou na saúde dos ruminantes neonatos. Além disso, o desenvolvimento do rúmen/intestino e o

estabelecimento da microbiota sempre foram estudados como aspectos separados da biologia dos ruminantes e há poucos relatos que buscam compreender possíveis interações entre esses dois compartimentos (Malmuthuge et al., 2015b).

O período de colonização gastrointestinal neonatal é crucial para o desenvolvimento intestinal e sistema imune (Fouhy et al., 2012), e pode ter efeitos em longo prazo para a saúde (Conroy et al., 2009). Uma comunidade comensal estável protege o hospedeiro de patógenos invasivos (Kamada et al., 2013), além de expandir a capacidade biossintética do hospedeiro, melhorando a captação de nutrientes (Karasov et al., 2011).

A microbiota residente representa uma barreira à invasão e proliferação de microrganismos patogênicos exógenos e oportunistas (Hooper et al., 1998). Esse efeito se dá pela produção de substâncias antagonistas (bacteriocinas), produção de metabólitos e produtos tóxicos (AGCC e H_2S), manutenção de baixo potencial de óxido-redução, além da depleção de nutrientes necessários para a manutenção dos patógenos (Savage, 1977; Bezirtzoglou, 1997).

A maioria das espécies bacterianas intestinais são espécies probióticas, tais como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus faecium* e espécies de *Bacillus* (Ballou, 2011). Essas espécies têm papel benéfico na produção de vitaminas, aminoácidos essenciais e outros substratos metabólicos benéficos (Leahy et al., 2005), além de auxiliarem no metabolismo de nutrientes (Wu et al., 2016), metabolismo e balanço energético (Sommer et al., 2016) e no sistema imunológico do hospedeiro (Lukens et al., 2014).

Lactobacillus e *Bifidobacterium*, bem como espécies de *Faecalibacterium*, podem modular o sistema imunológico e a resposta inflamatória (Simone et al., 1992; Oikonomou et al., 2013). Estas bactérias impedem a infecção por patógenos concorrentes em locais de ligação às células epiteliais (Duffy et al., 1994; Perdigon et al., 1995), estimulando as respostas intestinais aos anticorpos IgA (Fukushima et al., 1998) e aumentando a atividade fagocítica de leucócitos e macrófagos no sangue periférico (Gill et al., 2000).

A dinâmica entre microrganismos intestinais e sistema imunológico do TGI é crucial para o seu desenvolvimento e homeostase (Sansonetti e Medzhitov, 2009). A microbiota intestinal “ensina” o sistema imunológico do hospedeiro a reconhecer quais microrganismos são benéficos, e, ao mesmo tempo, a manter uma rápida resposta a patógenos prejudiciais (Candela et al., 2010). A medida que aumenta a renovação e a angiogênese das células

epiteliais e reduz a permeabilidade transepitelial, a microbiota intestinal favorece a função de renovação e barreira do epitélio do TGI (Neish, 2009).

Por outro lado, outros microrganismos são caracterizados como causadores de patologias e virulência ao hospedeiro, mas todos podem provocar endotoxemias em determinadas circunstâncias (Mackie et al., 1999; Brooks et al., 2007). Em função disso, microrganismos benéficos são capazes de limitar o crescimento de patobiontes. Por exemplo, *Bifidobacterium infantis* pode produzir substâncias que inibem *E. coli* e *Clostridium perfringens*, enquanto outras espécies de bifidobactérias podem inibir *Listeria*, *Shigella*, *Campylobacter* e *Vibrio cholerae* (Gibson e Wang, 1994).

O potencial protetor da microbiota intestinal é reduzido durante eventos estressantes, como a mudanças na dieta, o desaleitamento, transporte, mudança de ambiente e o contato com múltiplos agentes infecciosos, o que pode causar disbiose e, conseqüentemente, a alta incidência de doenças intestinais em bezerros (Fleige et al., 2007). Os sinais de disbiose podem ser muito mais sutis que a ocorrência de diarreia e podem incluir diminuição da taxa de crescimento, má qualidade da pele e do pelo, aumento de condições inflamatórias, suscetibilidade a infecções e menores taxas de crescimento (Czarnecki-Maulden, 2008).

2.4. Microbioma e desenvolvimento ruminal em bezerros

O microbioma ruminal controla os processos fermentativos e, por isso, sua diversidade e capacidade funcional sustentam a eficiência digestiva dos ruminantes (Abecia et al., 2014). Composto predominantemente por espécies bacterianas, mas também por archaeas metanogênicas, protozoários, fungos e bacteriófagos (Chaucheyras-Durand e Ossa, 2014), o ecossistema microbiano ruminal é responsável por vários nichos funcionais, incluindo funções proteolíticas, fibrolíticas e lipolíticas (Clemmons et al., 2019). As contagens estão na ordem de grandeza de 10^{10} UFC/mL de fluido ruminal para bactérias, 10^8 para protozoários, 10^7 para archaeas e 10^3 para esporos fúngicos (Deusch et al., 2015).

A composição microbiana do rúmen varia significativamente entre espécies de ruminantes, dieta, hospedeiros, estações climáticas e regiões geográficas (Tajima et al., 2001). Além disso, há influência na eficiência fermentativa e produção de metano (Morgavi et al., 2010), assim como alterações anatômicas na parede e vilosidades ruminais (Li et al. 2011).

As bactérias são os principais microrganismos ruminais, os quais contribuem principalmente para a produção de AGCC e proteínas microbianas (Kim et al., 2011), além de outros metabólitos, como lipídios bio-hidrogenados (Clemmons et al., 2019). Os metabólitos produzidos são absorvidos e metabolizados pelo epitélio ruminal ou pelo trato gastrointestinal posterior, e podem então entrar na corrente sanguínea, se tornando disponíveis para o animal (Weston e Hogan, 1968; Houpt, 1970; Kempton et al., 1977).

As bactérias essenciais para a função madura do rúmen podem ser detectadas um dia após o nascimento, muito antes do rúmen estar maduro ou mesmo antes da ingestão da dieta sólida (Jami et al., 2013; Dias et al., 2017). A população bacteriana anaeróbica aumenta com a idade do animal (Anderson et al., 1987) e com o consumo de alimentos sólidos (Fonty et al., 1987). Assim, quanto mais cedo os bezerros ingerirem alimentos sólidos, mais rápida a composição e funcionalidade gastrointestinal tornam-se semelhantes ao observado em animais adultos (Pitta et al., 2010; Li et al., 2012).

As espécies amilolíticas, celulolíticas e archaeas aparecem no terceiro dia de vida, independentemente da dieta (Anderson et al., 1987). Animais que recebem dieta com alimentos fibrosos podem apresentar atividade microbiana celulolítica já na quarta semana de vida, a qual aumenta a partir dessa idade e alcança as contagens de indivíduos adultos na sexta semana (Oliveira Filho et al., 2007).

Segundo Li et al. (2012), uma adequada colonização da microbiota ruminal em bezerros jovens estabelece uma base sólida para a transição do estado pré-ruminante para ruminante funcional, fase crítica de adaptação digestiva em bovinos. Para que a microbiota se estabeleça, o alimento concentrado deve proporcionar carboidratos facilmente fermentáveis, como o amido, necessários para a produção de AGCC e consequente desenvolvimento de papilas ruminais. As alterações nas propriedades estruturais e fisiológicas do rúmen estão ligadas ao estabelecimento dos microrganismos do rúmen (Beharka et al., 1998).

As bactérias fibrolíticas são críticas para o rápido desenvolvimento anatômico e fisiológico do rúmen à medida que o bezerro recém-nascido muda de uma dieta líquida, colostro e leite, para alimentação sólida, como o concentrado e feno (Rey et al., 2014; Li et al., 2011).

Li et al. (2012) compararam o metagenoma em bezerros de 2 e 6 semanas de idade, alimentados com sucedâneo, e observaram um microbioma ruminal taxonômico e

funcionalmente diverso em bezerros pré-ruminantes com alterações significativas dependentes da idade. Este estudo mostrou que os Bacteroidetes, seguido por Firmicutes e Proteobacteria, colonizaram o conteúdo ruminal de bezerros em aleitamento, e que apresentaram variações dependentes da idade em sua abundância relativa. A abundância de Bacteroidetes aumentou de 45,7% às 2 semanas para 74,8% às 6 semanas de idade, apesar dos bezerros receberem a mesma dieta durante todo o período. Tais diferenças relacionadas à idade foram mais proeminentes em nível de gêneros bacterianos, onde a dominância de *Prevotella* (33,1%), às duas semanas, foi substituída por *Bacteroides* (71,4%), às seis semanas. Variação semelhante também foi observada por Jami et al. (2013) em bezerros recém-nascidos com 1-3 dias, 2 e 6 meses e com 2 anos de idade.

Até a terceira semana de vida, os bezerros são considerados pré-ruminantes, pois o rúmen é anatomicamente e fisiologicamente subdesenvolvido (Davis e Drackley, 1998; Baldwin et al., 2004). Neste período, a dieta líquida representa maior parte do consumo, enquanto que o consumo de dieta sólida ainda é muito baixo. O consumo de alimentos sólidos aumenta o desenvolvimento de populações microbianas, resultando em maior utilização do concentrado e produção de AGCC (Baldwin et al, 2004). Dependendo da natureza e qualidade da dieta fornecida aos animais, a morfofisiologia do trato gastrointestinal pode ser alterada (Li et al., 2011). O epitélio ruminal é responsável por várias funções fisiologicamente importantes, incluindo proteção, além de absorção, transporte e metabolismo de AGCC (Gálfi et al., 1991).

A aceleração do desenvolvimento do rúmen está associada ao consumo de alimentos sólidos que resultam na produção de AGCC, especialmente os ácidos butírico e propiônico (Baldwin et al., 2004). Esses compostos são predominantemente derivados por fermentação microbiana do concentrado (Flint e Bayer, 2008). O acetato tem baixa proporção molar durante primeiros dois meses e aumenta até os nove meses de idade à medida que a ingestão de forragem aumenta (Davis e Drackley, 1998; Suarez-Mena et al., 2016; Diao et al., 2017), mas não está relacionado as alterações observadas no rúmen em desenvolvimento.

A presença e absorção de butirato e propionato no rúmen fornece estímulos químicos necessários para a proliferação do epitélio ruminal (Flatt et al., 1958; Tamate et al., 1962; Suarez-Mena et al., 2016). Alguns estudos sugerem que a proliferação de papilas ruminais está associada ao aumento do fluxo sanguíneo na parede do ruminal (Sander et al.,

1959; Glauber et al., 1991), e ao efeito direto de butirato e propionato na expressão gênica da mesma (Gálfi et al., 1991).

Além de mudanças anatômicas, ocorrem mudanças no local de digestão e absorção, que muda do intestino para o rúmen, e o metabolismo energético do bezerro é alterado, passando a utilizar mais AGCC e menos glicose. O desenvolvimento de outros compartimentos digestivos também ocorre com alterações na atividade das enzimas intestinais, da redução na atividade da lactase e aumento da maltase, bem como no desenvolvimento do aparelho salivar e no comportamento da ruminação (Warner et al., 1956; Baldwin et al., 2004; Guilloteau et al., 2009; Khan et al., 2016).

A alta produção e baixa absorção/remoção de AGCC no rúmen reduz o pH ruminal, com consequente redução da digestibilidade da fibra, pela diminuição de bactérias fibrolíticas (Russell e Wilson, 1996). Esse tipo de distúrbio, quando acomete bezerros em desenvolvimento, pode prejudicar o estabelecimento da microbiota. Contudo, o uso de ingredientes ricos em polissacarídeos não amiláceos (PNA), como a casca de soja, que durante a sua degradação ruminal não promovem o aumento na concentração de ácido lático e, consequentemente, não diminuem o pH, pode ser uma alternativa à inclusão nas dietas.

Forragens ou alimentos mais grosseiros promovem o desenvolvimento da musculatura ruminal e, também, mantêm a integridade do epitélio do rúmen (Baldwin et al., 2004), além de manterem o pH ruminal mais elevado, devido ao maior tamanho de partícula e perfil de fermentação (Žitňan et al., 1998). A manutenção de pH ruminal mais elevado suporta populações microbianas associadas tipicamente com forragens, que por sua vez alteram a produção de butirato e propionato para acetato.

Vários estudos recentes mostraram que proporcionar acesso à vontade a feno picado, promove a ingestão de alimentos sólidos em bezerros, ao contrário do que tradicionalmente foi aconselhado (Jiao et al., 2015). Castells et al. (2013) realizaram uma meta-análise e concluíram que não havia diferenças no preenchimento intestinal entre os bezerros que não consumiam forragem e os que consumiam forragem até 5% do consumo total de alimento sólido. Entretanto, o efeito que o fornecimento de forragem poderia ter a longo prazo no ecossistema microbiano do rúmen ainda não foi determinado.

Estudos recentes sugerem que seria realmente possível promover o estabelecimento de diferentes populações microbianas no rúmen do animal jovem, manipulando o manejo da

alimentação no início da vida, de forma que esta persista na vida adulta (Yáñez-Ruiz et al., 2010; Abecia et al., 2013; Abecia et al., 2014). Isso criaria diferenças na capacidade adaptativa pelas diferentes experiências iniciais de vida, levando à ideia de programação microbiana (Yáñez-Ruiz et al., 2015).

2.5. Microbioma intestinal em bezerros leiteiros

A microbiota intestinal é dominada por poucos filos bacterianos, sendo os mais dominantes os Bacteroidetes e Firmicutes (Ley et al., 2006), enquanto em nível de espécie e de cepas, a grande diversidade contribui para a grande variabilidade interindividual (Dethlefsen et al., 2006). Ewing e Cole (1994) descreveram as primeiras bactérias a colonizarem os intestinos, *Lactobacillus spp.* e *Streptococcus spp.*, provavelmente originárias do canal vaginal ou do colostro. Em sequência instalam-se *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* e *Clostridium spp.*. Além dos anaeróbios facultativos, as espécies anaeróbicas de *Bifidobacterium* também estão presentes em contagens elevadas nos intestinos de neonatos com uma semana de idade (Jost et al., 2012).

Microrganismos enterotoxigênicos, como *E. coli* e *Salmonella spp.*, são responsáveis por grande parte dos casos de diarreia neonatal em bezerros (Izzo et al., 2011). A diarreia foi citada como sendo a principal causa de morbidade e mortalidade em bezerros durante o período de aleitamento (dos Santos e Bittar, 2015; Alta Cria 2019; Fruscalso et al., 2020). Oikonomou et al. (2013) relataram uma ligação entre a menor incidência de diarreia em bezerros com 4 semanas de idade e a prevalência de *Faecalibacterium*, além de maior ganho de peso corporal. Ou seja, há microrganismos benéficos que podem ajudar a minimizar os casos de diarreia neonatal.

A colonização intestinal microbiana no início da vida é extremamente importante para o desenvolvimento de funções metabólicas, maturação do sistema imunológico e saúde futura dos bezerros (Gomez et al., 2017; Kouritzin e Guan, 2017). Além disso, bactérias comensais no intestino protegem contra invasões de microrganismos patogênicos (Martin et al., 2010; Kamada et al., 2013; Kouritzin e Guan, 2017), estimulam e mantêm a integridade da barreira mucosa intestinal, além de produzir uma variedade de substratos metabólicos benéficos (Leahy et al., 2005; Fukuda et al., 2011; Motherway et al., 2011).

O fornecimento da dieta líquida ao neonato tem implicações consideráveis no desenvolvimento da microbiota intestinal, pois vários dos seus constituintes, como os

oligossacarídeos, selecionam para uma microbiota intestinal altamente adaptada, dominada por bifidobactérias (Pacheco et al., 2015). No entanto, o tipo e a disponibilidade de nutrientes dos sucedâneos são diferentes daquela observada no leite, o que pode trazer grandes impactos na colonização do intestino do animal.

Dependendo da idade e taxa de alimentação, entre outras variáveis, 5 a 20% da matéria seca (MS) do leite consumido não é digerida (Guilloteau et al., 1986; Hill et al., 2010). No caso do sucedâneo lácteo, estas quantidades podem ser ainda maiores. Apesar deste, presumivelmente, maior fluxo de nutrientes fermentáveis no intestino posterior do bezerro pré-ruminante, pouca informação está disponível a respeito de como a atividade microbiana precoce pode afetar o desenvolvimento e a saúde do intestinal (Oikonomou et al., 2013) em comparação com o desenvolvimento ruminal. Portanto, durante a fase pré-ruminante do bezerro, o aumento no suprimento de substrato fermentável pode resultar na colonização bacteriana e estabelecimento da fermentação no intestino posterior, que são comparativamente iguais ou mais relevantes do que no intestino anterior para a saúde e sobrevivência do recém-nascido (Castro et al., 2016).

Os bezerros com menor diversidade microbiana, de acordo com avaliação em amostras fecais, também estiveram associados a maiores taxas de incidência de diarreia e pneumonia (Oikonomou et al., 2013). Esses achados são possíveis, pois o estabelecimento da microbiota do TGI, também estimula o desenvolvimento do sistema imunológico (Ishii et al., 2008) e pode ajudar os bezerros a enfrentarem desafios imunes além daqueles localizados no TGI.

O conhecimento sobre o microbioma intestinal em bezerras leiteiras ainda é limitado, e os mecanismos de influência desse microbioma sobre o desenvolvimento e a saúde intestinal ainda são desconhecidos e indefinidos (Kouritzin e Guan, 2017). Alguns estudos sugerem que amostras fecais podem não revelar o verdadeiro microbioma intestinal associado a mucosa e seus efeitos no hospedeiro (Malmuthuge et al., 2014, Malmuthuge et al., 2015b). No entanto, recentemente outros autores argumentaram que a composição microbiana fecal pode ser um bom indicador do microbioma gastrointestinal (Vandeputte et al., 2017), além de ser um método não invasivo que permite a coleta ao longo do período de aleitamento.

2.6. Dieta como fator de manipulação do microbioma gastrintestinal

A composição da comunidade microbiana do TGI é influenciada tanto pela dieta quanto pela idade do animal. A idade é fator para o aumento da diversidade e homogeneidade (Jami et al., 2013). Por outro lado, a dieta desempenha papel significativo na definição da estrutura do microbioma dos ruminantes e da saúde geral do TGI (Kreikemeier et al., 1990). A dieta é um fator contribuinte muito forte no estabelecimento da microbiota do TGI e pode servir como uma ferramenta para alterar direcionalmente a microbiota no início da vida (Dill-McFarland et al., 2019). A manipulação da microbiota do TGI na fase de aleitamento pode resultar no estabelecimento efetivo de uma microbiota alvo que permanece estável até a idade adulta (Malmuthuge e Guan, 2016). Segundo Dias et al. (2017), a manipulação da microbiota ruminal no aleitamento pode ser possível pela intervenção dietética, além de ser útil para projetar estratégias destinadas a promover a colonização de microrganismos alvos ligados ao melhor desenvolvimento da bezerra. Isso permite selecionar microrganismos benéficos, dando suporte ao seu maior crescimento, e possibilitando a redução de microrganismos patogênicos, causadores de diversas doenças em bezerras, como por exemplo, a diarreia.

Sabe-se que o microbioma do rúmen de animal adulto é resistente a mudanças sutis na dieta. As alterações na composição dos microbiomas podem ser transitórias, ocorrendo somente durante o período de suplementação (Weimer, 2015). Este fato sugere que manipulações da microbiota podem ser desafiadoras, uma vez que elas são resilientes (Abecia et al., 2018). Em contraste, a microbiota dos neonatos é mais sensível às pressões externas, como o uso de antibióticos, mudanças na composição das dietas líquida ou sólida (Mulder et al., 2011; Malmuthuge et al., 2015b). Dessa forma, faz-se necessária a avaliação da microbiota do TGI no mesmo indivíduo durante todo o seu desenvolvimento, de bezerra à vaca, para determinar quando as alterações na microbiota seriam mais eficientes em melhorar a produção de leite futura.

As mudanças de composição na microbiota gastrintestinal, que são causadas por fatores externos durante o início da vida, têm um impacto em longo prazo sobre os fenótipos do hospedeiro (Russell et al., 2012; Abecia et al., 2013). Isso implica em potenciais utilizações de ferramentas e técnicas de manipulação microbiana em neonatos que podem resultar em

composições e funções microbianas desejáveis em ruminantes mais velhos como menor produção de metano, maior eficiência de produção de leite ou taxas de ganho de peso.

Os ruminantes jovens que recebem concentrado desde o nascimento, além do leite, têm maior capacidade de digerir celulose e amido em comparação aos animais que recebem apenas leite (Poe et al., 1971). O consumo de alimentos sólidos aumenta o desenvolvimento de populações microbianas, resultando em maior utilização de alimentos (Coverdale et al., 2004). Alterações na dieta sólida, como na proporção forragem/concentrado, podem causar alterações na comunidade bacteriana ruminal no início da vida, e persistirem por até quatro meses (Yáñez-Ruiz et al., 2010)

A dieta líquida também exerce impacto fundamental sobre a microbiota intestinal. Por exemplo, o leite bovino contém cerca de 40 oligossacarídeos que potencialmente impedem a ligação de patógenos ao epitélio intestinal e servem como nutrientes para populações de bactérias benéficas no intestino (Pacheco et al., 2015). Além disso, a lactoferrina, presente no leite bovino, possui propriedades antimicrobianas, quelantes de ferro, anti-inflamatórias e prebióticas (Pacheco et al., 2015).

A modulação na dieta associada a práticas de manejo pode afetar o perfil microbiano do TGI em bezerros neonatos (Malmuthuge et al., 2015b). Dessa forma, pode melhorar o status de saúde, prevenir a colonização por microrganismos patogênicos no TGI e reduzir reações inflamatórias (Alimirzaei et al., 2020). Além disso, há a possibilidade de os efeitos da modulação permanecerem até a idade adulta do animal. No entanto, falta uma compreensão abrangente do efeito de modulação dietética na microbiota intestinal. Esse conhecimento pode fornecer uma compreensão aprofundada dos mecanismos por trás das mudanças funcionais em resposta a intervenções alimentares. O entendimento das interações microbianas e a relação com animal são vitais para o planejamento de ferramentas e técnicas eficazes para melhorar a saúde intestinal e o desempenho animal (Malmuthuge e Guan, 2017).

Referências

- Abecia, L., A.I. Martín-García, G. Martínez, C.J. Newbold, and D.R. Yáñez-Ruiz. 2013. Nutritional intervention in early life to manipulate rumen microbial colonization and methane output by kid goats postweaning¹. *J. Anim. Sci.* 91:4832–4840.
- Abecia, L., E. Ramos-Morales, G. Martínez-Fernandez, A. Arco, A.I. Martín-García, C.J. Newbold, and D.R. Yáñez-Ruiz. 2014. Feeding management in early life influences microbial colonisation and fermentation in the rumen of newborn goat kids. *Anim. Prod. Sci.* 54:1449.
- Abecia, L., G. Martínez-Fernandez, K. Waddams, A.I. Martín-García, E. Pinloche, C.J. Creevey, S.E. Denman, C.J. Newbold, and D.R. Yáñez-Ruiz. 2018. Analysis of the Rumen Microbiome and Metabolome to Study the Effect of an Antimethanogenic Treatment Applied in Early Life of Kid Goats. *Front. Microbiol.* 9:1–14.
- Adlerberth, I., and A.E. Wold. 2009. Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatr. Int. J. Paediatr.* 98:229–238.
- Akin, D.E., and W.S. Borneman. 1990. Role of Rumen Fungi in Fiber Degradation. *J. Dairy Sci.* 73:3023–3032.
- Alimirzaei, M., Y.A. Alijoo, M. Dehghan-Banadaky, and M. Eslamizad. 2020. The effects of feeding high or low milk levels in early life on growth performance, fecal microbial count and metabolic and inflammatory status of Holstein female calves. *Animal* 14:303–311.
- Alta Cria 2019. 2019. Autores: Azevedo, R.A., L.F.Martins, P.M.Tiveron, A.M. Teixeira, C.M.M. Bittar, L.C.M.S.Antunes, J.E.P. Santos, P.P. Rotta, R.M. Meneses and S.Ge. Coelho: Uberaba, Minas Gerais, 110p.
- Anderson, K.L., T.G. Nagaraja, J.L. Morrill, T.B. Avery, S.J. Galitzer, and J.E. Boyer. 1987. Ruminal microbial development in conventionally or early-weaned calves. *J. Anim. Sci.* 64:1215–1226.
- Avguštin, G., R.J. Wallace, and H.J. Flint. 1997. Phenotypic diversity among ruminal isolates of *Prevotella ruminicola*: Proposal of *Prevotella brevis* sp. nov., *Prevotella bryantii* sp. nov., and *Prevotella albensis* sp. nov. and redefinition of *Prevotella ruminicola*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:284–288.

- Baldwin, R.L.L., K.R.R. McLeod, J.L.L. Klotz, and R.N.N. Heitmann. 2004. Rumen Development, Intestinal Growth and Hepatic Metabolism In The Pre- and Postweaning Ruminant. *J. Dairy Sci.* 87:E55–E65.
- Ballou, M.A. 2011. Effects of a blend of prebiotics, probiotics, and hyperimmune dried egg protein on the performance, health, and innate immune responses of Holstein calves. *Prof. Anim. Sci.* 27:262–268.
- Beharka, A.A., T.G. Nagaraja, J.L. Morrill, G.A. Kennedy, and R.D. Klemm. 1998. Effects of Form of the Diet on Anatomical, Microbial, and Fermentative Development of the Rumen of Neonatal Calves. *J. Dairy Sci.* 81:1946–1955.
- Bekele, A.Z., S. Koike, and Y. Kobayashi. 2010. Genetic diversity and diet specificity of ruminal *Prevotella* revealed by 16S rRNA gene-based analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 305:49–57.
- Bettelheim, K.A., A. Breadon, M.C. Faiers, S.M. O'farrell, and R.A. Shooter. 1974. The origin of O serotypes of *Escherichia coli* in babies after normal delivery. *J. Hyg. (Lond).* 72:67–70.
- Bezirtzoglou, E. 1997. The intestinal microflora during the first weeks of life. Pages 173–177 in *Anaerobe*. Academic Press.
- Bi, Y., M.S. Cox, F. Zhang, G. Suen, N. Zhang, Y. Tu, and Q. Diao. 2019. Feeding modes shape the acquisition and structure of the initial gut microbiota in newborn lambs. *Environ. Microbiol.* 21:2333–2346.
- Brook, I., C.T. Barrett, C.R. Brinkman, W.J. Martin, and S.M. Finegold. 1979. Aerobic and anaerobic bacterial flora of the maternal cervix and newborn gastric fluid and conjunctiva: A prospective study. *Pediatrics* 63:451–455.
- Brooks, G.F., K.C. Carroll, J.S. Butel, and S.A. Morse. 2007. *Medical Microbiology*, 24th Edition.
- Candela, M., S. Maccaferri, S. Turrone, P. Carnevali, and P. Brigidi. 2010. Functional intestinal microbiome, new frontiers in prebiotic design. *Int. J. Food Microbiol.* 140:93–101.
- Cannon, S.J., G.C. Fahey, L.L. Pope, L.L. Bauer, R.L. Wallace, B.L. Miller, and J.K. Drackley. 2010. Inclusion of psyllium in milk replacer for neonatal calves. 2. Effects on volatile fatty acid concentrations, microbial populations, and gastrointestinal tract size. *J. Dairy Sci.* 93:4744–4758.
- Castells, L., A. Bach, A. Aris, and M. Terré. 2013. Effects of forage provision to young calves on rumen fermentation and development of the gastrointestinal tract. *J. Dairy Sci.* 96:5226–5236.

- Castro, J.J.J., A. Gomez, B.A. White, J.R.R. Loftén, J.K.K. Drackley, H.J. Mangian, J.R.R. Loftén, and J.K.K. Drackley. 2016. Changes in the intestinal bacterial community, short-chain fatty acid profile, and intestinal development of preweaned Holstein calves. 2. Effects of gastrointestinal site and age¹. *J. Dairy Sci.* 99:9703–9715.
- Chaucheyras-Durand, F., and F. Ossa. 2014. The rumen microbiome: Composition, abundance, diversity, and new investigative tools. *Prof. Anim. Sci.* 30:1–12.
- Clemmons, B.A., B.H. Voy, and P.R. Myer. 2019. Altering the Gut Microbiome of Cattle: Considerations of Host-Microbiome Interactions for Persistent Microbiome Manipulation. *Microb. Ecol.* 77:523–536.
- Conroy, M.E., H.N. Shi, and W.A. Walker. 2009. The long-term health effects of neonatal microbial flora. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 9:197–201.
- Costello, E.K., K. Stagaman, L. Dethlefsen, B.J.M. Bohannan, and D.A. Relman. 2012. The application of ecological theory toward an understanding of the human microbiome. *Science.* 336:1255–1262.
- Coverdale, J.A., H.D. Tyler, J.D. Quigley, and J.A. Brumm. 2004. Effect of Various Levels of Forage and Form of Diet on Rumen Development and Growth in Calves. *J. Dairy Sci.* 87:2554–2562.
- Czarnecki-Maulden, G.L. 2008. Effect of dietary modulation of intestinal microbiota on reproduction and early growth. *Theriogenology* 70:286–290.
- Davis, C.L., and J.K. Drackley. 1998. *The Development, Nutrition, and Management of the Young Calf.* Iowa State University Press.
- de Oliveira, M.N.V., K.A. Jewell, F.S. Freitas, L.A. Benjamin, M.R. Tótola, A.C. Borges, C.A. Moraes, and G. Suen. 2013. Characterizing the microbiota across the gastrointestinal tract of a Brazilian Nelore steer. *Vet. Microbiol.* 164:307–314.
- Dehority, B.A. 1998. Microbial interactions in the rumen. *Rev. Fac. Agron.* 15:69–86.
- Dethlefsen, L., P.B. Eckburg, E.M. Bik, and D.A. Relman. 2006. Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol. Evol.* 21:517–523.
- Deusch, S., B. Tilocca, A. Camarinha-Silva, and J. Seifert. 2015. News in livestock research - Use of Omics-technologies to study the microbiota in the gastrointestinal tract of farm animals. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 13:55–63.
- Diao, Q. yu, R. Zhang, and Y. Tu. 2017. Current research progresses on calf rearing and nutrition in China. *J. Integr. Agric.* 16:2805–2814.

- Dias, J., M.I. Marcondes, M.F. Noronha, R.T. Resende, F.S. Machado, H.C. Mantovani, K.A. Dill-McFarland, and G. Suen. 2017. Effect of Pre-weaning Diet on the Ruminal Archaeal, Bacterial, and Fungal Communities of Dairy Calves. *Front. Microbiol.* 8.
- Dias, J., M.I. Marcondes, S. Motta de Souza, B. Cardoso da Mata e Silva, M. Fontes Noronha, R. Tassinari Resende, F.S. Machado, H. Cuquetto Mantovani, K.A. Dill-McFarland, and G. Suen. 2018. Bacterial Community Dynamics across the Gastrointestinal Tracts of Dairy Calves during Prewaning Development. *Appl. Environ. Microbiol.* 84:e02675-17.
- Dill-McFarland, K.A., J.D. Breaker, and G. Suen. 2017. Microbial succession in the gastrointestinal tract of dairy cows from 2 weeks to first lactation. *Sci. Rep.* 7:40864.
- Dill-McFarland, K.A., P.J. Weimer, J.D. Breaker, and G. Suen. 2019. Diet Influences Early Microbiota Development in Dairy Calves without Long-Term Impacts on Milk Production. *Appl. Environ. Microbiol.* 85:1–12.
- Dominguez-Bello, M.G., E.K. Costello, M. Contreras, M. Magris, G. Hidalgo, N. Fierer, and R. Knight. 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:11971–11975.
- dos Santos, G., and C.M.M. Bittar. 2015. A survey of dairy calf management practices in some producing regions in Brazil. *Rev. Bras. Zootec.* 44:361–370.
- Dubos, R., R.W. Schaedler, R. Costello, and P. Hoet. 1965. Indigenous, normal, and autochthonous flora of the gastrointestinal. *J. Exp. Med.* 122:67–76.
- Duffy, L.C., M.A. Zielesny, M. Riepenhoff-Talty, D. Dryja, S. Sayahtheri-Altaie, E. Griffiths, D. Ruffin, H. Barrett, and P.L. Ogra. 1994. Reduction of virus shedding by *B. bifidum* in experimentally induced MRV infection statistical application for ELISA. *Dig. Dis. Sci.* 39:2334–2340.
- Ewing, W.N. (Wesley N., and D.J.A. Cole. 1994. *The Living Gut: An Introduction to Micro-Organisms in Nutrition*. Context, Dungannon, Co. Tyrone, N. Ireland.
- Fischer, A., Y. Song, Z. He, D. Haines, L.L. Guan, and M.A. Steele. 2018. Effect of delaying colostrum feeding on passive transfer and intestinal bacterial colonization in neonatal male Holstein calves. *J. Dairy Sci.* 101:3099–3109.
- Flatt, W.P., R.G. Warner, and J.K. Loosli. 1958. Influence of Purified Materials on the Development of the Ruminant Stomach. *J. Dairy Sci.* 41:1593–1600.

- Fleige, S., W. Preißinger, H.H.D. Meyer, and M.W. Pfaffl. 2007. Effect of lactulose on growth performance and intestinal morphology of pre-ruminant calves using a milk replacer containing *Enterococcus faecium*. *animal* 1:367.
- Flint, H.J., and E.A. Bayer. 2008. Plant cell wall breakdown by anaerobic microorganisms from the mammalian digestive tract. Pages 280–288 in *Annals of the New York Academy of Sciences*. Blackwell Publishing Inc.
- Fonty, G., J. Senaud, J.P. Jouany, and P. Gouet. 1988. Establishment of ciliate protozoa in the rumen of conventional and conventionalized lambs: influence of diet and management conditions. *Can. J. Microbiol.* 34:235–241.
- Fonty, G., J.P. Jouany, M. Chavarot, F. Bonnemoy, and P. Gouet. 1991. Development of the rumen digestive functions in lambs placed in a sterile isolator a few days after birth. *Reprod. Nutr. Dev.* 31:521–528.
- Fonty, G., P. Gouet, J.P. Jouany, and J. Senaud. 1987. Establishment of the microflora and anaerobic fungi in the rumen of lambs. *J. Gen. Microbiol.* 133:1835–1843.
- Fouhy, F., C.M. Guinane, S. Hussey, R. Wall, C.A. Ryan, E.M. Dempsey, B. Murphy, R.P. Ross, G.F. Fitzgerald, C. Stanton, and P.D. Cotter. 2012. High-throughput sequencing reveals the incomplete, short-term recovery of infant gut microbiota following parenteral antibiotic treatment with ampicillin and gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:5811–5820.
- Fruscalso, V., G. Olmos, and M.J. Hötzel. 2020. Dairy calves' mortality survey and associated management practices in smallholding, pasture-based herds in southern Brazil. *Prev. Vet. Med.* 175.
- Fukuda, S., H. Toh, K. Hase, K. Oshima, Y. Nakanishi, K. Yoshimura, T. Tobe, J.M. Clarke, D.L. Topping, T. Suzuki, T.D. Taylor, K. Itoh, J. Kikuchi, H. Morita, M. Hattori, and H. Ohno. 2011. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469:543–549.
- Fukushima, Y., Y. Kawata, H. Hara, A. Terada, and T. Mitsuoka. 1998. Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *Int. J. Food Microbiol.* 42:39–44.
- Gálfi, P., S. Neogrady, T. Sakata, P. Galfi, S. Neogrady, and T. Sakata. 1991. Effects of volatile fatty acids on the epithelial cell proliferation of the digestive tract and its hormonal

- mediation. *Physiol. Asp. Dig. Metab. Ruminants Proc. Seventh Int. Symp. Rumin. Physiol.* 49–59
- Gibson, G.R., and X. Wang. 1994. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 77:412–420.
- Gill, H.S., K.J. Rutherford, J. Prasad, and P.K. Gopal. 2000. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Br. J. Nutr.* 83:167–176.
- Gill, S.R., M. Pop, R.T. DeBoy, P.B. Eckburg, P.J. Turnbaugh, B.S. Samuel, J.I. Gordon, D.A. Relman, C.M. Fraser-Liggett, and K.E. Nelson. 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science.* 312:1355–1359.
- Glauber, J.G., N.J. Wandersee, J.A. Little, and G.D. Ginder. 1991. 5'-flanking sequences mediate butyrate stimulation of embryonic globin gene expression in adult erythroid cells. *Mol. Cell. Biol.* 11:4690–4697.
- Godden, S.M., D.J. Smolenski, M. Donahue, J.M. Oakes, R. Bey, S. Wells, S. Sreevatsan, J. Stabel, and J. Fetrow. 2012. Heat-treated colostrum and reduced morbidity in preweaned dairy calves: Results of a randomized trial and examination of mechanisms of effectiveness. *J. Dairy Sci.* 95:4029–4040.
- Gomez, D.E.E., L.G.G. Arroyo, M.C.C. Costa, L. Viel, and J.S.S. Weese. 2017. Characterization of the Fecal Bacterial Microbiota of Healthy and Diarrheic Dairy Calves. *J. Vet. Intern. Med.* 31:928–939.
- Guilloteau, P., R. Toullec, J.F. Grongnet, P. Patureau-Mirand, J. Prugnaud, and D. Sauvant. 1986. Digestion of milk, fish and soya-bean protein in the preruminant calf: flow of digesta, apparent digestibility at the end of the ileum and amino acid composition of ileal digesta. *Br. J. Nutr.* 55:571–592.
- Guilloteau, P., R. Zabielski, and J.W. Blum. 2009. Gastrointestinal tract and digestion in the young ruminant: ontogenesis, adaptations, consequences and manipulations. *J. Physiol. Pharmacol.* 60 Suppl 3:37–46.
- Guzman, C.E., L.T. Bereza-Malcolm, B. De Groef, and A.E. Franks. 2015. Presence of Selected Methanogens, Fibrolytic Bacteria, and Proteobacteria in the Gastrointestinal Tract of Neonatal Dairy Calves from Birth to 72 Hours. *PLoS One* 10:e0133048.

- Henderson, G., F. Cox, S. Ganesh, A. Jonker, W. Young, L. Abecia, E. Angarita, P. Aravena, G. Nora Arenas, C. Ariza, G.T. Attwood, J. Mauricio Avila, J. Avila-Stagno, A. Bannink, R. Barahona, M. Batistotti, M.F. Bertelsen et al. 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Sci. Rep.* 5.
- Hill, T.M., H.G. Bateman, J.M. Aldrich, and R.L. Schlotterbeck. 2010. Effect of milk replacer program on digestion of nutrients in dairy calves. *J. Dairy Sci.* 93:1105–1115.
- Hooper, L. V, L. Bry, P.G. Falk, and J.I. Gordon. 1998. Host-microbial symbiosis in the mammalian intestine: exploring an internal ecosystem. *Bioessays* 20:336–43.
- Houpt, T.R. 1970. Transfer of urea and ammonia to the rumen. In: Phillipson AT (ed.) *Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant*. Newcastle-upon-Tyne, UK: Oriel Press, pp. 119–131.
- Hungate, R.E. 1966. *The Rumen and Its Microbes*. Elsevier.
- Hungate, R.E. 1975. The Rumen Microbial Ecosystem. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 6:39–66.
- Ishii, K.J., S. Koyama, A. Nakagawa, C. Coban, and S. Akira. 2008. Host Innate Immune Receptors and Beyond: Making Sense of Microbial Infections. *Cell Host Microbe* 3:352–363.
- Izzo, M.M., P.D. Kirkland, V.L. Mohler, N.R. Perkins, A.A. Gunn, and J.K. House. 2011. Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea. *Aust. Vet. J.* 89:167–173.
- Jami, E., A. Israel, A. Kotser, and I. Mizrahi. 2013. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *ISME J.* 7:1069–1079.
- Janssen, P.H., and M. Kirs. 2008. Structure of the archaeal community of the rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:3619–3625.
- Jiao, J., X. Li, K.A. Beauchemin, Z. Tan, S. Tang, and C. Zhou. 2015. Rumen development process in goats as affected by supplemental feeding v. grazing: Age-related anatomic development, functional achievement and microbial colonisation. *Br. J. Nutr.* 113:888–900.
- Jost, T., C. Lacroix, C.P. Braegger, and C. Chassard. 2012. New Insights in Gut Microbiota Establishment in Healthy Breast Fed Neonates. *PLoS One* 7.
- Kamada, N., G.Y. Chen, N. Inohara, and G. Núñez. 2013. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat. Immunol.* 14:685–690.

- Karasov, W.H., C. Martínez del Rio, and E. Caviedes-Vidal. 2011. Ecological Physiology of Diet and Digestive Systems. *Annu. Rev. Physiol.* 73:69–93.
- Kempton, T.J., J. V. Nolan, and R.A. Leng. 1977. Principles for the use of non-protein nitrogen and by-pass proteins in diets for ruminants.
- Khan, M.A.A., A. Bach, D.M.M. Weary, and M.A.G.A.G. von Keyserlingk. 2016. Invited review: Transitioning from milk to solid feed in dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 99:885–902.
- Kim, M., M. Morrison, and Z. Yu. 2011. Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 76:49–63.
- Kouritzin, V.A., and L. Guan. 2017. The Colonization and Establishment of the Neonatal Mammalian Microbiome. *Fine Focus* 3:89–99.
- Kreikemeier, K.K., D.L. Harmon, J.P. Peters, K.L. Gross, C.K. Armendariz, and C.R. Krehbiel. 1990. Influence of dietary forage and feed intake on carbohydrase activities and small intestinal morphology of calves. *J. Anim. Sci.* 68:2916–2929.
- Leahy, S.C., D.G. Higgins, G.F. Fitzgerald, and D. Sinderen. 2005. Getting better with bifidobacteria. *J. Appl. Microbiol.* 98:1303–1315.
- Ley, R.E., C.A. Lozupone, M. Hamady, R. Knight, and J.I. Gordon. 2008. Worlds within worlds: Evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:776–788.
- Ley, R.E., F. Bäckhed, P. Turnbaugh, C.A. Lozupone, R.D. Knight, and J.I. Gordon. 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:11070–11075.
- Ley, R.E., P.J. Turnbaugh, S. Klein, and J.I. Gordon. 2006. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444:1022–1023.
- Li, R.W., E.E. Connor, C. Li, R.L. Baldwin VI, and M.E. Sparks. 2012. Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomic tools. *Environ. Microbiol.* 14:129–139.
- Li, R.W., Sparks, M.E., Connor Erin, E. 2011. Dynamics of the rumen microbiota. In *Metagenomics and Its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies*. Li, R.W. (ed.). New York, USA: Nova Science Publishers. 135–164.
- Lukens, J.R., P. Gurung, P. Vogel, G.R. Johnson, R.A. Carter, D.J. McGoldrick, S.R. Bandi, C.R. Calabrese, L. Vande Walle, M. Lamkanfi, and T.D. Kanneganti. 2014. Dietary modulation of the microbiome affects autoinflammatory disease. *Nature* 516:246–249.

- Mackie, R.I., A. Sghir, and H.R. Gaskins. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 69:1035S-1045S.
- Malmuthuge, N., and L.L. Guan. 2016. Gut microbiome and omics: a new definition to ruminant production and health. *Anim. Front.* 6:8–12.
- Malmuthuge, N., and L.L. Guan. 2017. Understanding the gut microbiome of dairy calves: Opportunities to improve early-life gut health. *J. Dairy Sci.* 100:5996–6005.
- Malmuthuge, N., P.J. Griebel, and L.L. Guan. 2014. Taxonomic Identification of Commensal Bacteria Associated with the Mucosa and Digesta throughout the Gastrointestinal Tracts of Preweaned Calves. *Appl. Environ. Microbiol.* 80:2021–2028.
- Malmuthuge, N., P.J. Griebel, and L.L. Guan. 2015b. The Gut Microbiome and Its Potential Role in the Development and Function of Newborn Calf Gastrointestinal Tract. *Front. Vet. Sci.* 2:36.
- Malmuthuge, N., Y. Chen, G. Liang, L.A. Goonewardene, and L.L. Guan. 2015a. Heat-treated colostrum feeding promotes beneficial bacteria colonization in the small intestine of neonatal calves. *J. Dairy Sci.* 98:8044–8053.
- Mao, S., M. Zhang, J. Liu, and W. Zhu. 2015. Characterising the bacterial microbiota across the gastrointestinal tracts of dairy cattle: membership and potential function. *Sci. Rep.* 5:16116.
- Martin, R., A.J. Nauta, K. Ben Amor, L.M.J. Knippels, J. Knol, and J. Garssen. 2010. Early life: Gut microbiota and immune development in infancy. *Benef. Microbes* 1:367–382.
- Meale, S.J., S. Li, P. Azevedo, H. Derakhshani, J.C. Plaizier, E. Khafipour, and M.A. Steele. 2016. Development of Ruminal and Fecal Microbiomes Are Affected by Weaning But Not Weaning Strategy in Dairy Calves. *Front. Microbiol.* 7:1–16.
- Miron, J., D. Ben-Ghedalia, and M. Morrison. 2001. Invited review: Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *J. Dairy Sci.* 84:1294–1309.
- Morgavi, D.P., E. Forano, C. Martin, and C.J. Newbold. 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal* 4:1024–1036.
- Motherway, M.O.C., A. Zomer, S.C. Leahy, J. Reunanen, F. Bottacini, M.J. Claesson, F. O'Brien, K. Flynn, P.G. Casey, J.A.M. Munoz, B. Kearney, A.M. Houston, C. O'Mahony, D.G. Higgins, F. Shanahan, A. Palva, W.M. De Vos, G.F. Fitzgerald, M. Ventura, P.W. O'Toole, and D. Van Sinderen. 2011. Functional genome analysis of *Bifidobacterium breve*

- UCC2003 reveals type IVb tight adherence (Tad) pili as an essential and conserved host-colonization factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:11217–11222.
- Mulder, I.E., B. Schmidt, M. Lewis, M. Delday, C.R. Stokes, M. Bailey, R.I. Aminov, B.P. Gill, J.R. Pluske, C.-D. Mayer, and D. Kelly. 2011. Restricting Microbial Exposure in Early Life Negates the Immune Benefits Associated with Gut Colonization in Environments of High Microbial Diversity. *PLoS One* 6:e28279.
- Myer, P.R., T.P.L. Smith, J.E. Wells, L.A. Kuehn, and H.C. Freetly. 2015. Rumen Microbiome from Steers Differing in Feed Efficiency. *PLoS One* 10:e0129174.
- Nagaraja, T.G. 2016. *Microbiology of the rumen*. Springer International Publishing.
- Neish, A.S. 2009. Microbes in Gastrointestinal Health and Disease. *Gastroenterology* 136:65–80.
- O’Hara, A.M., and F. Shanahan. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 7:688–693.
- Oikonomou, G., A.G.V. Teixeira, C. Foditsch, M.L. Bicalho, V.S. Machado, and R.C. Bicalho. 2013. Fecal Microbial Diversity in Pre-Weaned Dairy Calves as Described by Pyrosequencing of Metagenomic 16S rDNA. Associations of Faecalibacterium Species with Health and Growth. *PLoS One* 8:e63157.
- Oliveira Filho, J.P., D.P.G. Silva, M.D. Pacheco, L.M. Mascarini, M.G. Ribeiro, A.F.A.A. Alfieri, A.F.A.A. Alfieri, D.T. Stipp, B.J.P. Barros, and A.S. Borges. 2007. Diarréia em bezerros da raça Nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. *Pesqui. Veterinária Bras.* 27:419–424.
- Oliveira, J.S. de, A. de M. Zanine, and E.M. Santos. 2007. Fisiologia, manejo e alimentação de bezerros de corte. *Arq. Ciências Veterinárias e Zool. da UNIPAR* 10:39–48..
- Pacheco, A.R., D. Barile, M.A. Underwood, and D.A. Mills. 2015. The Impact of the Milk Glycobiome on the Neonate Gut Microbiota. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 3:419–445.
- Penders, J., C. Thijs, C. Vink, F.F. Stelma, B. Snijders, I. Kummeling, P.A. Van Den Brandt, and E.E. Stobberingh. 2006. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118:511–521.
- Perdigon, G., S. Alvarez, M. Rachid, G. Agüero, and N. Gobbato. 1995. Immune System Stimulation by Probiotics. *J. Dairy Sci.* 78:1597–1606.

- Pitta, D.W., W.E. Pinchak, S.E. Dowd, J. Osterstock, V. Gontcharova, E. Youn, K. Dorton, I. Yoon, B.R. Min, J.D. Fulford, T.A. Wickersham, and D.P. Malinowski. 2010. Rumen Bacterial Diversity Dynamics Associated with Changing from Bermudagrass Hay to Grazed Winter Wheat Diets. *Microb. Ecol.* 59:511–522.
- Poe, S.E., D.G. Ely, G.E. Mitchell, W.P. Deweese, and H.A. Glimp. 1971. Rumen development in lambs. I. Microbial digestion of starch and cellulose. *J. Anim. Sci.* 32:740–743.
- Rey, M., F. Enjalbert, S. Combes, L. Cauquil, O. Bouchez, and V. Monteils. 2014. Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning is sequential. *J. Appl. Microbiol.* 116:245–257.
- Russell, J.B., and D.B. Wilson. 1996. Why Are Ruminal Cellulolytic Bacteria Unable to Digest Cellulose at Low pH? *J. Dairy Sci.* 79:1503–1509.
- Russell, S.L., M.J. Gold, M. Hartmann, B.P. Willing, L. Thorson, M. Wlodarska, N. Gill, M.R. Blanchet, W.W. Mohn, K.M. McNagny, and B.B. Finlay. 2012. Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. *EMBO Rep.* 13:440–447.
- Sander, E.G., R.G. Warner, H.N. Harrison, and J.K. Loosli. 1959. The Stimulatory Effect of Sodium Butyrate and Sodium Propionate on the Development of Rumen Mucosa in the Young Calf. *J. Dairy Sci.* 42:1600–1605.
- Sansonetti, P.J., and R. Medzhitov. 2009. Learning Tolerance while Fighting Ignorance. *Cell* 138:416–420.
- Savage, D.C. 1977. Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. *Annu. Rev. Microbiol.* 31:107–133.
- Simone, C. De, A. Ciardi, A. Grassi, S.L. Gardini, S. Tzantzoglou, V. Trinchieri, S. Moretti, and E. Jirillo. 1992. Effect of bifidobacterium bifidum and lactobacillus acidophilus on gut mucosa and peripheral blood b lymphocytes. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 14:331–340.
- Sommer, F., M. Ståhlman, O. Ilkayeva, J.M. Arnemo, J. Kindberg, J. Josefsson, C.B. Newgard, O. Fröbert, and F. Bäckhed. 2016. The Gut Microbiota Modulates Energy Metabolism in the Hibernating Brown Bear *Ursus arctos*. *Cell Rep.* 14:1655–1661.
- Stevenson, D.M., and P.J. Weimer. 2007. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75:165–174.

- Suarez-Mena, F.X., A.J. Heinrichs, C.M. Jones, T.M. Hill, and J.D. Quigley. 2016. Straw particle size in calf starters: Effects on digestive system development and rumen fermentation. *J. Dairy Sci.* 99:341–353.
- Tajima, K., R.I. Aminov, T. Nagamine, H. Matsui, M. Nakamura, and Y. Benno. 2001. Diet-Dependent Shifts in the Bacterial Population of the Rumen Revealed with Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2766–2774.
- Tamate, H., A.D. McGilliard, N.L. Jacobson, and R. Getty. 1962. Effect of Various Dietaries on the Anatomical Development of the Stomach in the Calf. *J. Dairy Sci.* 45:408–420.
- Taschuk, R., and P.J. Griebel. 2012. Commensal microbiome effects on mucosal immune system development in the ruminant gastrointestinal tract. *Anim. Heal. Res. Rev.* 13:129–141.
- Uyeno, Y., Y. Sekiguchi, K. Tajima, A. Takenaka, M. Kurihara, and Y. Kamagata. 2010. An rRNA-based analysis for evaluating the effect of heat stress on the rumen microbial composition of Holstein heifers. *Anaerobe* 16:27–33.
- Vandeputte, D., R.Y. Tito, R. Vanleeuwen, G. Falony, and J. Raes. 2017. Practical considerations for large-scale gut microbiome studies. *FEMS Microbiol. Rev.* 41:S154–S167.
- Warner, R.G., W.P. Flatt, and J.K. Loosli. 1956. Dietary factors influencing the development of the ruminant stomach. *J. Agric. Food Chem.* 4:788–792.
- Weimer, P.J. 2015. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: Implications for engineering improved ruminal fermentations. *Front. Microbiol.* 6:296.
- Weston, R.H., and J.P. Hogan. 1968. The digestion of pasture plants by sheep i. Ruminal production of volatile fatty acids by sheep offered diets of ryegrass and forage oats. *Aust. J. Agric. Res.* 19:419–432.
- Williams, A.G., and G.S. Coleman. 1997. *The rumen protozoa*. Springer Netherlands.
- Wu, G.D., C. Compher, E.Z. Chen, S.A. Smith, R.D. Shah, K. Bittinger, C. Chehoud, L.G. Albenberg, L. Nessel, E. Gilroy, J. Star, A.M. Weljie, H.J. Flint, D.C. Metz, M.J. Bennett, H. Li, F.D. Bushman, and J.D. Lewis. 2016. Comparative metabolomics in vegans and omnivores reveal constraints on diet-dependent gut microbiota metabolite production. *Gut* 65:63–72.
- Xu, J., M.A. Mahowald, R.E. Ley, C.A. Lozupone, M. Hamady, E.C. Martens, B. Henrissat, P.M. Coutinho, P. Minx, P. Latreille, H. Cordum, A. Van Brunt, K. Kim, R.S. Fulton, L.A. Fulton,

- S.W. Clifton, R.K. Wilson, R.D. Knight, and J.I. Gordon. 2007. Evolution of Symbiotic Bacteria in the Distal Human Intestine. *PLoS Biol.* 5:e156.
- Yáñez-Ruiz, D.R., B. Macías, E. Pinloche, and C.J. Newbold. 2010. The persistence of bacterial and methanogenic archaeal communities residing in the rumen of young lambs. *FEMS Microbiol. Ecol.* 72:272–278.
- Yáñez-Ruiz, D.R., L. Abecia, and C.J. Newbold. 2015. Manipulating rumen microbiome and fermentation through interventions during early life: a review. *Front. Microbiol.* 6:1–12.
- Yeoman, C.J., and B. a White. 2014. Gastrointestinal Tract Microbiota and Probiotics in Production Animals. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2:469–486.
- Žitňan, R., J. Voigt, U. Schönhusen, J. Wegner, M. Kokardová, H. Hagemeister, M. Levkut, S. Kuhla, and A. Sommer. 1998. Influence of dietary concentrate to forage ratio on the development of rumen mucosa in calves. *Arch. Anim. Nutr.* 51:279–291.

3. MICROBIOMA RUMINAL E FECAL DE BEZERROS LEITEIROS ALIMENTADOS COM DIFERENTES NÍVEIS E FONTES DE FDN

Resumo

A composição da comunidade microbiana do TGI é influenciada pela dieta e pela idade do animal. Diferentes níveis e fontes de FDN podem modificar o microbioma gastrointestinal. Este estudo avaliou 18 bezerros da raça Holandesa alojados em gaiolas individuais suspensas e sem cama, alimentados com um dos três tratamentos: 22FDN – concentrado convencional contendo 22% de FDN ($n = 7$); 31FDN - concentrado com 31% de FDN, substituindo parte do milho por casca de soja ($n = 6$); e 22Feno - concentrado convencional com 22% de FDN mais feno coast cross a vontade ($n = 5$). Todos os animais receberam 4 L de sucedâneo lácteo diariamente (23,8% PB; 18,5% de gordura; diluídos em 12,5% de sólidos), divididos em duas refeições, sendo desaleitados na 8ª semana de idade. Após o desaleitamento, os animais foram alojados em abrigos tropicais até a 10ª semana, alimentados com a respectiva dieta sólida e feno coast cross a vontade para todos os tratamentos. Para avaliar o microbioma, amostras de fluido ruminal foram coletadas duas horas após a alimentação matinal, usando uma sonda oral Geishauser modificada, nas semanas 2, 4, 6, 8 e 10, e amostras fecais foram coletadas no nascimento (0) e nas semanas 1, 2, 4, 8 e 10. A comunidade microbiana foi determinada pelo sequenciamento de amplicons das regiões V3 e V4 do gene 16S rRNA que foi amplificado por PCR e sequenciado pela plataforma Illumina MiSeq. O microbioma ruminal não apresentou diferenças na diversidade para os efeitos de semanas, tratamentos ou interação de ambos os fatores. Dezesesseis filos bacterianos foram identificados e os mais abundantes foram Bacteroidota (34,62%), Firmicutes_A (22,97%), Firmicutes_C (19,60%), Actinobacteriota (7,97%) e Proteobacteria (4,40%). Os gêneros mais abundantes no líquido ruminal foram *Prevotella* (28,21%), *Succinivibrio* (2,94%), *CAG-791* (2,43%), *Pseudoscardovia* (2,12%) e *Treponema_D* (2,06%). Nas fezes, os índices de diversidade e uniformidade foram maiores no 22Feno quando comparado ao 22FDN, sem diferença para 31FDN ($P < 0,03$). Todos os índices foram significativamente afetados pela idade dos bezerros ($P < 0,001$). O tempo 0 teve a maior diversidade e riqueza. As semanas 1 e 2 tiveram menos uniformidade e diversidade. A estrutura da comunidade bacteriana nas fezes foi influenciada apenas pela idade ($P < 0,001$). Foram identificados 25 filos bacterianos, e os mais abundantes foram Bacteroidota (36,32%), Firmicutes_A (30,32%), Firmicutes_C (9,26%), Proteobacteria (7,60%) e Actinobacteriota (6,35%). Os gêneros mais abundantes foram *Prevotella* (12,35%), *Faecalibacterium* (7,05%), *RC9* (3,36%), *Megamonas* (3,17%) e *Phascolarctobacterium_A* (3,11%). Provavelmente o microbioma ruminal foi influenciado pela monensina presente no concentrado. O suprimento de feno foi eficaz apenas na modificação do microbioma fecal de bezerros leiteiros.

Palavras-chave: Feno; Microbiota intestinal; Monensina; Nutrição animal.

Abstract

The composition of the GIT microbial community is influenced by both the diet and the age of the animal. Different levels and sources of NDF can modify the gastrointestinal microbiome. This study evaluated 18 Holstein calves housed in not-bedded suspended individual cages, fed one of three treatments: 22NDF - conventional starter containing 22% NDF (n = 7); 31NDF - starter with 31% NDF, replacing part of the corn by soybean hull (n = 6); and 22Hay - conventional starter with 22% NDF plus coast-cross hay ad libitum (n = 5). All animals received 4 L of milk replacer daily (24% CP; 18.5% fat; diluted to 12.5% solids), divided into two meals, being weaned at 8th week of age. After weaning, animals were housed in tropical shelters until week 10, fed with the respective solid diet and coast-cross hay ad libitum for all treatments. To evaluate the microbiome, ruminal fluid samples were collected using a modified Geishauser oral probe at weeks 2, 4, 6, 8 and 10, two hours after the morning feeding, and fecal samples were collected at birth (0) and weeks 1, 2, 4, 8 and 10. The microbial community was determined by sequencing V3 and V4 region amplicons of the 16S rRNA gene that was amplified by PCR and sequenced by the Illumina MiSeq platform. The ruminal microbiome had no differences in diversity for the effects of weeks, treatments, or interaction of both factors. Sixteen bacterial phyla were identified, and the most abundant were Bacteroidota (34.62%), Firmicutes_A (22.97%), Firmicutes_C (19.60%), Actinobacteriota (7.97%) and Proteobacteria (4.40%). The most abundant genera in rumen fluid were *Prevotella* (28.21%), *Succinivibrio* (2.94%), *CAG-791* (2.43%), *Pseudoscardovia* (2.12%) and *Treponema_D* (2.06%). In feces, the diversity indices and evenness were higher for 22Hay when compared to 22NDF, with no difference for 31NDF ($P < 0.03$). All indices were significantly affected by calves age ($P < 0.001$). The point 0 had the greatest diversity and richness. Week 1 and 2 had less evenness and diversity. The structure of the bacterial community in feces was influenced only by age ($P < 0.001$). Twenty-five bacterial phyla were identified, and the most abundant were Bacteroidota (36.32%), Firmicutes_A (30.32%), Firmicutes_C (9.26%), Proteobacteria (7.60%) and Actinobacteriota (6.35%). The most abundant genera were *Prevotella* (12.35%), *Faecalibacterium* (7.05%), *RC9* (3.36%), *Megamonas* (3.17%), and *Phascolarctobacterium_A* (3.11%). Probably the rumen microbiome was influenced by the monensin present in the starter concentrate. The supply of hay was only effective in modifying the fecal microbiome of dairy calves.

Keywords: Hay; Intestinal microbiota; Monensin; Animal nutrition.

3.1. Introdução

O ambiente ruminal tem sido foco das maiores pesquisas com ruminantes adultos. Da mesma forma, muitos estudos com bovinos jovens se concentraram no desenvolvimento da função ruminal e na sucessão microbiana (Li et al., 2012; Rey et al., 2012; Wu et al., 2012; Jami et al., 2013; Rey et al., 2014; Jiao et al., 2015; Dias et al., 2017). Entretanto, nos últimos anos, a microbiota intestinal também foi alvo de estudos nesses animais, analisando-se amostras fecais (Uyeno et al., 2010; Oikonomou et al., 2013; Myer et al., 2016). No entanto, mesmo com uma série de pesquisas sobre esse tema, a relação de como a microbiota coloniza e se estabelece no TGI, principalmente em bezerros em aleitamento não foi ainda totalmente elucidada (Dias et al., 2018).

Conhecer e entender como os microrganismos se estabelecem no TGI tem implicações ecológicas e fisiológicas importantes na criação econômica, no desenvolvimento e na saúde dos bezerros e, também, na eficiência produtiva do animal a longo prazo (Li et al., 2012). Além disso, compreender como a alimentação e o manejo dos animais podem alterar a microbiota ruminal e intestinal poder ser uma janela de oportunidade para melhoria de desempenho e saúde dos animais.

A dieta, especialmente a dieta sólida, representa um dos fatores mais importantes que afetam o microbioma (Biesheuvel et al., 1991). Dessa forma, a composição do concentrado inicial tem grande influência na composição bacteriana e no desenvolvimento ruminal (Lengemann e Allen, 1959; Fonty et al., 1987; Carberry et al., 2014; Khan et al., 2016; Diao et al., 2019), pois além de servir como inóculo constante de microrganismos, serve também como substrato para crescimento dos mesmos.

A composição em ingredientes e em nutrientes dos concentrados iniciais é muito variável. O concentrado rico em amido é rapidamente fermentável pela microbiota, causando diminuição do pH ruminal, e dessa forma, pode inibir o crescimento microbiano de grupos mais sensíveis ao pH mais baixo. Assim, o conteúdo mínimo de fibra é fundamental para manter um ambiente ruminal adequado para os microrganismos e produzir bezerros saudáveis que possam responder a diferentes manejos alimentares (Poczynek et al., 2020). Davis e Drackley (1998) sugerem concentrados contendo de 16 a 25% de FDN. Essa ampla faixa de recomendação tem como objetivo além de garantir um material de alta digestibilidade, garantir também a saúde do epitélio ruminal. No entanto, o teor ideal de fibras

na dieta de bezerros em aleitamento ainda é motivo de discussão (Daneshvar et al., 2015). Além disso, não se sabe como o microbioma do TGI responde a essas variações de FDN no concentrado.

A inclusão de feno na dieta de bezerros em aleitamento poderia ser uma alternativa, uma vez que pode estimular o estabelecimento de populações microbianas específicas, como bactérias celulolíticas (Pounden e Hibbs, 1948; Hibbs et al., 1956; Bryant et al., 1958). Outra alternativa é a inclusão de ingredientes com fibra de alta digestibilidade em substituição ao milho, como a casca de soja (Zambom et al., 2001) ou a polpa cítrica (Oltramari et al., 2018), que podem ser utilizadas como fonte de energia, além de manter o teor de fibra da dieta adequado, e reduzir a concentração de lactato (Cunningham et al., 1993). No entanto, a literatura é escassa sobre como esses ingredientes poderiam afetar a microbiota do TGI de bezerros em aleitamento.

O objetivo com o presente trabalho foi analisar a evolução do microbioma gastrointestinal de bezerros em aleitamento recebendo dietas sólidas com diferentes níveis (22 ou 31% na matéria seca) e fontes de FDN (casca de soja ou feno).

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Animais, instalações e manejo alimentar

O Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” / Universidade de São Paulo aprovou todos os procedimentos envolvendo animais neste estudo (Protocolo nº. 2018.5.586.11.7).

O experimento foi desenvolvido nas instalações do Bezerreiro Experimental “Evilásio de Camargo”, do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP, localizado na cidade de Piracicaba – SP, no período de julho a dezembro de 2017. O estudo fez parte de um experimento maior em que foram utilizados 35 bezerros da raça holandesa, recém-nascidos e alimentados com 4L de colostro de alta qualidade (>50g/L) nas primeiras 6h de vida, conforme recomendação da literatura (Godden, 2008). Foram utilizados apenas animais que apresentaram proteína sérica acima de 5,5g/dL às 48h de vida (Elsohaby et al., 2018). O delineamento experimental foi de blocos casualizados, sendo utilizados o sexo, o peso ($37,33 \pm 1.33\text{Kg}$) e a data de nascimento dos bezerros como fator de blocagem. O período experimental foi 56 dias de aleitamento. Os dados de desempenho, saúde, parâmetros

ruminais e sanguíneos já foram publicados e detalhes do manejo estão descritos no artigo de Poczynek et al. (2020).

Do nascimento aos 56 dias os animais foram alojados em gaiolas individuais suspensas (113cm x 140cm), em galpão arejado, utilizando tapete de borracha como cama. Os animais tiveram livre acesso à água e ao concentrado inicial em cochos individuais localizados na parte frontal da gaiola.

A dieta líquida utilizada foi o sucedâneo lácteo (23,8% PB e 18,5% de gordura, Sprayfo Azul, Sloten de Brasil Ltd, Santos, SP, Brasil) diluído a 12,5% de sólidos, fornecido em baldes, no volume de 4 L/d, divididos em duas refeições (7h e 17h). Conforme descrito por Poczynek et al. (2020), este baixo volume de dieta líquida foi fornecido para estimular de maneira mais rápida o consumo de concentrado de forma que os efeitos da dieta sólida fossem mais marcantes.

Foram avaliadas três dietas sólidas, baseadas em dois concentrados iniciais (Tabela 1), formuladas de acordo com o NRC (2001) para atender as exigências de bezerros em aleitamento:

- 1) 22FDN: concentrado inicial contendo 22% de FDN (controle);
- 2) 22Feno: concentrado inicial contendo 22% de FDN, com oferta de feno de coast-cross picado ad libitum em cocho separado do concentrado.
- 3) 31FDN: concentrado inicial contendo 31% de FDN, com substituição parcial do milho por casquinha de soja;

Os teores de FDN no controle (22FDN) foram definidos considerando-se as recomendações de teor de fibra no concentrado de bezerros entre 16 a 25% de FDN sugeridas por Davis e Drackley (1998), resultando em concentrado com 10,1% de hemicelulose, 11,0% de celulose e 0,83% de lignina. O teor de FDN do concentrado com FDN elevado (31FDN) foi definido com o objetivo de estudar o efeito de elevar o FDN além do recomendado fazendo o uso de um coproduto disponível na indústria nacional, com boa qualidade da fibra que resultou em valores de 10,8% de hemicelulose, 19,0% de celulose e 1,2% de lignina. A dieta sólida baseada em concentrado e oferta livre de feno de gramínea picado foi definida considerando que esta é a prática mais comumente utilizada pelos produtores. Nesta situação os animais regulam o consumo tanto de concentrado, quanto de feno. O feno utilizado no

presente trabalho tem fibra de menor qualidade (29,5% hemicelulose, 34,8% celulose e 5,3% de lignina).

Tabela 1. Composição química e ingredientes das diferentes dietas experimentais.

Composição	22FDN	31FDN	22FENO
Composição, % MS			
Matéria seca, % Matéria natural	88,7	89,5	88,5
Matéria mineral	8,3	8,7	7,2
Proteína bruta	18,5	18,9	11,8
Fibra em detergente neutro	22,0	31,0	69,6
Fibra em detergente ácido	11,9	20,2	40,1
Lignina	0,83	1,2	5,3
Extrato Etéreo	2,8	2,6	1,3
Carboidratos não fibrosos	48,6	40,1	-
Nutrientes digestíveis totais	84,8	78,9	54,0
Ingredientes, % MS			
Milho moído	56	42	56
Farelo de soja	29	27	29
Casca de soja	11	27	11
Premix mineral/vitamínico ¹	4	4	4

¹Composição do Premix mineral/vitamínico: Ca 20%; P 6,5%; F 650 ppm; Na 4%; K 1%; Mg 7%; S 0,7 %; Co 25 ppm; Cu 800 ppm; Cr 20 ppm; I 40 ppm; Fe 1400 ppm; Mn 1500 ppm; Se 18 ppm; Zn 3200 ppm; Vit. A 140.000 UI/kg; Vit. D3 50.000 UI/kg; Vit. E 1500 UI/kg; Vit. B1 250, Vit B2 250.000 ppm; Vit B6 250 ppm; Vit. B12 250 ppm; Niacina 400 ppm; Ác. Pantotênico 500 ppm; Ác. Fólico 20 ppm; Biotina 10 ppm; B.H.T 800ppm, Monensina sódica 900 ppm.

3.2.2. Animais utilizados para avaliação do microbioma

Concomitante ao experimento de desempenho, foram selecionados 18 animais para a realização do estudo de microbioma, sendo sete para o tratamento 22FDN, cinco para o 22Feno e seis para o 31FDN. Além dos 56 dias de aleitamento, os animais permaneceram mais 14 dias em experimento para posteriores coletas.

Aos 56 dias de idade, iniciou-se o desaleitamento dos animais no aleitamento vespertino, com redução de 0,5L da dieta líquida por refeição, de modo que aos 58 dias os animais estavam desaleitados. A partir do desaleitamento, os animais foram alojados em abrigos do tipo casinha tropical até os 70 dias de idade, com livre acesso à água, ao mesmo concentrado do período de aleitamento e feno picado, agora para todos os grupos.

3.2.2.1. Coletas de fluido ruminal e fecal

Amostras de fluido ruminal foram colhidas nos dias 14 (S2), 28 (S4), 42 (S6), 56 (S8) e 70 (S10) de vida, duas horas após o fornecimento das dietas pela manhã. As colheitas foram

realizadas por via oro esofágica, utilizando-se uma mangueira flexível de 150 cm de comprimento, 1,3cm de diâmetro interno e 0,2cm de espessura de parede, a qual era conectada a uma bomba de vácuo (Modelo TE-0581, Tecnal Ltda., Piracicaba, SP, Brasil). As amostras foram colhidas, descartando-se a porção inicial de forma a se evitar a contaminação com saliva. Após filtragem em tecido de algodão, uma alíquota foi armazenada em tubete plástico estéril de 2mL, e congelado em freezer a -20°C, para posterior avaliação do microbioma

Amostras fecais foram coletadas no dia 0 ($\pm$ 2 horas após o nascimento, antes do fornecimento de colostro) e posteriormente nos dias 7 (S1), 14 (S2), 28 (S4), 56 (S8) (desaleitamento) e 70 (S10) (pós-desaleitamento). As amostras foram coletadas manualmente, de forma asséptica, diretamente do reto dos animais, utilizando-se uma luva de látex para cada animal, evitando-se contaminação cruzada das amostras. Cerca de 2g de fezes foram colhidos, acondicionadas em tubos estéreis, e congeladas imediatamente a -20°C.

Em caso de perda da coleta de amostra de fluído ruminal ou fezes, por demora no processo ou ausência de material (fecal), uma nova tentativa era realizada no dia seguinte, e caso, novamente, houvesse algum tipo de problema, essa coleta era descartada.

3.2.3. Avaliação do microbioma

3.2.3.1. Extração de DNA

A extração do DNA das amostras de rúmen e de fezes, foi realizada com o kit de extração QIAamp® Fast DNA Stool Minikit (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo o protocolo do fabricante. A qualidade das amostras de DNA da comunidade de microrganismos foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% e as concentrações das mesmas foram quantificadas em espectrofotômetro modelo NanoDrop® ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA).

3.2.3.2. Preparo de biblioteca e sequenciamento

O preparo das bibliotecas foi realizado seguindo as recomendações Illumina (Figura 1). A região hipervariável V3-V4 do gene 16S rRNA foi sequenciada com a plataforma Illumina MiSeq V2 (Illumina, San Diego, CA, EUA) e as leituras produzidas foram de 2x250 pb.

Figura 1. Princípio do preparo das bibliotecas, segundo recomendação da Illumina.

3.2.3.3. Análise de dados

Os dados foram analisados seguindo um pipeline previamente publicado (Callahan et al., 2016), usando o pacote DADA2 no R (R Core Team, 2019) para gerar variantes exatas da sequência de amplicons (ASVs; Amplicon Sequencing Variants) (Wang et al., 2007). A função `assignTaxonomy` toma como entrada um conjunto de sequências (ASVs) a serem classificadas e um conjunto de treinamento de sequências de referência com taxonomia conhecida, e atribui taxonomias. O banco de dados GTDB: Genome Taxonomy Database versão r89 foi utilizado como referência (Parks et al., 2017).

As classificações taxonômicas geradas pelo DADA2, e suas quantificações, foram importadas para o programa `phyloseq` (McMurdie e Holmes, 2013), também implementado no R. Foram utilizadas as ferramentas para ecologia e análise filogenética, `VEGAN` (Dixon, 2003), `ade4` (Dray e Dufour, 2007), `ape` (Paradis e Schliep, 2019), e `Picante` (Kembel et al., 2010), o `ggplot2` (Wickham, 2009) foi utilizado para produzir gráficos de alta qualidade. As análises de diversidade Alfa e Beta foram realizadas no pacote `phyloseq`, conforme descrito em (Callahan et al., 2016). Foram filtradas as ASVs que não foram classificadas em pelo menos até o nível de família, e ASVs assinaladas como mesmo gênero foram aglomeradas. Após a aplicação destes filtros, foram obtidas as tabelas de contagens brutas de abundância e de abundância relativa.

Em seguida, as contagens taxonômicas contidas no objeto `phyloseq` foram importadas para o pacote `edgeR` (Robinson et al., 2010) para normalização dos tamanhos das bibliotecas de cada amostra (Robinson e Oshlack, 2010), subsequentemente as contagens foram transformadas para o logaritmo base 2 das contagens por milhão (`logCPM`) de cada amostra (transformação `voom`) (Law et al., 2014). Estas transformações permitem que os modelos lineares implementados no pacote `limma` (Ritchie et al., 2015) sejam usados na

análise de abundância diferencial. Finalmente, após o ajuste do modelo linear com limma, a abundância taxonômica diferencial foi testada para cada contraste (par de tratamentos) com testes t moderados (Smyth, 2004). O programa STAMP 2.1.3 (Parks et al., 2014) foi utilizado para ilustrar a abundância diferencial entre os tratamentos.

3.3. Resultados

3.3.1. Resultados de desempenho

Segundo os dados publicados por Poczynek et al. (2020), os diferentes níveis e fontes de FDN não alteraram o consumo de concentrado e consumo total de dieta sólida. O consumo de FDN do concentrado ($P < 0,01$) e da dieta total ($P < 0,01$) foi maior para da dieta 31FDN em comparação as demais durante ao aleitamento. O peso ao desaleitamento, o ganho médio diário, a eficiência alimentar, as medidas corporais, os metabólitos sanguíneos e o escore fecal não foram afetados pelas diferentes dietas, mas todas mostraram efeito para idade, em função do aumento no consumo de concentrado. Em relação aos parâmetros ruminiais, a dieta 31FDN tendeu a maior concentração total de AGCC ($P = 0,06$), enquanto a dieta 22FDN resultou em maior concentração de N-amoniacal em comparação as outras dietas ($P < 0,01$). As diferentes dietas sólidas não afetaram o pH ruminal ou fecal.

3.3.2. Comunidade bacteriana no fluído ruminal

A análise de perfil microbiano foi realizada usando dados da sequência de amplicons do gene 16S rRNA. Os índices de diversidade α (Shannon e Simpson), riqueza (Chao1), uniformidade (Pielou) da comunidade bacteriana no rúmen não foram afetados pelas diferentes dietas sólidas ou pela idade dos animais, assim como pela interação entre esses fatores (Tabela 2).

Tabela 2. Índices de diversidade alfa, riqueza e uniformidade microbiana do fluído ruminal de bezerras alimentados com dietas sólidas contendo diferentes níveis e fontes de FDN

Índices	Dietas sólidas			p-valor		
	22FDN	22Feno	31FDN	DS ¹	I	DS x I
Shannon	2,12 ± 0,44	2,03 ± 0,44	2,10 ± 0,33	0,704	0,150	0,654
Simpson	0,77 ± 0,11	0,75 ± 0,12	0,78 ± 0,12	0,650	0,309	0,947
Chao1	39,83 ± 10,54	40,05 ± 11,80	40,45 ± 15,69	0,983	0,157	0,141
Pielou	0,58 ± 0,10	0,56 ± 0,10	0,58 ± 0,07	0,570	0,336	0,950

¹ DS = efeito da dieta sólida; I = efeito da idade; DS x I = efeito da interação entre dieta sólida e idade dos animais.

A análise de diversidade β também não mostrou efeitos das dietas sólidas ($P = 0,125$), idade dos animais ($P = 0,702$) ou da interação entre esses fatores ($P = 0,809$) (Figura 2). A comunidade bacteriana no fluído ruminal foi representada em duas abordagens: escalonamento multidimensional (MDS, Figura 2a) e análise de correspondência destendenciada (DCA, Figura 2b), que mostra a métrica de distância UniFrac ponderada. Em ambas abordagens não é possível observar diferenças tanto entre os tratamentos quanto entre as semanas.

Figura 2. Estrutura da comunidade microbiana em amostras ruminiais de bezerros alimentados com dietas sólidas contendo diferentes níveis e fontes de FDN. Escalonamento multidimensional (MDS) e análise de correspondência destendenciada (DCA) mostrando a métrica de distância UniFrac ponderada.

Em relação a composição microbiana do fluído ruminal, foram identificados um total de 16 filos bacterianos. No geral, os filos predominantes foram Bacteroidota (34,62%), Firmicutes_A (22,97%), Firmicutes_C (19,60%), Actinobacteriota (7,97%) e Proteobacteria (4,40%), que corresponderam a 89,56% do total. Independente da dieta sólida ou da idade do animal, o filo Bacteroidota foi o predominante. Dos 16 filos, 10 apresentaram abundância $\geq 1\%$, e cinco com abundância entre 0,1 e 1%. No entanto, há muita variação entre indivíduos (Figura 3).

Figura 3. Abundância relativa bacteriana a nível de filo em amostras de fluido ruminal em bezerros alimentados com dietas sólidas contendo diferentes níveis e fontes de FDN. Cada barra representa a indentificação da amostra analisada: X-SYR, onde X é o animal, SY, a semana a qual foi realizada a coleta, e R de rúmen.

Desses 16 filos, foram quantificados 217 gêneros no fluido ruminal, sendo identificados apenas 169 gêneros. Desses, 11 apresentavam abundância $\geq 1\%$, e 31 com abundância entre 0,1 e 1%. Os demais 48 gêneros permanecem sem identificação no banco de dados do GTDB. No entanto, vale ressaltar que sete desses gêneros sem identificação apresentaram abundância $\geq 1\%$, e outros sete entre 0,1 e 1%. Entre os identificados, pode-se destacar os predominantes, como o gênero *Prevotella* (28,21%), *Succinivibrio* (2,94%), *CAG-791* (2,43%), *Pseudoscardovia* (2,12%) e *Treponema_D* (2,06%) (Figura 4). Gêneros não identificados (NI) corresponderam a 39,0% do total. Dentre os NI, pode-se destacar um membro da família Lachnospiraceae e outro da família Selenomonadaceae, com abundâncias de 15,24% e 10,39%, respectivamente.

Independente da dieta sólida ou da idade do animal, o gênero *Prevotella* foi o mais abundante. De todos os gêneros quantificados, apenas três estiveram presentes em todas as amostras, sendo um gênero NI da família Lachnospiraceae, e os gêneros *Pyramidobacter* e *Prevotella*, o que pode representar um microbioma central e resiliente a esse tipo de dieta.

Figura 4. Abundância relativa bacteriana a nível de gênero para amostras de fluido ruminal em bezerros alimentados com dietas sólidas contendo diferentes níveis de FDN. Cada barra representa a indentificação da amostra analisada: X-SYR, onde X é o animal, SY, a semana a qual foi realizada a coleta, e R de rúmen.

Para a análise de abundância diferencial entre os grupos, foram considerados comparações entre as dietas sólidas, dentro de cada semana de idade dos animais. Dos 169 gêneros identificados, apenas 63 foram significativos no total entre as comparações testadas para tratamentos dentro das semanas, e 26 foram significativos apenas em uma única semana de vida. Uma observação interessante a respeito desses dados refere-se ao número de interações significativas. Na 2ª semana, foram 35 interações, sendo alteradas para 14, 11, 15 e finalmente 19 interações, respectivamente para 4ª, 6ª, 8ª e 10ª semana de vida (Figura 5).

Figura 5. Abundância diferencial em gêneros bacterianos abundantes em amostras de fluido ruminal em bezerros alimentados com dietas sólidas com diferentes níveis e fontes de FDN. Gêneros listados apresentaram abundância média $\geq 0,01\%$. Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste t ($P > 0,05$). Cada coluna representa a média dos animais amostrados naquela semana específica dentro da sua dieta.

3.3.3. Comunidade bacteriana fecal

A diversidade microbiana fecal mostrou resultados bem diferentes dos encontrados na comunidade bacteriana ruminal. Os índices de diversidade α (Shannon e Simpson) e a uniformidade (Pielou) foram superiores em amostras de animais recebendo a dieta 22Feno quando comparada à dieta 22FDN, não diferindo da dieta 31FDN. A idade dos animais afetou de forma significativa os índices de diversidade, riqueza e uniformidade, no entanto, não houve efeito de interação da dieta sólida e da idade dos animais (Tabela 3).

Tabela 3. Índices de diversidade alfa, riqueza e uniformidade microbiana em amostras fecais de bezerros alimentados com dietas sólidas contendo diferentes níveis e fontes de FDN

Índices	Dietas sólidas			p-valor		
	22FDN	22Feno	31FDN	DS ¹	I	DS x I
Shannon	2,57 ± 0,58 ^b	2,82 ± 0,52 ^a	2,65 ± 0,52 ^{ab}	0,027	< 0,001	0,131
Simpson	0,85 ± 0,09 ^b	0,89 ± 0,06 ^a	0,85 ± 0,06 ^{ab}	0,022	< 0,001	0,124
Chao1	57,47 ± 27,54	56,96 ± 21,91	59,31 ± 28,91	0,870	< 0,001	0,595
Pielou	0,65 ± 0,10 ^b	0,71 ± 0,07 ^a	0,66 ± 0,08 ^{ab}	0,002	< 0,001	0,068

¹DS = efeito da dieta sólida; I = efeito da idade; DS x I = efeito da interação entre dieta sólida e idade dos animais

Todos os índices analisados apresentaram efeito significativo da idade dos animais ($P > 0,0001$; Figura 6). De forma geral, as amostras coletadas no tempo 0 (até duas horas após o nascimento) apresentaram maior diversidade, riqueza e uniformidade. As semanas 4, 8 e 10 foram semelhantes ao tempo 0 em diversidade α , pelo índice de Simpson, e uniformidade (Pielou). Amostras coletadas nas semanas 1 e 2 foram as que tiveram menor diversidade α , tanto Simpson quanto Shannon, além de menor uniformidade (Pielou).

Figura 6. Índices de diversidade (Shannon e Simpson), riqueza (Chao1) e uniformidade (Pielou) em amostras fecais de bezerros alimentados com dietas sólidas contendo diferentes níveis de FDN

A avaliação da diversidade β mostra que houve efeito apenas para a idade dos animais ($P < 0,001$), sem efeito das dietas ou da interação desses fatores ($P = 0,206$; $= 0,088$). Os efeitos da idade dos animais podem ser observados na Figura 7, a partir da avaliação dos índices de diversidade β , MDS e DCA.

Figura 7. Estrutura da comunidade microbiana em amostras fecais de bezerros alimentados com dietas sólidas contendo diferentes níveis de FDN. Escalonamento multidimensional (MDS) e análise de correspondência destendenciada (DCA) mostrando a métrica de distância UniFrac ponderada.

Foram identificados 27 filos bacterianos nas amostras fecais. Os cinco filos mais abundantes corresponderam a 89,8% do total, compreendendo os filos Bacteroidota (36,32%), Firmicutes_A (30,32%), Firmicutes_C (9,26%), Proteobacteria (7,60%) e Actinobacteriota (6,35%) (Figura 8). Independente da dieta, Bacteroidota e Firmicutes_A foram os filos predominantes nas amostras de fezes. Já em relação à idade dos animais ou o efeito da idade dentro das dietas sólidas, houve muita variação e nenhum filo pode ser considerado como predominante.

Figura 8. Abundância relativa bacteriana a nível de filo em amostras de fecais de bezerras alimentados com dietas sólidas contendo diferentes níveis de FDN. Cada barra representa a indentificação da amostra analisada: X-SYR, onde X é o animal, SY, a semana a qual foi realizada a coleta, e F de fezes.

Nas amostras fecais, foram quantificados 457 gêneros, sendo identificados no banco de dados, apenas 361 (79%). Os gêneros mais prevalentes foram *Prevotella* (12,35%), *Faecalibacterium* (7,05%), *RC9* (3,36%), *Megamonas* (3,17%) e *Phascolarctobacterium_A* (3,11%) (Figura 9). Nas amostras fecais, o gênero *Prevotella* foi numericamente menos abundante quando comparado ao fluído ruminal. Outros gêneros menos abundantes representaram cerca de 44% do total e os não identificados cerca de 26,8% do total. *Prevotella* e *Faecalibacterium* foram os gêneros predominantes independente da dieta sólida fornecida aos animais.

O tempo 0 apresentou maior riqueza quando comparado aos demais tempos de coletas. Quando se avalia o banco de dados desconsiderando essas amostras, tem-se um total de 143 gêneros, entre identificados e não identificados. Ou seja, 314 gêneros que podem ser considerados transitórios.

Figura 9. Abundância relativa bacteriana a nível de gênero em amostras de fecais de bezerros alimentados com dietas sólidas contendo diferentes níveis de FDN. Cada barra representa a indentificação da amostra analisada: X-SYR, onde X é o animal, SY, a semana a qual foi realizada a coleta, e F de fezes.

Para a análise de abundância diferencial entre os grupos, foram consideradas comparações entre as dietas sólidas, dentro de cada semana de idade do animal. Dos 457 gêneros, apenas 96 foram significativos no total entre as comparações testadas. Assim como no fluido ruminal, o número de interações diminui muito em relação ao tempo 0 (42 interações significativa), quando se avalia as interações significativas na semana 1 (29 interações), e posteriormente nas semanas 2 (23), 4 (16), 8 (21) e 10 (14) de idade dos animais (Figura 10).

Figura 10. Abundância diferencial em gêneros bacterianos abundantes em amostras de fluido ruminal em bezerros alimentados com dietas sólidas com diferentes níveis e fontes de FDN. Gêneros listados apresentaram abundância média $\geq 0,01\%$. Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste t ($P > 0,05$). Cada coluna representa a média dos animais amostrados naquela semana específica dentro da sua dieta.

3.4. Discussão

3.4.1. Diversidade microbiana ruminal

Segundo Malmuthuge e Guan (2017), a diversidade microbiana no rúmen é muito dependente da dieta, ou seja, do substrato disponível para ser fermentado. Além disso, a diversidade possui uma forte especificidade com o hospedeiro. Dias et al. (2017) encontraram maior diversidade microbiana ruminal para animais que receberam concentrado durante o aleitamento em comparação a animais que foram alimentados exclusivamente com leite integral. Biscarini et al. (2018) também encontraram maior diversidade para animais suplementados com bagaço de uva em comparação ao grupo controle, ambas as dietas com nível de FDN (20%) similar a uma das dietas do presente estudo. No entanto, no presente trabalho, mesmo os diferentes níveis e fontes de FDN não foram suficientes para alterar a diversidade microbiana ruminal. Era esperado que animais suplementados com o feno apresentassem maior diversidade ruminal, assim como ocorreu no trabalho de Kim et al. (2016). Como observado no trabalho de Poczynek et al. (2020), as diferentes dietas, além de não afetarem o consumo de concentrado, que foi abaixo do esperado para animais recebendo apenas 4 L/d de leite, também não afetaram a maioria dos parâmetros ruminais, com exceção do N-amoniacal.

Trabalhos anteriores relataram que as comunidades bacterianas no rúmen mudaram com a idade (Jami et al., 2013; Rey et al., 2014; Dill-McFarland et al., 2017). Jami et al. (2013) sugeriram que há a transição de uma comunidade heterogênea e menos distinta para uma população bacteriana madura mais homogênea e diversa quando adultos. No trabalho de Dill-McFarland et al. (2017), bezerros amostrados alguns dias após o desaleitamento tinham uma comunidade ruminal mais diversa em comparação aos bezerros amostrados durante aleitamento. O mesmo não ocorreu no presente trabalho, uma vez que a diversidade microbiana não variou ao longo do período de aleitamento e permaneceu semelhante no pós-desaleitamento.

Uma possibilidade para a ausência de efeito da composição de dieta sólida e da idade dos animais na diversidade, seja a presença de monensina no premix mineral/vitamínico. A monensina é um ionóforo que interrompe o fluxo de íons através das membranas microbianas, causando morte celular (Schelling, 1984). Além de ser utilizado no controle de

coccidiose (Bangoura e Bardsley, 2020), em ruminantes é usada para limitar os efeitos da acidose ruminal (Clemmons et al., 2019). No entanto, não existem trabalhos na literatura que avaliem se a concentração de monensina adequada para tratar coccidiose pode afetar o estabelecimento e desenvolvimento do microbioma ruminal em bezerros leiteiros em aleitamento.

Em novilhos de corte, Thomas et al. (2017) observaram que a associação de monensina (478,3 mg/Kg de MS) e tilosina (96 mg/Kg de MS) diminuiu a diversidade microbiana ruminal quando comparados a animais que nunca receberam nenhum tipo de ionóforo, beta-agonistas, antibióticos ou antimicrobianos. Outro ponto importante que esses autores observaram é que a composição em nível de filo não foi afetada pelos tratamentos.

No presente estudo, a concentração da monensina foi de 36 mg/Kg de MS. Esta concentração está na faixa da recomendação citada por Bangoura e Bardsley (2020) para tratamento da coccidiose, de 0,3 até 1,0 mg/Kg de peso vivo. Mesmo sendo uma concentração 10 vezes menor que a utilizado no trabalho de Thomas et al. (2017), pode ser que para bezerros com o rúmen em desenvolvimento, a concentração presente na dieta já cause efeitos no microbioma que ainda está se estabelecendo.

Até a introdução de modernas técnicas moleculares, acreditava-se que uma população funcional de bactérias no rúmen de bezerros se estabeleceria com 10 a 14 dias de idade quando há acesso a concentrado convencional (Poe et al., 1971). Hoje, sabe-se que alguns microrganismos funcionais no rúmen já estão presente, em menor abundância, desde o primeiro dia de vida (Skillman et al., 2004; Gagen et al., 2012; Guzman et al., 2015), antes mesmo da introdução de alimentos sólidos (Rey et al., 2014; Dias et al., 2017) ou mesmo em animais que são alimentados apenas com leite durante todo o período de aleitamento (Li et al., 2012). No presente trabalho, cuja avaliação do microbioma ruminal começou aos 14 dias, alguns animais já apresentavam microbiota funcional mesmo com consumo de concentrado bastante reduzido, de aproximadamente 50g, conforme descrito no trabalho de Poczynek et al. (2020). Dessa forma, o rúmen já apresentava microbiota com composição que permaneceu estável após os animais serem desaleitados.

3.4.2. Diversidade microbiana fecal

Bezerros em aleitamento são considerados como pré-ruminantes, uma vez que o rúmen não está completamente desenvolvido e funcionando plenamente como uma câmara de fermentação. Assim, parte do alimento ingerido não é fermentado pelo rúmen, podendo servir de substrato para crescimento microbiano no trato intestinal (Dill-McFarland et al., 2017), e dessa forma, estimular uma maior diversidade microbiana quando comparada ao ambiente ruminal. O baixo consumo observado por Poczynek et al., (2020) também pode ter influência na diversidade microbiana fecal. Assim, o baixo consumo associado ao desenvolvimento do rúmen mais lento permitiria que mais substrato da dieta chegasse ao intestino, pois a fermentação ruminal não era eficiente. Talvez por isso, as dietas afetaram a diversidade microbiana fecal. Os trabalhos que citam o efeito da suplementação com feno no microbioma gastrointestinal, focam o efeito no rúmen, sem qualquer menção ao intestinal/fecal. Dessa forma, até anteriormente ao nosso trabalho, não se sabia a respeito da influência da suplementação com feno na microbiota fecal.

Diferente dos resultados encontrados no rúmen, a diversidade na comunidade microbiana fecal foi afetada pelas diferentes dietas sólidas. Embora no rúmen a ausência de efeitos da dieta sólida possa estar associada a presença de monensina, uma vez que este ionóforo chega em baixíssimas concentrações no intestino (Herberg et al., 1978; Thomas et al., 2017), a maior inclusão de FDN na dieta sólida dos animais afetou de forma significativa a comunidade bacteriana fecal.

Segundo Dill-McFarland et al. (2017), as comunidades bacterianas se estabelecem rapidamente no TGI (fezes utilizadas como proxy) dos bezerros logo às 2 semanas de idade, assim como observado em trabalhos anteriores (Uyeno et al., 2010; Malmuthuge et al., 2014). No presente estudo, com uma semana de idade, já havia uma microbiota bem estabelecida no intestino dos animais, mesmo com diversidade e uniformidade menor que as semanas posteriores. Uma hipótese para esses dados pode estar relacionada ao ambiente restrito ao qual esses animais foram submetidos, sendo alojados em gaiolas individuais suspensas sem a presença de cama. No entanto, não existem trabalhos na literatura que comparem como diferentes sistemas de criação podem afetar o microbioma gastrointestinal em bezerros leiteiros. Em humanos, já se sabe que o ambiente é um dos principais fatores que ajudam a

modular o microbioma intestinal (Spor et al., 2011; Korpela et al., 2016; Rothschild et al., 2018; Dong e Gupta, 2019).

A menor diversidade geral observada com 2 semanas de idade pode ser atribuída à maior ocorrência de diarreia, como observado por Poczynek et al. (2020). Resultados semelhantes foram discutidos por Nakamura et al. (2017), quando bezerros diarreicos apresentaram menor densidade e riqueza microbiana, e consequentemente, menor diversidade. Alterações no microbioma do TGI em função de diarreia também foram identificadas em bovinos jovens (Xie et al., 2013; Zeineldin et al., 2018). Além disso, o tratamento com antibióticos para tal doença tem grande efeito na microbiota intestinal/fecal, assim como relatado por Oultram et al. (2015) e Yousif et al. (2018). Em vacas em lactação, Ji et al. (2018) notaram que o uso de antibióticos afeta a microbiota ruminal e fecal a partir do terceiro dia de uso, com possibilidade de efeito residual por mais de 18 dias. Talvez em animais em crescimento, esse efeito ocorra mais rápido, mas com menor duração, pois quando se analisa os resultados da coleta aos 4 semanas de vida, observa-se maior diversidade e uniformidade comparada as amostras do período de diarreia. No entanto, Dill-McFarland et al. (2017) também observaram menor diversidade na 2ª semana de vida dos animais, quando comparada a 4ª e a 8ª semana, sem atribuir isso a outro fator específico, além da idade propriamente.

3.4.3. Composição microbiana do TGI

Firmicutes e Bacteroidota (antigo filo Bacteroidetes) são os filos bacterianos dominantes no TGI (Clemmons et al., 2019). No ambiente ruminal, Firmicutes são tipicamente mais abundantes em dieta predominantemente baseada em forragens, enquanto Bacteroidota são geralmente mais abundantes em dietas consistindo principalmente de concentrado (Fernando et al., 2010; McCann et al., 2016). Independente da dieta sólida, ou seja, do nível de FDN, o filo Bacteroidota foi o predominante, provavelmente devido ao fato de 31% de FDN não ser suficiente para modular o microbioma, especialmente em animais com o rúmen em desenvolvimento. Sabe-se que a dieta tem grande influência na composição da microbiota ruminal (Petri et al., 2013; Thoetkiattikul et al., 2013). No entanto, há uma forte especificidade da microbiota com o hospedeiro, o que torna a composição da comunidade bacteriana variável entre os bezerros alimentados com uma mesma dieta (Li et al., 2012; Jami et al., 2013). Em nosso trabalho foi observado uma variação individual para animais em uma

mesma dieta, sugerindo que outros fatores podem interferir na composição microbiana do TGI.

Segundo Jami et al. (2013), com o aumento da idade dos bezerros, as comunidades microbianas do rúmen tendem a apresentar decréscimo na abundância de Proteobacteria e simultaneamente aumento de Bacteroidota e Firmicutes desde o nascimento até o desaleitamento. Contudo, os resultados do presente estudo mostram que os três filos citados apresentaram abundância constante ao longo da idade dos bezerros, o que sugere mais uma vez o efeito da inclusão de monensina na dieta sólida sobre o microbioma ruminal. Por outro lado, esse efeito foi observado no microbioma fecal, com aumento da abundância do filo Bacteroidota e redução de Proteobacteria.

Em nível de gênero, observou-se que *Prevotella* foi predominante no microbioma ruminal e fecal, independentemente da dieta. Em outros trabalhos (Uyeno et al., 2010; Li et al., 2012; Dias et al., 2017; Dill-McFarland et al., 2017; Biscarini et al., 2018), esse gênero também foi o mais abundante no TGI ao longo do período de aleitamento. Essas bactérias são versáteis em aproveitar diferentes substratos, incluindo a fermentação de amidos e xilanos para produzir propionato, succinato e acetato (Flint et al., 2008). A literatura mostra que esse gênero aumenta rapidamente com ingestão de alimentos sólidos (Malmuthuge et al., 2014; Rey et al., 2014) e em animais alimentados com dietas ricas em fibras (Jami et al., 2013). No rúmen, a abundância, praticamente dobrou da 2ª para a 4ª semana de idade, provavelmente em função do aumento no consumo de concentrado, que saiu de cerca de 50g para quase 300g na 4ª semana (Poczynek et al., 2020). Como os animais apresentaram consumo de dieta sólida total, consumo de concentrado, e consumo de CNF e NDT similar ao longo do período de aleitamento (Poczynek et al., 2020), este pode ser um motivo para este gênero não diferir entre os tratamentos, tanto nas amostras de fluído ruminal quanto nas fezes. Outra possibilidade, conforme observado por Osborne e Dehority (1989) e Fondevila e Dehority (1996), é o fato da espécie *Prevotella ruminicola* poder interagir com a espécie *Fibrobacter succinogenes* e melhorar a digestibilidade da fibra. No entanto, o gênero associado a espécie de *Fibrobacter* não foi identificado em nosso trabalho, o que talvez tenha minimizado essa ação e possivelmente o crescimento da *Prevotella* nos animais alimentados com dietas com maior teor de fibra, resultando na ausência de efeito da dieta sólida. Segundo Callaway e Russell (2000), cepas de *Prevotella* podem apresentar capacidade de crescimento na presença

monensina. Isso explicaria a alta abundância desse gênero em relação aos demais, e também sua alta abundância no rúmen em comparação às fezes.

O *Succinivibrio* é outro gênero importante, principalmente para o rúmen, pois fermenta os produtos de hidrólise do amido (maltose, dextrina, glicose) em primariamente succinato, acetato e formato (Bryant e Small, 1956) e tem associação negativa com o pH ruminal (Rey et al., 2014) e proporção molar de acetato (Dias et al., 2017). Sua abundância variou em 2% nas primeiras semanas, mas aumentou para cerca de 4,76% na 8ª semana, quando os animais foram desaleitados, diminuindo para 3,36% na 10ª semana. Esses resultados corroboram aqueles de Rey et al. (2014), que observaram aumento na abundância de *Succinivibrio* após o fornecimento da dieta sólida. Da mesma forma, está em acordo com os dados de Meale et al. (2016), que relataram redução na abundância desse gênero após o desaleitamento.

Ao contrário do observado por Dias et al. (2017) e Jami et al. (2013), a abundância de *Megasphaera* não aumentou em resposta ao consumo de concentrado. Na verdade, diminuiu de 5,3% na 2ª semana para 0,22% na 10ª semana, resultados bem semelhantes as proporções encontradas por Meale et al. (2016). A presença de *Megasphaera* não foi relatada em estudos realizados com bezerros alimentados com sucedâneo (Li et al., 2012; Wu et al., 2012) ou leite integral e concentrado com feno (Malmuthuge et al., 2014; Rey et al., 2014). Segundo Dias et al. (2017), entender como diferentes dietas podem afetar a colonização, pode permitir a utilização de diferentes estratégias alimentares como forma de estimular a abundância de microrganismos de interesse.

3.5. Conclusão

Os níveis e fontes de FDN na dieta sólida não foram eficazes em modificar o microbioma ruminal de bezerros jovens. Não se sabe ao certo se o microbioma do rúmen em desenvolvimento é resiliente a mudanças na dieta ou se a monensina, mesmo em baixa concentração na dieta sólida, pode causar efeitos na colonização e estabelecimento da comunidade microbiana.

Por outro lado, o fornecimento de feno na dieta sólida resultou em maior diversidade α no microbioma em amostras fecais de bezerros leiteiros, sugerindo efeitos importantes no microbioma intestinal. Além disso, a diferença de acordo com a idade dos animais pode ser uma ferramenta para entender o melhor momento para possíveis intervenções na dieta para

manipular a composição do microbioma intestinal visando melhorar o desempenho e a saúde animal.

Referências

- Bangoura, B., and K.D. Bardsley. 2020. Ruminant Coccidiosis. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* 36:187–203.
- Biesheuvel, M.H., P.G. Bijker, and H.A. Urlings. 1991. Some aspects of the gastrointestinal microflora of veal calves fed different rations: a pilot study. *Vet. Q.* 13:97–104.
- Biscarini, F., F. Palazzo, F. Castellani, G. Masetti, L. Grotta, A. Cichelli, and G. Martino. 2018. Rumen microbiome in dairy calves fed copper and grape-pomace dietary supplementations: Composition and predicted functional profile. *PLoS One* 13:e0205670.
- Bryant, M.P., and N. Small. 1956. The anaerobic monotrichous butyric acid-producing curved rod-shaped bacteria of the rumen. *J. Bacteriol.* 72:16.
- Bryant, M.P., N. Small, C. Bouma, and I. Robinson. 1958. Studies on the Composition of the Ruminal Flora and Fauna of Young Calves. *J. Dairy Sci.* 41:1747–1767.
- Callahan, B.J., K. Sankaran, J.A. Fukuyama, P.J. McMurdie, and S.P. Holmes. 2016. Bioconductor Workflow for Microbiome Data Analysis: from raw reads to community analyses. *F1000Research* 5:1492.
- Callaway, T.R., and J.B. Russell. 2000. Variations in the ability of ruminal gram-negative *Prevotella* species to resist monensin. *Curr. Microbiol.* 40:185–189.
- Carberry, C.A., S.M. Waters, D.A. Kenny, and C.J. Creevey. 2014. Rumen methanogenic genotypes differ in abundance according to host residual feed intake phenotype and diet type. *Appl. Environ. Microbiol.* 80:586–594.
- Clemmons, B.A., B.H. Voy, and P.R. Myer. 2019. Altering the Gut Microbiome of Cattle: Considerations of Host-Microbiome Interactions for Persistent Microbiome Manipulation. *Microb. Ecol.* 77:523–536.
- Cunningham, K.D., M.J. Cecava, and T.R. Johnson. 1993. Nutrient Digestion, Nitrogen, and Amino Acid Flows in Lactating Cows Fed Soybean Hulls in Place of Forage or Concentrate. *J. Dairy Sci.* 76:3523–3535.

- Daneshvar, D., M. Khorvash, E. Ghasemi, A.H. Mahdavi, B. Moshiri, M. Mirzaei, A. Pezeshki, and M.H. Ghaffari. 2015. The effect of restricted milk feeding through conventional or step-down methods with or without forage provision in starter feed on performance of Holstein bull calves. *J. Anim. Sci.* 93:3979–3989.
- Davis, C.L., and J.K. Drackley. 1998. *The Development, Nutrition, and Management of the Young Calf*. Iowa State University Press.
- Diao, Q., R. Zhang, and T. Fu. 2019. Review of Strategies to Promote Rumen Development in Calves. *Animals* 9:490.
- Dias, J., M.I. Marcondes, M.F. Noronha, R.T. Resende, F.S. Machado, H.C. Mantovani, K.A. Dill-McFarland, and G. Suen. 2017. Effect of Pre-weaning Diet on the Ruminal Archaeal, Bacterial, and Fungal Communities of Dairy Calves. *Front. Microbiol.* 8.
- Dias, J., M.I. Marcondes, S. Motta de Souza, B. Cardoso da Mata e Silva, M. Fontes Noronha, R. Tassinari Resende, F.S. Machado, H. Cuquetto Mantovani, K.A. Dill-McFarland, and G. Suen. 2018. Bacterial Community Dynamics across the Gastrointestinal Tracts of Dairy Calves during Preweaning Development. *Appl. Environ. Microbiol.* 84:e02675-17.
- Dill-McFarland, K.A., J.D. Breaker, and G. Suen. 2017. Microbial succession in the gastrointestinal tract of dairy cows from 2 weeks to first lactation. *Sci. Rep.* 7:40864.
- Dixon, P. 2003. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *J. Veg. Sci.* 14:927–930.
- Dong, T.S., and A. Gupta. 2019. Influence of Early Life, Diet, and the Environment on the Microbiome. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 17:231–242.
- Dray, S., and A.-B. Dufour. 2007. The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists. *J. Stat. Softw.* 22.
- Elsohaby, I., J.T. McClure, L.A. Waite, M. Cameron, L.C. Heider and G.P. Keefe. 2018. Using serum and plasma samples to assess failure of transfer of passive immunity in dairy calves. *J. Dairy Sci.* 102:567–577.
- Fernando, S.C., H.T. Purvis, F.Z. Najar, L.O. Sukharnikov, C.R. Krehbiel, T.G. Nagaraja, B.A. Roe, and U. DeSilva. 2010. Rumen Microbial Population Dynamics during Adaptation to a High-Grain Diet. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:7482–7490.
- Flint, H.J., E.A. Bayer, M.T. Rincon, R. Lamed, and B.A. White. 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: Potential for new insights from genomic analysis. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:121–131.

- Fondevila, M., and B.A. Dehority. 1996. Interactions between *Fibrobacter succinogenes*, *Prevotella ruminicola*, and *Ruminococcus flavefaciens* in the Digestion of Cellulose from Forages. *J. Anim. Sci.* 74:678–684.
- Fonty, G., P. Gouet, J.P. Jouany, and J. Senaud. 1987. Establishment of the microflora and anaerobic fungi in the rumen of lambs. *J. Gen. Microbiol.* 133:1835–1843.
- Gagen, E.J., P. Mosoni, S.E. Denman, R. Al Jassim, C.S. McSweeney, and E. Forano. 2012. Methanogen Colonisation Does Not Significantly Alter Acetogen Diversity in Lambs Isolated 17 h After Birth and Raised Aseptically. *Microb. Ecol.* 64:628–640.
- Godden, S. 2008. Colostrum Management for Dairy Calves. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* 24:19–39.
- Guzman, C.E., L.T. Bereza-Malcolm, B. De Groef, and A.E. Franks. 2015. Presence of Selected Methanogens, Fibrolytic Bacteria, and Proteobacteria in the Gastrointestinal Tract of Neonatal Dairy Calves from Birth to 72 Hours. *PLoS One* 10:e0133048.
- Herberg, R., J. Manthey, L. Richardson, C. Cooley, and A. Donoho. 1978. Excretion and Tissue Distribution of Monensin in Cattle. *J. Agric. Food Chem.* 26:1087–1090.
- Hibbs, J.W., H.R. Conrad, W.D. Pouden, and N. Frank. 1956. A High Roughage System for Raising Calves Based on Early Development of Rumen Function. VI. Influence of Hay to Grain Ratio on Calf Performance, Rumen Development, and Certain Blood Changes. *J. Dairy Sci.* 39:171–179.
- Jami, E., A. Israel, A. Kotser, and I. Mizrahi. 2013. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *ISME J.* 7:1069–1079.
- Ji, S., T. Jiang, H. Yan, C. Guo, J. Liu, H. Su, G.M. Alugongo, H. Shi, Y. Wang, Z. Cao, and S. Li. 2018. Ecological Restoration of Antibiotic-Disturbed Gastrointestinal Microbiota in Foregut and Hindgut of Cows. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8:1–13.
- Jiao, J., X. Li, K.A. Beauchemin, Z. Tan, S. Tang, and C. Zhou. 2015. Rumen development process in goats as affected by supplemental feeding v. grazing: Age-related anatomic development, functional achievement and microbial colonisation. *Br. J. Nutr.* 113:888–900.
- Kembel, S.W., P.D. Cowan, M.R. Helmus, W.K. Cornwell, H. Morlon, D.D. Ackerly, S.P. Blomberg, and C.O. Webb. 2010. Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. *Bioinformatics* 26:1463–1464.

- Khan, M.A.A., A. Bach, D.M.M. Weary, and M.A.G.A.G. von Keyserlingk. 2016. Invited review: Transitioning from milk to solid feed in dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 99:885–902.
- Kim, Y.-H., R. Nagata, N. Ohtani, T. Ichijo, K. Ikuta, and S. Sato. 2016. Effects of Dietary Forage and Calf Starter Diet on Ruminal pH and Bacteria in Holstein Calves during Weaning Transition. *Front. Microbiol.* 7:1–12.
- Korpela, K., A. Salonen, L.J. Virta, R.A. Kekkonen, K. Forslund, P. Bork, and W.M. De Vos. 2016. Intestinal microbiome is related to lifetime antibiotic use in Finnish pre-school children. *Nat. Commun.* 7:1–8.
- Law, C.W., Y. Chen, W. Shi, and G.K. Smyth. 2014. voom: precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol.* 15:R29.
- Lengemann, F.W., and N.N. Allen. 1959. Development of Rumen Function in the Dairy Calf. II. Effect of Diet upon Characteristics of the Rumen Flora and Fauna of Young Calves. *J. Dairy Sci.* 42:1171–1181.
- Li, R.W., E.E. Connor, C. Li, R.L. Baldwin VI, and M.E. Sparks. 2012. Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomic tools. *Environ. Microbiol.* 14:129–139.
- Malmuthuge, N., and L.L. Guan. 2017. Understanding the gut microbiome of dairy calves: Opportunities to improve early-life gut health. *J. Dairy Sci.* 100:5996–6005.
- Malmuthuge, N., P.J. Griebel, and L.L. Guan. 2014. Taxonomic Identification of Commensal Bacteria Associated with the Mucosa and Digesta throughout the Gastrointestinal Tracts of Preweaned Calves. *Appl. Environ. Microbiol.* 80:2021–2028.
- McCann, J.C., S. Luan, F.C. Cardoso, H. Derakhshani, E. Khafipour, and J.J. Looor. 2016. Induction of subacute ruminal acidosis affects the ruminal microbiome and epithelium. *Front. Microbiol.* 7:701.
- McMurdie, P.J., and S. Holmes. 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 8:e61217.
- Meale, S.J., S. Li, P. Azevedo, H. Derakhshani, J.C. Plaizier, E. Khafipour, and M.A. Steele. 2016. Development of Ruminal and Fecal Microbiomes Are Affected by Weaning But Not Weaning Strategy in Dairy Calves. *Front. Microbiol.* 7:1–16.
- Myer, P.R., J.E. Wells, T.P.L. Smith, L.A. Kuehn, and H.C. Freetly. 2016. Microbial community profiles of the jejunum from steers differing in feed efficiency. *J. Anim. Sci.* 94:327–338.

- Nakamura, S.-I., Y.H. Kim, K. Takashima, A. Kimura, K. Nagai, T. Ichijo, and S. Sato. 2017. Composition of the microbiota in forestomach fluids and feces of Japanese Black calves with white scours. *J. Anim. Sci.* 95:3949.
- NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. National Academies Press.
- Oikonomou, G., A.G.V. Teixeira, C. Foditsch, M.L. Bicalho, V.S. Machado, and R.C. Bicalho. 2013. Fecal Microbial Diversity in Pre-Weaned Dairy Calves as Described by Pyrosequencing of Metagenomic 16S rDNA. Associations of *Faecalibacterium* Species with Health and Growth. *PLoS One* 8:e63157.
- Oltramari, C.E., G.G.O. Nápoles, M.R. De Paula, J.T. Silva, M.P.C. Gallo, M.C. Soares, and C.M.M. Bittar. 2018. Performance and metabolism of dairy calves fed starter feed containing citrus pulp as a replacement for corn. *Anim. Prod. Sci.* 58:561.
- Osborne, J.M., and B.A. Dehority. 1989. Synergism in Degradation and Utilization of Intact Forage Cellulose, Hemicellulose, and Pectin by Three Pure Cultures of Ruminal Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2247–2250.
- Oultram, J., E. Phipps, A.G. V. Teixeira, C. Foditsch, M.L. Bicalho, V.S. Machado, R.C. Bicalho, and G. Oikonomou. 2015. Effects of antibiotics (oxytetracycline, florfenicol or tulathromycin) on neonatal calves' faecal microbial diversity. *Vet. Rec.* 117:vetrec-2015-103320.
- Paradis, E., and K. Schliep. 2019. ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics* 35:526–528.
- Parks, D.H., C. Rinke, M. Chuvochina, P.A. Chaumeil, B.J. Woodcroft, P.N. Evans, P. Hugenholtz, and G.W. Tyson. 2017. Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life. *Nat. Microbiol.* 2:1533–1542.
- Parks, D.H., G.W. Tyson, P. Hugenholtz, and R.G. Beiko. 2014. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics* 30:3123–3124.
- Petri, R.M., T. Schwaiger, G.B. Penner, K.A. Beauchemin, R.J. Forster, J.J. McKinnon, and T.A. McAllister. 2013. Changes in the Rumen Epimural Bacterial Diversity of Beef Cattle as Affected by Diet and Induced Ruminal Acidosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:3744–3755.
- Poczynek, M., A.F. Toledo, A.P. Silva, M.D. Silva, G.B. Oliveira, M.G. Coelho, G.F. Virginio, D. Polizel, J.H. Costa, and C.M.M. Bittar. 2020. Partial corn replacement by soybean hull, or

- hay supplementation: Effects of increased NDF in diet on performance, metabolism and behavior of pre-weaned calves. *Livest. Sci.* 231:103858.
- Poe, S.E., D.G. Ely, G.E. Mitchell, W.P. Deweese, and H.A. Glimp. 1971. Rumen development in lambs. I. Microbial digestion of starch and cellulose. *J. Anim. Sci.* 32:740–743.
- Pounden, W.D., and J.W. Hibbs. 1948. The Influence of the Ratio of Grain to Hay in the Ration of Dairy Calves on Certain Rumen Microorganisms. *J. Dairy Sci.* 31:1051–1054.
- R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; <https://www.R-project.org/>.
- Rey, M., F. Enjalbert, and V. Monteils. 2012. Establishment of ruminal enzyme activities and fermentation capacity in dairy calves from birth through weaning. *J. Dairy Sci.* 95:1500–1512.
- Rey, M., F. Enjalbert, S. Combes, L. Cauquil, O. Bouchez, and V. Monteils. 2014. Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning is sequential. *J. Appl. Microbiol.* 116:245–257.
- Ritchie, M.E., B. Phipson, D. Wu, Y. Hu, C.W. Law, W. Shi, and G.K. Smyth. 2015. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 43:e47.
- Robinson, M.D., and A. Oshlack. 2010. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol.* 11:R25.
- Robinson, M.D., D.J. McCarthy, and G.K. Smyth. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139–140.
- Rothschild, D., O. Weissbrod, E. Barkan, A. Kurilshikov, T. Korem, D. Zeevi, P.I. Costea, A. Godneva, I.N. Kalka, N. Bar, S. Shilo, D. Lador, A.V. Vila, N. Zmora, M. Pevsner-Fischer, D. Israeli, et al. 2018. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature* 555:210–215.
- Schelling, G.T. 1984. Monensin Mode of Action in the Rumen. *J. Anim. Sci.* 58:1518.
- Skillman, L.C., P.N. Evans, G.E. Naylor, B. Morvan, G.N. Jarvis, and K.N. Joblin. 2004. 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs. *Anaerobe* 10:277–285.
- Smyth, G.K. 2004. Linear Models and Empirical Bayes Methods for Assessing Differential Expression in Microarray Experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* 3:1–25.

- Spor, A., O. Koren, and R. Ley. 2011. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 9:279–290.
- Thoetkiattikul, H., W. Mhuantong, T. Laothanachareon, S. Tangphatsornruang, V. Pattarajinda, L. Eurwilaichitr, and V. Champreda. 2013. Comparative analysis of microbial profiles in cow rumen fed with different dietary fiber by tagged 16S rRNA gene pyrosequencing. *Curr. Microbiol.* 67:130–137.
- Thomas, M., M. Webb, S. Ghimire, A. Blair, K. Olson, G.J. Fenske, A.T. Fonder, J. Christopher-Hennings, D. Brake, and J. Scaria. 2017. Metagenomic characterization of the effect of feed additives on the gut microbiome and antibiotic resistome of feedlot cattle. *Sci. Rep.* 7:1–13.
- Uyeno, Y., Y. Sekiguchi, K. Tajima, A. Takenaka, M. Kurihara, and Y. Kamagata. 2010. An rRNA-based analysis for evaluating the effect of heat stress on the rumen microbial composition of Holstein heifers. *Anaerobe* 16:27–33.
- Wang, Q., G.M. Garrity, J.M. Tiedje, and J.R. Cole. 2007. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:5261–5267.
- Wickham, H. 2009. *Ggplot2*. Springer New York, New York, NY.
- Wu, S., R.L. Baldwin, W. Li, C. Li, E.E. Connor, and R.W. Li. 2012. The Bacterial Community Composition of the Bovine Rumen Detected Using Pyrosequencing of 16S rRNA Genes. *Metagenomics* 1:1–11.
- Xie, G., G.C. Duff, L.W. Hall, J.D. Allen, C.D. Burrows, J.C. Bernal-Rigoli, S.E. Dowd, V. Guerriero, and C.J. Yeoman. 2013. Alteration of digestive tract microbiome in neonatal Holstein bull calves by bacitracin methylene disalicylate treatment and scours¹. *J. Anim. Sci.* 91:4984–4990.
- Yousif, M., J.-H. Li, Z.-Q. Li, G. Maswayi Alugongo, S.-K. Ji, Y.-X. Li, Y.-J. Wang, S.-L. Li, and Z.-J. Cao. 2018. Low Concentration of Antibiotics Modulates Gut Microbiota at Different Levels in Pre-Weaning Dairy Calves. *Microorganisms* 6:118.
- Zambom, M.A., G.T. dos Santos, E.C. Modesto, C.R. Alcalde, G.D. Gonçalves, D.C. da Silva, K.T. da Silva, and J.O. Faustino. 2001. Valor nutricional da casca do grão de soja, farelo de soja, milho moído e farelo de trigo para bovinos. *Acta Sci.* 23:937–943.

Zeineldin, M., R. Barakat, A. Elolimy, A.Z.M. Salem, M.M.Y. Elghandour, and J.C. Monroy. 2018. Synergetic action between the rumen microbiota and bovine health. *Microb. Pathog.* 124:106–115.

4. MICROBIOMA FECAL DE BEZERROS LEITEIROS ALIMENTADOS COM DIFERENTES DIETAS LÍQUIDAS

Resumo

O fornecimento de dieta líquida ao bezerro recém-nascido tem implicações consideráveis para o desenvolvimento da microbiota intestinal, pois sua composição pode mudar a população para uma microbiota altamente adaptada. A acidificação do leite pode afetar positivamente os microrganismos benéficos para a saúde do intestino. O presente trabalho avaliou 15 bezerros da raça Holandesa alojados em abrigos tropicais, alimentados com uma das três dietas líquidas: I - leite integral (n = 5), II – sucedâneo lácteo (22,9% PB; 18,8 % de gordura; diluído para 14% de sólidos; n = 5) e III - leite integral acidificado a pH 4,5 com ácido fórmico (n = 5). Todos os animais receberam 6 L de dieta líquida, divididos em duas refeições, sendo desmamados na 8ª semana de idade. Após o desaleitamento, todos os bezerros foram agrupados alojados e alimentados com o concentrado inicial e feno a vontade. Para avaliar o microbioma, as amostras fecais foram coletadas no nascimento (0) e nas semanas 1, 2, 4, 8 e 10. A comunidade microbiana foi determinada pelo sequenciamento de amplicons das regiões V3 e V4 do gene 16S rRNA que foi amplificado por PCR e sequenciado pela plataforma Illumina MiSeq. Os índices de diversidade e uniformidade foram maiores para o leite integral quando comparado ao sucedâneo, sem diferença para o leite acidificado ($P < 0,03$). Todos os índices tiveram resultados significativos para as semanas ($P < 0,001$). O tempo 0 apresentou maior riqueza e diversidade, enquanto as semanas 1 e 2 foram menores. A estrutura da comunidade bacteriana foi afetada pela dieta, idade e interação de ambos os fatores ($P < 0,01$). Foram identificados 38 filos bacterianos, sendo os mais abundantes em geral Bacteroidota (38,45%), Firmicutes_A (24,83%), Firmicutes_A (24,83%), Firmicutes (10,34%), Proteobacteria (6,65%) e Firmicutes_C (7,21%). Os gêneros mais abundantes foram *Prevotella* (8,64%), *Bacteroides_A* (6,10%), *Escherichia* (5,24%), *Faecalibacterium* (5,07%) e *Lactobacillus* (4,63%). É possível modificar o microbioma alterando a dieta líquida. A alimentação com leite integral foi associada a uma maior abundância de bactérias benéficas para o TGI, principalmente durante o período de maior ocorrência de diarreia. No entanto, diferenças de acordo com a idade dos bezerros podem mostrar no futuro qual seria o melhor momento para possíveis intervenções na dieta para manipular o microbioma intestinal para melhorar a saúde dos animais.

Palavras-chave: Bifidobacterium; Microbiota intestinal; Nutrição animal; Saúde intestinal.

Abstract

Feeding a liquid diet to the newborn calf has considerable implications for the development of the intestinal microbiota, as its composition can shift the population to a highly adapted microbiota. Milk acidification may positively affect microorganisms that are beneficial to the intestine health. The present work evaluated 15 Holstein calves housed in tropical shelters, fed one of the three liquid diets: I – whole milk (n = 5), II – milk replacer (22.9 % CP; 18.8 % fat; diluted to 14% solids; n = 5) and III - whole milk acidified to pH 4.5 with formic acid (n = 5). All animals received 6 L of liquid diet, divided into two meals, being weaned at the 8th week of age. After weaning, all calves were grouped housed and fed with the starter concentrate and coast-cross hay ad libitum. To evaluate the microbiome, fecal samples were collected at birth (0) and weeks 1, 2, 4, 8, and 10. The microbial community was determined by sequencing V3 and V4 region amplicons of the 16S rRNA gene that was amplified by PCR and sequenced by the Illumina MiSeq platform. The diversity indices and evenness were higher for whole milk when compared to milk replacer, with no difference for whole milk acidified ($P < 0.03$). All indices had significant results for the weeks ($P < 0.001$). Time 0 had higher richness and diversity, while weeks 1 and 2 had the lowest. The structure of the bacterial community was affected by diet, age, and interaction of both factors ($P < 0.01$). A total of 38 bacterial phyla were identified, the most abundant in general are Bacteroidota (38.45%), Firmicutes_A (24.83%), Firmicutes (10.34%), Proteobacteria (6.65%) and Firmicutes_C (7.21%). The most abundant genera were *Prevotella* (8.64%), *Bacteroides_A* (6.10%), *Escherichia* (5.24%), *Faecalibacterium* (5.07%) and *Lactobacillus* (4.63%). It is possible to modify the microbiome by changing the liquid diet. The feeding with whole milk was associated with a greater abundance of beneficial bacteria for GIT, especially during the period of greatest diarrhea occurrence. However, differences according to calves' age may show in the future, what would be the best time for possible interventions in the diet to manipulate the intestinal microbiome to improve animals' health.

Keywords: Bifidobacterium; Intestinal microbiota; Animal nutrition; Intestinal health.

4.1. Introdução

Nutrição e manejo, além de outros fatores, podem afetar o microbioma do trato gastrointestinal (TGI) em bezerros recém-nascidos (Malmuthuge et al., 2015). A nutrição é o fator de maior influência na comunidade bacteriana intestinal de bezerros durante o período desaleitamento (Klein-Jöbstl et al., 2014; Rey et al., 2014; Guzman et al., 2015) e pode ser dependente da composição da dieta líquida.

A composição do alimento oferecido aos bezerros afeta a estrutura da microbiota intestinal, uma vez que disponibiliza diferentes substratos alimentares às comunidades bacterianas (Maslowski e MacKay, 2011; Li et al., 2012; Kasparovska et al., 2016). Entretanto, a maioria dos estudos que avaliaram os efeitos de manejos alimentares na microbiota intestinal de bezerros se concentraram no impacto da dieta sólida (Callaway et al., 2010; Shanks et al., 2011; Petri et al., 2013a; Dias et al., 2018), de forma que pouca informação está disponível sobre o efeito da composição da dieta líquida na composição microbiana intestinal (Górka et al., 2011; Edrington et al., 2012; Deng et al., 2017). Sabe-se que a microbiota intestinal é essencial para o desenvolvimento do TGI estável e do sistema imunológico saudável (Czarnecki-Maulden, 2008).

As principais dietas líquidas oferecidas aos bezerros são o leite integral, leite de descarte, leite de descarte pasteurizado, leite de transição ou sucedâneo lácteo, seja em rebanhos leiteiros brasileiros (dos Santos; Bittar, 2015; Alta Cria, 2019), americanos (USDA, 2016) ou canadenses (Vasseur et al., 2010). A dieta líquida é comumente ofertada por períodos de 60 a 90 dias, mas em alguns casos, até mais de 90 dias, quando esses animais são desaleitados.

O fornecimento de leite integral tem implicações consideráveis no desenvolvimento da microbiota intestinal (Kelly et al., 2016), com seleção para uma microbiota intestinal altamente adaptada, dominada por bifidobactérias. Estas bactérias têm efeitos benéficos pronunciados nas condições fisiológicas do intestino, auxiliando no desenvolvimento intestinal e ajudando a prevenir a disbiose (Hidalgo-Cantabrana et al., 2017). Vários constituintes do leite, como oligossacarídeos e glicoconjugados, enriquecem seletivamente esse tipo de bactéria (Pacheco et al., 2015). Sabe-se que em humanos, bebês alimentados com leite materno em comparação a fórmula, tem sua microbiota com profunda relação a genes de enterócitos neonatais que influenciam a proteção e o desenvolvimento do hospedeiro

(Schwartz et al., 2012). Além disso, bebês alimentados com fórmula apresentam maior colonização por *Clostridium spp.* e particularmente *C. difficile* (Penders et al., 2005; Penders et al., 2006; Vael; Desager, 2009), microrganismos associados a vários problemas, inclusive diarreia (Dial et al., 2004; Poutanen e Simor, 2004; Lees et al., 2020).

Em muitos rebanhos, especialmente aqueles que adotam o aleitamento a vontade, o leite é acidificado com ácidos orgânicos até pH 4,2-4,5, de forma a manter sua qualidade microbiológica ao longo do dia. Este tipo de dieta líquida aparece como uma alternativa para aleitamento e tem sido estudada como um método simples e de baixo custo (Yanar et al., 2006). A acidificação pode auxiliar na modulação da microbiota gastrointestinal, diminuindo o crescimento ou eliminando microrganismos patogênicos (Muller, 1986; Jaster et al., 1990), os quais são sensíveis ao pH mais baixo. Além disso, a acidificação pode favorecer o crescimento de microrganismos benéficos, como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Faecalibacterium* (Deng et al., 2017), que nesta condição têm menor competição por nutrientes com microrganismos patogênicos (Lucci, 1989).

Em algumas situações, o fornecimento de leite integral é substituído por fórmulas comerciais (sucedâneos lácteos), seja por motivos econômicos, de constância na composição da dieta líquida ou pela oportunidade de aumentar o teor de sólidos da dieta líquida. Muitos estudos mostram que os sucedâneos podem ser adequados para substituir o leite, garantindo o desempenho animal, desde que tenham composição adequada em fontes e níveis de nutrientes (Cooper e Watson, 2013; Bittar et al., 2018; Badman et al., 2019; Bai et al., 2020). A vasta gama de ingredientes, a exemplo de derivados lácteos e fontes de origem vegetal, que podem ser utilizados no processo de fabricação, resultam em produtos com diferentes níveis de gordura e proteína (Bittar et al., 2018), os quais podem afetar o microbioma gastrointestinal (Badman et al., 2019).

O objetivo com o presente trabalho foi analisar o microbioma gastrointestinal de bezerros recebendo diferentes dietas líquidas (leite integral, leite integral acidificado e sucedâneo lácteo) durante o período de aleitamento. Além disso, verificar a resiliência dessa microbiota após o desaleitamento.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Animais, instalações e manejo alimentar

O Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” / Universidade de São Paulo aprovou todos os procedimentos envolvendo animais neste estudo (Protocolo nº. 2018.5.586.11.7).

O experimento foi desenvolvido nas instalações do Bezerreiro Experimental “Evilásio de Camargo”, do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP, localizado na cidade de Piracicaba – SP, no período de fevereiro a maio de 2019. Foram utilizados 35 bezerros, machos ($32,84 \pm 1,54\text{Kg}$) e fêmeas ($28,22 \pm 0,81\text{Kg}$) da raça holandesa, recém-nascidos e alimentados com 10% do peso vivo em colostro de alta qualidade ($> 50\text{g/L}$) nas primeiras 6h de vida (Godden, 2008). Foram utilizados apenas animais que apresentaram proteína sérica acima de $5,5 \text{ g/dL}$ às 48h de vida (Elsohaby et al., 2018). Os dados de desempenho, saúde, parâmetros sanguíneos estão descritos no Apêndice A (Coelho et al., 2020).

O delineamento experimental foi de blocos casualizados, sendo utilizados o sexo, o peso e a data de nascimento dos bezerros como fatores de blocagem. O período de aleitamento foi de 56 dias.

Logo após o nascimento, os animais foram alojados em gaiolas suspensas individuais ($113\text{cm} \times 140\text{cm}$) com cama de serragem em galpão arejado, onde permaneceram até os 15 dias de vida. Desde o segundo dia de vida os animais tiveram livre acesso à água e ao concentrado inicial, localizados na parte frontal da gaiola. A partir do dia 16 até o desaleitamento completo, os animais foram alojados em abrigos do tipo casinha tropical, também com livre acesso à água e concentrado. O concentrado comercial (24,7% PB, 13,9% FDN, Ração Bezerra Ag Milk Agrocere Multimix Nutrição Animal Ltda., Rio Claro, São Paulo, Brasil) foi fornecido diariamente, sempre logo após o fornecimento da dieta líquida, e seu consumo foi monitorado através de pesagem das sobras do dia anterior

As dietas líquidas foram fornecidas a partir do 2º dia de vida, inicialmente em mamadeiras e posteriormente em baldes sem bico, no volume de 6 L/d, divididos em duas refeições (7h e 17h). Foram avaliadas três diferentes dietas líquidas:

- 1) Substituto lácteo (22,9% PB e 18,8% de gordura; Sprayfo Azul, Sloten de Brasil Ltd, Santos, SP, Brasil) diluído para 14% de sólidos;

2) Leite integral refrigerado;

3) Leite integral acidificado.

O leite integral a ser ofertado era dividido em duas porções, sendo uma refrigerada e outra acidificada a pH 4,5 com a adição de ácido fórmico (ácido fórmico 85%, Dinâmica Química Contemporânea Ltda, Diadema, São Paulo, Brasil), e mantido em temperatura ambiente ($\pm 23,7^{\circ}\text{C}$). O pH foi mensurado por pHmetro de bancada (Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brasil) no momento da acidificação, primeiramente até atingir o pH alvo, e depois corrigido no momento do fornecimento para o valor de 4,5. O leite foi acidificado pelo menos 12 horas antes do fornecimento, à 5°C para evitar a formação de coágulos de proteína. Todas as dietas líquidas foram aquecidas a $38\text{-}40^{\circ}\text{C}$ para fornecimento aos animais.

Aos 57 dias de idade iniciou-se o desaleitamento dos animais no aleitamento da tarde, reduzindo-se 1L/d (57d = 5L, 58d = 4L, 59d = 3L, 60d = 2L, 61d = 1L, 62d = 0) do total fornecido, dividindo-se o volume total a ser fornecido em duas refeições nos dias posteriores até o completo desaleitamento.

Após o desaleitamento, os animais permaneceram em piquete coletivo, com livre acesso a água, concentrado (o mesmo utilizado durante o período de aleitamento), pasto e feno. Os animais foram acompanhados até os 70 dias de idade, quando se encerrou o estudo.

4.2.2. Animais utilizados para avaliação do microbioma

Concomitante ao experimento de desempenho, foram selecionados, dos 35 animais, 15 bezerros, pertencentes a cinco blocos completos, três blocos de machos ($28,52 \pm 0,91$ Kg) e dois blocos de fêmea ($35,89 \pm 2,24$ Kg), para a realização do estudo de microbioma.

4.2.2.1. Coletas de conteúdo fecal

Amostras fecais foram coletadas no dia 0 (± 1 horas após o nascimento, antes do fornecimento de colostro) e posteriormente nos dias 7 (S1), 14 (S2), 28 (S4), 56 (S8) (desaleitamento) e 70 (S10) (pós-desaleitamento). As amostras foram coletadas manualmente com luvas, de forma asséptica, diretamente do reto dos animais, e descartadas a cada coleta para evitar contaminação cruzada entre as amostras. Cerca de 2g de fezes foram colhidas, acondicionadas em tubos estéreis, e congeladas imediatamente a -20°C .

4.2.3. Avaliação do microbioma

4.2.3.1. Extração de DNA

A extração do DNA das amostras de rúmen e de fezes, foi realizada com o kit de extração QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo o protocolo do fabricante. A qualidade das amostras de DNA da comunidade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% e as concentrações das mesmas foram quantificadas em espectrofotômetro modelo NanoDrop® ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA).

4.2.3.2. Preparo de biblioteca e sequenciamento

O preparo das bibliotecas foi realizado seguindo as recomendações Illumina (Figura 1). A região hipervariável V3-V4 do gene 16S rRNA foi sequenciada com a plataforma Illumina MiSeq V2 (Illumina, San Diego, CA, EUA) e as leituras produzidas foram de 2x250 pb.

Figura 1. Princípio do preparo das bibliotecas, segundo recomendação da Illumina.

4.2.3.3. Análise de dados

Os dados foram analisados seguindo um pipeline previamente publicado (Callahan et al., 2016), usando o pacote DADA2 no R (R Core Team, 2019) para gerar variantes exatas da sequência de amplicons (ASVs; Amplicon Sequencing Variants) (Wang et al., 2007). A função assignTaxonomy toma como entrada um conjunto de sequências (ASVs) a serem classificadas e um conjunto de treinamento de sequências de referência com taxonomia conhecida, e atribui taxonomias. O banco de dados GTDB: Genome Taxonomy Database versão r89 foi utilizado como referência (Parks et al., 2017).

As classificações taxonômicas geradas pelo DADA2, e suas quantificações, foram importadas para o programa phyloseq (McMurdie e Holmes, 2013), também implementado no R. Foram utilizadas as ferramentas para ecologia e análise filogenética, VEGAN (Dixon, 2003), ade4 (Dray e Dufour, 2007), ape (Paradis e Schliep, 2019), Picante (Kembel et al., 2010) e o ggplot2 (Wickham, 2009) foi utilizado para produzir gráficos de alta qualidade. As análises de diversidade Alfa e Beta foram realizadas no pacote phyloseq, conforme descrito em (Callahan et al., 2016). Foram filtradas as ASVs que não foram classificadas em pelo menos até o nível de família, e ASVs assinaladas como mesmo gênero foram aglomeradas. Após a aplicação destes filtros, foram obtidas as tabelas de contagens brutas de abundância e de abundância relativa.

Em seguida, as contagens taxonômicas contidas no objeto phyloseq foram importadas para o pacote edgeR (Robinson et al., 2010) para normalização dos tamanhos das bibliotecas de cada amostra (Robinson e Oshlack, 2010), subsequentemente as contagens foram transformadas para o logaritmo base 2 das contagens por milhão (logCPM) de cada amostra (transformação voom) (Law et al., 2014). Estas transformações permitem que os modelos lineares implementados no pacote limma (Ritchie et al., 2015) sejam usados na análise de abundância diferencial. Finalmente, após o ajuste do modelo linear com limma, a abundância taxonômica diferencial foi testada para cada contraste (par de tratamentos) com testes t moderados (Smyth, 2004). O programa STAMP 2.1.3 (Parks et al., 2014) foi utilizado para ilustrar a abundância diferencial entre os tratamentos.

4.3. Resultados

4.3.1. Resumo do experimento de desempenho

Resultados preliminares de desempenho e saúde dos animais foram publicados por Coelho et al. (2020). De maneira resumida, o consumo da dieta líquida foi menor para os animais alimentados com o leite acidificado, em comparação as demais dietas ($P < 0,01$). Houve efeito da interação dieta líquida e idade de forma que os animais que receberam leite acidificado apresentaram menor consumo nas três primeiras semanas de vida, se igualando aos demais tratamentos a partir da quarta semana ($P < 0,01$). O consumo de concentrado não foi afetado pelas diferentes dietas líquidas, mas aumentou com a idade dos animais ($P < 0,01$). O consumo de concentrado ao desaleitamento ficou entre 500 e 600g/d, sendo os maiores

valores observados para animais recebendo leite integral refrigerado e os menores para o sucedâneo lácteo, com animais aleitados com leite acidificado com valores intermediários. No entanto, o peso ao desaleitamento, o ganho médio diário e a medida de altura de cernelha foram maiores para os animais alimentados com leite, em comparação as demais dietas ($P < 0,05$). O escore fecal foi menor para os animais que recebiam leite em comparação ao sucedâneo, sem diferirem àqueles que recebiam leite acidificado ($P < 0,01$). O pH fecal não diferiu entre os tratamentos. A temperatura retal foi menor para os bezerros que alimentados com o leite acidificado ($P < 0,01$), os quais também tiveram menos dias com febre ($P < 0,06$). No entanto, animais alimentados com sucedâneo lácteo apresentaram maior escore fecal (fezes mais fluídas; $P < 0,05$) e maior número de dias com escore fecal 2 (considerado com diarreia; $P < 0,05$) que animais alimentados com leite integral refrigerado, enquanto animais aleitados com leite acidificado apresentaram valores intermediários (Apêndice A).

4.3.2. Microbioma fecal

A análise de perfil microbiano foi realizada usando dados da sequência de amplicons do gene 16S rRNA. Estão representados na Tabela 1, os índices de diversidade α (Shannon e Simpson), riqueza (Chao1) e uniformidade (Pielou). Os índices de Shannon e Pielou foram afetados pelas diferentes dietas líquidas, com maior diversidade e uniformidade para a comunidade bacteriana dos animais alimentados com o leite integral, em comparação aos animais aleitados com sucedâneo, sem diferir daqueles recebendo leite acidificado. Houve uma tendência semelhante para a diversidade Simpson. Todos os índices foram afetados pela idade, mas não houve efeito de interação da dieta líquida com a idade (Tabela 1).

Tabela 1. Índices de diversidade alfa, riqueza e uniformidade microbiana em fezes de bezerros alimentados com diferentes dietas líquidas

Índices	Dieta Líquida			p-valor		
	Leite acidificado	Leite integral	Sucedâneo lácteo	DL	I	DL x I
Shannon	2,61 ± 0,72 ^{ab}	2,76 ± 0,49 ^a	2,50 ± 0,70 ^b	0,028	< 0,001	0,788
Simpson	0,85 ± 0,11 ^{ab}	0,88 ± 0,05 ^a	0,84 ± 0,09 ^b	0,054	< 0,001	0,532
Chao1	62,43 ± 39,70	63,08 ± 34,43	60,12 ± 40,91	0,747	< 0,001	0,618
Pielou	0,65 ± 0,11 ^{ab}	0,69 ± 0,07 ^a	0,63 ± 0,09 ^b	0,021	< 0,001	0,650

¹DL = efeito da dieta líquida; I = efeito da idade; DL x I = efeito da interação entre dieta líquida e idade dos animais

Em relação aos efeitos das semanas para os índices Shannon e Chao1, o dia 0 apresentou maior diversidade e riqueza, enquanto que a semana 1 e 2 foram as menores, em comparação às demais semanas. Em Simpson, a semana 0 não diferiu da 8 e 10, sendo as maiores diversidades. A uniformidade foi maior para a semana 0, 4, 8 e 10, sendo a 4 e 8 semelhantes a semana 1, a qual junto da semana 2, foram as semanas com a menor uniformidade (Figura 2).

Figura 2. Índices de diversidade (Shannon e Simpson), riqueza (Chao1) e uniformidade (Pielou) microbiana em fezes de bezerros alimentados com diferentes dietas líquidas

A diversidade β foi afetada pela dieta líquida ($P < 0,001$), pela idade dos animais ($P < 0,001$) e também pela interação desses fatores ($P < 0,01$). Os efeitos da semana podem ser observados na Figura 3 onde os grupos de semanas estão bem agrupados, como evidenciados pelo MDS e DCA. A semana 0 está mais disperso, em relação aos demais, talvez pela maior riqueza de grupos microbianos.

Figura 3. Estrutura da comunidade microbiana em amostras fecais de bezerros alimentados com diferentes dietas líquidas. Escalonamento multidimensional (MDS) e análise de correspondência destendenciada (DCA) mostrando a métrica de distância UniFrac ponderada.

Avaliando o efeito da interação entre as diferentes dietas líquidas e a idade dos animais, pode-se perceber mais nitidamente como afetaram a estrutura do microbioma fecal ao longo do tempo. As dissimilaridades nas comunidades bacterianas foram mais evidentes entre os bezerros aleitados com leite acidificado e com leite em comparação com aqueles que receberam sucedâneo. Na primeira semana, esses grupos de dieta líquida tenderam a se agrupar separadamente (Figura 4). Na 4ª semana, apenas no MDS é possível observar diferenças entre os animais que receberam leite integral e aqueles que foram aleitados com leite acidificado ou sucedâneo. Entretanto, essa segregação não foi observada entre os bezerros na 2ª, 8ª e 10ª semana de idade, quando a composição da comunidade foi mais homogênea. Na 10ª semana, após o desaleitamento, há uma maior similaridade entre o microbioma dos animais, independentemente da dieta líquida.

Figura 4. Efeito da interação das dietas líquidas com as diferentes idades dos bezerros na estrutura da comunidade microbiana em amostras fecais de bezerros. Análise de correspondência destendenciada (DCA) e do escalonamento multidimensional (MDS) mostrando a métrica de distância UniFrac ponderada.

Foram identificados 40 filos bacterianos nas amostras fecais. No geral, os filos predominantes foram Bacteroidota (38,45%), Firmicutes_A (24,83%), Firmicutes (10,34%), Proteobacteria (9,65%), Firmicutes_C (7,21%) Fusobacteriota (4,21%) e Actinobacteriota (3,08%), correspondendo a 97,77% do total (Figura 5). Independente da dieta, Bacteroidota e Firmicutes_A foram os predominantes. Já em relação a idade dos animais ou a idade dentro das dietas líquidas, houve muita variação e nenhum filo permaneceu como predominante ao longo do tempo.

Figura 5. Abundância relativa bacteriana em nível de filo para amostras de rúmen de bezerros alimentados com diferentes dietas líquidas. Cada barra representa a indentificação da amostra analisada: AxxSy, onde Axx é o animal, Sy, a semana a qual foi realizada a coleta.

Desses 40 filos, foram quantificados 559 gêneros bacterianos, sendo identificados apenas 434 (77,6%), com os demais 125 ainda sem identificação, segundo o banco de dados do GTDB. Dentre os gêneros identificados, os mais predominantes foram *Prevotella* (8,64%), *Bacteroides_A* (6,10%), *Escherichia* (5,24%), *Faecalibacterium* (5,07%) e *Lactobacillus* (4,63%) (Figura 6). *Bifidobacterium* teve baixa abundância em relação aos demais (1,65%), estando em 12ª entre os mais predominantes no geral. Os não identificados representaram 28,14% da abundância total, destacando-se os gêneros não identificados da família Bacteroidaceae, Lachnospiraceae e Muribaculaceae que corresponderam respectivamente a 8,22%, 4,90% e 4,54% do total. Dezesete gêneros identificados (GI) e 7 não identificados (NI) apresentaram abundância $\geq 1\%$, e 49 e 14 com abundância entre 1 e 0,1%, respectivamente.

O tempo 0 apresentou maior riqueza e diversidade, mas quando se considera que os gêneros presentes na semana 0 podem ser transitórios, ao serem retirados da conta, sobram apenas 18 filos e 239 gêneros (197 GI e 42 NI).

Figura 6. Abundância relativa bacteriana em nível de gênero para amostras fecais de bezerros alimentados com diferentes dietas líquidas. Cada barra representa a indentificação da amostra analisada: AxxSy, onde Axx é o animal, Sy, a semana a qual foi realizada a coleta.

Para a análise de abundância diferencial entre os grupos, foram considerados comparações entre as dietas líquidas, dentro de cada semana de idade do animal. Dos 434 gêneros identificados, apenas 104 foram significativos no total entre as comparações testadas. Interessante notar que o maior número de comparações significativas ocorreu na 4ª semana (62 gêneros), e o menor número na 2ª semana (18 gêneros), ou seja, durante o período de aleitamento (Figura 7). Ao incluir os bezerros da 10ª semana, o número cai para 8 gêneros. Esse resultado mostra que, assim como evidenciado pela interação da diversidade β (MDS e DCA), há uma maior similaridade entre o microbioma dos bezerros após o desaleitamento.

Figura 7. Abundância diferencial em gêneros bacterianos abundantes em amostras de fluido ruminal em bezerros alimentados com dietas sólidas com diferentes níveis e fontes de FDN. Gêneros listados apresentaram abundância média $\geq 0,01\%$. Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste t ($P > 0,05$). Cada coluna representa a média dos animais amostrados naquela semana específica dentro da sua dieta.

4.4. Discussão

O TGI de bezerros recém-nascidos é tradicionalmente considerado estéril ao nascer, mas rapidamente adquire população microbiana diversa (Mayer et al., 2012). Badman et al. (2019), analisaram amostras fecais e observaram que a diversidade aumentou com o tempo durante o período de aleitamento, em bezerros alimentados com diferentes sucedâneos lácteos. Oikonomou et al. (2013) também relataram que a diversidade microbiana aumenta com idade. No presente trabalho, a maior diversidade foi observada logo após o nascimento, sendo reduzida a partir da primeira semana de vida, mas aumentando com a idade até alcançar valores próximos ao observado ao nascer. A maior riqueza e diversidade ao nascimento (tempo 0) sugere que a maioria dos microrganismos presentes são transitórios. As amostras desse tempo de coleta são do mecônio, e foram coletadas até mais ou menos uma hora após o nascimento, antes do fornecimento de colostro. Isso indica que o trato intestinal é rapidamente colonizado durante o nascimento. Além disso, quando as amostras desse ponto foram retiradas da contagem, o número de filos identificados, e conseqüentemente de gêneros, reduziu drasticamente. Isso não significa que esses microrganismos não sejam importantes, mas pode ser que representem papel fundamental apenas na colonização inicial após o nascimento. Segundo Fischer et al. (2018), esses microrganismos iniciais podem interagir com o hospedeiro de uma maneira única, levando à alta variação individual no microbioma.

Essa menor diversidade nas duas primeiras semanas, podem ser atribuídas a presença do gênero *Escherichia*, predominante na primeira semana, e o quinto mais abundante na segunda, independente da dieta líquida fornecida. Este foi o período de maior incidência de diarreia neonatal (Coelho et al., 2020), distúrbio TGI que está associado com disbiose. De fato, este gênero, tendo como principal representante, a espécie *Escherichia coli* enterotoxigênica, é uma das responsáveis por grande proporção de casos de diarreia neonatal em bezerros (Butler e Clarke, 1994; Rigobelo et al., 2006; Izzo et al., 2011). Assim, pode ser um dos principais motivos para diminuição da riqueza, diversidade e densidade microbiana em amostras fecais de bezerros leiteiros, como observado em outros estudos (Oikonomou et al., 2013; Xie et al., 2013; Nakamura et al., 2017; Zeineldin et al., 2018). O crescimento excessivo de *E. coli* pode ser limitado por bactérias produtoras de ácido lático, como *Lactobacillus spp.* (Ripamonti et al., 2013). *Lactobacillus spp.* foram associados ao aumento de

resistência à infecções e doenças diarreicas, além de estimular o sistema imunológico da mucosa (Abe et al., 1995; Macfarlane et al., 2008). Interessante notar que gêneros de *Lactobacillus* estiveram presentes também em maior abundância nesse período, provavelmente ajudando a minimizar e controlar os efeitos desse patógeno. Tanto na primeira quanto na segunda semana, a maior abundância significativa para os três gêneros foi relacionada às dietas líquidas leite integral e sucedâneo lácteo. Interessante notar que na 4ª semana, a menor abundância de *Escherichia* foi associada a essas duas dietas. No entanto, era esperado que o processo de acidificação do leite promovesse maior abundância de microrganismos desses gêneros, mas como o consumo dessa dieta foi menor que as demais (Coelho et al., 2020), é possível que esse estímulo tenha acontecido em menor intensidade.

Outro microrganismo que apareceu em menor concentração, mas foi abundante na primeira semana, foi o gênero *Bifidobacterium*, com maior abundância para os animais alimentados com sucedâneo em comparação ao leite integral, sem diferirem do leite acidificado. Na segunda semana, a maior abundância desse gênero foi para os animais alimentados com leite integral e sucedâneo. Provavelmente, a baixa abundância desse gênero em animais alimentados com leite acidificado está relacionada ao menor consumo desta dieta líquida nas primeiras semanas de vida, associada a ocorrência de diarreia. O aumento da proporção de bifidobactérias na microbiota de recém-nascidos está associado à saúde (Yoshioka et al., 1983; Harmsen et al., 2000; Albenberg e Wu, 2014), e à melhoria da barreira mucosa intestinal por meio de atividades contra patógenos (Lievin et al., 2000; Macfarlane et al., 2008; Fukuda et al., 2011; Hidalgo-Cantabrana et al., 2017). Acredita-se também que as bifidobactérias modulam o sistema imunológico intestinal, além de aumentar a produção de imunoglobulina A (Ouweland et al., 2002). No entanto, a maior abundância desse gênero ocorreu em animais diarreicos, com maior temperatura retal e maior número de dias com febre. Talvez haja a possibilidade desse gênero se expressar também em momentos de disbiose, para ajudar a manter a homeostase intestinal. Como os sucedâneos lácteos disponíveis no mercado apresentam variação em sua composição (Bittar et al., 2018), alguns autores comentam que seja possível a presença de alguns oligossacarídeos, que podem ser importantes no estabelecimento de uma microbiota intestinal benéfica, que podem atuar como componentes alimentares bioativos de alto potencial (Barile et al., 2009; Aldredge et

al., 2013; Badman et al., 2019). Esses dados talvez ajudem a entender o porquê do sucedâneo estimular a maior abundância desse gênero.

Semelhante a *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, *Faecalibacterium spp.* é capaz de produzir butirato (Pryde et al., 2002; Duncan et al., 2004), o qual promove o desenvolvimento ruminal e intestinal em bezerros (Steele et al., 2016). A maior prevalência inicial de *Faecalibacterium spp.* nas fezes foi relacionada com a menor incidência de diarreia nas primeiras quatro semanas de vida, além de aumento do ganho de peso corporal em bezerros (Oikonomou et al., 2013), em camundongos e em crianças obesas (Ley et al., 2005; Balamurugan et al., 2010). O mesmo foi observado no presente estudo, pois animais alimentados com leite ou leite acidificado tiveram maior abundância significativa desse gênero na primeira semana e apresentaram menor incidência de diarreia (Coelho et al., 2020). Essa capacidade de reduzir a incidência de diarreia pode estar relacionada, além da produção de butirato, com o bloqueio na produção de citocinas pró-inflamatórias (Tak e Firestein, 2001; Ley et al., 2005; Turnbaugh et al., 2006; Sokol et al., 2008; Oikonomou et al., 2013; Quévrain et al., 2016; Rossi et al., 2016).

Além desses gêneros, outros são descritos como comensais e benéficos ao ambiente intestinal. Bactérias dos gêneros *Akkermansia* (aumento da barreira da mucosa e biomarcador de saúde intestinal), *Dialister* (produção de valerato e capacidade anti-inflamatória), *Lawsonibacter* (produção de butirato) e *Sutterella* (atividade imunomoduladora) foram descritas na literatura como essenciais para a homeostase intestinal (Belzer e De Vos, 2012; Hiippala et al., 2016; Derrien et al., 2017; Sakamoto et al., 2018; Valles-Colomer et al., 2019; Taylor et al., 2020). Essas bactérias foram mais abundantes nas amostras coletadas na primeira e segunda semana em animais alimentados com o leite acidificado em comparação ao sucedâneo, sem diferirem do leite integral. Apesar do escore fecal não ter diferido entre os animais alimentados com sucedâneo e leite acidificado, e da menor presença de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em animais do leite acidificado, a presença desses outros gêneros menores e de *Faecalibacterium* contribuíram para a menor temperatura retal, e consequentemente, o menor número de dias com febre.

Apesar dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Faecalibacterium* auxiliarem no desenvolvimento do TGI, ao longo do tempo são superados pela competição por bactérias degradadoras de fibras (Dill-McFarland et al., 2017). Como observado em nosso trabalho e em trabalhos anteriores, a abundância desses três gêneros diminuiu com a idade (Uyeno et al.,

2010; Oikonomou et al., 2013; Klein-Jöbstl et al., 2014; Tomassini, 2015), enquanto houve aumento na abundância de bactérias associadas com a digestão da fibra, como os gêneros de *Fibrobacter* e *Ruminococcus*.

A presença de bactérias fermentadoras de carboidratos, como *Fusobacterium*, *Proteobacteria* e *Bacteroides* durante o período de aleitamento sugere um aumento da capacidade de utilização de carboidratos complexos que atingem o intestino grosso, incluindo celulose, hemicelulose, amido resistente e xilanas, provavelmente oriundos do concentrado fornecido (Dias et al., 2017; Gupta et al., 2017; Zhang et al., 2017)

A partir da quarta semana de vida, provavelmente em função do crescente consumo de concentrado, houve aumento da abundância e dominância do gênero *Prevotella*. Esse gênero possui uma ampla gama de capacidades metabólicas (Petri et al., 2013b; Rubino et al., 2017), pois pode utilizar carboidratos solúveis, pectinas, proteínas e hemicelulose (Huws et al., 2016). A dominância da *Prevotella* em resposta ao maior consumo de concentrado também foi observada por Meale et al. (2016).

No geral, há mudança dramática em direção a uma microbiota semelhante à de animais adultos, à medida que o animal aumenta o consumo de concentrado, desenvolvendo o rúmen e se preparando para o desaleitamento (Lallès, 2012). Isso pode ser observado a partir dos dados de estrutura microbiana, onde provavelmente em função do consumo de concentrado, há uma menor diferença entre os clusters para as diferentes dietas líquidas. Outra informação importante a ser analisada é que a diferença entre grupos significativos diminuiu consideravelmente na 10ª semana, quando esses animais já estavam desaleitados, alojados em um mesmo piquete e sob mesmo manejo. A coabitação permite que os indivíduos adquiriram uma microbiota compartilhada (Song et al., 2013; Wang et al., 2016; Diao et al., 2019), diminuindo a sua dissimilaridade.

4.5. Conclusão

As diferentes dietas líquidas foram eficientes em causar modificações nos microbiomas fecais durante o período de aleitamento. O leite resulta em maior diversidade e uniformidade da microbiota intestinal de bezerros, quando comparado ao sucedâneo lácteo, com o leite acidificado sem diferença entre as duas dietas líquidas. O fornecimento de leite integral também foi associado com maior abundância de bactérias benéficas para o TGI,

principalmente durante o período de maior ocorrência de diarreias. No entanto, após o desaleitamento, animais alimentados com diferentes dietas líquidas tiveram maior similaridade entre seus microbiomas. Assim, existem diferenças na colonização inicial em função de diferentes dietas líquidas, mas o microbioma intestinal converge para uma composição similar após o desaleitamento, provavelmente em função do ambiente e da composição da dieta sólida.

Referências

- Abe, F., N. Ishibashi, and S. Shimamura. 1995. Effect of Administration of Bifidobacteria and Lactic Acid Bacteria to Newborn Calves and Piglets. *J. Dairy Sci.* 78:2838–2846.
- Albenberg, L.G., and G.D. Wu. 2014. Diet and the Intestinal Microbiome: Associations, Functions, and Implications for Health and Disease. *Gastroenterology* 146:1564–1572.
- Aldredge, D.L., M.R. Geronimo, S. Hua, C.C. Nwosu, C.B. Lebrilla, and D. Barile. 2013. Annotation and structural elucidation of bovine milk oligosaccharides and determination of novel fucosylated structures. *Glycobiology* 23:664–76.
- Alta Cria 2019. 2019. Autores: Azevedo, R.A., L.F. Martins, P.M. Tiveron, A.M. Teixeira, C.M.M. Bittar, L.C.M.S. Antunes, J.E.P. Santos, P.P. Rotta, R.M. Meneses and S.G. Coelho: Uberaba, Minas Gerais, 110p.
- Badman, J., K. Daly, J. Kelly, A.W. Moran, J. Cameron, I. Watson, J. Newbold, and S.P. Shirazi-Beechey. 2019. The Effect of Milk Replacer Composition on the Intestinal Microbiota of Pre-ruminant Dairy Calves. *Front. Vet. Sci.* 6:1–9.
- Bai, Y., T. Liu, K. Hultquist, J. Wu, and D.P. Casper. 2020. Feeding an amino acid formulated milk replacer for Holstein calves. *J. Anim. Sci.* 98.
- Balamurugan, R., G. George, J. Kabeerdoss, J. Hepsiba, A.M.S. Chandragunasekaran, and B.S. Ramakrishna. 2010. Quantitative differences in intestinal *Faecalibacterium prausnitzii* in obese Indian children. *Br. J. Nutr.* 103:335–338.
- Barile, D., N. Tao, C.B. Lebrilla, J.D. Coisson, M. Arlorio, and J.B. German. 2009. Permeate from cheese whey ultrafiltration is a source of milk oligosaccharides. *Int. Dairy J.* 19:524–530.
- Belzer, C., and W.M. De Vos. 2012. Microbes inside from diversity to function: The case of *Akkermansia*. *ISME J.* 6:1449–1458.

- Bittar, C.M.M., J.T. da Silva, and H. Chester-Jones. 2018. Macronutrient and amino acids composition of milk replacers for dairy calves. *Rev. Bras. Saúde e Produção Anim.* 19:47–57.
- Butler, D.G. and R.C. Clarke. 1994 Diarrhoea and dysentery in calves. In Gyles C.L. (Ed.) *E. coli in domestic animals and humans*. Wallingford: Cab International. p.91-116
- Callahan, B.J., K. Sankaran, J.A. Fukuyama, P.J. McMurdie, and S.P. Holmes. 2016. Bioconductor Workflow for Microbiome Data Analysis: from raw reads to community analyses. *F1000Research* 5:1492.
- Callaway, T.R., S.E. Dowd, T.S. Edrington, R.C. Anderson, N. Krueger, N. Bauer, P.J. Kononoff, and D.J. Nisbet. 2010. Evaluation of bacterial diversity in the rumen and feces of cattle fed different levels of dried distillers grains plus solubles using bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing. *J. Anim. Sci.* 88:3977–3983.
- Coelho, M. G., C. R. Tomalusi, S. C. Donde, A. F. Toledo, J. P. G. Bernardes, N. Jeronymo, G. F. Virginio Jr, M. D. Silva, M. E. Reis and C. M. M. Bittar. 2020. Performance and health of dairy calves fed with acidified milk in tropical climates In: ASAS-CSAS-WSASAS Virtual Annual Meeting and Trade Show, Madison. American Society of Animal Science Association. Champaign.
- Cooper, R., and I. Watson. 2013. A guide to feeding and assessment of calf milk replacer. *Livestock* 18:216–222.
- Czarnecki-Maulden, G.L. 2008. Effect of dietary modulation of intestinal microbiota on reproduction and early growth. *Theriogenology* 70:286–290.
- Deng, Y.F., Y.J. Wang, Y. Zou, A. Azarfar, X.L. Wei, S.K. Ji, J. Zhang, Z.H. Wu, S.X. Wang, S.Z. Dong, Y. Xu, D.F. Shao, J.X. Xiao, K.L. Yang, Z.J. Cao, and S.L. Li. 2017. Influence of dairy by-product waste milk on the microbiomes of different gastrointestinal tract components in pre-weaned dairy calves. *Sci. Rep.* 7:42689.
- Derrien, M., C. Belzer, and W.M. de Vos. 2017. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. *Microb. Pathog.* 106:171–181.
- Dial, S., K. Alrasadi, C. Manoukin, A. Huang, and D. Menzies. 2004. Risk of *Clostridium difficile* diarrhea among hospital inpatients prescribed proton pump inhibitors: Cohort and case-control studies. *CMAJ* 171:33–38.

- Diao, Q., R. Zhang, and T. Fu. 2019. Review of Strategies to Promote Rumen Development in Calves. *Animals* 9:490.
- Dias, J., M.I. Marcondes, M.F. Noronha, R.T. Resende, F.S. Machado, H.C. Mantovani, K.A. Dill-McFarland, and G. Suen. 2017. Effect of Pre-weaning Diet on the Ruminal Archaeal, Bacterial, and Fungal Communities of Dairy Calves. *Front. Microbiol.* 8.
- Dias, J., M.I. Marcondes, S. Motta de Souza, B. Cardoso da Mata e Silva, M. Fontes Noronha, R. Tassinari Resende, F.S. Machado, H. Cuquetto Mantovani, K.A. Dill-McFarland, and G. Suen. 2018. Bacterial Community Dynamics across the Gastrointestinal Tracts of Dairy Calves during Preweaning Development. *Appl. Environ. Microbiol.* 84:e02675-17.
- Dill-McFarland, K.A., J.D. Breaker, and G. Suen. 2017. Microbial succession in the gastrointestinal tract of dairy cows from 2 weeks to first lactation. *Sci. Rep.* 7:40864.
- Dixon, P. 2003. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *J. Veg. Sci.* 14:927–930.
- dos Santos, G., and C.M.M. Bittar. 2015. A survey of dairy calf management practices in some producing regions in Brazil. *Rev. Bras. Zootec.* 44:361–370.
- Dray, S., and A.-B. Dufour. 2007. The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists. *J. Stat. Softw.* 22.
- Duncan, S.H., G. Holtrop, G.E. Lobley, A.G. Calder, C.S. Stewart, and H.J. Flint. 2004. Contribution of acetate to butyrate formation by human faecal bacteria. *Br. J. Nutr.* 91:915–23.
- Edrington, T.S., R.L. Farrow, B.H. Carter, A. Islas, G.R. Hagevoort, T.R. Callaway, R.C. Anderson, and D.J. Nisbet. 2012. Age and Diet Effects on Fecal Populations and Antibiotic Resistance of a Multi-drug Resistant *Escherichia coli* in Dairy Calves. *Agric. Food Anal. Bacteriol.* 2:162–174.
- Elsohaby, I., J.T. McClure, L.A. Waite, M. Cameron, L.C. Heider and G.P. Keefe. 2018. Using serum and plasma samples to assess failure of transfer of passive immunity in dairy calves. *J. Dairy Sci.* 102:567–577.
- Fischer, A., Y. Song, Z. He, D. Haines, L.L. Guan, and M.A. Steele. 2018. Effect of delaying colostrum feeding on passive transfer and intestinal bacterial colonization in neonatal male Holstein calves. *J. Dairy Sci.* 101:3099–3109.
- Fukuda, S., H. Toh, K. Hase, K. Oshima, Y. Nakanishi, K. Yoshimura, T. Tobe, J.M. Clarke, D.L. Topping, T. Suzuki, T.D. Taylor, K. Itoh, J. Kikuchi, H. Morita, M. Hattori, and H. Ohno.

2011. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469:543–549.
- Godden, S. 2008. Colostrum Management for Dairy Calves. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* 24:19–39.
- Górka, P., Z.M. Kowalski, P. Pietrzak, A. Kotunia, W. Jagusiak, and R. Zabielski. 2011. Is rumen development in newborn calves affected by different liquid feeds and small intestine development? *J. Dairy Sci.* 94:3002–3013.
- Gupta, R.S., A. Nanda, and B. Khadka. 2017. Novel molecular, structural and evolutionary characteristics of the phosphoketolases from bifidobacteria and Coriobacteriales. *PLoS One* 12.
- Guzman, C.E., L.T. Bereza-Malcolm, B. De Groef, and A.E. Franks. 2015. Presence of Selected Methanogens, Fibrolytic Bacteria, and Proteobacteria in the Gastrointestinal Tract of Neonatal Dairy Calves from Birth to 72 Hours. *PLoS One* 10:e0133048.
- Harmsen, H.J.M., A.C.M. Wildeboer-Veloo, G.C. Raangs, A.A. Wagendorp, N. Klijn, J.G. Bindels, and G.W. Welling. 2000. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 30:61–67.
- Hidalgo-Cantabrana, C., S. Delgado, L. Ruiz, P. Ruas-Madiedo, B. Sánchez, and A. Margolles. 2017. Bifidobacteria and Their Health-Promoting Effects. *Microbiol. Spectr.* 5.
- Hiippala, K., V. Kainulainen, M. Kalliomäki, P. Arkkila, and R. Satokari. 2016. Mucosal Prevalence and Interactions with the Epithelium Indicate Commensalism of *Sutterella* spp.. *Front. Microbiol.* 7:1706.
- Huws, S.A., J.E. Edwards, C.J. Creevey, P.R. Stevens, W. Lin, S.E. Girdwood, J.A. Pachebat, and A.H. Kingston-Smith. 2016. Temporal dynamics of the metabolically active rumen bacteria colonizing fresh perennial ryegrass. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92.
- Izzo, M.M., P.D. Kirkland, V.L. Mohler, N.R. Perkins, A.A. Gunn, and J.K. House. 2011. Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea. *Aust. Vet. J.* 89:167–173.
- Jaster, E.H., G.C. McCoy, T. Tomkins, and C.L. Davis. 1990. Feeding acidified or sweet milk replacer to dairy calves. *J Dairy Sci* 73:3563–3566.

- Kasparovska, J., M. Pecinkova, K. Dadakova, L. Krizova, S. Hadrova, M. Lexa, J. Lochman, and T. Kasparovsky. 2016. Effects of Isoflavone-Enriched Feed on the Rumen Microbiota in Dairy Cows. *PLoS One* 11:e0154642.
- Kelly, W.J., A.L. Cookson, E. Altermann, S.C. Lambie, R. Perry, K.H. Teh, D.E. Otter, N. Shapiro, T. Woyke, and S.C. Leahy. 2016. Genomic analysis of three *Bifidobacterium* species isolated from the calf gastrointestinal tract. *Sci. Rep.* 6:30768.
- Kembel, S.W., P.D. Cowan, M.R. Helmus, W.K. Cornwell, H. Morlon, D.D. Ackerly, S.P. Blomberg, and C.O. Webb. 2010. Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. *Bioinformatics* 26:1463–1464.
- Klein-Jöbstl, D., E. Schornsteiner, E. Mann, M. Wagner, M. Drillich, and S. Schmitz-Esser. 2014. Pyrosequencing reveals diverse fecal microbiota in Simmental calves during early development. *Front. Microbiol.* 5:622.
- Lallès, J.P. 2012. Long term effects of pre- and early postnatal nutrition and environment on the gut. *J. Anim. Sci.* 90:421–429.
- Law, C.W., Y. Chen, W. Shi, and G.K. Smyth. 2014. voom: precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol.* 15:R29.
- Lees, E.A., E.D. Carrol, N.A.F. Ellaby, P. Roberts, C.E. Corless, L. Lenzi, A. Darby, S.J. O’Brien, N.A. Cunliffe, M.A. Turner, F. Miyajima, and M. Pirmohamed. 2020. Characterization of Circulating *Clostridium difficile* Strains, Host Response and Intestinal Microbiome in Hospitalized Children With Diarrhea. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 39:221–228.
- Ley, R.E., F. Bäckhed, P. Turnbaugh, C.A. Lozupone, R.D. Knight, and J.I. Gordon. 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:11070–11075.
- Li, R.W., E.E. Connor, C. Li, R.L. Baldwin VI, and M.E. Sparks. 2012. Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomic tools. *Environ. Microbiol.* 14:129–139.
- Lievin, V., I. Peiffer, S. Hudault, F. Rochat, D. Brassart, J.R. Neeser, and A.L. Servin. 2000. *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 47:646–652.
- Lucci, C.S. 1989. Bovinos leiteiros jovens: nutrição, manejo, doenças. São Paulo: Nobel - EDUSP, 371p.

- Macfarlane, G.T., H. Steed, and S. Macfarlane. 2008. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *J. Appl. Microbiol.* 104:305–344.
- Malmuthuge, N., P.J. Griebel, and L.L. Guan. 2015. The Gut Microbiome and Its Potential Role in the Development and Function of Newborn Calf Gastrointestinal Tract. *Front. Vet. Sci.* 2:36.
- Maslowski, K.M., and C.R. MacKay. 2011. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat. Immunol.* 12:5–9.
- Mayer, M., A. Abenthum, J.M. Matthes, D. Kleeberger, M.J. Ege, C. Hölzel, J. Bauer, and K. Schwaiger. 2012. Development and genetic influence of the rectal bacterial flora of newborn calves. *Vet. Microbiol.* 161:179–185.
- McMurdie, P.J., and S. Holmes. 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 8:e61217.
- Meale, S.J., S. Li, P. Azevedo, H. Derakhshani, J.C. Plaizier, E. Khafipour, and M.A. Steele. 2016. Development of Ruminal and Fecal Microbiomes Are Affected by Weaning But Not Weaning Strategy in Dairy Calves. *Front. Microbiol.* 7:1–16.
- Muller C. 1986. An acidified milk replacer for calves compared clinically with a traditional replacer with special reference to the effect on intestinal flora. Giessen: German Federal Republic, Justus Liebig University. p. 154.
- Nakamura, S.-I., Y.H. Kim, K. Takashima, A. Kimura, K. Nagai, T. Ichijo, and S. Sato. 2017. Composition of the microbiota in forestomach fluids and feces of Japanese Black calves with white scours. *J. Anim. Sci.* 95:3949.
- Oikonomou, G., A.G.V. Teixeira, C. Foditsch, M.L. Bicalho, V.S. Machado, and R.C. Bicalho. 2013. Fecal Microbial Diversity in Pre-Weaned Dairy Calves as Described by Pyrosequencing of Metagenomic 16S rDNA. Associations of Faecalibacterium Species with Health and Growth. *PLoS One* 8:e63157.
- Ouwehand, A., E. Isolauri, and S. Salminen. 2002. The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood. *Eur. J. Nutr.* 41:32–37.
- Pacheco, A.R., D. Barile, M.A. Underwood, and D.A. Mills. 2015. The Impact of the Milk Glycobiome on the Neonate Gut Microbiota. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 3:419–445.

- Paradis, E., and K. Schliep. 2019. ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics* 35:526–528.
- Parks, D.H., G.W. Tyson, P. Hugenholtz, and R.G. Beiko. 2014. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics* 30:3123–3124.
- Penders, J., C. Thijs, C. Vink, F.F. Stelma, B. Snijders, I. Kummeling, P.A. Van Den Brandt, and E.E. Stobberingh. 2006. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118:511–521.
- Penders, J., C. Vink, C. Driessen, N. London, C. Thijs, and E.E. Stobberingh. 2005. Quantification of *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 243:141–147.
- Petri, R.M., T. Schwaiger, G.B. Penner, K.A. Beauchemin, R.J. Forster, J.J. McKinnon, and T.A. McAllister. 2013a. Changes in the Rumen Epimural Bacterial Diversity of Beef Cattle as Affected by Diet and Induced Ruminant Acidosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:3744–3755.
- Petri, R.M., T. Schwaiger, G.B. Penner, K.A. Beauchemin, R.J. Forster, J.J. McKinnon, and T.A. McAllister. 2013b. Characterization of the Core Rumen Microbiome in Cattle during Transition from Forage to Concentrate as Well as during and after an Acidotic Challenge. *PLoS One* 8:e83424.
- Poutanen, S.M., and A.E. Simor. 2004. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *CMAJ* 171:51–58.
- Pryde, S.E., S.H. Duncan, G.L. Hold, C.S. Stewart, and H.J. Flint. 2002. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol. Lett.* 217:133–139.
- Quévrain, E., M.A. Maubert, C. Michon, F. Chain, R. Marquant, J. Tailhades, S. Miquel, L. Carlier, L.G. Bermúdez-Humarán, B. Pigneur, O. Lequin, P. Kharrat, G. Thomas, D. Rainteau, C. Aubry et al. 2016. Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* 65:415–425.
- R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; <https://www.R-project.org/>.
- Rey, M., F. Enjalbert, S. Combes, L. Cauquil, O. Bouchez, and V. Monteils. 2014. Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning is sequential. *J. Appl. Microbiol.* 116:245–257.

- Rigobelo, E.C., H.J. Gamez, J.M. Marin, C. Macedo, J.A. Ambrosin, and F.A. Ávila. 2006. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 58:305–310.
- Ripamonti, B., E. Tirloni, S. Stella, C. Bersani, A. Agazzi, S. Marocco, and G. Savoini. 2013. Effects of a species-specific probiotic formulation on multiresistant *Escherichia coli* isolates from the gut of veal calves. *Czech J. Anim. Sci.* 58:201–207.
- Ritchie, M.E., B. Phipson, D. Wu, Y. Hu, C.W. Law, W. Shi, and G.K. Smyth. 2015. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 43:e47.
- Robinson, M.D., and A. Oshlack. 2010. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol.* 11:R25.
- Robinson, M.D., D.J. McCarthy, and G.K. Smyth. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139–140.
- Rossi, O., L.A. Van Berkel, F. Chain, M. Tanweer Khan, N. Taverne, H. Sokol, S.H. Duncan, H.J. Flint, H.J.M. Harmsen, P. Langella, J.N. Samsom, and J.M. Wells. 2016. *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 has a high capacity to induce IL-10 in human and murine dendritic cells and modulates T cell responses. *Sci. Rep.* 6:1–12.
- Rubino, F., C. Carberry, S. M Waters, D. Kenny, M.S. McCabe, and C.J. Creevey. 2017. Divergent functional isoforms drive niche specialisation for nutrient acquisition and use in rumen microbiome. *ISME J.* 11:932–944.
- Sakamoto, M., T. Iino, M. Yuki, and M. Ohkuma. 2018. *Lawsonibacter asaccharolyticus* gen. nov., sp. nov., a butyrateproducing bacterium isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68:2074–2081.
- Schwartz, S., I. Friedberg, I. V. Ivanov, L.A. Davidson, J.S. Goldsby, D.B. Dahl, D. Herman, M. Wang, S.M. Donovan, and R.S. Chapkin. 2012. A metagenomic study of diet-dependent interaction between gut microbiota and host in infants reveals differences in immune response. *Genome Biol.* 13.
- Shanks, O.C., C.A. Kelty, S. Archibeque, M. Jenkins, R.J. Newton, S.L. Mclellan, S.M. Huse, and M.L. Sogin. 2011. Community Structures of Fecal Bacteria in Cattle from Different Animal Feeding Operations. *J. Anim. Sci.* 112:2992–3001.

- Smyth, G.K. 2004. Linear Models and Empirical Bayes Methods for Assessing Differential Expression in Microarray Experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* 3:1–25.
- Sokol, H., B. Pigneur, L. Watterlot, O. Lakhdari, L.G. Bermúdez-Humarán, J.J. Gratadoux, S. Blugeon, C. Bridonneau, J.P. Furet, G. Corthier, C. Grangette, N. Vasquez, P. Pochart, G. Trugnan, G. Thomas, H.M. Blottière, J. Doré, P. Marteau, P. Seksik, and P. Langella. 2008. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:16731–16736.
- Song, S.J., C. Lauber, E.K. Costello, C.A. Lozupone, G. Humphrey, D. Berg-Lyons, J. Gregory Caporaso, D. Knights, J.C. Clemente, S. Nakielnny, J.I. Gordon, N. Fierer, and R. Knight. 2013. Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. *Elife* 2013.
- Steele, M.A., G.B. Penner, F. Chaucheyras-Durand, and L.L. Guan. 2016. Development and physiology of the rumen and the lower gut: Targets for improving gut health¹. *J. Dairy Sci.* 99:4955–4966.
- Tak, P.P., and G.S. Firestein. 2001. NF- κ B: A key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.* 107:7–11.
- Taylor, H., J. McDonald, J.I. Serrano Contreras, J. Li, J. Marchesi, and A. Hart. 2020. DOP08 Deep remission in paediatric Crohn’s disease is associated with increased abundance of dialister species and increased valerate. *J. Crohn’s Colitis* 14:S045–S046.
- Tomassini, L. 2015. Rectal microbiota dynamics in preweaned dairy calves depending on colostrum intake, presence of diarrhea, and antibiotic treatment. *Washingt. STATE Univ.*
- Turnbaugh, P.J., R.E. Ley, M.A. Mahowald, V. Magrini, E.R. Mardis, and J.I. Gordon. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444:1027–1031.
- USDA. 2016. Dairy 2014, Dairy Cattle Management Practices in the United States, 2014. USDA, Fort Collins, CO.
- Uyeno, Y., Y. Sekiguchi, K. Tajima, A. Takenaka, M. Kurihara, and Y. Kamagata. 2010. An rRNA-based analysis for evaluating the effect of heat stress on the rumen microbial composition of Holstein heifers. *Anaerobe* 16:27–33.
- Vael, C., and K. Desager. 2009. The importance of the development of the intestinal microbiota in infancy. *Curr. Opin. Pediatr.* 21:794–800.

- Valles-Colomer, M., G. Falony, Y. Darzi, E.F. Tigchelaar, J. Wang, R.Y. Tito, C. Schiweck, A. Kurilshikov, M. Joossens, C. Wijmenga, S. Claes, L. Van Oudenhove, A. Zhernakova, S. Vieira-Silva, and J. Raes. 2019. The neuroactive potential of the human gut microbiota in quality of life and depression. *Nat. Microbiol.* 4:623–632.
- Vasseur, E., F. Borderas, R.I. Cue, D. Lefebvre, D. Pellerin, J. Rushen, K.M. Wade, and A.M. de Passillé. 2010. A survey of dairy calf management practices in Canada that affect animal welfare. *J. Dairy Sci.* 93:1307–1316.
- Wang, L., Q. Xu, F. Kong, Y. Yang, D. Wu, S. Mishra, and Y. Li. 2016. Exploring the Goat Rumen Microbiome from Seven Days to Two Years. *PLoS One* 11:e0154354.
- Wang, Q., G.M. Garrity, J.M. Tiedje, and J.R. Cole. 2007. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:5261–5267.
- Wickham, H. 2009. *Ggplot2*. Springer New York, New York, NY.
- Xie, G., G.C. Duff, L.W. Hall, J.D. Allen, C.D. Burrows, J.C. Bernal-Rigoli, S.E. Dowd, V. Guerriero, and C.J. Yeoman. 2013. Alteration of digestive tract microbiome in neonatal Holstein bull calves by bacitracin methylene disalicylate treatment and scours¹. *J. Anim. Sci.* 91:4984–4990.
- Yanar, M., O. Guler, B. Bayram and J. Metin. 2006. Effects of feeding acidified milk replacer on the growth, health and behavioral characteristics of Holstein Friesian calves *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 30:235-241.
- Yoshioka, H., K. Iseki, and K. Fujita. 1983. Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics* 72:317–321.
- Zeineldin, M., R. Barakat, A. Elolimy, A.Z.M. Salem, M.M.Y. Elghandour, and J.C. Monroy. 2018. Synergetic action between the rumen microbiota and bovine health. *Microb. Pathog.* 124:106–115.
- Zhang, N., C. Song, M. Wang, Y. Liu, M. Hui, and Z. Cui. 2017. Diversity and characterization of bacteria associated with the deep-sea hydrothermal vent crab *Austinograea* sp. comparing with those of two shallow-water crabs by 16S ribosomal DNA analysis. *PLoS One* 12:e0187842.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A dieta e a idade desempenham um importante papel na manutenção e na diversidade do microbioma gastrointestinal. A composição da dieta sólida é capaz de alterar o microbioma ruminal. E o fornecimento de feno modificou o microbioma fecal. As diferentes dietas líquidas foram eficientes em modificar o microbioma fecal durante o período de aleitamento. No entanto, essas diferenças foram minimizadas após desaleitamento.

Apesar disso, há a possibilidade de utilizar diferentes dietas para melhorar ou estimular a presença de microrganismos benéficos durante o período de aleitamento. Dessa forma, parece promissora a possibilidade de utilizar possíveis intervenções dietéticas em determinadas idades para manipular o microbioma gastrointestinal para melhorar a saúde e, conseqüentemente, o desempenho dos animais.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Performance and health of dairy calves fed with acidified milk in tropical climates (Coelho et al., 2020).

Abstract text: The acidification of milk is used in mild climate countries as a way of conservation because it reduces the feed bacteriological load and consequently improves the animals' performance. However, this management is hampered in hot climates. Thirty-three males and female Holstein colostrum fed newborns calves were used in a randomized block experimental design and fed different liquid feed: refrigerated whole milk (WM); acidified milk kept in room temperature (AM); or a commercial milk replacer (MR: 22.9% CP; 18.8% fat; 16% solids). The animals were housed in individual shelters with free access to water and starter concentrate since 2d of age. Calves were fed 6L of liquid diet divided in two meals until their gradual weaning at 56d of age. The milk was acidified to a pH of 4.5 with formic acid 12 hours prior to feeding and kept in ambient temperature (23.7°C). The pH was monitored and corrected to the target pH before each meal. Blood samples were weekly collected and health was evaluated daily. No effect on feed intake was observed (Table 1). Feeding AM decreased calves' weight gain as compared to that for WM fed calves but with no difference from those fed MR. Fecal scores was higher for MR as compared to WM fed calves, but with no difference from AM. However, AM calves presented higher average rectal temperature then WM fed calves, but a lower number of days with fever. AM is an alternative for feeding calves in tropical climates with performance similar to that observed for MR but with lower days with fever.

Keywords: liquid diet, conservation, formic acid, weight gain, intake

Table - Performance data and health of dairy calves submitted to different liquid diet.

	Treatment			SEM ⁽¹⁾	P < ⁽²⁾		
	Whole milk	Acidified milk	Milk replacer		T	W	TxW
Intake							
Liquid diet, L/d	5.95	5.82	5.93	0.02	0.01	<.01	<.01
Concentrate, g DM/d	214.16	167.54	185.38	39.66	0.66	<.01	0.85
at weaning, g/d	592.59	509.77	483.41	0.02	0.01	<.01	<.01
Body weight, kg							
at birth, Kg	30.69	31.63	30.74	1.80	0.24	-	-
at weaning, Kg	70.54 ^a	63.56 ^b	61.15 ^b	1.677	<.0001	-	-
Weight gain, Kg/d	0.703 ^a	0.582 ^b	0.543 ^b	0.0235	<0.01	<0.01	0.08
Faecal score	0.68 ^b	0.77 ^{ab}	0.98 ^a	0.08	0.01	<0.01	0.43
Days with diarrhea							
Score - 2	6.33 ^b	8.20 ^{ab}	11.38 ^a	1.35	0.03	-	-
Score - 3	0.58	1.20	1.31	0.47	0.49	-	-
Faecal pH	6.61	6.61	6.71	0.08	0.61	<0.01	0.12
Rectal temperature	38.51 ^a	38.35 ^b	38.41 ^{ab}	0.04	0.01	<0.01	0.99
Days with fever	2.83 ^b	1.04 ^a	2.54 ^b	0.55	0.06	-	-

⁽¹⁾SEM: Standard error of the mean

⁽²⁾T: treatment effect; W: week effect; TxW: interaction effect treatment x week; abc: different letters on the same line indicate statistical difference (p < 0.05).