UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

"CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN BACTERIANA DEL SISTEMA DIGESTIVO EN BECERRAS DURANTE TEMPRANA EDAD"

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MVZ RENÉ PÉREZ AVENDAÑO

TUTOR
DR. EZEQUIAS CASTILLO LÓPEZ
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL
DR. HUGO RAMÍREZ ÁLVAREZ
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
DR. MARIO CUCHILLO HILARIO
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

Cuautitlán Izcalli, Agosto, 2020

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“Todo se puede alcanzar si se tiene fe en dios, en el estudio, en el trabajo y en la perseverancia”

MVZ Jesús Arturo Sandoval Romero (1959 - 2020)

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Ana María Avendaño Moreno y René Pérez García por ser la mayor motivación en mi vida, este trabajo está completamente dedicado a ustedes, por su amor y sus cuidados a través de todos estos años que han estado conmigo, me faltan palabras para agradecerles todo lo que han hecho pro mí, los amo.

A mi hermano Rodrigo Pérez Avendaño, que desde siempre me ha apoyado, ha estado a mi lado en las buenas y en las malas, y me ha dado los mejores consejos en la vida, te quiero mucho Drigo, gracias Chef.

A mi asesor, el Dr. Ezequias Castillo López, por aceptarme como su alumno de maestría, el apoyo y la confianza que me brindó a lo largo de este viaje fue incondicional, siempre con los consejos más acertados para realizar un excelente trabajo, a pesar de la distancia trabajamos de una manera excelente, gracias Doc.

A mi comité tutor, el Dr. Hugo Ramírez Álvarez y el Dr. Mario Cuchillo Hilario por las valiosas observaciones relacionadas al presente trabajo desde el primer tutoral, siempre tuvieron excelentes comentarios que mejoraron la calidad del trabajo, muchas gracias Doctores.

A los miembros del jurado, la Dra. Claudia Márquez Mota, El Dr. Atmir Romero Pérez y el Dr. Alberto Miranda Romero por sus valiosos comentarios que mejoraron notablemente el presente trabajo, muchas gracias Doctores.

Al MVZ Javier Hernández Balderas por encaminarme en el mundo de las vacas, guiarme durante todo el servicio social por este fascinante mundo, apoyarme en la tesis de licenciatura y actualmente por permitirme ser su ayudante, dando clases, muchas gracias Doc.

Al Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez por seguirme guiando desde la licenciatura, su apoyo y sus consejos siempre serán los mejores, muchas gracias Doc.

Al MVZ Jesús Arturo Sandoval Romero por todo el apoyo que me dio durante la carrera, los consejos que me ha dado ahora en la vida profesional, siempre de lo más atinado para salir avante con los casos clínicos, siempre lo recordaré con muchìsimo afecto, muchísimas gracias Doc.

A la MMVZ Miriam Rogel Hernández por todo, su apoyo, su amistad, sus consejos, definitivamente una de las más grandes inspiraciones que he tenido en la vida, no tengo palabras para agradecer todo lo que has hecho por mi, mil gracias Miri.

A la MMVZ Mayra Anzaldo Salinas por todo, después de años de no saber de nosotros, este viaje nos reencontró, haciendo una excelente amistad y un

excelente equipo de trabajo, compartiendo grandes momentos juntos, espero sigamos así por demasiado tiempo, mil gracias May.

Al MMVZ Javier Donnadieú Zavala por ser mi gran guía en la clínica de bovinos, después de tantos años, me volvió a aceptar para seguir aprendiendo del mejor, muchas gracias Doc.

A mi querido amigo Ángel Cervantes Ramírez, por estar siempre ahí, en las buenas, en las malas y en las peores, alentándome, ayudándome, creo esta amistad se forjó desde el primer día que nos vimos en la prepa, muchas gracias por todo Ángel.

A mis tres queridas y amadas niñas, Samanta Flores Quiroz, Cecilia Monroy Martínez y Alejandra Lozano Romo, por su amistad, además por ser mis primeras alumnas, que pude orientarlas un poco por el camino de los bovinos y por ayudarme a colectar las muestras, estuvieron siempre al pendiente de las becerritas, afortunadamente no solo se quedó en el servicio social, la amistad siguió y espero siga así por mucho tiempo más, muchas gracias, las quiero mucho.

A mis entrañables amigos de la Prepa 9, Sandra, Cirene, Memo, Ruth, Dione, Rafa, Bere, Fanny, por todos los momentos que hemos pasado juntos, por todo el apoyo que nos damos, en las buenas y en las malas, sé que siempre estaremos para todos, no se que hubiera hecho sin ustedes en la prepa, gracias.

A mis queridos amigos de toda la vida Mario, Adrián, Pablo, que seguimos reuniéndonos después de miles de años, jugando futbol, las retas de FIFA, y solo por convivir, muchas gracias por todo.

A todos los habitantes de las localidades de Oxtotipac, Santiago Tepetitlán, San Francisco, Belén, San Miguel, Coyotepec, Santa Bárbara y Coamilpa por permitirme ser su Médico Veterinario de confianza, gracias.

A la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo y en especial al personal del establo #160 por el permiso otorgado para la ejecución del experimento en dicho lugar.

A todos los profesores tanto de la FES-C como de la FMVZ con los cuales tomé clases, que me compartieron su conocimiento y experiencia, para ser mejor como profesionista, cada uno de ellos aportó demasiado en este trabajo, muchas gracias.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por ser mi alma mater, mi segunda casa, me formó como MVZ, ahora me forma como M en C y me está permitiendo devolverle algo siendo profesor, no tengo palabras para agradecer tanto que ha hecho por mí.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyecto número IA203618 y Programa de Apoyo a Proyectos Para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME), proyecto número PE202718 de la Universidad Nacional Autónoma de México, proyectos en los que el tutor de la presente tesis funge como responsable. Los recursos otorgados contribuyeron a financiar los gastos incurridos para la realización de la presente tesis.

A las vacas, toros, becerros, por dejarme trabajar con ellos, por guiarme desde la licenciatura, servicio social, vida profesional y maestría, la vida no sería igual sin ustedes, muchas gracias.

A Violeta, Lucas, Dominó, Mitocondria, Barra, Ezio, Dados, Miguelito, Enzima y Guanina por estar ahí, siempre cuidándome, que aunque unos ya no estén presentes, seguro deben estar viéndome y guiándome para ser un excelente profesionista, muchas gracias latosos.

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN *1*

2. ABSTRACT *3*

3. INTRODUCCIÓN *5*

4. ANTECEDENTES *7*

4.1 Generalidades del bovino y su alimentación **7**

4.2 Sistema digestivo de los bovinos **10**

4.2.1 Desarrollo 10
4.2.2 Anatomía 12
4.2.3 Microbiota 14

4.3 Presencia de diarrea en las becerras **18**

4.3.1 Diarrea secretora 19
4.3.2 Diarrea osmótica 20
4.3.3 Diarrea de mala absorción 20
4.3.4 Diarrea exudativa 20
4.3.5 Diarrea nutricional 21
4.3.6 Diarrea causada por patógenos 21

4.4 Estudio de la microbiota gastrointestinal **22**

4.4.1 Uso de medios de cultivo 22
4.4.2 Uso de la secuenciación masiva de ADN 23
4.4.3 Importancia clínica del estudio de la microbiota 28

5. TRABAJO EXPERIMENTAL *29*

5.1 Justificación **29**

5.2 Hipótesis **29**

5.3 Objetivo general **29**

5.3.1 Objetivos particulares 30

5.4 MATERIALES Y MÉTODOS **30**

5.4.1 Becerras, manejo nutricional y diseño experimental 31
5.4.2 Verificación de la calidad de calostro y transferencia de IgG a las becerras 32
5.4.3 Verificación de la calidad de la leche y del alimento iniciador 34
5.4.4 Colecta de muestras fecales y análisis de población de bacterias 35
5.4.5 Análisis estadístico 38

5.5 RESULTADOS **38**

5.5.1 Calidad de calostro y transferencia de IgG a las becerras 38
5.5.2 Composición nutrimental de la leche y alimento iniciador 39
5.5.3 Presencia de diarreas en las becerras 40
5.5.4 Diversidad beta de la población bacteriana 41
5.5.5 Diversidad alfa de la población bacteriana 42

5.5.6 Población bacteriana en el nivel taxonómico de filo 42
5.5.7 Población bacteriana en el nivel taxonómico de clase 46
5.5.8 Población bacteriana en el nivel taxonómico de orden 49
5.5.9 Población bacteriana en el nivel taxonómico de familia 52
5.5.10 Población bacteriana en el nivel taxonómico de género 56
5.5.11 Población bacteriana en el nivel taxonómico de especie 60
5.5.12 Bacterias potencialmente patógenas 63

5.6 DISCUSIÓN **67**

6. CONCLUSIONES ***72***

7. BIBLIOGRAFÍA ***74***

8. APÉNDICES ***83***

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Capacidades relativas de las divisiones del aparato digestivo del bovino en función de la edad, expresadas como porcentaje de la capacidad gástrica total. 11
Cuadro 2. Tipos de microorganismos y cantidad aproximada que se encuentran en rumen 14
Cuadro 3. Tipos de bacterias encontrados en el sistema digestivo de bovinos 16
Cuadro 4. Resultados de calidad de calostro y transferencia de IgG a las becerras. 38
Cuadro 5. Composición química de la leche proporcionada a las becerras. 39
Cuadro 6. Composición química del alimento iniciador proporcionado a las becerras. 39
Cuadro 7. Índices de diversidad alfa de la población de bacterias en las heces de becerras durante las primeras 4 semanas de vida. 42
Cuadro 8. Filos de bacterias en las heces de becerras durante las primeras 4 semanas de vida. 44
Cuadro 9. Clases de bacterias en las heces de becerras durante las primeras 4 semanas de vida. 47
Cuadro 10. Órdenes de bacterias en las heces de becerras durante las primeras 4 semanas de vida. 50
Cuadro 11. Familias de bacterias en las heces de becerras durante las primeras 4 semanas de vida. 53
Cuadro 12. Géneros de bacterias en las heces de becerras durante las primeras 4 semanas de vida. 57
Cuadro 13. Especies de bacterias más abundantes en las heces de becerras durante las primeras 4 semanas de vida. 61
Cuadro 14. Bacterias potencialmente patógenas detectadas en las heces de becerras durante las primeras 4 semanas de vida. 64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema digestivo en la fase fetal del bovino (22 mm).. 10
Figura 2. Sistema digestivo de bovino de 1 mes de edad. 11
Figura 3. Becerras adquiriendo microbiota del ambiente (A) y del alimento (B) 15
Figura 4. Diarrea tipo secretora en becerra de 1 mes de edad..... 19
Figura 5. Subunidad 16S del gen ribosomal, se aprecian las regiones hipervariables. En el presente trabajo se llevo a cabo la secuenciación de la región hipervariable V4…….....24
Figura 6. Pasos a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante amplificación por PCR y secuenciación del gen 16S ARNr..... 25
Figura 7. Representacion de un ciclo de secuenciación en la plataforma de Illumina. 26
Figura 8. Illustración del alojamiento en corral individual post-parto (A) y administración de calostro al nacimiento en algunas de las becerras utilizadas en el experimento (B). 32
Figura 9. Colecta de muestras de sangre en becerras por venopunción de yugular (A) y su colocación en tubos para la separación del suero (B)..... 34
Figura 10. A) Colecta de heces mediante estimulación gentil en la becerra; B) tubos para el almacenamiento de las muestras; C) preservación de las muestras. 36
Figura 11. Prevalencia de diarreas en las becerras durante el experimento..... 40
Figura 12. Diversidad beta de la población bacteriana de las heces de becerras según la edad: día 1 (puntos rojos), día 7 (puntos azules), día 14 (puntos naranjas), día 21 (puntos verdes) y día 28 (puntos morados). 41
Figura 13. Población bacteriana de las heces en uno de los casos (becerra 2277) con proliferación de *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens* como los patógenos predominantes en un problema diarreico. 65
Figura 14. Población bacteriana de las heces en uno de los casos (becerra 1617) con proliferación del patógeno *Bacteroides fragilis*..... 66

RESUMEN

La microbiota gastrointestinal juega un papel indispensable en los rumiantes. Al nacer, el sistema digestivo es estéril y es colonizado por microrganismos durante las primeras semanas de vida. Esta colonización microbiana es influenciada por la alimentación y el medio ambiente, y puede ser alterada por patógenos presentes en el establo. Por lo tanto, es necesario conocer dicha colonización bajo condiciones que reflejen el ambiente real de alojamiento, manejo y alimentación animal. Los objetivos de este estudio implicaron evaluar el efecto de la edad de las becerras sobre la colonización bacteriana intestinal en un hato comercial e identificar momentos críticos en la proliferación de patógenos, así como su posible relación con la alimentación y su efecto sobre la microbiota intestinal. Para ello:

1. Se realizó un análisis de muestras fecales.
2. Se emplearon 8 becerras recién nacidas que fueron alimentadas según lo establecido en el establo. La edad de las becerras (y dieta) en las que se evaluó la población bacteriana intestinal fueron: **día 1**: calostro, **día 7**: leche, **día 14**: leche e introducción de concentrado, **día 21**: leche y concentrado y **día 28**: leche y concentrado.
3. Se verificó la calidad del calostro, la leche y el alimento concentrado. Además, se verificó la adecuada transferencia de inmunidad a las becerras.
4. Se tomaron muestras de heces en los días correspondientes y se realizó la extracción de ADN, PCR y secuenciación de ADN bacteriano con la plataforma Illumina, así como el análisis taxonómico de la población obtenida.

El análisis estadístico fue realizado con SAS, el modelo incluyó el efecto fijo de edad y el efecto aleatorio de becerra. En el día 1, hubo una mayor ($P < 0.05$) proporción del filo *Proteobacteria* comparado con el resto de las semanas. A partir del día 7, se observó un aumento significativo ($P < 0.05$) en la población de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*.

Durante las primeras 2 semanas, hubo una proliferación mayor ($P < 0.05$) del género *Lactobacillus* comparado con el resto de las semanas. A partir del día 14, hubo un aumento ($P < 0.05$) de bacterias degradadores de fibra y almidón como

Ruminococcus y *Lachnospiraceae*. Las familias de bacterias más abundantes fueron *Burkholderiaceae, Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae, Bacteroidaceae* y *Lachnospiraceae.* Los principales patógenos detectados fueron *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* y *Bacteroides fragilis*, y predominaron durante las primeras 2 semanas.

En general, durante las primeras 4 semanas de vida los cambios en la dieta favorecen el establecimiento paulatino de la microbiota intestinal. El consumo de alimento concentrado promueve el desarrollo de bacterias fibrolíticas, proteolíticas y amilolíticas. Las principales variaciones en la microbiota, proliferación de patógenos y prevalencia de diarreas se observaron durante las primeras 2 semanas de vida, periodo en el que se dieron los mayores cambios en la dieta, por lo que es recomendable realizar dichos cambios de manera gradual (de calostro a leche y al momento de introducir concentrado) para evitar el riesgo de crear nichos que faciliten la proliferación de patógenos, así como extremar medidas de higiene durante esta etapa. Conocer el establecimiento de la microbiota intestinal y los momentos críticos asociados con la aparición de patógenos contribuye a mejorar los métodos de alimentación y prevención, lo que promueve una microbiota benéfica mejorando la salud animal.

Palabras clave: Ganado lechero, becerras**,** población bacteriana, secuenciación de ADN

1. ABSTRACT

The gastrointestinal microbiota plays an indispensable role in ruminants. At birth, the digestive system is sterile and is colonized by microorganisms during the first weeks of life. This microbial colonization is influenced by food and the environment, and can be altered by pathogens present in the barn. Therefore, it is necessary to know this colonization under conditions that reflect the real environment of lodging, handling and animal feeding. The objectives of this study implicated to evaluate the effect of calf age on intestinal bacterial colonization in a commercial herd, and to identify critical moments in the proliferation of pathogens, as well as its possible relationship with feeding and its effect on the intestinal microbiota. For this:

1. This through the analysis of fecal samples.
2. Eight newborn calves were used, which were fed as established in the stable. Specifically, the age of the calves (and diet) in which the intestinal bacterial population was evaluated were: **day 1:** colostrum, **day 7**: milk, **day 14:** milk and concentrate introduction, **day 21:** milk and concentrate, and **day 28:** milk and concentrate.
3. The quality of colostrum, milk and concentrated feed were verified as well as the adequate transfer of immunity to the calves.
4. Stool samples were taken on the corresponding days and DNA extraction, PCR, and DNA sequencing with the Illumina platform were performed along with taxonomic analysis of the bacterial population.

Statistical analysis was performed with SAS, the model included the age fixed effect and the calf random effect. On Day 1, there was a higher ($P < 0.05$) proportion of the *Proteobacteria* phylum compared to the rest of the weeks. From Day 7, a significant increase ($P < 0.05$) was observed in the *Firmicutes* and *Bacteroidetes* population.

During the first 2 weeks, there was a greater proliferation ($P < 0.05$) of the genus *Lactobacillus* compared to the rest of the weeks. From Day 14, there was an

increase (P <0.05) of fiber and starch degrading bacteria such as *Ruminococcus* and *Lachnospiraceae*. The most abundant families of bacteria were *Burkholderiaceae, Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae, Bacteroidaceae* and *Lachnospiraceae*. The main pathogens detected were *Escherichia coli, Clostridium perfringens* and *Bacteroides fragilis*, and they predominated during the first 2 weeks.

In general, during the first 4 weeks of life, changes in diet favor the gradual establishment of the intestinal microbiota. The consumption of concentrated food promotes the development of fibrolytic, proteolytic and amylolytic bacteria. The main variations in the microbiota, proliferation of pathogens, and prevalence of diarrhea were observed during the first 2 weeks of life, the period in which the greatest changes in diet occurred.

Therefore, it is advisable to make these changes as gradually as possible (from colostrum to milk and when introducing concentrate) to avoid the risk of creating niches that facilitate the proliferation of pathogens, as well as extreme hygiene measures during this stage. Knowing the establishment of the intestinal microbiota and the critical moments associated with the appearance of pathogens contributes to improving feeding and prevention methods, which promotes a beneficial microbiota improving animal health.

Key words: Dairy cattle, calves, microbiota, DNA sequencing.

2. INTRODUCCIÓN

La producción de leche en México es de suma importancia (Loera et al., 2017). Dentro de este sector, las becerras recién nacidas juegan un papel esencial debido a que fungen como reemplazos de los animales adultos. Por lo tanto, es indispensable conocer los factores que influyen sobre su salud y productividad. Esto con el fin de establecer planes que conlleven a mejorar los sistemas de producción o bien prevenir efectos negativos sobre la economía de los establos (Schrag, 1982). El sistema digestivo de los bovinos alberga una microbiota compleja. Este ecosistema incluye distintos microorganismos de los cuales las bacterias son las más abundantes y diversas, y establecen una simbiosis que permite la fermentación y degradación del alimento, lo que resulta en la conversión de materiales vegetales en compuestos digeribles, como lo es la proteína bacteriana (Ley et al., 2018).

El tracto gastrointestinal es estéril al momento del nacimiento, pero los microorganismos lo colonizan rápidamente en los primeros días de vida. La colonización del tracto gastrointestinal es de interés debido a su influencia sobre los procesos fisiológicos, digestivos y de salud del animal (Jami et al., 2013). Durante las últimas décadas, el estudio de los microorganismos del sistema gastrointestinal se ha basado principalmente en el aislamiento en medios de cultivo o técnicas de fermentación *in vitro* que han permitido caracterizar una buena porción de dicha población microbiana y que han mejorado nuestro entendimiento sobre la función de estos en los procesos metabólicos (Plaizier et al., 2017). Recientemente, el desarrollo de técnicas moleculares como la secuenciación de ADN y el análisis filogenético del gen de la subunidad 16 del ARN ribosomal (16S ARNr) con programas bioinformáticos han permitido una mayor profundización en el conocimiento sobre esta microbiota, mejorando así nuestra visión sobre su clasificación e identificación (Reguero, 2014). Estas técnicas no solamente están permitiendo el estudio de la población benéfica del sistema digestivo, sino que también permiten conocer más sobre el efecto de patógenos sobre la población microbiana y la salud animal. En este sentido, la integración de técnicas moleculares cobra mayor interés, en especial cuando se

quiere identificar aquellos microorganismos que no pueden ser cultivados en laboratorio o de los que se tiene poca información como el caso de nuevos patógenos que pueden incrementar la mortalidad en las becerras (Pérez et al., 2017).

Durante las primeras semanas de vida, las becerras son sujetas a cambios en su alimentación, lo cual beneficia su desarrollo. Sin embargo, esta es una etapa muy sensible en la que tienen que adaptarse a cambios metabólicos que pueden contribuir a la aparición de disturbios digestivos (Rosa et al., 2018). Entre las causas de enfermedad y tal vez de muerte más importantes en rumiantes neonatos están las diarreas, consideradas como la principal causa de morbilidad y mortalidad (Gómez et al., 2017). Por lo tanto, el estudio del establecimiento de la población microbiana del sistema digestivo, particularmente de la última porción de éste, proporcionará información de la identificación de momentos críticos en la aparición de patógenos, su posible relación con la alimentación y el proceso de recuperación de la microbiota que, de a poco, se reestablece hasta lograr un microbioma homogéneo, sin omitir la importancia del manejo durante esta etapa.

Con respecto a la hipótesis, se establece que la edad de las becerras, así como los cambios en la dieta, influirán sobre el tipo y proporción de bacterias intestinales. En este sentido, es fundamental considerar la existencia de momentos cruciales relacionados con la alimentación y/o con la aparición de patógenos que podrían alterar la microbiota y causar disturbios digestivos.

3. ANTECEDENTES

4.1 Generalidades del bovino y su alimentación

Con el paso del tiempo, el ser humano ha seleccionado ciertos animales y planificado los apareamientos en los bovinos. Con esto fue posible fijar ciertos rasgos que demostraron alguna superioridad. De ese modo evolucionaron varios tipos de ganado, los destinados a la producción de carne, de leche, de doble propósito y de tiro (Gloobe, 1989).

El ganado productor de leche se distingue por un sistema mamario bien desarrollado, que transforma el alimento ingerido en leche de alta calidad. A diferencia de las aves, cerdos y del hombre, los rumiantes pueden ingerir pasto y convertirlo en proteínas. Los rumiantes también pueden utilizar y digerir el nitrógeno no proteico (urea), material relativamente barato y transformarlo en proteína animal para el consumo humano (Gloobe, 1989).

Los bovinos se caracterizan por su capacidad para alimentarse de forraje. Esta característica se basa en la posibilidad de degradar los carbohidratos estructurales del forraje, como celulosa y la hemicelulosa, poco digestibles para los monogástricos. Basada en esta diferencia fundamental la fisiología digestiva del bovino adquiere características particulares (D'Mello, 2000). La degradación del alimento se realiza mayoritariamente por digestión fermentativa. Los procesos fermentativos los realizan diferentes tipos de microorganismos que el bovino aloja en sus compartimentos digestivos (Frandson et al., 2009). Por esta razón, es indispensable tener presente que, al alimentar a los bovinos, primero se alimenta a los microorganismos del sistema digestivo. Esta digestión, favorece al bovino permitiéndole degradar carbohidratos estructurales y también otros componentes de la dieta, expuestos a los mismos procesos fermentativos como las proteínas y el almidón (Malmuthuge et al., 2016).

El sistema gastrointestinal de los bovinos alberga una microbiota muy compleja. Es un ecosistema en el cual distintos microorganismos incluyendo bacterias, arqueas, hongos y protozoarios, establecen una simbiosis que permite la degradación de nutrientes bajo condiciones anaeróbicas. Por ejemplo, los

microorganismos fermentan los componentes de los alimentos para producir ácidos grasos volátiles (AGV's), amoníaco y proteína microbiana que el animal digiere, absorbe y convierte en otros productos metabólicos. También se sabe que estos microorganismos interactúan con el sistema inmune del huésped, lo que influye sobre la salud, productividad y resistencia a infecciones (Ley et al., 2008; Zilber-Rosenberg y Rosenberg, 2008; Serikov y Finlay, 2009).

En los rumiantes, el tracto gastrointestinal es estéril al momento del nacimiento, pero las bacterias lo colonizan rápidamente durante las primeras 24 horas de vida. La colonización de este medio libre de microorganismos es de interés para comprender el desarrollo de sus funciones, que son un requisito previo para el destete (Jami et al., 2013).

El epitelio gastrointestinal de los becerros se enfrenta con el reto de proteger a estos de los contenidos tóxicos del medio luminal mientras controla la absorción y el metabolismo de los nutrientes benéficos. Se ha demostrado en mamíferos recién nacidos que la comunidad microbiana inicial se adquiere del medio circundante. Esto incluye la vagina, la piel durante la lactancia y el aseo, el material de crianza, el calostro y la leche (Steele et al., 2016). Todas estas formas posibles no son mutuamente excluyentes. Los alimentos sólidos también llevan sustratos de fermentación, reforzando y potencialmente influyendo en la colonización microbiana (Alexander et al., 2016).

Históricamente la microbiología ha sido estudiada mediante técnicas de cultivo permitiendo la descripción de muchas especies de microorganismos. Sin embargo, debido a que la mayoría de éstos no son cultivables, aún no se ha logrado explicar fehacientemente la relación entre muchas poblaciones microbianas y su función ecológica con la fisiología del ganado y su respuesta a suplementos y/o dietas particulares (McCann et al., 2014). En consecuencia, entender la relación de la microbiota gastrointestinal y la modulación de sus poblaciones por factores intrínsecos y extrínsecos es un tema prioritario.

Los mecanismos que gobiernan el metabolismo y la función gastrointestinal han recibido una atención particular desde la década pasada, especialmente con avances en técnicas moleculares como la PCR y la secuenciación de ADN (Espinoza-Velasco et al., 2018). En este proceso, el rumen ha sido el principal punto de estudio de los bovinos productores de leche, mientras que la microbiota intestinal ha recibido relativamente poca atención (Kobayashi, 2006).

La dieta tiene un efecto sobre la composición de las poblaciones microbianas, se ha descrito un núcleo microbiano constituido por el filo *Firmicutes*, destacando dentro de éste los géneros *Ruminococcus* y *Butyrivibrio*, y el filo *Bacteroidetes*, particularmente incluyendo a *Prevotella*. Además, en animales adultos, se considera que la microbiota gastrointestinal es altamente resistente a cambios y es específica del huésped. Los 30 grupos bacterianos más abundantes reportados pertenecen a los géneros *Prevotella, Butyrivibrio, Ruminococcus*, así como a las familias *Lachnospiraceae, Ruminococcaceae* y órdenes *Bacteroidales y Clostridiales*, los cuales representan hasta el 67% del total (Henderson et al., 2015).

En los sistemas de producción lechera, durante los primeros días de vida, la alimentación está basada en el consumo lácteo y se complementa con concentrado y forraje hasta un periodo que comprende desde los 60 y hasta los 90 días de edad. En general, la leche se proporciona a razón de 10% del peso vivo, la cual puede administrarse en una o dos tomas, en biberón o cubeta. Debe proporcionarse en cantidades tales que aporten un mínimo de 350 a 400 g de sólidos al día. El empleo de concentrado es más importante en los animales que se destetarán a menor edad, pues el alimento sustituirá a la leche como proveedor de nutrientes. En general, se sugiere ofrecerlo *ad libitum* con lo que los animales se adaptarán poco a poco a su consumo, de tal manera que a los 90 días tendrán ingestiones promedio diarias de aproximadamente 1 kg (McDonald et al., 2011). Los concentrados de iniciación deben tener alrededor de 16% de proteína. El alimento sólido también favorece el desarrollo del retículo-rumen, tanto en

capacidad como en función, en especial al estimular la producción de ácidos grasos volátiles y el desarrollo de las papilas ruminales (McDonald et al., 2011; Shimada, 2015).

4.2 Sistema digestivo de los bovinos

4.2.1 Desarrollo

El sistema digestivo del rumiante se desarrolla a partir del endodermo, específicamente como dilataciones del intestino primitivo del embrión (figura 1). En la fase temprana, el sistema digestivo fetal tiene una configuración adulta; es decir, el rumen ocupa la mayor proporción pero durante los últimos meses de vida intrauterina el abomaso supera a los demás (Hyttel et al., 2010).

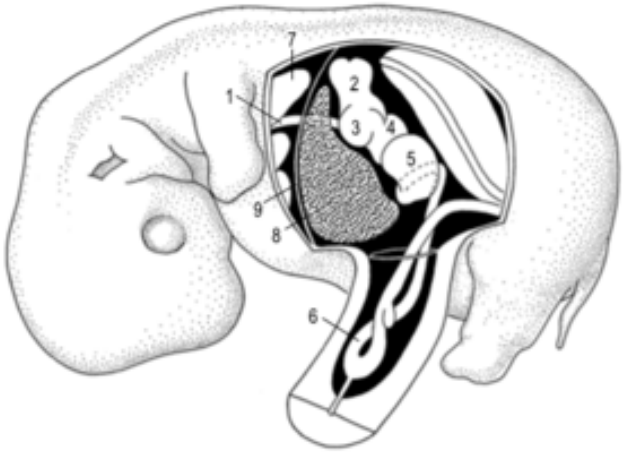

Figura 1. Sistema digestivo en la fase fetal del bovino (22 mm).**1.** Esófago; **2.** Rumen; **3.** Retículo; **4.** Omaso; **5.** Abomaso; **6.** Intestino; **7.** Pulmón; **8.** Hígado; **9.** Diafragma (Hyttel et al., 2010).

En el neonato, el abomaso representa aproximadamente la mitad del sistema digestivo. Esto se debe a su función en el aprovechamiento de la dieta líquida durante las primeras semanas de vida. La leche evita pasar por el rumen, el retículo y el omaso por medio del *sulcus reticuli* y el *sulcus omasi* logrando pasar directamente al abomaso, donde se coagula por acción de la renina, convirtiendo la caseína soluble en una red de paracaseinato de calcio, que retiene los glóbulos grasos. Este coágulo segrega el suero que transporta la lactosa y proteínas solubles hacia el intestino. La lactosa es degradada en glucosa y galactosa por la lactasa en los enterocitos y es absorbida. El enterocito posee también peptidasas

que actúa sobre el suero (Mcdonald et al., 2011). La actividad digestiva intestinal contrarresta la baja capacidad secretora del páncreas y del hígado en esta etapa (Relling, 2003). Por otro lado, la actividad lipolítica recae en la lipasa salival que libera monoglicéridos y ácidos grasos libres que son absorbidos por los enterocitos (Klein, 2013). Con el cambio de dieta líquida a sólida, el rumen, el retículo y el omaso se vuelven funcionales y aumentan de tamaño (cuadro 1 y figura 2) (Hyttel et al., 2010). Por lo tanto, esta transición de lactante a rumiante conlleva cambios funcionales, metabólicos, microbiológicos, y morfológicos (Frandson et al., 2009; McDonald et al., 2011; Klein, 2013).

Cuadro 1. Capacidades relativas de las divisiones del aparato digestivo del bovino en función de la edad, expresadas como porcentaje de la capacidad gástrica total (Hyttel et al., 2010).

Edad	Retículo-rumen %	Omaso %	Abomaso %
Neonato	40	4	56
3 semanas	48	4	36
7 semanas	66	4	23
Adulto	85-90	3-5	8-9

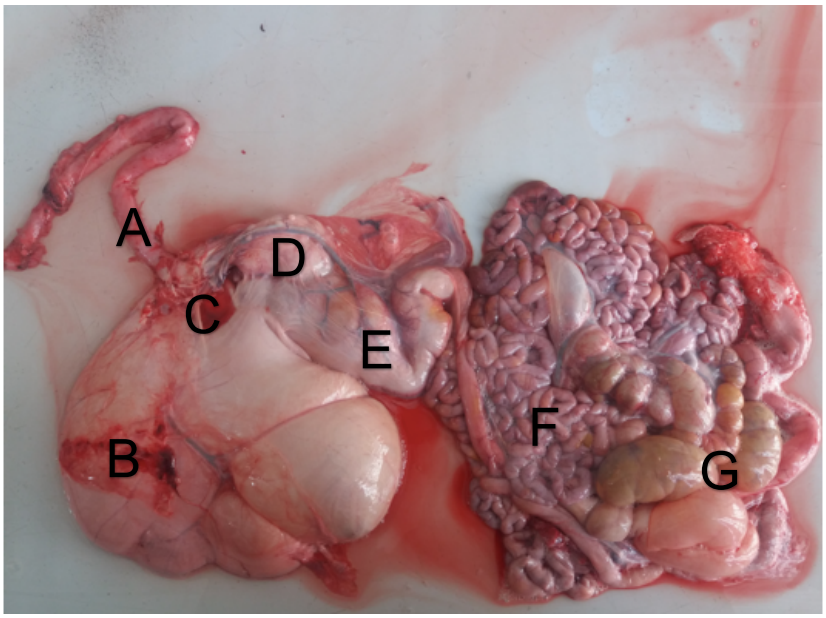

Figura 2. Sistema digestivo de bovino de 1 mes de edad. **A**) Esófago **B)** Rumen **C)** Retículo **D)** Omaso **E)** Abomaso **F)** Intestino delgado **G)** Intestino grueso. (Fuente no publicada. MVZ René Pérez Avendaño)

4.2.2 Anatomía

El sistema digestivo anterior del bovino incluye el rumen, retículo y omaso (Getty, 2002). Estos están compuestos de epitelio escamoso estratificado no glandular y comprende una serie de cámaras en las cuales la comida se digiere por microorganismos antes de pasar a través del tracto digestivo posterior hacia la sección glandular del rumiante, el abomaso y los intestinos (figura 2) (König et al., 2004).

Rumen. Tiene como característica principal la presencia de papilas cónicas que se proyectan hacia la luz provenientes de la mucosa cutánea. Estas papilas pueden ser de 1.5 cm de longitud y contienen tejido conectivo vascularizado con fibras elásticas y colágenas finas (König et al., 2004). Los pilares del rumen son grandes pliegues que contiene una parte central de músculo (Bacha et al., 2012). Es el compartimento más grande; ocupa toda la mitad izquierda de la cavidad abdominal, desde el diafragma hasta la entrada de la pelvis. Cuando el rumen está lleno, puede sobrepasar la línea media y llegar a ocupar parte del lado derecho (Getty, 2002; Gloobe, 1989). Está dividido en varios sacos: saco ventral, saco dorsal, saco craneal, saco ciego caudodorsal, saco ciego caudoventral (König et al., 2004).

Retículo. Su morfología es similar a la del rumen. La mucosa tiene muchos pliegues primarios que, a simple vista, se ordenan como una red o un panal. A partir de estos pliegues se observan numerosas papilas secundarias y terciarias (Frandson et al., 2009). Una masa aislada de músculo liso de la lámina muscular mucosa se presenta en los bordes de los pliegues reticulares (Bacha et al., 2012). El retículo es el compartimento más craneal. Su mucosa se realza en forma de crestas que se intersectan por esto recibe el nombre común de redecilla (Gloobe, 1989). El retículo está íntimamente relacionado con el rumen, tanto en estructura como en función y muchos autores lo describen como el compartimento ruminoreticular (König et al., 2004). La mucosa reticular es no glandular (Bacha et al., 2012).

Omaso. El omaso tiene una forma de esfera bilateral aplanada y algo comprimida entre sus superficies parietal y visceral (Getty, 2002). Se relaciona ventralmente

con el retículo y el abomaso. Su superficie parietal se relaciona con el hígado, duodeno y yeyuno; su superficie visceral con rumen y retículo (Gloobe, 1989). De sus paredes se proyectan hacia su cavidad entre 100 y130 láminas longitudinales paralelas de diferentes tamaños, denominadas hojas. Las láminas son hojas musculares delgadas con mucosa no glandular (Bacha et al., 2012). Mediante sus hojas, se aumenta el proceso mecánico y de absorción del contenido alimenticio. El omaso se comunica con el retículo a través del orificio retículo - omasal y con el abomaso a través del orificio omaso – abomasal (König et al., 2004).

Abomaso. Es una de las porciones glandulares de los rumiantes. Está formado por una membrana glandular, una túnica muscular compuesta de fibras lisas y una serosa (Getty, 2002). La mucosa glandular del abomaso comprende el epitelio superficial, lámina propia rica en glándulas y capa muscular de la mucosa.

Las glándulas fúndicas son las más abundantes. En estas hay varios tipos de células:

- Célula de la mucosa del cuello: producen mucinógeno.
- Células parietales: secretan HCl.
- Células principales: secretan proteínas.
- Células Apud.
- Células indiferenciadas (Bacha et al., 2012).

El abomaso se puede dividir en fondo, cuerpo y parte pilórica. El fondo está en la región xifoides. El cuerpo se extiende caudalmente entre el saco ventral del rumen y el omaso, situándose más a la izquierda que a la derecha del plano medio. La parte pilórica gira a la derecha caudal del omaso y se inclina dorsalmente para unirse al duodeno en el píloro (Gloobe, 1989).

Intestinos. Los intestinos se pueden dividir en delgado y grueso. El intestino delgado incluye el duodeno, yeyuno e íleon. El intestino grueso incluye el colon ciego y recto. Entre las funciones más importantes de los intestinos están la absorción de nutrientes productos de la digestión de proteínas, lípidos y carbohidratos. Además, se producen enteropeptidasas y sacaridasas que llevan a cabo la parte final de la digestión antes de la absorción de los productos. En el intestino grueso existe también una importante absorción de agua. Esta porción

intestinal esta formada por músculos que contribuyen a la formación de las heces (Hyttel et al., 2010; Sadler, 2012).

4.2.3 Microbiota

La composición de la microbiota gastrointestinal y su función en los bovinos lecheros es muy importante, esta puede influenciar la producción de leche y la salud del hospedero. Nuestro conocimiento sobre la microbiota de tracto gastrointestinal de los bovinos productores de leche sigue siendo limitada. El sistema digestivo está habitado por una alta densidad de microbiota, que consiste en bacterias, protozoarios, arqueas y hongos que degradan los nutrientes consumidos (cuadro 2) (Alexander et al., 2016).

Cuadro 2. Tipos de microorganismos y cantidad aproximada que se encuentran en rumen (Alexander et al., 2016)

Tipos	Dominio	No. (por mL o g de contenido ruminal)	Porcentaje total de la masa microbiana
Bacterias	Eubacteria	10^9-10^{11}	40-90
Arqueas	Archaea	10^5-10^8	2-4
Protozoarios	Eukarya	10^2-10^3	<60
Hongos	Eukarya	--	<10

Bacterias. Su concentración en los compartimentos anteriores o en el intestino grueso oscila entre 10^{10} y 10^{11} células/gramo de ingesta (Jami et al., 2012). La mayoría de estas bacterias son anaerobias estrictas, aunque también pueden encontrarse microorganismos facultativos.

El estudio de estas poblaciones bacterianas complejas y su interacción es de gran importancia (Jami et al., 2012; Jami et al., 2013). El desarrollo del sistema digestivo es el resultado de la interacción íntima entre las bacterias, su metabolismo, la dieta y el hospedero. Por ejemplo, los ácidos grasos volátiles producidos influyen sobre el tamaño y forma de las papilas ruminales (Jami et al., 2012; Rey et al., 2013).

Las estructuras únicas del sistema digestivo, a su vez, proporcionan nichos para la colonización de ciertos microorganismos al ser adquiridos del medio ambiente (figura 3, foto tomada en el establo #160 de la cuenca de Tizayuca, Hidalgo). Se han reportado que los anaerobios facultativos y bacterias aeróbicas, incluyendo bacterias fermentadoras de lactato son las dominantes en la primera semana de vida (Khafipour et al., 2009). También se ha observado que cuando los terneros son apartados de la madre, la posibilidad de adquirir una comunidad bacteriana benéfica se reduce y el intestino puede ser fácilmente colonizado por patógenos (Jami et al., 2013; Mao et al., 2015).

Figura 3. Becerras adquiriendo microbiota del ambiente (A) y del alimento (B) (Fuente no publicada, MVZ René Pérez Avendaño)

La reciente aplicación de técnicas moleculares, como las técnicas de amplificación y secuenciación del gen 16S ARNr, han proporcionado la alternativa para examinar la diversidad y estructura de esta población, estimando así que la cantidad de géneros y especies de bacterias es de 10 a 100 veces mayor que la que actualmente se tiene descrita (Li et al., 2012). En el cuadro 3 se enlistan algunas de estas especies.

Cuadro 3. Tipos de bacterias encontrados en el sistema digestivo de bovinos (Flores, 2019)

Bacterias celulolíticas *Bacteroides succinogenes* *Ruminococcus flavefaciens* *Ruminococcus albus* *Butyrivibrio fibrisolvens*	Bacterias que utilizan azúcares *Treponema bryantii* *Lactobacillus vitulinus* *Lactobacillus ruminis*
Bacterias hemicelulolíticas *Butyrivibrio fibrisolvens* *Bacteroides ruminicola* *Ruminococcus sp.*	Bacterias productoras de amoníaco *Bacteroides ruminicola* *Selenomonas ruminantium*
Bacterias pectinolíticas *Butyrivibrio fibrisolvens* *Bacteroides ruminicola* *Lachnspira multiparus* *Succinivibrio dextrinosolvens* *Treponema bryantii* *Streptococcus bovis*	Bacterias proteolíticas *Bacteroides amylophilus* *Bacteroides ruminicola* *Butyrivibrio fibrisolvens* *Streptococcus bovis*
Bacterias amilolíticas *Bacteroides amylophilus* *Streptococcus bovis* *Succinimonas amylolytica* *Bacteroides ruminicola*	Bacterias que utilizan lípidos *Anaerovibrio lipolytica* *Butyrivibrio fibrisolvens* *Treponema bryantii* *Eubacterium s* *Fusocillus sp* *Micrococcus sp.*
Bacterias ureolíticas *Succinivibrio dextrinosolvens* *Selenomonas sp.* *Bacteroides ruminicola* *Ruminococcus brodi* *Butyrivibrio sp.* *Treponema sp.*	

Protozoarios. Los protozoarios fueron los primeros microorganismos ruminales en ser descubiertos por Gruby y Delafond (1843) (Williams et al., 1992), al igual que las bacterias, son anaerobios (Hobson et al., 1997). Ciertas especies poseen organelos, llamados hidrogenosomas, estas estructuras los hacen aerotolerantes y

son también responsables del rol que juegan en la eliminación de oxígeno para mantener la anaerobiosis (Mendoza et al., 1993; Millen et al., 2016).

Hongos. Los hongos anaerobios fueron descubiertos en 1975 por Colin Orpin. Antes de su descubrimiento, las estructuras fúngicas (esporas) se confundieron con los protozoarios flagelados. Según las características morfológicas, los hongos se clasifican en dos grandes grupos: levaduras y mohos (Millen et al., 2016). Las levaduras son organismos unicelulares y los mohos son multicelulares formando una red de filamentos llamados hifas. Funcionalmente, los hongos en el rumen se clasifican en dos grupos. El grupo 1 consiste en hongos que son facultativamente anaeróbicos o aeróbicos, son transitorios y no contribuyen a la digestión ruminal (Hobson et al., 1997). El segundo grupo consiste en hongos anaeróbicos obligatorios que son autóctonos del rumen y contribuyen a la digestión ruminal. Las levaduras en el rumen varían en concentración de 10^2 a 10^3/gramo de contenido (Millen et al., 2016).

Arqueas. El dominio de las arqueas difiere filogenéticamente de las bacterias, protozoarios y hongos, estas carecen de peptidoglicano y tienen estructuras lipídicas inusuales. Las arqueas constituyen aproximadamente el 2–4% de la población microbiana en el rumen, se han cultivado a partir de contenidos ruminales y pertenecen solo a unos pocos géneros y especies. Los metanógenos que se han cultivado pertenecen a cinco géneros y siete especies: *Methanobacterium formicium, Methanobacterium bryantii, Methanobrevibacter olleyae, Methanobrevibacter millerae, Methanobrevibacter ruminantium, Methanomicrobium mobile, Methanoculleues olentangyker* (Castillo-López et al., 2016; Millen et al., 2016).

La microbiota gastrointestinal contribuye a la salud del huésped y al desarrollo inmunológico. Esta microbiota está presente en cantidades aproximadamente constantes en el intestino sano (Suchodolski et al., 2012). Dicha simbiosis actúa como una barrera de defensa contra la colonización por enteropatógenos

transitorios, apoyan al huésped en la digestión y la recolección de energía de la dieta, y proporcionan señales estimulantes al sistema inmune (Weese et al., 2016; Zeineldin et al., 2018; Oikonomou et al., 2013).

Los cambios en la composición de la microbiota fecal se han asociado con diversas enfermedades gastrointestinales; por ejemplo, ciertas estructuras comunitarias parecen ser protectoras contra los patógenos que pueden causar diarrea (Oikonomou et al., 2013). Las perturbaciones en la salud gastrointestinal a menudo son multifactoriales y pueden causar pérdidas económicas en el ganado a través de la disminución de la fertilidad, la producción de leche y / o la ganancia de peso (Cho et al., 2014).

La mala salud gastrointestinal también se asocia con procesos digestivos y de absorción deteriorados, interrupciones de la microbiota residente y una mayor incidencia de morbilidad y mortalidad, particularmente en animales jóvenes. Las posibles causas de diarrea en terneros indica que se debe a una combinación de factores como pueden ser, infecciones parasitarias (coccidiosis) y bacterianas (*Clostridium perfringens*, *Escherichia coli, Bacteroides fragilis*) (Zeineldin et al., 2018).

4.3 Presencia de diarreas en las becerras

Entre las causas de enfermedad y tal vez de muerte más importantes en el recién nacido están las diarreas. Estas son consideradas como la principal causa de morbilidad y mortalidad en becerras, siendo responsables de las mayores pérdidas económicas que pueden involucrar a cualquier otra enfermedad (Rosa et al., 2018) y representa una importante limitante en la producción (Deusch et al., 2017).

La compleja fisiopatología de la diarrea neonatal es mediada por endotoxinas bacterianas, por una inflamación de origen parasitario o por una atrofia de las vellosidades intestinales. Las becerras con diarrea aguda causada por los enteropatógenos comunes presentan pérdida neta de agua, iones de sodio, bicarbonato, cloro y potasio hacia los intestinos y subsecuentemente hacia las heces (Olguín y Bernal, 2006; Rosa et al., 2018). Esto resulta en deshidratación,

hipovolemia, acidosis metabólica, hiponatremia e hipocloremia (figura 4, foto tomada en el establo #160 de la cuenca de Tizayuca, Hidalgo).

En becerros con diarrea, el volumen fecal total puede ser hasta 40 veces más que lo normal (Olguín y Bernal, 2006). La pérdida real de peso corporal puede ser subestimada, ya que hay cantidades variables de líquido y electrólitos en el lumen intestinal durante el periodo de diarrea, pero sin haber sido expulsadas aún con las heces. A esto se le conoce como deshidratación intraluminal (Zeineldin et al., 2018).

Figura 4. Diarrea tipo secretora en becerra de 1 mes de edad (Fuente no publicada. MVZ René Pérez Avendaño)

4.3.1 Diarrea secretora

La diarrea secretora causa que los enterocitos del intestino delgado se desvíen de la absorción neta de fluidos, a una secreción neta de cloro, sodio y agua hacia la luz intestinal, debido a una alteración en el transporte de agua y de iones a través del epitelio intestinal. Este aumento de la secreción disminuye la capacidad de absorción del intestino grueso, resultando en una diarrea que se caracteriza por: a) Pérdida de sodio mayor a la de potasio, b) Pérdida de HCO_3 provocando una

acidosis metabólica y c) Heces voluminosas (acuosa) e isotónicas (Zeineldin et al., 2018).

4.3.2 Diarrea osmótica

Los oligosacáridos y disacáridos son moléculas polares que normalmente no pueden ser absorbidas por el intestino si previamente no son hidrolizadas a monosacáridos. Cuando la actividad de las disacaridasas se altera por un daño en el borde en cepillo del epitelio intestinal, esto puede ocurrir cuando restos de azúcares sin digerir queden retenidos en la luz intestinal, entonces se convierten en partículas osmóticamente activas que atraen agua desde el líquido extracelular. Se caracteriza por: a) Presencia de solutos osmóticamente activos en la luz intestinal, b) La osmolaridad fecal es muy alta respecto al plasma, c) Tendencia a la deshidratación con alto contenido de sodio en el plasma, d) Es de corta duración y e) Desaparece con el ayuno (Zeineldin et al., 2018).

4.3.3 Diarrea de mala absorción

En esta diarrea, las criptas del intestino delgado están intactas y continúan secretando fluidos, mientras que la atrofia o la destrucción de las vellosidades intestinales reduce la absorción de agua, electrolitos y nutrientes. Los ácidos biliares y los nutrientes no digeridos como carbohidratos, proteínas y grasas pueden alcanzar el íleon y el colon en gran cantidad, donde la fermentación bacteriana puede además intensificar la diarrea. La fermentación resulta en la producción del ácido D-láctico y otros ácidos orgánicos (los cuales incrementan la acidosis), partículas osmóticamente activas y otros productos que directamente estimulan la secreción de agua del colon (Olguín y Bernal, 2006).

4.3.4 Diarrea exudativa

También llamada diarrea inflamatoria. Se genera cuando aparece un daño en la mucosa intestinal, incluyendo inflamación y úlceras que tienen como consecuencia un aumento de la permeabilidad intestinal. Se produce una pérdida pasiva de fluidos ricos en proteínas y una menor capacidad para reabsorber los fluidos

perdidos. Se caracteriza por un trastorno inflamatorio en el intestino y por la presencia de heces purulentas y/o sanguinolentas (Smith, 2015).

4.3.5 Diarrea nutricional

Puede darse por sobrealimentación o administración de sustitutos de leche con proteína poco digestible para el becerro. En la mayoría de los casos no provocan la muerte, ésta se produce por un desbalance de fluidos y electrólitos. También se ha sugerido que los cambios drásticos en la dieta de los animales pueden alterar la microbiota intestinal y crear nichos que faciliten la proliferación de patógenos (Callaway et al., 2010; Harris et al., 2019).

4.3.6 Diarrea causada por patógenos

Bacterias: *Escherichia coli* es considerada como la más importante, pero *Salmonella typhimurium* y *Clostridium perfringens* tipo C también se pueden encontrar en becerras con diarreas.

Protozoarios: Las coccidias *Eimeria surni, E. bovis*; y *Cryptosporidium* sp. son las más comunes.

Hongos: La infección con hongos esta asociadoa con sobreuso o cambios constantes en la medicación, el principal es *Candida albicans*.

Virus: Puede ser por rotavirus “virus de la diarrea del becerro”, coronavirus, o parvovirus. También se ha reportado enterovirus y adenovirus (Gómez, 2017).

Aunque las bacterias patógenas, virus y protozoarios se pueden encontrar en un gran porcentaje de casos, la etiología de la enfermedad puede ser difícil de discernir debido a la presencia común de coinfecciones (más de un patógeno identificado en el mismo paciente) y el hecho de que la mayoría de los organismos también se pueden encontrar en individuos sanos (Cho et al. 2013; Gómez et al., 2017).

Estas observaciones sugieren que la causa de la diarrea puede ser compleja cuando no esta asociada con un solo patógeno (Smith, 2015).

También se ha reportado que la interrupción de este ecosistema, conocida como disbiosis, puede desencadenar trastornos gastrointestinales, aumentando la dificultad para la recuperación de la microbiota (Antharam et al., 2013). Por lo tanto, la estructura taxonómica de la microbiota en terneros debe examinarse con más detalle utilizando técnicas de laboratorio disponibles en la actualidad (Gómez et al., 2017).

4.4 Estudio de la microbiota gastrointestinal

La microbiología gastrointestinal se ha estudiado principalmente por técnicas de cultivo anaeróbico (Hungate, 1979) o por técnicas de fermentación y producción de gas *in vitro* (Ferarro et al., 2016; Dominguez et al., 2017) que han contribuido a entender la función de los microorganismos. Actualmente, la microbiología está incorporando nuevas técnicas, especialmente los basados en el análisis de ADN bacteriano amplificado por la PCR, la secuenciación de ADN, y el análisis bioinformático (Plaizier et al., 2017; Castillo-Lopez et al., 2017a; Petri et al., 2019).

Para la toma de muestras, debe tenerse en cuenta el fin para el que se necesitan. Cuando las muestras se tomen de animales vivos, se tendrá cuidado para evitar heridas o sufrimiento del animal o cualquier peligro para el operador y sus ayudantes (www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/1.1.01_Muestreo_2007.pdf). Las muestras se deben obtener directamente del recto del bovino, con el fin de evitar la contaminación de las mismas (Figueiredo et al., 2010). En bovinos pequeños, la colecta se realiza introduciendo uno o dos dedos en el recto del animal, previo masaje en la región perianal (Gracia et al., 2005). Si se recogen las heces del suelo, la proliferación accidental de larvas de vida libre, parásitos vegetales o la posible desecación de las heces pueden alterar los resultados (Gracia et al., 2005).

4.4.1 Uso de medios de cultivo

El estudio de la microbiota gastrointestinal durante el último medio siglo se ha centrado principalmente en explorar su fisiología, morfología y productos

metabólicos (Hungate, 1950, 1960, 1966). Uno de los objetivos principales del estudio de la microbiota es la maximización de la producción animal a través de la optimización de la digestión y la fermentación de la dieta al proporcionar condiciones adecuadas para dichos microorganismos. Con el crecimiento de microorganismos bajo condiciones de laboratorio, se ha podido caracterizar una buena porción de la población microbiana, describiendo sus características morfológicas, productos fermentativos, substratos que prefieren y su relación con otros microorganismos en el sistema digestivo. Sin embargo, sólo una fracción de la comunidad bacteriana es cultivable.

En el caso del rumen se estima que solamente entre el 10 y 50% de la comunidad bacteriana total puede ser cultivada en laboratorio (Kobayashi, 2006), lo cual enfatiza la necesidad de introducir técnicas moleculares y herramientas de otras disciplinas como la bioinformática que permitan un estudio más amplio de la microbiota gastrointestinal (Caporaso et al., 2012).

4.4.2 Uso de la secuenciación masiva de ADN

La comparación de las secuencias del gen 16S ARNr (de aproximadamente 1,500 nucleótidos de longitud) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas. Esto implica la amplificación del gen por PCR, para su posterior secuenciación y análisis bioinformático (Reguero, 2014; Hambal et al., 2019). Como cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, el gen 16S ARNr se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla (Pérez et al., 2017). El análisis de este gen ha revelado un hecho adicional de gran importancia práctica: la presencia de una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos firma. Se trata de secuencias específicas cortas que aparecen en todos (o en la mayor parte de) los miembros de un determinado grupo filogenético, y no están presentes en otros grupos, lo cual permite la identificación taxonómica de las bacterias (Goodwin et al., 2016).

La secuencia del gen 16S ARNr se utilizó por primera vez en 1985 para el análisis filogenético (Lane et al., 1985). Debido a que contiene regiones altamente conservadas para el diseño de los primers y regiones hipervariables para identificar las características filogenéticas de los microorganismos, la secuencia del gen 16S ARNr se convirtió en el gen marcador más utilizado para perfilar comunidades bacterianas (Tringe et al., 2008). Las secuencias completas del gen 16S ARNr consisten en nueve regiones hipervariables que están separadas por nueve regiones altamente conservadas (Baker, 2003; Wuang, 2009; Yang et al. 2016; Chakravorty et al. 2007). El grado de conservación varía ampliamente entre las regiones hipervariables, con regiones más conservadas en correlación con la taxonomía de nivel superior y las regiones menos conservadas a niveles más bajos, tales como género y especie (Gürsoy et al. 2019). Aunque ninguna región hipervariable puede clasificar con precisión todas las bacterias de dominio para las especies, algunas pueden predecir de forma fiable los niveles taxonómicos específicos (Chakravorty et al., 2007).

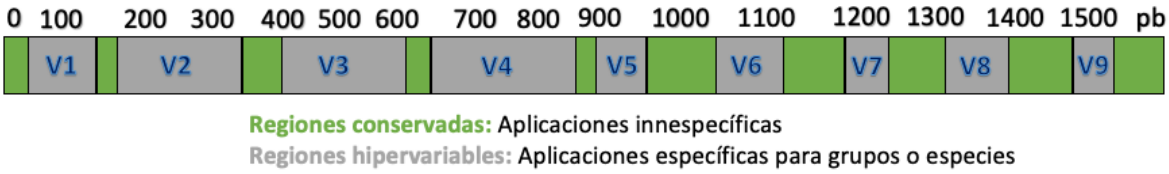

Figura 5. Subunidad 16S del gen ribosomal, se aprecian las regiones hipervariables. En el presente trabajo se llevo a cabo la secuenciación de la región hipervariable V4.

El método molecular de identificación bacteriana mediante secuenciación del mencionado gen incluye varios pasos (figura 5).

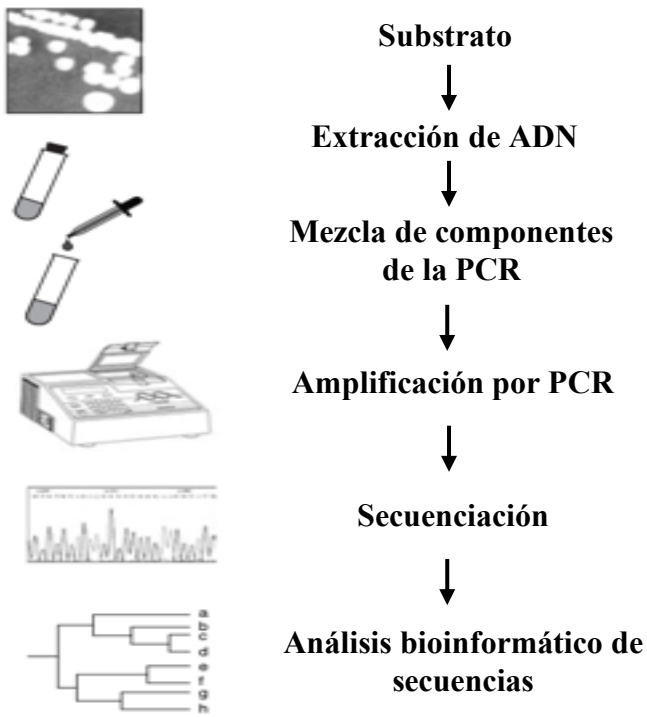

Figura 6. Pasos a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante amplificación por PCR y secuenciación del gen 16S ARNr (Del Rosario Rodicio et al., 2004).

Estos pasos se pueden resumir en tres etapas principales:

a) Extracción de ADN de la muestra y amplificación por PCR.
b) Secuenciación del amplicón.
c) Análisis bioinformático de las secuencias.

Extracción de ADN y amplificación

La extracción de ADN se ha llevado a cabo por medio de varios pasos, que incluyen la eliminación de la membrana celular y nuclear, seguida por la precipitación del ADN mediante sales y alcohol para tener acceso al contenido, y la purificación y dilución del ADN (Pérez et al., 2017). Algunas cuestiones importantes en este proceso son: inhibir las enzima que degradan el ADN cuando se lisan las células; obtener solo ADN o ARN o únicamente el ADN mitocondrial y que el ADN obtenido sea lo más puro posible y no contenga trazas de los productos usados para la lisis y extracción del ADN (detergentes, fenol, cloroformo, etc.), que interferirían en la PCR y procesos de secuenciación (Psifidi

et al., 2015). La amplificación del ADN se consigue en un termociclador por la reacción en cadena de la polimerasa, esto permite analizar cualquier ADN aunque no se tenga conocimiento de la secuencia a priori (Pérez et al., 2017). Las regiones conservadas facilitan el uso de oligonucleótidos o iniciadores que favorecen la hibridación específica (Khafipour et al., 2009; Castillo-Lopez et al., 2014).

Secuenciación del amplicón

En esta etapa se llevan a cabo las reacciones de secuenciación (figura 6) y verificación de los productos por electroforesis. Actualmente, se emplea la secuenciación cíclica, en una reacción similar a la de amplificación, que utiliza un único iniciador por reacción y terminadores marcados con fluorocromos adecuados, que interrumpirán la síntesis de manera aleatoria y facilitarán la detección posterior de los fragmentos interrumpidos. La disponibilidad actual de secuenciadores automáticos facilita enormemente este proceso (Karnati et al., 2003). El número de bases comúnmente generadas por un secuenciador automático es de 150 a 900, dependiendo del capilar utilizado en la electroforesis (Li et al., 2012; Pérez et al., 2017).

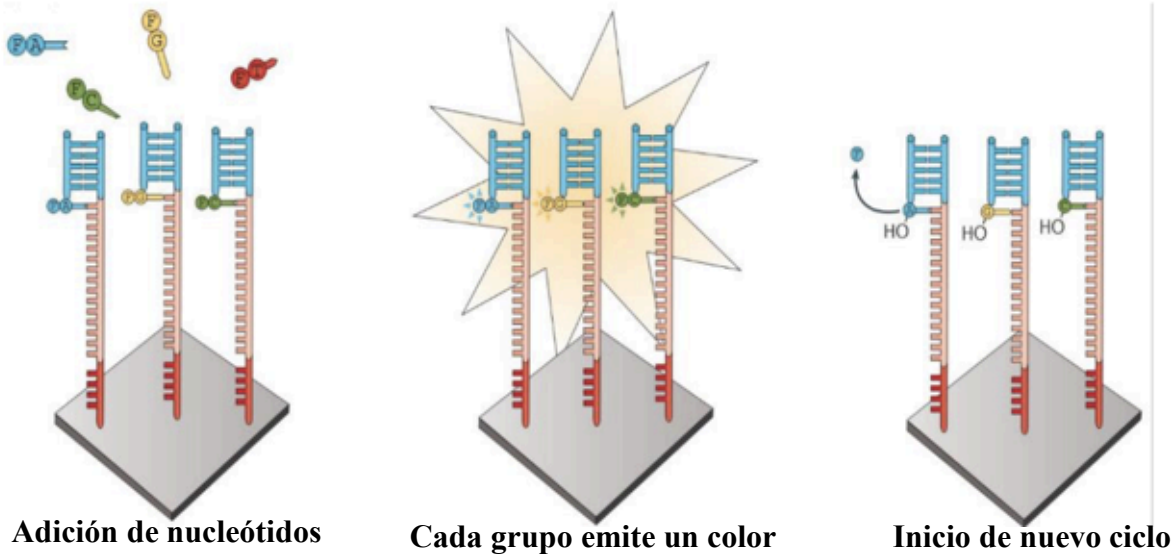

Figura 7. Representacion de un ciclo de secuenciación en la plataforma de Illumina (Flores, 2019).

Análisis bioinformático de las secuencias

La última etapa de este proceso es el análisis taxonómico por medio de programas bioinformáticos como por ejemplo QIIME (Caporaso et al., 2010) o mothur (Schloss et al., 2009). En este proceso, se lleva a cabo una serie de filtrados y purificación de las secuencias para trabajar solamente con las secuencias de alta calidad. Seguidamente se lleva a cabo la comparación de la secuencia de las muestras con las depositadas en bases de datos. Actualmente existen distintas bases de datos, algunas públicas cuyo acceso es libre a través de internet, como GeneBank, NCBI (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), RDP (Ribosomal Database Project), RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms) (Reguero, 2014). También se realizan cálculos de porcentajes que ocupa cada grupo de bacterias en cada nivel taxonómico, árboles filogenéticos y gráficas de diversidad bacteriana (Castillo-Lopez et al., 2017a; Petri et al., 2019).

Método de secuenciación con la plataforma Illumina

En los últimos años, la industria de la secuenciación ha estado dominada por el método de Illumina ya que ofrece instrumentos de secuenciación de lectura corta y bajo rendimiento hasta instrumentos de alto rendimiento dedicados a la secuenciación de genomas completos. Esa plataforma ha adoptado un enfoque utilizando nucleótidos marcados con fluorescencia similares a la secuenciación tipo Sanger (Flores, 2019; Goodwin et al., 2016). Después del enriquecimiento de la plantilla en la fase sólida, se agrega una mezcla de cebadores, ADN polimerasa y nucleótidos. Cada nucleótido está bloqueado por un grupo 3'-O-azidometilo y está marcado con un fluoróforo escindible específico de la base. Durante cada ciclo, los fragmentos en cada grupo incorporarán solo un nucleótido ya que el grupo bloqueado 3’ evita incorporaciones adicionales. Después de la incorporación de la base, las no incorporadas se lavan y se forma una imagen de fluorescencia. El color identifica la base que se incorporó. Seguidamente el ciclo de adición de nucleótidos, alargamiento y escisión reinicia (Goodwin et al., 2016). En la actualidad, este método comúnmente genera 2 archivos (*paired-end sequencing*)

por cada muestra secuenciada, lo que resulta en secuencias de muy alta calidad, mismas que se alinean al momento de empezar el análisis taxonómico (Kozich et al., 2013).

4.4.3 Importancia clínica del estudio de la microbiota

Algunas ventajas de la genómica microbiana son:

1. Estudio de bacterias no cultivables o de crecimiento lento a causa de sus requerimientos nutricionales.
2. Estudio de bacterias cuyas características no se adaptan a las de ningún género o especie reconocida. Por ejemplo, cuando se trata de patógenos nuevos.
3. Estudio de bacterias para las cuales la caracterización fenotípica sea deficiente.

(Reguero, 2014).

Mediante el uso de estos métodos, el análisis de metagenomas proporciona información valiosa sobre la diversidad genética, la riqueza de especies y la estructura de la población, incluidas las bacterias que son difíciles o imposibles de cultivar, además de permitir la comparación cruzada de diferentes comunidades y monitorear los cambios temporales (Nocker et al., 2007). Un conocimiento más amplio de la ecología del intestino del ternero, el papel de la microbiota bacteriana causante de diarreas y la comprensión del efecto de las prácticas de manejo en el equilibrio normal de la microbiota intestinal pueden definir mejor los factores predisponentes, las fuentes o los sitios de exposición. Esto puede resultar en el desarrollo de planes de tratamiento más efectivos y recomendaciones preventivas más específicas más allá de la terapia antimicrobiana empírica, a menudo inútil pero potencialmente perjudicial (McGuirk, 2008). Los antimicrobianos se usan comúnmente para la prevención y el tratamiento de enfermedades en terneros y a veces se administran por temor a la mortalidad en lugar de basarse en evidencia científica (Berge et al., 2009). Además que los antimicrobianos pueden afectar negativamente a las comunidades microbianas del intestino aumentando el riesgo de complicaciones gastrointestinales (Nagao-Kitamoto et al., 2016).

5. TRABAJO EXPERIMENTAL

CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN BACTERIANA DEL SISTEMA DIGESTIVO EN BECERRAS DURANTE TEMPRANA EDAD

5.1 JUSTIFICACIÓN

Uno de los problemas de salud que comúnmente se observa en bovinos a edad temprana son los disturbios gastrointestinales, estos causan pérdidas económicas de hasta el 50%. Por ello se requieren estudios para investigar el papel de la alimentación, la colonización microbiana y las medidas de manejo de las becerras durante esta etapa. Además de dilucidar los momentos críticos y los microorganismos patógenos que ocasionan los problemas digestivos, así como la recuperación de la microbiota. Esto puede conllevar a implementar un tratamiento específico validado científicamente y evitar el uso excesivo de fármacos de manera empírica que alteren la microbiota benéfica del sistema digestivo.

4.2 HIPÓTESIS

La edad de las becerras y los cambios graduales en la dieta influirá sobre el tipo y proporción de bacterias intestinales. Además, se podrán identificar los momentos críticos en el desarrollo de diarreas así como su relación con la alimentación y la población intestinal.

5.3 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la población bacteriana del sistema digestivo en becerras durante las primeras 4 semanas de vida enfocándose en los cambios graduales en la dieta y problemas diarreicos mediante análisis de muestras fecales por secuenciación masiva de ADN.

5.3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1) Evaluar el efecto de edad de las becerras sobre la colonizaciónón bacteriana intestinal desde el nacimiento hasta la cuarta semana de vida, sujetas a un cambio gradual en la alimentación primeramente de calostro a leche, luego introducción de alimento concentrado iniciador, esto por medio del análisis de muestras fecales de manera semanal.

2) Identificar momentos críticos en la proliferación de bacterias patógenas, así como su posible relación con la alimentación y su efecto sobre la microbiota intestinal durante y después del cuadro patológico.

3) Básandose en los resultados, realizar una sugerencia relacionada con la alimentación o el manejo de las becerras que conlleve a promover el establecimiento de una microbiota intestinal saludable.

5.4 MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca (CAIT), Hidalgo, ubicado en el Km 50 de la carretera federal México – Pachuca. El municipio se localiza al sur del Estado de Hidago a una altitud de 2,300 msnm.
Específicamente, se llevó a cabo en el establo #160. En este establo se lleva a cabo un manejo intensivo en la producción lechera con una alimentación a base de concentrado y forraje, la población total de vacas es de 500 cabezas, se cuenta principalmente con la raza Holstein–Friesian. En total, el establo cuenta con alrededor de 60 becerros de distintas edades a la vez. El periodo total de muestreos del presente experimento comprendió los meses de julio a octubre de 2018. Este estudio fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CICUAE) de la UNAM-FESC, protocolo numero C18_14.

5.4.1 Becerras, manejo nutricional y diseño experimental

Se utilizaron 8 becerras recién nacidas identificadas con los números 1617, 1841, 2277, 2289, 2866, 2281, 1875 y 2989. Las becerras fueron sujetas a un manejo y alimentación según lo implementado en el hato, lo cual consiste en lo siguiente: inmediatamente después del nacimiento, se registró el peso vivo y se trasladó la becerra al corral de neonatos con cama de arena (figura 7 A). Durante las primeras 36 horas de vida se ofreció calostro 2 veces al día a una razón de 10% del peso corporal (figura 7 B), procurando que la primera toma sea inmediatamente después del nacimiento. A partir del tercer día de vida, se trasladaron las becerras a una caseta individual y se les ofreció leche, una cubeta de 4 litros a las 8 am y otra cubeta a las 4 pm. La cantidad ofrecida se ajustó conforme al aumento de peso vivo de las becerras. A partir de la segunda semana de vida se ofreció alimento iniciador concentrado (M.S. 90.2%, P.C. 17.61%, Grasa 3.51%, FDN 18.33, FDA 8.55%, Cenizas 6.35%) *ad libitum*. Las becerras tuvieron acceso al consumo de agua *ad libitum*.

Se llevó a cabo el registro cotidiano de la presencia de diarreas. Las diarreas fueron tratadas durante 3 días con antibióticos de amplio espectro (una de las siguientes opciones: oxitetraciclina o sulfamida) y, de ser necesario, hidratación con electrolitos.

En cada becerra, la población de bacterias en las heces se evaluó en cinco momentos distribuidos de manera semanal durante los primeros 28 días de vida, los cuales fueron los siguientes (edad de las becerras y tipo de alimentación):

Día 1: calostro

Día 7: leche

Día 14: leche e introducción de concentrado iniciador *ad libitum*

Día 21: leche y concentrado iniciador *ad libitum*

Día 28: leche y concentrado iniciador *ad libitum*

Figura 8. Illustración del alojamiento en corral individual post-parto (A) y administración de calostro al nacimiento en algunas de las becerras utilizadas en el experimento (B).

5.4.2 Verificación de la calidad de calostro y transferencia de IgG a las becerras

Calidad del calostro

Con el fin de verificar la calidad del calostro consumido, se colectaron 100 mL de este antes de la toma, la muestra se colocó en una probeta a temperatura

ambiente y se dejó reposar durante 10 minutos hasta la disminución de la espuma (Arancibia, 2009).

Seguidamente, se introdujo un calostrómetro hasta el fondo de la probeta y se permitió que flotara libremente.

Una vez que el calostrómetro se estabilizó, se llevó a cabo la lectura basándose en una escala de colores adherida al mismo, el calostro de pobre calidad (color rojo) tendrá una gravedad especifica menor a 1035, la cual corresponde a concentraciones de IgG menores a 20 mg/mL, el calostro de moderada calidad (color amarillo) tendrá una gravedad especifica entre 1035 y 1046, la cual corresponde a concentraciones de IgG entre 20 y 50 mg/mL, y el calostro de buena calidad (color verde) tendrá una gravedad mayor a 1046, la cual corresponde a concentraciones de IgG superiores a 50 mg/mL (Campos et al., 2007).

Transferencia de inmunoglobulinas IgG a las becerras

Para verificar la adecuada transferencia de inmunidad a las becerras, al momento de proporcionar la segunda toma de calostro que se ofrece 12 horas posteriores a la primera toma, se realizó la colecta de sangre mediante venopunción de la vena yugular (figura 8) ya sea izquierda o derecha con aguja Enrotainer ® 21G x 25 mm estéril y se colectó en un tubo Vacutainer® rojo estéril. La cantidad de sangre colectada fue de aproximadamente 2 mL.

Una vez obtenida la sangre, se dejó reposar por un día para obtener el suero. Luego se procedió a realizar el análisis de refractometría para conocer la cantidad de IgG presentes por decilitro de sangre, el cual se realizó colocando 0.5 mL de suero en la placa de luz del refractómetro. El suero se esparció en toda la superficie de la placa y se procedió a observar la muestra a través de una fuente de luz para realizar la lectura (Bielmann et al., 2010). Los niveles de proteínas que se encuentren por encima de 5.5 g/dL se consideran como una transferencia pasiva adecuada. Se debe tener cuidado con las lecturas altas (mayor a 7.2 g/dL) ya que estas pueden ser un falso positivo causadas por terneras deshidratadas por lo que este método también puede servir de ayuda para detectar este tipo de problema en los animales (Brett, 2006).

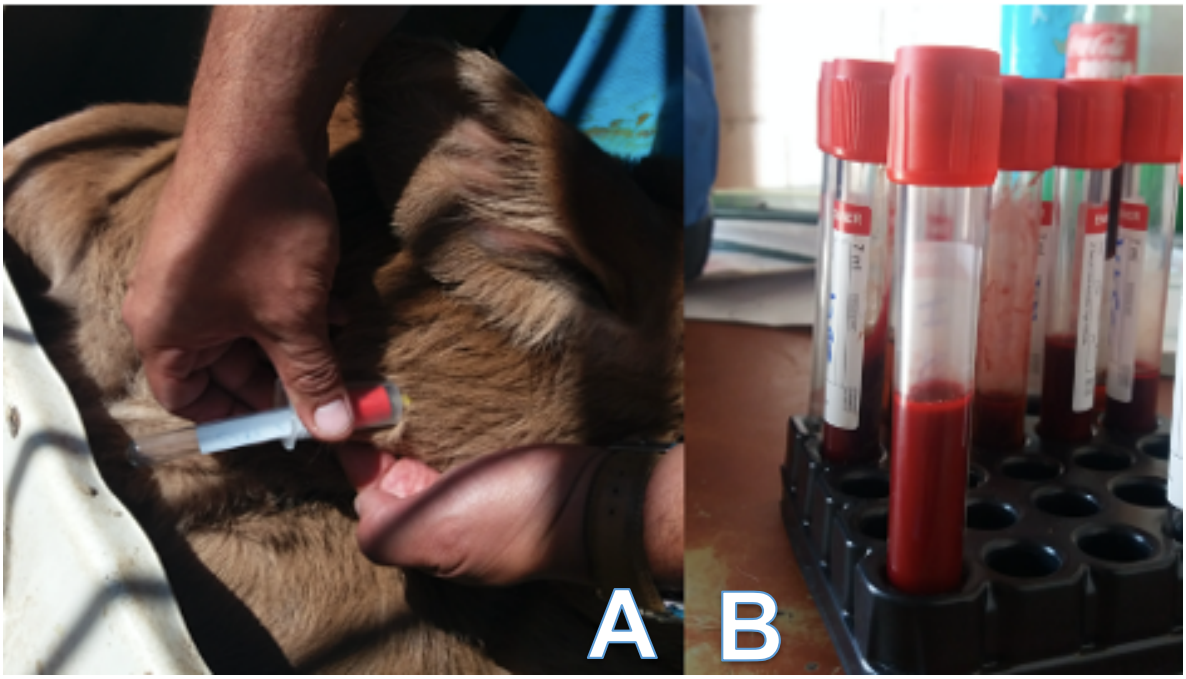

Figura 9. Colecta de muestras de sangre en becerras por venopunción de yugular (A) y su colocación en tubos para la separación del suero (B)

5.4.3 Verificación de la calidad de la leche y del alimento iniciador

Se colectó un kilogramo de alimento iniciador concentrado (Malta Clayeton®) de manera semanal. Dichas muestras se colocaron en bolsas de plástico, se etiquetaron con la fecha y se almacenaron en un lugar fresco y seco hasta su posterior análisis individual. Al finalizar el periodo de colecta de muestras, se llevó a cabo el análisis químico proximal de acuerdo con los métodos descritos por el laboratorio Forrajera de Ganaderos de Aguascalientes S.A. de C.V. (FOGASA, Estado de Aguascalientes) que fueron los siguientes; Humedad: NMX-Y-098-SCFI-2018 (Determinación de humedad en alimentos balanceados e ingredientes mayores); Ceniza: NMX-Y-093-SCFI-2003 (Determinación de cenizas en alimentos terminados e ingredientes para animales); Proteína Cruda: AOAC 990.03 (Proteína Cruda en alimentos para animales, método de combustión); Grasa Cruda: AOCS (Procedimiento Oficial Am 5-04); Fibra Cruda: AOCS Procedimiento aprobado Ba 6ª-05.

También se tomaron muestras de leche, estas consisitieron en 50 mililitros recolectados de manera directa del tanque de ordeña de manera semanal a las 8 am que es la hora de finalización de la ordeña y se colocaron en viales de plástico. Después de la colecta, se congelaron inmediatamente a –20 ºC hasta su posterior análisis individual. Al finalizar el experimento, las muestras de leche fueron analizadas para determinación de grasa, proteína, lactosa, sólidos no grasos y sólidos totales, por espectroscopia de infrarrojo por el Consejo para el Fomento de la Calidad de la Leche y sus Derivados, A.C. (COFOCALEC, Estado de Jalisco) NMX-F-708-COFOCALEC-2015.

5.4.4 Colecta de muestras fecales y análisis de población de bacterias

Muestreo. Para evitar el uso de métodos invasivos, se evaluó la población bacteriana intestinal por medio del análisis de muestras fecales. El procedimiento de colecta fue similar a lo reportado previamente (Uyeno et al., 2010). Para ello se tomaron muestras en el primer día de vida (entre 12 y 24 horas después del nacimiento) y luego semanalmente durante las primeras 4 semanas de vida de cada una de las 8 becerras, cada muestra fue tomada a las 9 de la mañana, lo que dio un total de 40 muestras. Las muestras de heces se tomaron mediante estimulación anal gentil con guante estéril (figura 9 A). Se reciberon las heces en una bolsa de plástico y se depositaron alrededor de 2 mL de muestra en un tubo eppendorf estéril, la muestra se tomó por duplicado (figura 9 B). Los tubos se congelaron inmediatamente en el establo a una temperatura de -20 ºC (figura 9 C). Una vez terminado el periodo experimental correspondiente a la colecta de muestras, estás se llevaron a almacenar al laboratorio de nutrición de la FES–Cuautitlán hasta su posterior análisis.

Figura 10. A) Colecta de heces mediante estimulación gentil en la becerra; B) tubos para el almacenamiento de las muestras; C) preservación de las muestras.

Extracción de ADN. Al finalizar el experimento, se llevó a cabo la extracción de ADN de las muestras de heces colectadas. Este proceso se realizó de manera similar a lo descrito por Bagheri et al. (2018) utilizando el kit Qiagen Power Soil. En este procedimiento se utilizan aproximadamente 250 mg de muestra descongelada. Las muestras se colocaron en microtubos y se agregó 60 µL de la solución C1 (TRIS; Hidroximetil amino metano), en seguida se mezcló hasta lograr una combinación homogénea. Después, las muestras son centrifugadas a 10,000 × g durante 30 segundos y el sobrenadante se colectó y colocó en un nuevo tubo de 2 mL. Luego, se añadió 250 µL de solución C2 (EDTA; Ácido etilen diamino tetra acético), se mezcló e incubó sobre hielo durante 5 minutos, y se centrifugó. Se procedió de manera similar con las soluciones C3 (NaCl; Cloruro de sodio), C4 (Mercaptoetanol) y C5 (SDS; Dodecil sulfato de sodio). Después de llevar a cabo los pasos de centrifugación para eliminar inhibidores de PCR, el sobrenadante se colocó en microtubos nuevos y se diluyó con 100 µL de solución C6 (Acetato de

Potasio; $C_2H_3KO_2$). La concentración de ADN se midó con el aparato Qubit 2.0. Se tomó una submuestra del ADN para su amplificación con PCR punto final seguido por la secuenciación masiva.

PCR, secuenciación de ADN y análisis bioinformático. Del ADN extraído, se llevó a cabo la amplificación por PCR de la región hipervariable V4 del gen 16S ARNr de las poblaciones bacterianas utilizando los cebadores 515F/805R (Caporaso et al., 2011; Caporaso et al., 2012; Castillo-Lopez et al., 2017a). Seguidamente, se realizó la secuenciación masiva de ADN por medio de la plataforma de Illumina Miseq según lo descrito por Kozich et al. (2013). Una vez recibidas las secuencias de ADN del laboratorio, llevamos a cabo el análisis bioinformático y taxonómico de las poblaciones de bacterias, lo cual se realizó utilizando los programas de QIIME y mothur siguiendo un proceso similar a lo descrito por Castillo-Lopez et al. (2017b) con ligeras actualizaciones. Para esto, primero llevamos a cabo la alineación de cada par de secuencias generadas por muestra, seguido por los procesos de filtrado, purificación, eliminación de quimeras y de los errores de secuenciación. Después, se realizó la identificación de OTUs (Operational Taxonomic Units por sus siglas en inglés) empleando la versión más reciente de la base de datos SILVA (versión 128) con una similitud de mínimo 97%. Una vez identificados los OTUs, se construyó un cuadro en el formato BIOM, mismo que se empleó para los análisis subsiguientes. Dichos análisis consistieron en la elaboración de una gráfica de diversidad beta para describir la similitud poblacional entre las muestras. Estas gráficas se visualizaron con el programa EMPEROR (Vazquez-Baeza et al., 2013). También se generaron gráficas y porcentajes de las poblaciones bacterianas en cada nivel taxonómico (filo, clase, orden, familia, género, especie) de cada muestra visualizándose por medio de archivos con extensión html, para su posterior análisis estadístico.

5.4.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos sobre las poblaciones de bacterias se analizaron con el método Proc Mixed del programa estadístico SAS (versión 9.4; Cary, NC; SAS Institue Inc.). La unidad experimental fue cada una de las 8 becerras. Debido a la gran cantidad de grupos de bacterias detectados en los niveles taxonómicos de menor rango y por la baja proporción de muchos de ellos, solamente se compararon estadísticamente los que representan una mayor proporción (generalmente con un promedio superior a 0.1% en la población total). Los grupos bacterianos encontrados en muy baja proporción se colocaron en la sección de apéndices. Se verificó la distribución normal de los datos por medio de las pruebas de *Shapiro-Wilk*, *Kolmogorov-Smirnov*, *Cramer-von Mises* y *Anderson-Darling*. El modelo estadístico del análisis de varianza incluyó el efecto fijo de edad y el efecto aleatorio de becerra. Se utilizó la instrucción LSMEANS seguido por la opción PDIFF para la comparación de medias. Se consideró como efecto significativo cuando se obtuvo un valor de $P \leq 0.05$ y como una tendencia cuando el valor de $P > 0.05$ pero ≤ 0.10. Para indicar la variación entre las medias comparadas, se reporta el error estándar mayor de dichas medias.

5.5 RESULTADOS

5.5.1 Calidad de calostro y transferencia de IgG a las becerras

La concentración de IgG en el calostro consumido por las becerras fluctuó en el rango de 50 a 70 mg de IgG/mL, con un promedio de 60 mg de IgG/mL (cuadro 4). Basándose en estos resultados, el calostro fue calificado como de calidad buena (Campos et al., 2007). Además, los resultados de tranferencia de inmunidad a las becerras fue muy buena, con un promedio de 6.9 g de IgG/dL en el suero sanguíneo (cuadro 4) (Brett, 2006).

Cuadro 4. Resultados de calidad de calostro y transferencia de IgG a las becerras.

Parámetro	Valor promedio (± DE)
IgG, mg/mL de calostro	60 ± 9.2
Calificacion del calostro	Buena
IgG, g/dL de suero de sangre	6.9 ± 0.50

Calificación de inmunidad	Muy buena

5.5.2 Composición nutrimental de la leche y alimento iniciador

La leche proporcionada a las becerras tuvo en promedio 3.43% de proteína, 3.58% de grasa y 4.77% de lactosa (cuadro 5). Estos valores se encuentran dentro del rango normalmente reportado para la composición química de la leche en la raza Holstein-Friesian (www.fao.org/dairy-production-products/products/composición-de-la-leche/es/).

Cuadro 5. Composición química de la leche proporcionada a las becerras.

Parámetro	Valor promedio %
Grasa	3.58
Proteína	3.43
Lactosa	4.77
Sólidos totales	12.37

El alimento concentrado iniciador que consumieron las becerras durante este experimento tuvo en promedio 17.61% de proteína cruda, 3.51% de grasa y 18.33% de fibra detergente neutro (cuadro 6).

El valor nutricional de este alimento fue similar a lo que generalmente se proporciona a las becerras en distintos establos comerciales productores de leche en nuestro país (Aguilar et al., 1998; Ávalos et al., 2017; Medina, 2016).

Cuadro 6. Composición química del alimento iniciador proporcionado a las becerras.

Parámetro	Valor promedio %
Materia seca	90.20
Proteína Cruda	17.61
Grasa	3.51
Fibra detergente neutro	18.33
Fibra detergente ácido	8.55
Carbohidratos no fibrosos	54.32
Cenizas	6.35
Total de nutrientes digestibles	80.32

5.5.3 Presencia de diarreas en las becerras

La figura 10 ilustra la prevalencia de diarreas en las becerras utilizadas en el presente experimento. Se notó un incremento drástico en el porcentaje de becerras con diarrea durante la segunda semana de vida, alcanzando hasta un 50% del total de animales. Mientras que en el resto del periodo evaluado este valor estuvo entre 0 y 12.5%.

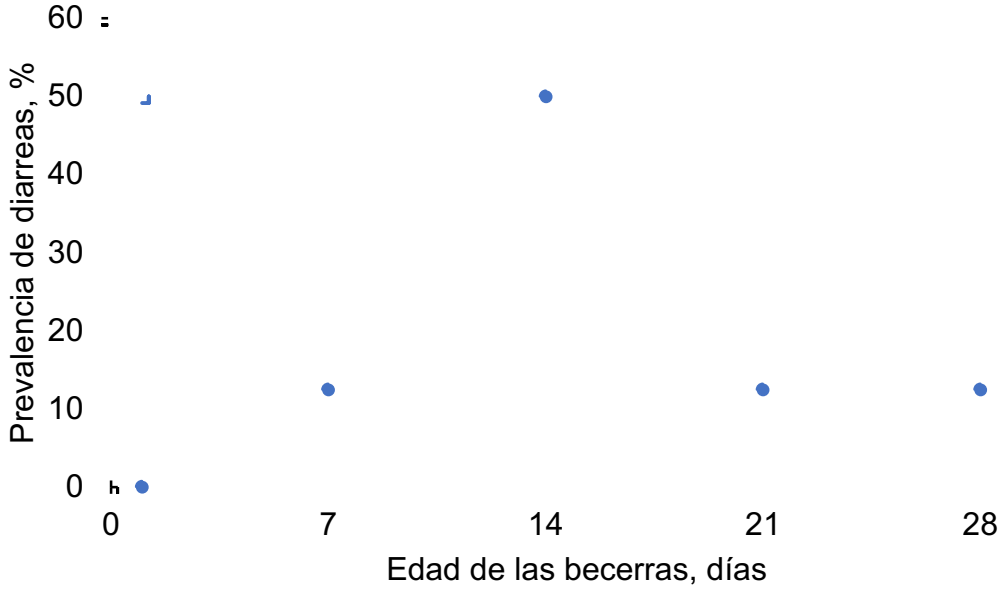

Figura 11. Prevalencia de diarreas en las becerras durante el experimento.

5.5.4 Diversidad beta de la población bacteriana

La figura 12 proporciona un panorama general sobre la similitud de las poblaciones bacterianas entre las muestras. A menor distancia entre los puntos (muestras), mayor es la similitud de poblaciones entre dichas muestras. La gráfica indica que, durante el primer día de vida, la población de bacterias difiere del resto de las semanas subsiguientes, esto debido a que, a diferencia del resto de las semanas en el primer día la dieta estuvo basada en calostro. Así mismo la gráfica muestra que la población bacteriana de las becerras en la primera y segunda semana fueron similares, esto posiblemente debido a que en ambas semanas la alimentación estuvo basada principalmente en leche. Además, es notorio que, cuando las becerras empiezan a consumir alimento iniciador, se da un cambio en la población bacteriana, dicho cambio se acentúa en la cuarta semana de vida cuando hay un mayor consumo de alimento sólido. Aunque la gráfica no señala nombres específicos, se nota la evolución de la población según la edad y la alimentación.

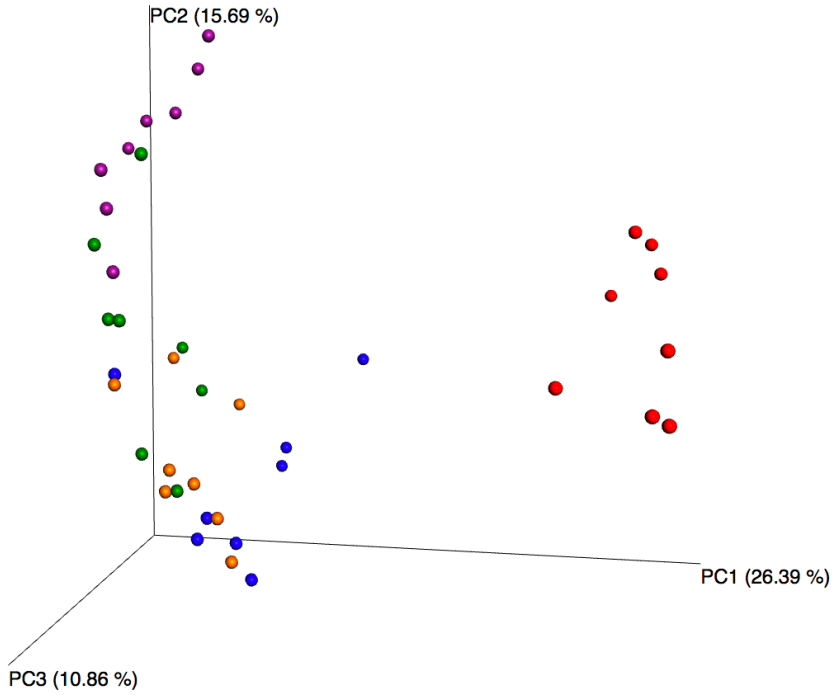

Figura 12. Diversidad beta de la población bacteriana de las heces de becerras según la edad: día 1 (puntos rojos), día 7 (puntos azules), día 14 (puntos naranjas), día 21 (puntos verdes) y día 28 (puntos morados).

5.5.5 Diversidad alfa de la población bacteriana

El cuadro 7 provee información acerca del número de especies observadas y OTU's. Como se puede observar, el número de especies y OTU's aumentó gradualmente conforme la edad de las becerras, lo cual indica que la diversidad bacteriana del sistema digestivo incrementó durante las primeras 4 semanas de vida. Los indices de diversidad Shannon y Simpson toman en cuenta la proporción que ocupan los diferentes grupos taxonómicos con relación al número total de los mismos. De este modo, se aprecia un incremento en la diversidad bacteriana considerando la relación entre el aumento de los índices mencionados y la edad de las becerras.

Cuadro 7. Índices de diversidad alfa de la población de bacterias en las heces de becerras durante las primeras 4 semanas de vida.

	Edad de las becerras[1]						
Índice	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	EE[2]	Valor-*P*
Chao1	53.56	78.4	82.70	103.6	138.36	10.06	<0.01
OTUs	50.00	62.5	75.87	94.50	121.00	8.417	<0.01
Shannon	2.34	3.00	3.41	4.24	4.55	0.407	<0.01
Simpson	0.483	0.73	0.801	0.895	0.882	0.062	<0.01

[1]Día 1: dieta solamente con calostro, día 7: Dieta solamente con leche, día 14: dieta a base de leche e introducción de alimento concentrado iniciador *ad libitum*, día 21 y día 28: dieta a base de leche y alimento concentrado iniciador *ad libitum*.

[2]El mayor error estándar de las medias

5.5.6 Población bacteriana en el nivel taxonómico de filo

En total, se detectaron 16 filos de bacterias en las muestras fecales de las becerras. En el cuadro 7, se presentan los principales. Los filos más abundantes fueron *Firmicutes, Proteobacteria, Fusobacteria, Bacteroidetes* y *Actinobacteria*. El filo *Proteobacteria* fue más abundante ($P < 0.01$) en el primer día de vida comparado con las semanas subsiguientes con un promedio de 74.96% y 1.12% para el primer día de vida y en las semanas subsiguientes, respectivamente. En contraste, en el primer día de vida, los filos *Firmicutes* ($P < 0.01$) y *Bacteroidetes*

(P < 0.05) ocuparon una menor proporción comparado con las semanas siguientes, y mostraron un aumento (P < 0.01) a partir de la primera semana de vida. Otros filos que disminuyeron al avanzar la edad de las becerras fueron *Tenericutes* (P < 0.05) y *Deinococcus-Thermus* (P < 0.05). También se nota que, en este nivel taxonómico, se pudo identificar casi el 100% de la problación bacteriana presente en las heces de las becerras. Los filos correspondientes a cada becerra se encuentran en el apéndice desde el cuadro A hasta el cuadro H.

Cuadro 8. Filos de bacterias en las heces de becerras durante las primeras 4 semanas de vida.

	Edad de las becerras[1]						
Filo[2]	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	EE[3]	Valor-*P*
Firmicutes	8.93[c]	55.74[b]	74.08[a]	47.63[b]	51.23[b]	7.707	<0.001
Proteobacteria	74.96[a]	2.03[b]	0.917[b]	0.871[b]	0.655[b]	3.220	<0.001
Fusobacteria	5.96[c]	35.4[abc]	24.11[bc]	45.58[a]	43.47[a]	7.667	0.006
Bacteroidetes	5.96[b]	35.4[b]	24.11[b]	45.58[a]	43.47[a]	7.667	0.006
Actinobacteria	7.91	6.73	0.641	5.013	2.667	3.257	0.519
Tenericutes	0.84[a]	0.00[b]	0.00[b]	0.233[b]	0.795[a]	0.223	0.017
Gemmatimonadetes	0.36	0.00	0.00	0.00	0.00	0.164	0.420
Chloroflexi	0.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.090	0.144
Cyanobacteria	0.18	0.00	0.00	0.002	0.009	0.062	0.159
Deinococcus-Thermus	0.16[a]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.044	0.039
Planctomycetes	0.09[a]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.028	0.080
Lentisphaera	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.039	0.424
Verrucomicrobia	0.03	0.03	0.03	0.02	0.00	0.023	0.779
Elusimicrobia	0.02	0.03	0.00	0.002	0.027	0.019	0.682
Acidobacteria	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.010	0.424
Spirochaetae	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.004[b]	0.345[a]	0.051	<0.001
Otros	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.020	0.211

[1]Día 1: dieta solamente con calostro, día 7: Dieta solamente con leche, día 14: dieta a base de leche e introducción de alimento concentrado iniciador *ad libitum*, día 21 y día 28: dieta a base de leche y alimento concentrado iniciador *ad libitum*.

[2]Clasificación de OTU basada en la base de datos SILVA (versión 128) con 97% de similaridad.

[3]El error estándad mayor de las medias.

abc: para cada grupo taxonómico, las medias con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes.

5.5.7 Población bacteriana en el nivel taxonómico de clase

Se detectaron 35 clases de bacterias en las muestras fecales en total. En el Cuadro 8 se presentan las principales. Las clases más abundantes fueron *Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Actinobacteria, Bacilli, Clostridia,* y *Bacteroidia*. En el primer día de vida las clases más abundante y que ocuparon la mayor proporción de la población bacteriana fueron *Betaproteobacteria* ($P < 0.05$) y *Gammaproteobacteria* ($P < 0.05$) con promedios de 54.94% y 15.25% para *Betaproteobacteria y Gammaproteobacteria*, respectivamente. En las semanas siguientes, las proporciones de estas clases disminuyeron alcanzando solamente en promedio 0.24% para *Betaproteobacteria* y 0.76% para *Gammaproteobacteria*. La clase *Bacilli* ocupó una mayor proporción ($P < 0.01$) en la primera y segunda semana comparada con el resto de las semanas. Además, las clases *Clostridia* ($P < 0.01$) y *Bacteroidia* ($P < 0.01$) fueron las clases que más abundaron a partir de la primera semana de edad. Por otro lado, las clases que tendieron a disminuir conforme avanzó la edad de las becerras fueron *Alphaproteobacteria* ($P = 0.07$) y *Flavobacteria* ($P = 0.05$). Otras clases identificadas que se encuentraron en menor proporción se presentan en el apéndice, cuadro I.

Cuadro 9. Clases de bacterias en las heces de becerras durante las primeras 4 semanas de vida.

	Edad de las becerras[1]						
Clase[2]	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	EE[3]	Valor-*P*
Betaproteobacteria	54.94[a]	0.17[b]	0.174[b]	0.488[b]	0.132[b]	6.09	<0.001
Gammaproteobacteria	16.25[a]	1.728[b]	0.522[b]	0.325[b]	0.469[b]	4.30	0.049
Actinobacteria	7.783	6.494	0.451	4.492	1.316	3.241	0.442
Bacilli	4.501[b]	43.67[a]	48.27[a]	13.38[b]	3.15[b]	6.50	<0.001
Clostridia	4.069[c]	11.49[b]	25.18[b]	32.60[a]	45.64[a]	6.25	<0.001
Alphaproteobacteria	3.581[a]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.001[b]	1.036	0.074
Flavobacteriia	2.35[a]	0.00[b]	0.011[b]	0.007[b]	0.004[b]	0.063	0.053
Cytophagia	1.479	0.00	0.00	0.00	0.00	0.546	0.239
Bacteroidia	1.365[c]	35.39[a]	24.10[ab]	45.50[a]	43.42[a]	7.580	0.001
Mollicutes	0.843[a]	0.00[b]	0.00[b]	0.232[b]	0.795[a]	0.223	0.017
Sphingobacteriia	0.607[a]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.085	<0.001
Erysipelotrichia	0.361[b]	0.378[b]	0.265[b]	0.99[b]	2.07[a]	4.667	0.022
Deltaproteobacteria	0.189	0.002	0.103	0.053	0.052	0.092	0.676
Gemmatimonadetes	0.188	0.00	0.00	0.00	0.00	0.083	0.416
Fusobacteriia	0.079	0.029	0.221	0.579	0.209	0.272	0.626
Coriobacteriia	0.003[b]	0.240[b]	0.190[b]	0.521[b]	1.351[a]	0.342	0.078
Negativicutes	0.00[b]	0.203[b]	0.361[ab]	0.655[a]	0.378[ab]	0.142	0.041
Epsilonproteobacteria	0.00	0.128	0.117	0.003	0.00	0.072	0.366
Spirochaetes	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.005[b]	0.345[a]	0.051	<0.001

[1]Día 1: dieta solamente con calostro, día 7: Dieta solamente con leche, día 14: dieta a base de leche e introducción de alimento concentrado iniciador *ad libitum*, día 21 y día 28: dieta a base de leche y alimento concentrado iniciador *ad libitum*.

[2]Clasificación de OTU basada en la base de datos SILVA (versión 128) con 97% de similaridad.

[3]El error estándad mayor de las medias.

abc: para cada grupo taxonómico, las medias con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes.

5.5.8 Población bacteriana en el nivel taxonómico de orden

Se detectaron 51 órdenes de bacterias. En el cuadro 9 se presentan las principales. Los órdenes más abundantes fueron *Burkholderiales* ($P < 0.01$), *Enterobacteriales* ($P = 0.43$), *Clostridiales* ($P < 0.05$), *Lactobacillales* ($P < 0.01$) y *Bacteroidales* ($P < 0.01$). En el primer día de vida el orden más abundante fue *Burkholderiales* ($P < 0.01$), pero en las siguientes semanas descendió la proporción de este alcanzando un promedio de solamente 0.24%. En la primera y segunda semana hubo un incremento notable en la proporción que representa el orden *Lactobacillales,* siendo dicha proporción mayor ($P < 0.01$) comparada con el resto de las semanas. Los órdenes *Clostridiales* ($P < 0.05$) y *Bacteroidales* ($P < 0.01$) incrementaron a partir de la segunda y tercera semana donde los animales empezaron a ser alimentados con concentrado iniciador. Por otra parte, *Pseudomonadales* ($P < 0.05$) y *Corynebacteriales* ($P < 0.05$) tuvieron una presencia elevada durante la primera semana de vida; sin embargo, en las semanas subsiguientes la proporción de estos órdenes disminuyó a 0%. Otros órdenes que mostraron una disminución conforme avanzó la edad de las becerras fueron *Bacillales, Cytophagales, Mycoplasmatales,* y *Sphingobacteriales.* Los órdenes identificados que se encuentran en menor proporción se presentan en el apéndice, cuadro J.

Cuadro 10. Órdenes de bacterias en las heces de becerras durante las primeras 4 semanas de vida.

	Edad de las becerras[1]						
Orden[2]	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	EE[3]	Valor-*P*
Burkholderiales	54.82[a]	0.170[b]	0.174[b]	0.489[b]	0.132[b]	6.09	<0.001
Enterobacteriales	10.36	1.556	0.460	0.178	0.441	4.495	0.433
Pseudomonadales	4.591[a]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	1.105	0.020
Corynebacteriales	4.237[a]	0.00[b]	0.001[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.776	0.001
Clostridiales	4.069[b]	11.49[b]	25.18[ab]	32.60[a]	45.64[a]	6.25	0.003
Micrococcales	2.88[a]	0.00[b]	0.00[b]	0.002[b]	0.001[b]	0.812	0.063
Lactobacillales	2.739[b]	43.67[a]	48.27[a]	13.38[b]	3.15[b]	6.50	<0.001
Flavobacteriales	2.35[a]	0.007[b]	0.011[b]	0.078[b]	0.05[b]	0.633	0.053
Rhodobacterales	1.95	0.00	0.00	0.00	0.001	0.711	0.228
Bacillales	1.762[a]	0.00[b]	0.001[b]	0.001[b]	0.00[b]	0.338	0.002
Cytophagales	1.48	0.00	0.00	0.00	0.00	0.546	0.239
Bacteroidales	1.365[b]	35.39[a]	24.10[ab]	45.50[a]	43.42[a]	7.59	0.001
Xanthomonadales	1.06[a]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.248	0.016
Mycoplasmatales	0.821[a]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.131	0.002
Sphingobacteriales	0.607[a]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.085	<0.001
Erysipelotrichales	0.361[b]	0.378[b]	0.265[b]	0.99[b]	2.07[a]	0.466	0.022
Fusobacteriales	0.079	0.03	0.221	0.58	0.21	0.272	0.626
Coriobacteriales	0.034	0.239	0.190	0.521	1.351	0.342	0.078
Mollicutes RF9	0.021[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.232[b]	0.795[a]	0.179	0.014
Bifidobacteriales	0.00	6.467	0.421	4.479	1.31	2.802	0.420
Selenomonadales	0.00[b]	0.203[b]	0.361[ab]	0.655[a]	0.378[ab]	0.143	0.041

[1]Día 1: dieta solamente con calostro, día 7: dieta solamente con leche, día 14: dieta a base de leche e introducción de alimento concentrado iniciador *ad libitum*, día 21 y día 28: Dieta a base de leche y alimento concentrado iniciador *ad libitum*.

[2]Clasificación de OTU basada en la base de datos SILVA (versión 128) con 97% de similaridad.

[3]El error estándad mayor de las medias.

abc: para cada grupo taxonómico, las medias con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes.

5.5.9 Población bacteriana en el nivel taxonómico de familia

Se detectaron 103 familias de bacterias. En el cuadro 10 se presentan las principales. Las familias más abundantes fueron *Burkholderiaceae* ($P < 0.01$), *Lactobacillaceae* ($P < 0.01$), *Bacteroidaceae* ($P < 0.05$), *Lachnospiraceae* ($P < 0.05$), *Ruminococcaceae* ($P < 0.05$), *Porphyromonadaceae* ($P = 0.07$), *Prevotellaceae* ($P = 0.11$), *Moraxellaceae* ($P = 0.05$), *Corynebacteriaceae* ($P < 0.01$), *Flavobacteriaceae* ($P = 0.05$) y *Erysipelotrichaceae* ($P < 0.05$). La familia *Burkholderiaceae* fue la más abundante ($P < 0.01$) en el primer día de vida comparado con las semanas subsiguientes con un promedio de 54.53% y 0.02% para el primer día de vida y en las semanas subsiguientes, respectivamente. La proporción de la familia *Lactobacillaceae* fue mayor ($P < 0.01$) en la primera y segunda semana comparada con el resto de las semanas. La proporción de las familias *Lachnospiraceae* ($P < 0.05$) y *Ruminococcaceae* ($P < 0.05$) fueron mayores a partir de la segunda semana de edad. Otras familias que mostraron una disminución ($P < 0.05$) conforme avanzó la edad de las becerras fueron *Moraxellaceae, Corynebacteriaceae, Flavobacteriaceae, Xanthomonadaceae, Mycoplasmatales, Bacillaceae, Pseudomonadaceae, Carnobacteriaceae, Sphingomonadaceae* y *Pasteurellaceae.* Familias adicionales identificadas y que se encuentran en menor proporción se presentan en el apéndice, cuadro K.

Cuadro 11. Familias de bacterias en las heces de becerras durante las primeras 4 semanas de vida.

	Edad de las becerras[1]						
Familia[2]	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	EE[3]	Valor-*P*
Burkholderiaceae	54.53[a]	0.009[b]	0.042[b]	0.011[b]	0.019[b]	6.08	<0.001
Enterobacteriaceae	10.36	1.55	0.46	0.178	0.441	4.49	0.433
Lactobacillaceae	0.976[b]	43.25[a]	47.69[a]	12.77[b]	3.11[b]	6.48	<0.001
Bacteroidaceae	0.189[b]	30.03[a]	15.67[a]	29.84[a]	15.76[a]	6	0.008
Lachnospiraceae	0.841[b]	3.62[b]	12.83[ab]	16.76[a]	18.86[a]	4.75	0.041
Ruminococcaceae	0.921[c]	7.50[bc]	11.43[b]	14.80[b]	25.51[a]	3.32	0.003
Bifidobacteriaceae	0.00	6.46	0.421	4.48	1.31	2.80	0.420
Porphyromonadaceae	0.029	2.41	5.07	7.10	8.74	2.37	0.075
Prevotellaceae	0.074	2.42	2.10	5.36	4.71	1.57	0.117
Moraxellaceae	4.02[a]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	1.01	0.052
Corynebacteriaceae	3.61[a]	0.00[b]	0.003[b]	0.00[b]	0.003[b]	0.658	0.001
Flavobacteriaceae	2.35[a]	0.007[b]	0.001[b]	0.007[b]	0.005[b]	0.633	0.053
Micrococcaceae	2.05	0.00	0.00	0.002	0.001	0.635	0.108
Rhodobacteraceae	1.95	0.00	0.00	0.00	0.001	0.711	0.228
Clostridiaceae	1.45	0.039	0.003	0.210	0.169	0.573	0.367
Cytophagaceae	1.275	0.00	0.00	0.00	0.00	0.483	0.263
Xanthomonadaceae	1.061[a]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.248	0.016
Bacteroidales S247	1.01	0.00	0.00	0.324	9.52	2.75	0.089
Streptococcaceae	0.951	0.079	0.178	0.129	0.038	0.413	0.504
Mycoplasmataceae	0.822[a]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.132	0.002
Mycoplasmatales	0.821[a]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.131	0.002
Peptostreptococcaceae	0.806	0.147	0.627	0.465	0.328	0.38	0.728
Bacillaceae	0.77[a]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.177	0.014

Planococcaceae	0.71	0.00	0.00	0.001	0.00	0.225	0.128
Pseudomonadaceae	0.573[a]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.132	0.014
Dietziaceae	0.513[a]	0.00[b]	0.007[b]	0.001[b]	0.001[b]	0.133	0.036
Carnobacteriaceae	0.501[a]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.122	0.020
Sphingomonadaceae	0.417[a]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.966	0.015
Caulobacteraceae	0.362	0.00	0.00	0.00	0.00	0.113	0.114
Erysipelotrichaceae	0.361[b]	0.378[b]	0.265[b]	0.99[b]	2.07[a]	0.466	0.022
Chitinophagaceae	0.325[a]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.063	0.003
Cellulomonadaceae	0.315	0.00	0.00	0.00	0.00	0.116	0.235
Nocardioidaceae	0.301	0.00	0.00	0.00	0.00	0.122	0.323
Sphingobacteriaceae	0.282[a]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.056	0.004
Dermabacteraceae	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.098	0.254
Hyphomicrobiaceae	0.255	0.00	0.00	0.00	0.00	0.084	0.145
Enterococcaceae	0.167	0.34	0.40	0.47	0.00	0.258	0.686
Pasteurellaceae	0.128[a]	0.172[a]	0.062[ab]	0.01[b]	0.00[b]	0.041	0.009
Fusobacteriaceae	0.08	0.03	0.222	0.58	0.21	0.272	0.626
Rikenellaceae	0.056[b]	0.502[b]	1.24[b]	2.71[a]	4.23[a]	1.05	0.014
Family XIII	0.042[b]	0.165[b]	0.203[a]	0.315[a]	0.154[b]	0.07	0.042
Coriobacteriaceae	0.034	0.239	0.190	0.521	1.351	0.342	0.078
Christensenellaceae	0.007	0.00	0.00	0.002	0.535	0.151	0.070
Alcaligenaceae	0.00[b]	0.16[b]	0.132[b]	0.477[a]	0.112[b]	0.11	0.057
Campylobacteraceae	0.00	0.128	0.117	0.003	0.128	0.073	0.366
Acidaminococcaceae	0.00	0.114	0.302	0.534	0.353	0.133	0.069
Spirochaetaceae	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.005[b]	0.35[a]	0.051	<0.001

[1]Día 1: dieta solamente con calostro, día 7: dieta solamente con leche, día 14: dieta a base de leche e introducción de alimento concentrado iniciador *ad libitum*, día 21 y día 28: dieta a base de leche y alimento concentrado iniciador *ad libitum*.

[2]Clasificación de OTU basada en la base de datos SILVA (versión 128) con 97% de similaridad.

[3]El error estándad mayor de las medias.

abc: para cada grupo taxonómico, las medias con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes.

5.5.10 Población bacteriana en el nivel taxonómico de género

Se detectaron 185 géneros bacterianos. En el cuadro 11 se presentan los principales. Los géneros más abundantes fueron *Ralstonia* ($P < 0.01$), *Lactobacillus* ($P < 0.01$), *Bacteroides* ($P < 0.01$), *Corynebacterium 1* ($P < 0.01$), *Blautia* ($P = 0.05$), *Parabacteroides* ($P < 0.01$), *RikenellaceaeRC9* ($P < 0.05$), *Ruminiclostridium 9* ($P < 0.05$), *Acinetobacter* ($P < 0.01$) *y Ruminococcus* ($P < 0.01$). Comparado con el resto de las semanas, en el primer día de vida la proporción del género *Ralstonia* fue mayor ($P < 0.001$) con un promedio de 54.50%, en las semanas siguientes la proporción de este género disminuyó a tan solamente 0.02% en promedio. El género *Lactobacillus* ($P < 0.001$) predominó en la primera y segunda semana de vida (45.47%) cuando la alimentación estuvo basada en leche. La proporción de *Bacteroides,* un género que se encarga de degradar poteína y fibra de la dieta, incrementó ($P < 0.01$) en la tercera semana de vida, momento en el que las becerras también consumen alimento concentrado iniciador. Por otro lado, otros géneros que disminuyeron ($P < 0.05$) conforme avanzó la edad de las becerras fueron *Acinetobacter* y *Mycoplasma*. En contraste, otros géneros que aumentaron ($P < 0.05$) conforme avazó la edad de las becerras fueron *Blautia, RikenellaceaeRC9, Anaerotruncus, Sharpea* y *Eubacterium.* El resto de los géneros identificados y que se encuentran en menor proporción se presentan en el apéndice, cuadro L.

Cuadro 12. Géneros de bacterias en las heces de becerras durante las primeras 4 semanas de vida.

	Edad de las becerras[1]						
Género[2]	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	EE[3]	Valor-*P*
Ralstonia	54.50[a]	0.009[b]	0.042[b]	0.012[b]	0.02[b]	6.08	<0.001
Escherichia	10.15	1.55	0.46	0.177	0.441	4.42	0.437
Lactobacillus	0.976[b]	43.25[a]	47.69[a]	12.77[b]	3.11[b]	6.48	<0.001
Bacteroides	0.189[b]	30.03[a]	15.67[a]	29.84[a]	15.76[a]	6.004	0.008
Corynebacterium 1	3.56[a]	0.00[b]	0.003[b]	0.00[b]	0.003[b]	0.665	0.002
Bifidobacterium	0.00	6.46	0.42	4.48	1.31	2.80	0.420
Faecalibacterium	0.071	2.46	4.27	3.01	3.4	1.12	0.123
Alloprevotella	0.047	2.35	2.02	4.98	2.67	1.54	0.291
Ruminococcus torques	0.009	0.965	8.80	6.94	10.48	3.89	0.242
Odoribacter	0.00	1.52	3.11	4.48	4.97	2.18	0.477
Blautia	0.084[b]	0.453[b]	0.545[b]	3.87[a]	4.30[a]	1.32	0.056
Subdoligranulum	0.002	1.06	1.87	2.84	4.97	1.38	0.141
Parabacteroides	0.00[b]	0.761[b]	1.32[b]	2.40[ab]	2.92[a]	0.599	0.009
RikenellaceaeRC9	0.017[b]	0.45[b]	0.406[b]	2.24[ab]	3.38[a]	0.959	0.022
RuminococcaceaeUCG 014	0.10	0.074	0.549	1.93	4.65	1.43	0.151
Psychrobacter	2.84	0.00	0.00	0.00	0.00	0.904	0.124
Paracoccus	1.87	0.00	0.00	0.001	0.001	0.69	0.237
Clostridium Sensu Stricto 1	1.45	0.039	0.003	0.16	0.114	0.572	0.350
Pontibacter	1.153	0.00	0.00	0.00	0.00	0.488	0.368
Acinetobacter	1.17[a]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.21	0.001
Kocuria	1.03	0.00	0.00	0.002	0.001	0.32	0.104
Chryseobacterium	0.956	0.00	0.00	0.00	0.00	0.354	0.240
Lactococcus	0.92	0.003	0.00	0.00	0.00	0.41	0.425

Glutamicibacter	0.86	0.00	0.00	0.00	0.00	0.281	0.150
Mycoplasma	0.82[a]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.132	0.002
Peptoclostridium	0.802	0.085	0.001	0.464	0.33	0.26	0.200
Planococcus	0.71	0.00	0.00	0.001	0.00	0.23	0.130
Lachnospiraceae NK4A136	0.643[a]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.00	0.001
Enterococcus	0.167	0.34	0.40	0.478	0.00	0.26	0.690
Anaerotruncus	0.101[b]	0.031[b]	0.172[b]	0.08[b]	0.506[a]	0.105	0.025
Fusobacterium	0.08	0.03	0.222	0.58	0.21	0.272	0.626
Collinsella	0.034	0.232	0.186	0.41	0.836	0.313	0.440
Ruminiclostridium 9	0.007[b]	0.164[b]	0.166[b]	0.185[b]	0.611[a]	0.105	0.006
PrevotellaceaeUCG 003	0.004	0.038	0.008	0.014	0.91	0.301	0.164
Ruminoccus Gnavus	0.00	0.825	1.38	1.10	0.013	0.505	0.208
Lachnospiraceae UCG 008	0.00	0.52	0.04	2.15	0.582	0.63	0.121
Ruminococcus 2	0.00	0.50	0.90	0.273	0.91	0.334	0.192
Oscillospira	0.00	0.324	0.252	0.111	0.708	0.22	0.220
Tyzzerella	0.00	0.173	0.555	0.463	0.246	0.165	0.152
Mogibacterium	0.00[b]	0.164[ab]	0.196[ab]	0.264[a]	0.075[b]	0.062	0.033
Butyricimonas	0.00	0.122	0.577	0.150	0.612	0.262	0.207
Phascolarctobacterium	0.00	0.073	0.292	0.32	0.32	0.107	0.119
Peptostreptococcus	0.005	0.062	0.626	0.001	0.00	0.276	0.434
Alistipes	0.00	0.05	0.803	0.46	0.85	0.335	0.177
Prevotella 2	0.00	0.032	0.057	0.25	0.36	0.112	0.100
Sharpea	0.00[b]	0.017[b]	0.073[b]	0.51[a]	0.453[a]	0.168	0.031
Ruminococcus Gauvreauii	0.001[b]	0.013[b]	0.073[b]	0.473[b]	1.25[a]	0.24	0.003
Eubacterium	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.31[b]	1.98[a]	0.33	0.006
Prevotella 7	0.00	0.00	0.00	0.027	0.623	0.27	0.390
BacteroidalesS24-7	0.00	0.00	0.00	0.006	7.03	2.77	0.299

Otras	0.03[b]	1.834[a]	2.353[a]	2.88[a]	1.36[ab]	0.63	0.035

[1]Día 1: dieta solamente con calostro, día 7: dieta solamente con leche, día 14: dieta a base de leche e introducción de alimento concentrado iniciador *ad libitum*, día 21 y día 28: dieta a base de leche y alimento concentrado iniciador *ad libitum*.

[2]Clasificación de OTU basada en la base de datos SILVA (versión 128) con 97% de similaridad.

[3]El error estándad mayor de las medias.

abc: dara cada grupo taxonómico, las medias con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes.

5.5.11 Población bacteriana en el nivel taxonómico de especie

En el cuadro 12 se presentan los principales grupos taxonómicos de bacterias fecales que se identificaron hasta el nivel de especie. Las especies más abundantes fueron *Lactobacillus amylovorus* ($P < 0.01$), *Lactobacillus ruteri* ($P < 0.01$), ($P < 0.01$), *Bacteroides coprocola* ($P < 0.05$), *Bacteroides thetaiotaomicron* ($P = 0.07$), *Bacteroides plebeius* ($P < 0.05$), *Blautia glucerasea* ($P < 0.05$) y *Corynebacterium stationis* ($P < 0.05$). La proporción de la especie *Lactobacillus ruteri* ($P < 0.001$) fue mayor en la segunda semana de vida comparado con el resto de las semanas. También se nota una disminución paulatina ($P < 0.05$) de la especie *Corynebacterium stationis* conforme avanza la edad de las becerras. Algunas especies que aumentaron en proporción conforme avanzó la edad de las becerras fueron *Bacteroides coprocola* ($P < 0.034$), *Bacteroides plebeius* ($P < 0.05$) y *Bacteroides thetaiotaomicron* ($P = 0.07$). Especies adicionales identificadas y que se encontran en menor proporción se presentan en el apéndice, cuadro M.

Cuadro 13. Especies de bacterias más abundantes en las heces de becerras durante las primeras 4 semanas de vida.

	Edad de las becerras[1]						
Especie[2]	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	EE[3]	Valor-*P*
Lactobacillus reuteri	17.40[b]	8.879[b]	23.71[a]	3.930[b]	8.880[b]	3.263	<0.001
Lactobacillus amylorovus	9.650[b]	28.224[a]	16.911[a]	3.730[b]	33.43[a]	5.128	0.001
Bacteroides coprophilus	0.00	8.171	1.880	9.030	8.171	2.73	0.117
Bacteroides coprocola	0.051[b]	7.903[a]	3.235[b]	5.750[ab]	7.903[a]	1.767	0.034
Lactobacillus gasseri	0.663	4.559	5.754	4.387	2.185	1.979	0.293
Odoribacter splachnicus	0.00	1.479	2.993	4.441	4.726	2.155	0.499
Faecalibacterium prausnitzii	0.073	2.408	4.338	2.909	3.265	1.127	0.128
Bifidobacterium pseudolongum	0.00	6.447	0.409	4.376	6.447	2.773	0.417
Gemmiger formicilis	0.002	0.981	1.774	2.638	4.253	1.234	0.172
Bacteroides plebeius	0.00[c]	0.393[bc]	0.597[bc]	2.652[ab]	3.800[a]	0.945	0.033
Alloprevotella rava	0.044	2.144	1.563	2.382	0.104	1.278	0.529
Parabacteroides merdae	0.00[b]	0.494[b]	0.774[b]	2.135[a]	1.845[a]	0.441	0.008
Bacteroides thetaiotaomicron	0.00[c]	0.551[bc]	1.061[abc]	1.401[a]	0.486[bc]	0.371	0.078
Ruminococcus gnavus	0.00	0.792	1.339	1.068	0.006	0.483	0.199
Corynebacterium stationis	2.665[a]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.00[b]	0.581	0.008
Pseudoflavonifractor capillosus	0.00	0.161	0.411	0.692	0.428	1.182	0.086
Collinsella aerofaciens	0.033	0.226	0.182	0.424	0.806	0.303	0.438
Blautia glucerasea	0.00[b]	0.006[b]	0.044[b]	0.447[a]	1.003[a]	0.246	0.028
Clostridium lactatifermentans	0.00	0.172	0.563	0.457	0.220	0.164	0.137

[1]Día 1: dieta solamente con calostro, día 7: dieta solamente con leche, día 14: dieta a base de leche e introducción de alimento concentrado iniciador *ad libitum*, día 21 y día 28: dieta a base de leche y alimento concentrado iniciador *ad libitum*.

[2]Clasificación de OTU basada en la base de datos SILVA (versión 128) y Ribosomal Database Project (RDP) con 97% de similaridad.

[3]El error estándad mayor de las medias.

abc: para cada grupo taxonómico, las medias con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes.

5.5.12 Bacterias potencialmente patógenas

En el cuadro 13 se presentan las principales especies de bacterias patógenas, o bien, que pueden estar asociadas con la aparición de disturbios digestivos. Estas fueron *Escherichia coli* (P = 0.44), *Bacteroides fragilis* (P = 0.33) y *Clostridium perfringens* (P = 0.42). De estas especies, en el primer día de vida, la especie *Escherichia coli* fue numéricamente más abundante con un promedio general en las 8 becerras de 10.18%. Específicamente, la figura 12 ilustra cómo la presencia de *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens* elimina la gran mayoría de la población de bacterias benéficas en una de las becerras, y la posterior recuperación de dicha microbiota en las semanas subsiguientes una vez que los patógenos fueron eliminados. La proliferación de la especie *Bacteroides fragilis* también estuvo asociada con la aparición de diarreas alcanzando un promedio general en las 8 becerras de 8.5% en el día 7 y 4.1% en el día 14. Específicamente, la figura 13 ilustra el efecto de esta especie sobre la población de bacterias en una de las becerras y la recuperación de dicha población en las semanas subsiguientes una vez que este patógeno se eliminó.

Cuadro 14. Bacterias potencialmente patógenas detectadas en las heces de becerras durante las primeras 4 semanas de vida.

	Edad de las becerras[1]						
Especie[2]	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	EE[3]	Valor-*P*
Escherichia coli	10.18	1.687	0.500	0.195	0.435	4.454	0.442
Bacteroides fragilis	0.001	8.589	4.188	2.955	0.207	3.221	0.338
Clostridium perfringens	1.212	0.341	0.083	0.113	0.095	0.542	0.425

[1]Día 1: dieta solamente con calostro, día 7: dieta solamente con leche, día 14: dieta a base de leche e introducción de alimento concentrado iniciador *ad libitum*, día 21 y día 28: Dieta a base de leche y alimento concentrado iniciador *ad libitum*.

[2]Clasificación de OTU basada en la base de datos SILVA (versión 128) y Ribosomal Database Project (RDP) con 97% de similaridad.

[3]El error estándad mayor de las medias

abc: para cada grupo taxonómico, las medias con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes.

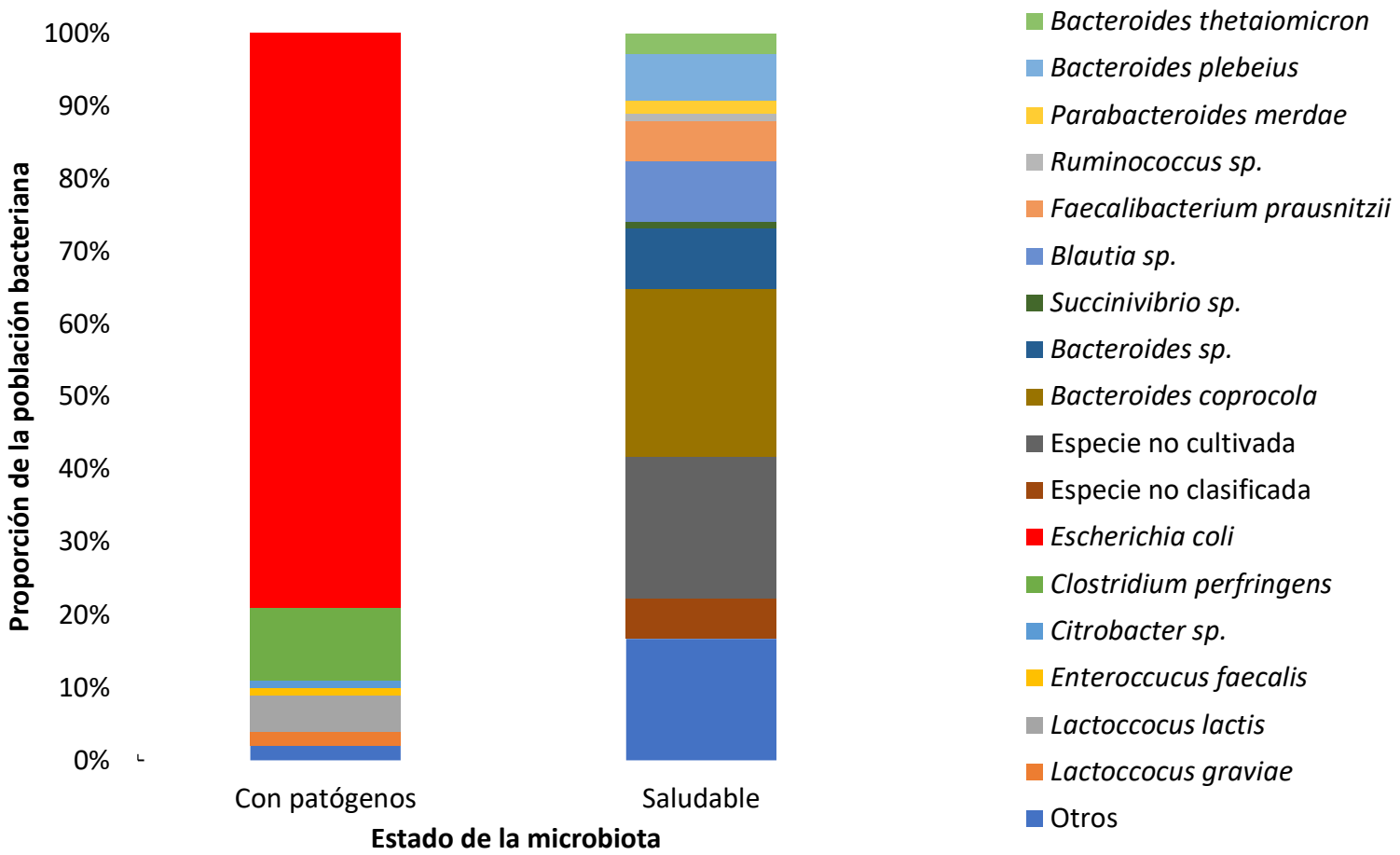

Figura 13. Población bacteriana de las heces en uno de los casos (becerra 2277) con proliferación de *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens* como los patógenos predominantes en un problema diarreico.

La figura 12 muestra una disminución de la diversidad bacteriana durante el ataque patogénico con recuperación posterior de la diversidad.

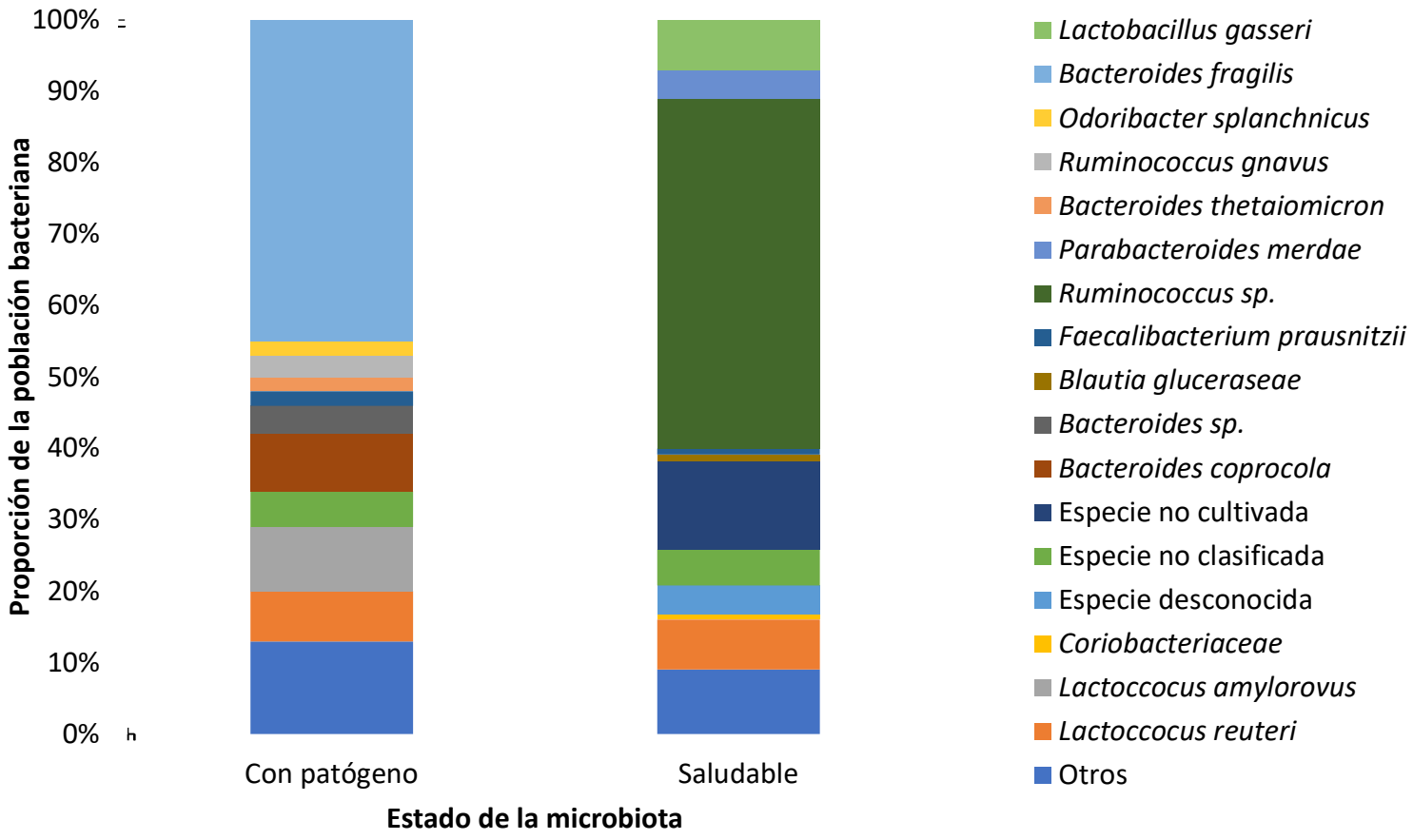

Figura 14. Población bacteriana de las heces en uno de los casos (becerra 1617) con proliferación del patógeno *Bacteroides fragilis*.

Durante el ataque, *Bacteroides fragilis* abarcó casi la mitad de la población bacteriana total. Sin embargo, al eliminarse, se nota una población saludable con proliferación de *Ruminoccocus* sp., una especie benéfica.

5.6 DISCUSIÓN

Dada la importancia del sector lechero en México y debido a la delicadeza de los primeros días de vida de las becerras, es de suma importancia conocer los factores que influyen sobre su salud y metabolismo de nutrientes. La microbiota del sistema digestivo juega un papel esencial sobre estos factores, no sólo a temprana edad, también durante la vida adulta. Por lo tanto, es necesario la integración de nuevas tecnologías para su estudio y para conocer los factores que lo afectan, y así promover una microbiota benéfica y fortalecer la salud de los animales.

Por esta razón en el presente trabajo se evaluó, cómo la edad de las becerras influye sobre la población bacteriana que se establece desde el momento del nacimiento hasta las 4 semanas de vida. Además, se identificaron momentos críticos en la proliferación de especies de bacterias patógenas y su posible relación con la alimentación y manejo. En general, se observó un claro efecto de edad (resultado del cambio en la dieta e interacción con el ambiente) sobre el tipo de bacterias que colonizan el sistema intestinal en todos los niveles taxonómicos: filo, clase, orden, familia, género y especie.

En el nivel taxonómico de filo, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Li et al. (2012) quienes evaluaron la población bacteriana de becerras con una edad de 14 y 42 días. Concordando con estos autores, los filos que predominaron en las becerras utilizadas en este estudio fueron *Bacteroidetes, Firmicutes* y *Proteobacteria*. Sin embargo, una de las diferencias entre nuestros resultados y los reportados por Li et al. (2012) es que ellos observaron que el filo *Bacteroidetes* fue el de mayor presencia con 45% a los 14 días de edad, en nuestro estudio, el filo que tuvo mayor proporción a los 14 días fue *Firmicutes* con 74%. Esta diferencia puede deberse a la porción del sistema digestivo estudiado, ya que a diferencia de nuestro caso, los autores previamente mencionados evalauron la población bacteriana del rumen. Por otra parte, Jami et al. (2012) reportaron la presencia de 15 filos en las heces de becerras, y que en el primer día de vida, el

filo *Firmicutes* fue es el más abundante; sin embargo, en este estudio el filo *Proteobacteria* predominó en el primer día de vida con 74.9%. Estas diferencias pueden deberse a las condiciones de alimentación o ambiente, ya que nuestro estudio reflejó las condiciones empleadas en los hatos comerciales de los sistemas de producción del ganado lechero en nuestro país. Es posible comprobar lo anterior y compararlo con los resultados de Rey et al. (2013), ya que en condiciones similares donde habitaban los animales en su experimento y el nuestro, las cuales fueron casetas individuales con cama de arena, alimentación con leche en cubeta a las 8 am y a las 4 pm, tuvieron como resultado un mayor número de Proteobacteria con un 70.4%, que concuerda aproximadamente con lo obtenido por nosotros de 74.9%.

El filo *Proteobacteria* (y sus respectivas clases *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*) que predominó en el primer día de vida es adquirido por contacto con el ambiente, se ha observado que las proteobacterias son ubicuas en hábitats como el suelo, las plantas, el agua de mar, el agua dulce, la atmósfera y varias partes del cuerpo de mamíferos (Shin et al., 2015).

Por ejemplo, el género *Ralstonia* (perteneciente a este filo) pudo haberse obtienido por contacto con el canal del parto o con el suelo durante y después del parto. También es posible que este grupo taxonómico este adaptado para digerir solamente productos provenientes del calostro, ya que muestra una disminución drástica en las semanas subsiguientes. Se puede observar una situación similar en una gran cantidad de grupos taxonómicos como *Moraxellaceae*, *Corynebacteriaceae, Xanthomonadaceae, Mycoplasmataceae, Mycoplasmatales, Bacillaceae, Pseudomonadaceae, Carnobacteriaceae, Sphingomonadaceae, Erysipelotrichaceae* y otros localizados en la sección de apéndices. Esto demuestra la rápida colonización del sistema intestinal por microorganismos provenientes del ambiente desde el primer día de vida (Villanueva et al., 2017), pero que con el cambio de la dieta desaparecen para ceder el lugar a otros que definirán la estructura de la población bacteriana intestinal de las becerras.

Los géneros predominantes del día 7 al día 28 fueron *Bacteroides* (especies *Bacteroides coprophilus* y *Bacteroides coprocola)* y *Lactobacillus* (especies *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus amylovorus). Bacteroides* incluye microorganismos que generalmente degradan varios tipos de nutrientes (Russell, 2002) y *Lactobacillus* esta conformado por especies que degradan los componentes de la leche. Además, Russell (2002) reporta que las familias *Ruminococcaceae* y *Lachnospiraceae* aumentaron en los días 14, 21 y 28.

Este resultado se debe a que, en esta etapa, las becerras consumen alimento concentrado iniciador que contiene 18.3% de fibra detergente neutro y 54.3% de carbohidratos no fibrosos, ya que estas familias incluyen especies que degradan fibra y almidón, respectivamente (Russell, 2002). Concordando con el cambio en la alimentación de las becerras, los resultados de este estudio muestran una disminución gradual de algunas especies degradadoras de los componentes de la leche en los días 21 y 28, como por ejemplo Lactobacillus reuteri, esto posiblemente debido a la disminución en la cantidad de los nutrientes provenientes de la leche aunque el volumen fuera el mismo ya que las becerras por si solas aumentaron el consumo de alimento concentrado iniciador.

Por otra parte, se notó el aumento de algunos grupos taxonómicos que pueden estar involucrados en el metabolismo de la energía. Por ejemplo, la familia *Christensenellaceae* esta involucrada en el metabolismo energético y acumulación de lípidos corporales en especies monogástricas (Goodrich et al. 2014). En el presente experimento, esta familia tendió a incrementar conforme avanzó la edad de las becerras, por lo tanto, es posible que también influya sobre la acumulación de grasa y el aprovechamiento de la energía del alimento iniciador en rumiantes.

La diarrea neonatal de terneros genera la mayor proporción de morbilidad y mortalidad en los recién nacidos, contabilizando más del 50% del total de muertes y tiene un gran impacto en la economía de las granjas lecheras (Walker et al., 2012). En estudios recientes, se ha sugerido que el cambio en la composición de

la microbiota fecal puede abrir nichos que permiten la proliferación de patógenos causantes de enfermedades gastrointestinales (Gómez-Nieto, 2017) y que la mala salud gastrointestinal está asociada con deterioros en los procesos digestivos y de absorción y una mayor incidencia de morbilidad y mortalidad (Zeineldin et al., 2018). En este experimento, aun cuando se logró una adecuada transferencia de inmunidad a las becerras, durante la segunda semana de vida se presentó una alta incidencia y prevalencia de diarrea amarillenta y muy líquida.

Esta observación fue antecedida por la proliferación de algunas especies consideradas como potencialmente patógenas como *Escherichia coli*, *Bacteroides fragillis* y *Clostridium perfringens*. Yanliang et al. (2017) reportaron que cuando *Escherichia coli* predomina, comúnmente se observa una disminución de otros grupos taxonómicos. Nuestros resultados indican una gran abundancia de *Escherichia coli* (perteneciente al orden *Enterobacteriales* y filo *Proteobacteria)*, alcanzando un máximo de 79% del total la población bacteriana en las heces en uno de los casos. *Escherichia coli* produce diarrea de tipo secretora que causa deshidratación rápida. Este patógeno también daña el epitelio intestinal, lo que impide la absorción de nutrientes (Smith, 2015).

Los resultados de este estudio también demuestran que, con un tratamiento e hidratación oportuna, se puede promover la recuperación de la microbiota intestinal. Se observó que dos semanas después de la proliferación del patógeno se reestableció la diversidad bacteriana del sistema digestivo, en el cual predominó el género *Bacteroides*, que incluye bacterias que generalmente degradan la proteína y la fibra de la dieta (Groleau et al., 1982), momento en el cual las becerras consumen más alimento concentrado iniciador.

En el caso de patógeno *Bacteroides fragilis* (perteneciente al orden *Bacteroidales* y filo *Bacteroidetes)* llegó a representar hasta un 45% de la microbiota intestinal en uno de los casos. Los resultados también demostraron que al eliminarse el patógeno, incrementó la población de *Ruminococcus*, un género benéfico que

promueve la digestión de la fibra desarrollándose una microbiota heterogénea con alta diversidad.

Los cambios bruscos en la dieta de las becerras podrían contribuir a la proliferación de estos patógenos, y por lo tanto al incremento observado en la prevalencia de diarreas durante la segunda semana de vida. Esto debido a que el cambio en la dieta puede alterar la población de bacterias y crear nichos que facilitan la proliferación de las mencionadas especies dañinas (Callaway et al., 2010; Harris et al., 2019). Además, descuidos en medidas de higiene como el lavado inadecuado de las cubetas y mamilas o no limpiar las casetas antes del alojamiento de la becerra recién nacida pueden contribuir a incrementar la incidencia de disturbios gastrointestinales en las recién nacidas.

En general, la edad de las becerras (y por lo tanto, la dieta y ambiente), tuvo un gran impacto sobre la población bacteriana que se estableció en el sistema intestinal durante las primeras 4 semanas de vida. Aunque los patógenos causaron disturbios en la microbiota, después del tratamiento su recuperación fue rápida con un reestablecimiento de especies benéficas. No en todos los casos de diarrea se pudo detectar la presencia de bacterias patógenas, en esos casos la diarrea pudo haber sido viral, fúngica o nutricional. Por otro lado, en cada uno de los niveles taxonómicos evaluados se detectaron muchos taxones de los cuales existe información limitada, lo cual demuestra la necesidad de seguir integrando técnicas y conocimientos de varias disciplinas para continuar descubriendo el papel que juegan las bacterias en los procesos digestivos, en el metabolismo de nutrientes y en la salud de los rumiantes.

6. CONCLUSIONES

Durante los últimos años ha habido un rápido desarrollo de tecnologías moleculares, como por ejemplo la PCR y secuenciación masiva de ADN, así como su análisis con herramientas de bioinformática. La información generada en este estudio aportó a la investigación en el área de la microbiología aplicada en el sector ganadero. En el presente estudio, en una unidad comercial de producción de leche se identificó el microbioma intestinal que se desarrolla desde el primer día hasta las 4 semanas de vida. Comprender cómo se va poblando el sistema intestinal ayuda a mejorar la alimentación y manejo de los animales para el establecimiento de una microbiota saludable. Los cambios en la dieta de las becerras en edad temprana favorecieron el establecimiento y desarrollo de la microbiota intestinal. Durante las primeras dos semanas de vida, se notaron variaciones drásticas en la población bacteriana. Por ejemplo, se notó un aumento en la población de bacterias degradadoras de la lactosa (*Lactobacillus*) durante los primeros días de vida. Después, estas disminuyeron para ceder lugar a bacterias fibrolíticas, proteolíticas y amilolíticas (por ejemplo, *Ruminococus*, *Bacteroides* y *Lachnospiraceae*), esto favorecido por el aumento en el consumo de alimento concentrado. Además, hubo proliferación de especies patógenas como *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* y *Bacteroides fragilis*, y alta prevalencia de diarreas, este periodo coincidió con los principales cambios en la dieta, por lo que dichos cambios pudieron abrir nichos permitiendo la proliferación de dichas especies.

Recomendaciones

Realizar los cambios en la alimentación lo más gradual posible para que la adaptación y variación en las poblaciones bacterianas sea paulatino, de esta manera evitar el riesgo de crear nichos que permitan la proliferación de especies dañinas. Ejemplos de recomendaciones específicas podrían incluir la combinación de calostro y leche para la transición al consumo de leche (debido a la gran diferencia en contenido de grasa y proteína entre estos alimentos); además, la dosificación en el consumo del alimento concentrado iniciador al empezar su

introducción (debido a las altas proporciones de proteína, almidón y fibra en este alimento). También es recomendable reforzar medidas de higiene, esterilización y lavado de recipientes en la alimentación y manejo de los neonatos, en especial durante esta etapa.

Con los avances en técnicas moleculares, así como mejoras en efectividad, costos y duración del análisis, estas podrían contribuir a la identificación de especies patógenas en los establos y permitir un tratamiento más efectivo por medio del uso de medicamentos específicos. De esta manera promover una recuperación pronta de las becerras y su microbiota. Por otro lado, existe la necesidad de continuar integrando herramientas y conocimientos de distintas disciplinas que incluyan técnicas convencionales de cultivos *in vitro*, métodos moleculares y herramientas de bioinformática para seguir descifrando el papel del microbioma en los procesos digestivos, en el metabolismo de nutrientes y en la salud de los animales.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar, MIO., Manzano, EP., Sánchez, JMC., Naranjo, OO. 1998. Prevención de afecciones gastrointestinales mediante el uso de probióticos en becerros Holstein lactantes. Veterinaria México, 29(2), 197-201.
2. Alexander, T.W., J.C. Plaizier. 2016. The importance of microbiota in ruminant production. Animal Frontiers. Vol 6(2): 4–7.
3. Antharam, V.C., Li, E.C., Ishmael, A., Intestinal dysbiosis and depletion of butyrogenic bacteria in Clostridium difficile infection and nosocomial diarrhea. 2013. Journal of Clinical Microbiology; 51:2884– 2892.
4. Arancibia, R. Manejo del ternero recién nacido. 2009. TecnoVet 15: 23-26.
5. Ávalos, RG., Avalos, JG., Revuelta, BPP., Reséndiz, AM., Carrillo, JLR. 2017. Análisis del costo de alimentación y desarrollo debecerras de reemplazo lactantes. Revista Mexicana de Agronegocios, 40, 561-569.
6. Bacha, WJ., Bacha, LM., 2012. Color Atlas of Veterinary Histology. 3rd edition. Blackwell. UK.
7. Bagheri Varzaneh M, F. Klevenhusen, Q. Zebeli, and R. Petri. 2018. Scrophularia striata Extract Supports Rumen Fermentation and Improves Microbial Diversity *in vitro* Compared to Monensin. Front. Microbiol. 9:2164.
8. Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. 2003. J Microbiol Methods; 55(3):541–55.
9. Berge A.C., Moore D.A., Besser T.E., Sischo W.M., 2009. Targeting therapy to minimize antimicrobial use in preweaned calves: Effects on health, growth, and treatment costs. Journal Dairy Science 92, 4707-4714.
10. Bielmann, V., Gillan, J., Perkins, N.R., Skidmore, A.L., Godden, S., Leslie, K.E., 2010. An evaluation of Brix refractometry instruments for measurement of calostrum quality in dairy cattle. J. Dairy Sci. 93: 3713-3721.
11. Brett, J. 2006. Empiece bien sus becerras. Dairy herd management. 5(8): 86-112.
12. 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.

13. Campos, R., Carrillo, A., Loaiza, V., Giraldo, L, 2007. El Calostro: Herramienta para la Cría de Terneros. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. Departamento de Ciencias Animales. 12.

14. Caporaso, J. G. et al. 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. ISME J. 6, 1621–1624.

15. Caporaso, J. G., J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F. D. Bushman,, E. K. Costello, N. Fierer, N., A. Gonzalez Pena et al. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nature Methods. 7(5), 335-336.

16. Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Noah Fierer, N., & Knight, R. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. Proc Natl Acad Sci USA 108, 4516–4522.

17. Castillo-Lopez, E., C. J. R. Jenkins, N. D. Aluthge, T. Westom, S.C. Fernando, and P. J. Kononoff. 2017a. The effects of regular or low-fat distillers grains and solubles on rumen methanogenesis and the rumen bacterial community. Journal of Applied Microbiology. *97*(3), 1578-1593.

18. Castillo-Lopez, E., J. Moats, N. Aluthge, H.A. Ramirez Ramirez, D. Christiansen, T. Mutsvangwa, G. Penner, and S. Fernando. 2017b. Effect of partially replacing a barley-based concentrate with flaxseed-based products on the rumen bacterial population of lactating Holstein dairy cows. *Journal of Applied Microbiology*, 124:42-57.

19. Castillo-Lopez, E., T. J. Klopfenstein, S. C. Fernando, and P. J. Kononoff. 2014a. Effect of dried distillers' grains and solubles when replacing corn or soybean meal on rumen microbial growth in vitro as measured using DNA as a microbial marker. Canadian Journal of Animal Science 94(2):349-356.

20. Castillo, C., Abuelo, A., Hernández, J. 2016. El Desafío de la Metanogénesis en el Bovino. Nutri news.

21. Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., Alland, D. A detailed analysis of 16s ribosomal RNA gene sgments for the diagnosis of pathogenic bacteria. 2017. Journal of Microbiological Methods 69: 330-339.

22. Cho, Y.I., Han, J.I., Wang, C., Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea. 2013. Vet Micro- biol; 166:375–385.

23. Cho, Y. y Yoon, K.J., An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention, 2014. J. Vet. Sci. 15:1–17.

24. Del Rosario Rodicio, M., Del Carmen Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, 22(4), 238-245.

25. D'Mello, J.P.F. 2000. Farm Animal Metabolism and nutrition. 1st edition. CABI Publishing. UK.

26. Deusch S, A. Camarinha-Silva, J. Conrad, U. Beifuss, M. Rodehutscord and J. Seifert. 2017. A Structural and Functional Elucidation of the Rumen Microbiome Influenced by Various Diets and Microenvironments. Front. Microbiol. 8:1605.

27. Dominguez-Ordonez, M.G., L.A. Miranda-Romero, M. Huerta-Bravo, P.A. Martinez-Hernandez, and E. Castillo-Lopez. 2019. Evaluation of nutritional methods to reactivate preserved ruminal inoculum, assessed through in vitro fermentation kinetics and forage digestibility. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias. 10(2):315-334.

28. Espinoza-Velasco, B. Ramírez-Mella, M. Sánchez-Villareal, A. 2018. Elucidando la Relación entre la Microbiota Ruminal y la Emisión de Gases de Efecto invernadero Mediante la Aplicación de la Genómica. Agroproductividad: Vol 11 (2): 3 - 8.

29. Figueiredo, MG., Augusto, PJC., Martini, M. 2010. Manual Veterinario de Toma y Envío de Muestras. 1ª ed. Panaftosa. Brasil

30. Flores, SI. 2019. Efecto de la composición química de la dieta sobre la microbiota ruminal evaluada por secuenciación de ADN con la plataforma torrente de iones en ganado lechero. Tesis Licenciatura. UNAM.

31. Frandson, RD., Wilke, WL., Fails, AD., 2009. Anatomy and Physiology of Farm Animals. Blackwell. 7th edition. E. U.

32. Getty, R. Sisson y Grossman. 2002. Anatomía de los animales domésticos. 5ª edición. Masson. España.

33. Gloobe, H. 1989. Anatomía aplicada del bovino. Instituto interamericano de Cooperación para la Agricultura. Servicio Editorial IICA. 1ª edición. Costa Rica.

34. Gómez, D.E.., Arroyo, L.G., Costa, M.C., Viel, L., and Weese, J.S. 2017. Characterization of the Fecal Bacterial Microbiota of Healthy and Diarrheic Dairy Calves. J Vet Intern Med 31:928–939

35. Gómez-Nieto, D. 2017. Investigations in calf diarrhea: bovine coronavirus, intestinal microbiota, and antimicrobial usage. Thesis Doctor of Philosophy degree. University of Guelph. Canadá.

36. Goodrich, J. K., J. L. Waters, A. C. Poole, J. L. Sutter, O. Koren, R. Bleckhman, M. Beaumont, V. Treuren, R. Knight, J. T. Bell, T. D. Spector, A. G. Clark, and R. E. Ley. 2014. Human Genetics Shape the Gut Microbiome. Cell. 159:789-799.

37. Goodwin, S. McPherson, J.D, McCombie, W.R. 2016. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. Nature Review Genetics. 17(6), 333 - 351.

38. Gracia, E., Moreno, B., Fernández, A., Pérez, GC., Morsetti, IA., Domingo, RB. 2005. Toma de muestras en rumiantes. Albéitar: publicación veterinaria independiente, (87), 26-27.

39. Groleau, D., Forsberg, C. W. 1981. Cellulolytic activity of the rumen bacterium Bacteroides succinogenes. Canadian Journal of Microbiology, 27(5), 517-530.

40. Gürsoy, O., Can, M. Hypervariable Regions in 16S rRNA Genes for the Taxonomic Calssification. 2019. Southeast Europe Journal of Soft Computing. ISSN 2233-1859

41. Hambal M, M. Admi, S. Safika, W.E. Sari, T.R Ferasyi, D. Dasrul, U. Balqis, D. Darmawl. 2019. Identification of Staphylococcus species isolated from preputium of Aceh cattle based on 16S rRNA gene sequences analysis, Veterinary World, 12(10): 1540-1545.

42. Harris, E.V., J.C. de Roode, N.M. Gerardo. 2019. Diet–microbiome–disease: Investigating diet's influence on infectious disease resistance through alteration of the gut microbiome. PLoS Pathog 15(10): e1007891.

43. Henderson G., Cox F., Ganesh S., Jonker A., Ypung W., 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. Science Reproduction 5: 14567.

44. Hobson, P. N., Stewart, C. S. 1997. The Rumen Microbial Ecosystem. 2nd edition. Springer. Netherlands.

45. Hungate, R. E. 1950. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. Bacteriol. Rev. 14:1-49.

46. Hungate, R.E. 1960. Symposium: Selected topics in microbial ecology. I. Microbial ecology of the rumen. Bacteriol. Rev. 24: 353-364.

47. Hungate, R.E. 1966. The Rumen and its Microbes. Academic Press, New York, NY.

48. Hungate, R.E. 1979. Evolution of a microbial ecologist. Ann. Rev. Microbiol. 33: 1-20.

49. Hyttel, P. Sinowatz, F., Vejlsted, M., Betteridge, K., 2010. Essentials of Domestic Animal Embriology. 1st edition. ElSevier. UK.

50. Jami E, I. Mizrahi. 2012. Composition and Similarity of Bovine Rumen Microbiota across Individual Animals. PLoS ONE 7(3): e33306.

51. Jami, E., A. Israel, A. Kotser, y I. Mizrahi. 2013. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. International Society for Microbial Ecology. *ISME J* **7,** 1069–1079.

52. Karnati, S.K., Yu, Z., Sylvester, T., Dehority, B. A., Morrison, M. y Firkins, J. L. 2003. Technical note: Specific PCR amplification of protozoal 18S rDNA sequences from DNA extracted from ruminal samples of cows. American Society of Animal Science. USA. *Journal of Animal Science*, Volume 81, Issue 3, March 2003, Pages 812–815

53. Khafipour, E. S. Li, J.C. Plaizier, D.O. Krause. 2009. Rumen Microbiome Composition Determined Using Two Nutritional Models of Subacute Ruminal Acidosis. Applied and Environmental Microbiology, 75 (22) 7115-7124;

54. Klein BG. 2013. Cunningham Fisiología Veterinaria. 5º edición. El Sevier. España.

55. Kobayashi, Y. 2006. Inclusion of novel bacteria in rumen microbiology: Need for basic and applied science. A*nimal Science Journal* 77, 375–385.

56. König H. E., H.G. Liebich. 2004. Veterinary Anatomy of Domestic Mammals. Schattauer GmbH. Alemania.

57. Kozich, J.J., S.L. Westcott, N.T. Baxter, S.K. Highlander, and P.D. Schloss. 2013. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. Appl Environ Microbiol 79, 5112–5120.

58. Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc Natl Acad Sci USA. 82(20):6955–9.

59. Ley, R.E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P.J., Ramey, R.R., Bircher, J.S., Schlegel, M.L., Tucker, T.A. et al. 2008. Evolution of mammals and their gut microbes. Science 320, 1647–1651.

60. Li, R.W., Connor, E.E., Li, C. Baldwin, R.L. y Sparks, M.E. 2012. Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomic tools. Environmental microbiology. 14(1), 129-139.

61. Loera, J, Banda, J. 2017. Industria lechera en méxico: parámetros de la producción de leche y abasto del mercado interno. Revista de Investigaciones Altoandinas, 19(4), 419-426.

62. Malmuthuge, N., Luo Guan, L. 2016. Gut microbiome and omics: a new definition to ruminant production and health. Animal Frontiers. *6*(2), 8-12.

63. Mao, S. M. Zhang, J. Liu, y W. Zhu. 2015. Characterising the bacterial microbiota across the gastrointestinal tracts of dairy cattle: membership and potential function. Nature Scientific Reports. 5:16116.

64. McCann J.C., T.A. Wickersham, J.L. Loor. 2014. High-throughput methods redefine the rumen microbiome and its relationship with nutrition and metabolism. Bioinformatics and Biology Insights 8: 109-125.

65. McDonald, P., Edwards, RA., Greenhalgh, JFD., Morgan, CA., Sinclair, LA., Wilkinson, RG., 2011. Animal nutrition. 7th edition. Pearson. EUA.

66. McGuirk, S.M., 2008 Disease Management of Dairy Calves and Heifers. Vet Clin Food Anim 24; 139–153.

67. Medina, OEE. 2016. Eificiencia alimenticia neta en becerras de los grupos raciales criollo Angus x Criollo y Hereford x Angus. Tesis maestría. Universidad Autonoma De Chihuahua.

68. Mendoza, G. D., R.A. Britton, R.A. Stock. 1993. Influence of Ruminal Protozoa on Site and Extent of Starch Digestion and Ruminal Fermentation. J. Anim. Sci. 71:1572-1578.

69. Millen, DD., Arrigoni, MB., Lauritano, PRD., 2016. Rumenology. 1st edition. Springer. Switzerland.

70. Nagao-Kitamoto, H., Kitamoto, S., Kuffa, P., Kamada, N. 2016. Pathogenic role of the gut microbiota in gastrointestinal diseases. Intestinal research, 14(2), 127–138.

71. Nocker, A., Burr, M. Camper, A.K. Genotypic Microbial Community Profiling: A Critical Technical Review. 2007. Microb Ecol 54, 276–289.

72. Oikonomou, G., Teixeira, A.G.V., Foditsch, C., Bicalho, M.L., Machado, V.S., Bicalho, R.C., Fecal Microbial Diversity in Pre-Weaned Dairy Calves as Described by Pyrosequencing of Metagenomic 16S rDNA. Associations of Faecalibacterium Species with Health and Growth. 2013. PLoS One. 8 e63157.

73. Olguín y Bernal, A. 2006. Diarrea en becerros. UNAM, México.

74. Pérez, M., Tolosa, A. 2017. Genómica en medicina. Una guía práctica. Medigen press. España.

75. Plaizier, J. C., Li, S., Danscher, A. M., Derakshani, H., Andersen, P. H., Khafipour, E. 2017. Changes in Microbiota in Rumen Digesta and Feces due to Grain-based Subacute Ruminal Acidosis (SARA) Challenge. Microbial Ecology. *74*(2), 485-495.

76. Psifidi, A., Dovas, C. I., Bramis, G., Lazou, T., Russel, C. L., Arsenos, G., & Banos, G. 2015. Comparison of eleven methods for genomic DNA extraction suitable for large-scale whole-genome genotyping and long-term DNA banking using blood samples. PloS one, 10(1), e0115960.

77. Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. Cell 2004; 118:229–241.

78. Reguero, RMT. 2014. DNA sequencing: historical and technical considerations. IBT. *Revista Colombiana de Biotecnologia*, *16*(1), 5-8.

79. Relling, AE, Mattioli GA. 2003. Fisiología Digestiva y Metabólica de los Rumiantes. 2º edición. EDULP. Argentina.

80. Rey, M. Enjalbert, F. Combes, S. Cauquil, L. Bouchez, O. Monteils, V. 2013. Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning is sequential. Journal of Applied Microbiology. *116*(2), 245-257.

81. Rosa F, Busato S, Avaroma FC, Linville K, Trevisi E, Osorio JS, et al. 2018. Transcriptional changes detected in fecal RNA of neonatal dairy calves undergoing a mild diarrhea are associated with inflammatory biomarkers. PLoS ONE 13(1): e0191599.

82. Russell, J. B. 2002. Rumen Microbiology and Its Role in Ruminant Nutrition. 1st ed. USA.

83. Sadler, T. W. 2012. Langma's Medical embryology. 12th edition. Lippincott Williams & Wilkins. E.U.

84. Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., et al. 2009. Introducing mothur: open-source, platform- independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Appl Environ Microbiol 75, 7537–7541.

85. Schrag, L. 1982. Healthy calves--healthy cattle. 1st ed. L. Schober. USA

86. Shimada, MA. 2015. Nutrición Animal. 3ra ed. México. Trillas.

87. Shin, NR., Whon, TW., Bae, JW. 2015. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. Trends in biotechnology, 33(9), 496-503.

88. Smith, BP. Large Animal Internal Medicine. 5th edition. ElSevier. USA, 2015.

89. Steele, MA. Penner, GB. Chucheyras-Durand, Luo Guan, L. 2016. Development and physiology of the rumen and the lower gut: Targets for improving gut health. J. Dairy Sci. 99:4955-4966.

90. Suchodolski, J.S., Markel, M.E., Garcia-Mazcorro, J.F., Unterer, S., Heilmann, R.M., Dowd, S.E., Kachroo, P., Ivanov, I., Minamoto, Y., Dillman, E.M., Steiner, J.M., Cook, A.K., Toresson, L., The Fecal Microbiome in Dogs with Acute Diarrhea and Idiopathic Inflammatory Bowel Disease, PLoS One. 7 (2012).

91. Tringe SG, Hugenholtz P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. Curr Opin Microbiol. 2008;11(5):442-6.

92. Uyeno, Y., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y. 2010. rRNA-based analysis to monitor succession of faecal bacterial communities in Holstein calves. Letters in applied microbiology, 51(5), 570-577.

93. Vazquez-Baeza, Y., Pirrung, M., Gonzalez, A. and Knight, R. 2013. EMPeror: a tool for visualizing high-throughput microbial community data. GigaScience *2*(1), 2047-217X.

94. Villanueva, G., Morales, S. 2017. Resistencia antibiótica de patógenos bacterianos aislados de mastitis clínica en bovinos de crianza intensiva. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, 18(12), 1-12.

95. Walker W.L., Epperson W.B., Wittum T.E., Lord L.K., Rajala-Schultz P.J., Lakritz J. 2012. Characteristics of dairy calf ranches: Morbidity, mortality, antibiotic use practices, and biosecurity and biocontainment practices. Journal Dairy Science 95, 2204-2214.

96. Weese, JS., Jelinski, M., Assessment of the Fecal Microbiota in Beef Calves, J. Vet. Intern. Med. (2016) 176–185.

97. Williams, AG., Coleman, GS., 1992. The rumen protozoa. Springer Science & Business Media. 1st ed. USA.

98. www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/1.1.01_Muestreo_2007.pdf.

99. Yang, B., Wang, Y., Qian, P. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. BMC Bioinformatics. 2016. 17:135

100. Yanliang, B., Chuntao, Y., Qiyu, D. y Yan, T. 2017. Effects of dietary supplementation with two alternatives to antibiotics on intestinal microbiota of preweaned calves challenged with *Escherichia coli* K99. Feed Research Institute. *7*(1), 1-12.

101. Zeineldin M, Aldridge B, Lowe J. 2018. Dysbiosis of the fecal microbiota in feedlot cattle with hemorrhagic diarrhea, Microbial Pathogenesis. *115*, 123-130.

8. APÉNDICES

Cuadro A. Efecto de edad de la becerra 1617 sobre los principales filos detectados.

	Edad de la becerra[1]				
Filo[2]	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
Firmicutes	0.15095	0.37572	0.96776	0.23209	0.85154
Bacteroidetes	0.07614	0.62214	0.03005	0.74515	0.09113
Proteobacteria	0.66750	0.00102	0.00054	0.00773	0.00443
Actinobacteria	0.08390	0.00093	0.00118	0.01124	0.02074
Tenericutes	0.02148	0.00000	0.00000	0.00000	0.00653
Fusobacteria	0.00000	0.00000	0.00045	0.00000	0.00201
Gemmatimonadetes	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Spirochaetae	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00613
Cyanobacteria	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00145
Chloroflexi	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Deinococcus-Thermus	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Verrucomicrobia	0.00000	0.00000	0.00000	0.00014	0.00000
Planctomycetes	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Lentisphaerae	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Elusimicrobia	0.00000	0.00017	0.00000	0.00000	0.00000
Otro	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Acidobacteria	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000

[1]Día 1: dieta solamente con calostro; día 7: dieta solamente con leche; día 14: dieta a base de leche e introducción de alimento concentrado iniciador *ad libitum*; día 21 y día 28: Dieta a base de leche y alimento concentrado iniciador *ad libitum*.
[2]Clasificación de OTU basada en la base de datos SILVA (versión 128) con 97% de similaridad.

Cuadro B. Efecto de edad de la becerra 2277 sobre los principales filos detectados.

	Edad de la becerra[1]				
Filo[2]	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
Firmicutes	0.15095	0.37572	0.96776	0.23209	0.85154
Bacteroidetes	0.07614	0.62214	0.03005	0.74515	0.09113
Proteobacteria	0.66750	0.00102	0.00054	0.00773	0.00443
Actinobacteria	0.08390	0.00093	0.00118	0.01124	0.02074
Tenericutes	0.02148	0.00000	0.00000	0.00000	0.00653
Fusobacteria	0.00000	0.00000	0.00045	0.00000	0.00201
Gemmatimonadetes	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Spirochaetae	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00613
Cyanobacteria	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00145
Chloroflexi	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Deinococcus-Thermus	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Verrucomicrobia	0.00000	0.00000	0.00000	0.00014	0.00000
Planctomycetes	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Lentisphaerae	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Elusimicrobia	0.00000	0.00017	0.00000	0.00000	0.00000
Otro	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Acidobacteria	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000

[1]Día 1: dieta solamente con calostro; día 7: dieta solamente con leche; día 14: dieta a base de leche e introducción de alimento concentrado iniciador *ad libitum*; día 21 y día 28: Dieta a base de leche y alimento concentrado iniciador *ad libitum*.
[2]Clasificación de OTU basada en la base de datos SILVA (versión 128) con 97% de similaridad.

Cuadro C. Efecto de edad de la becerra 2289 sobre los principales filos detectados.

	Edad de la becerra[1]				
Filo[2]	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
Firmicutes	0.01431	0.44497	0.37476	0.58656	0.27897
Bacteroidetes	0.01476	0.12207	0.61007	0.38705	0.71314
Proteobacteria	0.95467	0.03479	0.00472	0.00997	0.00049
Actinobacteria	0.00002	0.39785	0.00738	0.01641	0.00198
Tenericutes	0.00451	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Fusobacteria	0.00000	0.00000	0.00088	0.00000	0.00000
Gemmatimonadetes	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Spirochaetae	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00522
Cyanobacteria	0.00979	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Chloroflexi	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Deinococcus-Thermus	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Verrucomicrobia	0.00000	0.00029	0.00216	0.00000	0.00000
Planctomycetes	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Lentisphaerae	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Elusimicrobia	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Otro	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Acidobacteria	0.00191	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000

[1]Día 1: dieta solamente con calostro; día 7: dieta solamente con leche; día 14: dieta a base de leche e introducción de alimento concentrado iniciador *ad libitum*; día 21 y día 28: Dieta a base de leche y alimento concentrado iniciador *ad libitum*.
[2]Clasificación de OTU basada en la base de datos SILVA (versión 128) con 97% de similaridad.

Cuadro D. Efecto de edad de la becerra 2866 sobre los principales filos detectados.

	Edad de la becerra[1]				
Filo[2]	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
Firmicutes	0.01154	0.52746	0.97677	0.43886	0.39975
Bacteroidetes	0.00545	0.46228	0.01705	0.25205	0.58201
Proteobacteria	0.93735	0.00431	0.00604	0.00101	0.00789
Actinobacteria	0.02315	0.00555	0.00012	0.30806	0.00197
Tenericutes	0.01098	0.00000	0.00000	0.00000	0.00422
Fusobacteria	0.00636	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Gemmatimonadetes	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Spirochaetae	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00197
Cyanobacteria	0.00513	0.00000	0.00000	0.00000	0.00009
Chloroflexi	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Deinococcus-Thermus	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Verrucomicrobia	0.00000	0.00019	0.00000	0.00000	0.00000
Planctomycetes	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Lentisphaerae	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Elusimicrobia	0.00000	0.00019	0.00000	0.00000	0.00197
Otro	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Acidobacteria	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000

[1]Día 1: dieta solamente con calostro; día 7: dieta solamente con leche; día 14: dieta a base de leche e introducción de alimento concentrado iniciador *ad libitum*; día 21 y día 28: Dieta a base de leche y alimento concentrado iniciador *ad libitum*.
[2]Clasificación de OTU basada en la base de datos SILVA (versión 128) con 97% de similaridad.

Cuadro E. Efecto de edad de la becerra 2281 sobre los principales filos detectados.

	Edad de la becerra[1]				
Filo[2]	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
Firmicutes	0.07949	0.55617	0.77760	0.72823	0.79595
Bacteroidetes	0.12471	0.42083	0.20545	0.24558	0.18495
Proteobacteria	0.48178	0.01730	0.00298	0.00596	0.00031
Actinobacteria	0.28488	0.00479	0.01376	0.02022	0.00404
Tenericutes	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.01390
Fusobacteria	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00072
Gemmatimonadetes	0.00010	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Spirochaetae	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00010
Cyanobacteria	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Chloroflexi	0.00637	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Deinococcus-Thermus	0.00715	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Verrucomicrobia	0.00000	0.00088	0.00018	0.00000	0.00000
Planctomycetes	0.00380	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Lentisphaerae	0.00699	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Elusimicrobia	0.00190	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Otro	0.00277	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Acidobacteria	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000

[1]Día 1: dieta solamente con calostro; día 7: dieta solamente con leche; día 14: dieta a base de leche e introducción de alimento concentrado iniciador *ad libitum*; día 21 y día 28: Dieta a base de leche y alimento concentrado iniciador *ad libitum*.
[2]Clasificación de OTU basada en la base de datos SILVA (versión 128) con 97% de similaridad.

Cuadro F. Efecto de edad de la becerra 1875 sobre los principales filos detectados.

	Día de la becerra[1]				
Filo[2]	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
Firmicutes	0.09252	0.99742	0.75643	0.39961	0.33420
Bacteroidetes	0.02365	0.00047	0.23078	0.59269	0.59882
Proteobacteria	0.83653	0.00047	0.00316	0.00222	0.00353
Actinobacteria	0.02934	0.00047	0.00940	0.00313	0.06234
Tenericutes	0.01387	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Fusobacteria	0.00000	0.00000	0.00019	0.00030	0.00000
Gemmatimonadetes	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Spirochaetae	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00008
Cyanobacteria	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Chloroflexi	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Deinococcus-Thermus	0.00142	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Verrucomicrobia	0.00263	0.00115	0.00000	0.00202	0.00000
Planctomycetes	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Lentisphaerae	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Elusimicrobia	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Otro	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Acidobacteria	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000

[1]Día 1: dieta solamente con calostro; día 7: dieta solamente con leche; día 14: dieta a base de leche e introducción de alimento concentrado iniciador *ad libitum*; día 21 y día 28: Dieta a base de leche y alimento concentrado iniciador *ad libitum*.
[2]Clasificación de OTU basada en la base de datos SILVA (versión 128) con 97% de similaridad.

Cuadro G. Efecto de edad de la becerra 1841 sobre los principales filos detectados.

	Edad de la becerra[1]				
Filo[2]	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
Firmicutes	0.11102	0.37430	0.95050	0.58392	0.89411
Bacteroidetes	0.20870	0.50956	0.04541	0.39560	0.05661
Proteobacteria	0.43538	0.00126	0.00319	0.00515	0.00465
Actinobacteria	0.19066	0.11487	0.00088	0.01472	0.00294
Tenericutes	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.02630
Fusobacteria	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00130
Gemmatimonadetes	0.02937	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Spirochaetae	0.00000	0.00000	0.00000	0.00008	0.00710
Cyanobacteria	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00204
Chloroflexi	0.01614	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Deinococcus-Thermus	0.00492	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Verrucomicrobia	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00008
Planctomycetes	0.00377	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Lentisphaerae	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Elusimicrobia	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Otro	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Acidobacteria	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000

[1]Día 1: dieta solamente con calostro; día 7: dieta solamente con leche; día 14: dieta a base de leche e introducción de alimento concentrado iniciador *ad libitum*; día 21 y día 28: Dieta a base de leche y alimento concentrado iniciador *ad libitum*.
[2]Clasificación de OTU basada en la base de datos SILVA (versión 128) con 97% de similaridad.

Cuadro H. Efecto de edad de la becerra 2989 sobre los principales filos detectados.

	Edad de la becerra[1]				
Filo[2]	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
Firmicutes	0.06100	0.38763	0.30906	0.61061	0.34054
Bacteroidetes	0.02351	0.57802	0.61936	0.34478	0.55815
Proteobacteria	0.87762	0.02131	0.05153	0.00580	0.02847
Actinobacteria	0.02059	0.01119	0.01068	0.01870	0.02077
Tenericutes	0.01658	0.00000	0.00000	0.01860	0.01250
Fusobacteria	0.00000	0.00182	0.00934	0.00049	0.01250
Gemmatimonadetes	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Spirochaetae	0.00000	0.00000	0.00000	0.00019	0.00702
Cyanobacteria	0.00000	0.00000	0.00000	0.00019	0.00384
Chloroflexi	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Deinococcus-Thermus	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Verrucomicrobia	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Planctomycetes	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Lentisphaerae	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Elusimicrobia	0.00000	0.00000	0.00000	0.00019	0.00019
Otro	0.00067	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Acidobacteria	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000

[1]Día 1: dieta solamente con calostro; día 7: dieta solamente con leche; día 14: dieta a base de leche e introducción de alimento concentrado iniciador *ad libitum*; día 21 y día 28: Dieta a base de leche y alimento concentrado iniciador *ad libitum*.
[2]Clasificación de OTU basada en la base de datos SILVA (versión 128) con 97% de similaridad.

Cuadro I. Clases de bacterias encontradas en menor proporción en las heces de becerras durante las primeras 4 semanas de vida.

	Edad de las becerras[1]				
Clase[2]	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
Deinococci	0.14996	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Bacteroidetes Incertae Sedis	0.14569	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Thermomicrobia	0.13024	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Longimicrobia	0.12597	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Verrucomicrobiae	0.02931	0.02936	0.02607	0.02413	0.00091
Cyanobacteria	0.09141	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Melainabacteria	0.00000	0.00000	0.00000	0.00219	0.08392
Anaerolineae	0.08507	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Planctomycetacia	0.08429	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Lentisphaeria	0.07775	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Elusimicrobia	0.02115	0.02860	0.00000	0.00219	0.02406
Acidimicrobiia	0.06107	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Otras	0.03842	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Ardenticatenia	0.03499	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
S0134 terrestrial group	0.03435	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Subgroup 6	0.02127	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Thermoleophilia	0.02119	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000

[1]Día 1: dieta solamente con calostro; día 7: dieta solamente con leche; día 14: dieta a base de leche e introducción de alimento concentrado iniciador *ad libitum*; día 21 y día 28: Dieta a base de leche y alimento concentrado iniciador *ad libitum*.
[2]Clasificación de OTU basada en la base de datos SILVA (versión 128) con 97% de similaridad.

Cuadro J. Órdenes de bacterias encontradas en menor proporción en las heces de becerras durante las primeras 4 semanas de vida.

	Edad de las becerras[1]				
Orden[2]	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
Caulobacterales	0.42601	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Sphingomonadales	0.40326	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Pasteurellales	0.11340	0.15305	0.05497	0.00914	0.00000
Rhizobiales	0.31479	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Spirochaetales	0.00000	0.00000	0.00000	0.00434	0.30721
Propionibacteriales	0.26774	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Campylobacterales	0.00000	0.11401	0.10430	0.00337	0.00000
Rickettsiales	0.19608	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Desulfovibrionales	0.00000	0.00213	0.09169	0.04720	0.04671
Kineosporiales	0.16916	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Myxococcales	0.16807	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Gemmatimonadales	0.16719	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Deinococcales	0.14996	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Aeromonadales	0.00000	0.00000	0.00000	0.12171	0.02554
Order II	0.14569	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Longimicrobiales	0.12597	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Rhodospirillales	0.10992	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Verrucomicrobiales	0.02931	0.02936	0.02607	0.02413	0.00091
Neisseriales	0.10786	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Actinomycetales	0.05699	0.02387	0.01785	0.00764	0.00000
Frankiales	0.09557	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
SubsectionII	0.09141	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Gastranaerophilales	0.00000	0.00000	0.00000	0.00219	0.08392
Anaerolineales	0.08507	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Planctomycetales	0.08429	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Victivallales	0.07775	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
JG30-KF-CM45	0.07743	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Elusimicrobiales	0.02115	0.02860	0.00000	0.00219	0.02406
Legionellales	0.06313	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Acidimicrobiales	0.06107	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
AKYG1722	0.05280	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Other	0.03842	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Ardenticatenales	0.03499	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
uncultured Gemmatimonadetes bacterium	0.03435	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000

Gammaproteobacteria	0.03308	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
uncultured bacterium	0.02127	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Solirubrobacterales	0.02119	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000

[1]Día 1: dieta solamente con calostro; día 7: dieta solamente con leche; día 14: dieta a base de leche e introducción de alimento concentrado iniciador *ad libitum*; día 21 y día 28: Dieta a base de leche y alimento concentrado iniciador *ad libitum*.
[2]Clasificación de OTU basada en la base de datos SILVA (versión 128) con 97% de similaridad.

Cuadro K. Familias de bacterias encontradas en menor proporción en las heces de becerras durante las primeras 4 semanas de vida.

	Edad de las becerras[1]				
Familia[2]	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
Comamonadaceae	0.18821	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Desulfovibrionaceae	0.00000	0.00213	0.09169	0.04720	0.04671
Bogoriellaceae	0.18652	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Kineosporiaceae	0.16916	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Sandaracinaceae	0.16807	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Gemmatimonadaceae	0.16719	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Staphylococcaceae	0.15467	0.00000	0.00134	0.00000	0.00000
Trueperaceae	0.14996	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Succinivibrionaceae	0.00000	0.00000	0.00000	0.12171	0.02554
Rhodothermaceae	0.14569	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Bacteroidales RF16 group	0.00000	0.00000	0.00000	0.00328	0.12750
Longimicrobiaceae	0.12597	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Aerococcaceae	0.11910	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Clostridiales vadinBB60 group	0.00000	0.00169	0.04351	0.00555	0.06801
Flammeovirgaceae	0.11579	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Verrucomicrobiaceae	0.02931	0.02936	0.02607	0.02413	0.00091
Neisseriaceae	0.10786	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Actinomycetaceae	0.05699	0.02387	0.01785	0.00764	0.00000
Hyphomonadaceae	0.10434	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Geodermatophilaceae	0.09557	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
FamilyII	0.09141	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Anaerolineaceae	0.08507	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Planctomycetaceae	0.08429	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Eubacteriaceae	0.00000	0.01317	0.03559	0.02431	0.00487
uncultured bacterium	0.07743	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Family X	0.07640	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Elusimicrobiaceae	0.02115	0.02860	0.00000	0.00219	0.02406
Nocardiaceae	0.07306	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Oxalobacteraceae	0.07296	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Rhodospirillales Incertae Sedis	0.07062	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Cyclobacteriaceae	0.06556	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Coxiellaceae	0.06313	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
uncultured	0.06107	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
uncultured	0.05945	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000

uncultured bacterium	0.05280	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Victivallaceae	0.04745	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Brucellaceae	0.04744	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Rickettsiales Incertae Sedis	0.04262	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Phyllobacteriaceae	0.04072	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Acetobacteraceae	0.03930	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
uncultured bacterium	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.03848
Intrasporangiaceae	0.03499	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
uncultured bacterium	0.03499	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
uncultured Gemmatimonadetes	0.03435	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Gammaproteobacteria	0.03308	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Erythrobacteraceae	0.03201	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
vadinBE97	0.03030	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Mycobacteriaceae	0.02532	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Family XII	0.02455	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
uncultured bacterium	0.02127	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Solirubrobacteraceae	0.02119	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Comamonadaceae	0.18821	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Desulfovibrionaceae	0.00000	0.00213	0.09169	0.04720	0.04671
Bogoriellaceae	0.18652	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Kineosporiaceae	0.16916	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Sandaracinaceae	0.16807	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Gemmatimonadaceae	0.16719	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000

[1]Día 1: dieta solamente con calostro; día 7: dieta solamente con leche; día 14: dieta a base de leche e introducción de alimento concentrado iniciador *ad libitum*; día 21 y día 28: dieta a base de leche y alimento concentrado iniciador *ad libitum*.
[2]Clasificación de OTU basada en la base de datos SILVA (versión 128) con 97% de similaridad.

Cuadro L. Géneros de bacterias encontradas en menor proporción en las heces de becerras durante las primeras 4 semanas de vida.

	Edad de las becerras[1]				
Género[2]	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
Faecalitalea	0.00000	0.28740	0.07890	0.08658	0.06624
Pseudomonas	0.50967	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Christensenellaceae R-7	0.00686	0.00000	0.00000	0.01481	0.47572
Ruminococcaceae UCG-004	0.00000	0.08614	0.10576	0.11348	0.16730
Dietzia	0.45577	0.00000	0.00604	0.00112	0.00093
Erysipelatoclostridium	0.00000	0.02354	0.08921	0.31240	0.03436
Anoxybacillus	0.45640	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Atopostipes	0.42196	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Ornithobacterium	0.41921	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Parasutterella	0.00000	0.12204	0.03294	0.18658	0.06477
Streptococcus	0.02955	0.06828	0.15824	0.11468	0.03396
Lachnospiraceae UCG-004	0.00000	0.00877	0.38538	0.00123	0.00194
Sutterella	0.00000	0.02089	0.08497	0.23769	0.03538
Luteimonas	0.37490	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Flavonifractor	0.00000	0.04969	0.11486	0.11390	0.07115
Brevundimonas	0.32168	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Turicibacter	0.30077	0.00099	0.00000	0.00985	0.00214
Treponema 2	0.00000	0.00000	0.00000	0.00434	0.30721
Olsenella	0.00000	0.00085	0.00119	0.08830	0.20046
Lysobacter	0.25142	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Flavobacterium	0.24546	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Acidaminococcus	0.00000	0.03625	0.00879	0.18086	0.01334
Brachybacterium	0.23187	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Nocardioides	0.22957	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Ulvibacter	0.22753	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Devosia	0.22663	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Campylobacter	0.00000	0.11401	0.10430	0.00337	0.00000
Gallibacterium	0.00000	0.15305	0.05497	0.00804	0.00000
Barnesiella	0.00000	0.00000	0.00279	0.02969	0.18077
Sphingobacterium	0.20432	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Ruminiclostridium	0.00000	0.00000	0.00000	0.02844	0.16794
Tepidimonas	0.18821	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Roseburia	0.02931	0.00000	0.00951	0.01069	0.13866
Desulfovibrio	0.00000	0.00213	0.09169	0.04720	0.04671

Georgenia	0.18652	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Enterobacter	0.18169	0.00000	0.00000	0.00109	0.00000
Quadrisphaera	0.16916	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
uncultured	0.16807	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Stenotrophomonas	0.16745	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Gemmatimonas	0.16719	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Ruminiclostridium 6	0.01338	0.00000	0.00000	0.00000	0.14323
Ruminococcaceae UCG-010	0.15073	0.00000	0.00000	0.00328	0.00209
uncultured	0.00000	0.00085	0.00000	0.00790	0.14719
Novosphingobium	0.15167	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Gelidibacter	0.15011	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Truepera	0.14996	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Micrococcus	0.14827	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Ruminococcaceae NK4A214	0.10867	0.00000	0.00000	0.01203	0.02672
Succinivibrio	0.00000	0.00000	0.00000	0.12171	0.02554
Oscillibacter	0.00000	0.00000	0.00000	0.06770	0.06821
uncultured bacterium	0.00000	0.00000	0.00000	0.00328	0.12750
Oceanobacillus	0.13057	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
uncultured	0.00000	0.00677	0.01017	0.06964	0.04391
Prevotella 1	0.00000	0.00229	0.00930	0.07027	0.04218
Vibrionimonas	0.11884	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Anaerofilum	0.00000	0.00000	0.00000	0.10653	0.01186
uncultured	0.11651	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Howardella	0.00000	0.04060	0.01829	0.04757	0.00965
Tunicatimonas	0.11579	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Veillonella	0.00000	0.05817	0.02937	0.02741	0.00000
Jeotgalicoccus	0.11194	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Akkermansia	0.02931	0.02936	0.02607	0.02413	0.00091
Hirschia	0.10434	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Cellulomonas	0.10355	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Coprococcus 1	0.00000	0.00000	0.00754	0.04611	0.04517
Salinimicrobium	0.09614	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Bacillus	0.09596	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Blastococcus	0.09557	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Sarcina	0.00000	0.00000	0.00000	0.04391	0.04892
Chroococcidiopsis	0.09141	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Prevotellaceae NK3B31 group	0.00000	0.00000	0.00000	0.00656	0.08345
Ohtaekwangia	0.08632	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000

Ruminiclostridium 5	0.00000	0.00000	0.00201	0.06603	0.01780
uncultured	0.08507	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Eubacterium	0.00000	0.01317	0.03559	0.02431	0.00487
Lachnospiraceae AC2044	0.00000	0.00000	0.00109	0.00000	0.07589
Lachnoclostridium	0.00000	0.02540	0.03663	0.00580	0.00896
Thermicanus	0.07640	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Elusimicrobium	0.02115	0.02860	0.00000	0.00219	0.02406
Other	0.07451	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Empedobacter	0.07432	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Facklamia	0.07400	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Segetibacter	0.07380	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Rhodococcus	0.07306	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Massilia	0.07296	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Candidatus Alysiosphaera	0.07062	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
uncultured	0.07038	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Roseibaca	0.06936	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
dgA-11 gut group	0.03487	0.00254	0.02611	0.00225	0.00000
uncultured	0.06556	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
uncultured organism	0.00000	0.00169	0.04351	0.00555	0.01457
Eubacterium nodatum group	0.00000	0.00085	0.00000	0.03328	0.02925
Diplorickettsia	0.06313	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Coprobacter	0.00000	0.00000	0.00788	0.02054	0.03451
Erysipelotrichaceae UCG-003	0.00000	0.00000	0.00000	0.00479	0.05719
uncultured Acidimicrobidae bacterium	0.06107	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Family XIII AD3011 group	0.00000	0.00000	0.00593	0.01188	0.04081
uncultured	0.05770	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Ruminococcaceae UCG-013	0.00000	0.00000	0.00000	0.03172	0.02548
Flaviflexus	0.05699	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Ruminococcus 1	0.00000	0.00000	0.00000	0.01860	0.03634
Porphyromonadaceae	0.00000	0.01015	0.03812	0.00553	0.00000
uncultured bacterium	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.05344
Neisseria	0.05016	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Actinomyces	0.00000	0.02387	0.01785	0.00764	0.00000
Lawsonella	0.04779	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
uncultured bacterium	0.04745	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Pseudochrobactrum	0.04744	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Taibaiella	0.04644	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000

Pedobacter	0.04631	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Aerococcus	0.04509	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Senegalimassilia	0.00000	0.00085	0.00278	0.00438	0.03527
Constrictibacter	0.04262	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Phyllobacteriaceae	0.04072	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Roseomonas	0.03930	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Aeromicrobium	0.03817	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Megamonas	0.00000	0.01818	0.00512	0.01090	0.00302
Anaerostipes	0.00000	0.00000	0.03632	0.00085	0.00000
Family XIII UCG-002	0.03716	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Macrococcus	0.03516	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Ornithinimicrobium	0.03499	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Pseudofulvimonas	0.03308	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Cellulosilyticum	0.03245	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Porphyrobacter	0.03201	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
uncultured	0.03030	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Succiniclasticum	0.00000	0.00000	0.00000	0.00975	0.01747
Proteiniphilum	0.02573	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Mycobacterium	0.02532	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Aequorivita	0.02515	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Exiguobacterium	0.02455	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Limnobacter	0.02290	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Hymenobacter	0.02172	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Solirubrobacter	0.02119	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Prevotella 6	0.01981	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Flavisolibacter	0.01950	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Pir4 lineage	0.01391	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Staphylococcus	0.00757	0.00000	0.00134	0.00000	0.00000

[1]Día 1: dieta solamente con calostro; día 7: dieta solamente con leche; día 14: dieta a base de leche e introducción de alimento concentrado iniciador *ad libitum*; día 21 y día 28: dieta a base de leche y alimento concentrado iniciador *ad libitum*.
[2]Clasificación de OTU basada en la base de datos SILVA (versión 128) con 97% de similaridad.

Cuadro M. Especies de bacterias encontradas en menor proporción en las heces de becerras durante las primeras 4 semanas de vida.

	Edad de las becerras[1]				
Especie[2]	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
Enterococcus cecorum	0.01680	0.26911	0.35967	0.41226	0.00000
Barnesiella sp	0.75720	0.00000	0.00000	0.14489	0.15033
Sharpea azabuensis	0.00000	0.02114	0.07027	0.51180	0.42380
Acinetobacter sp	1.01315	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Pontibacter sp	0.98910	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Bacteroides salyersiae	0.00000	0.37401	0.30780	0.04097	0.26220
Parabacteroides distasonis	0.00000	0.19757	0.34151	0.28757	0.09839
Arthrobacter sp	0.91568	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Alistipes onderdonkii	0.00000	0.00880	0.52690	0.10902	0.26112
Phascolarctobacterium succinatutens	0.00000	0.06817	0.25393	0.27413	0.26848
Kocuria sp	0.84688	0.00000	0.00000	0.00114	0.00000
Mycoplasma wenyonii	0.72600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Prevotella sp	0.01766	0.00000	0.01020	0.11450	0.58307
Bacillus sp	0.70453	0.00606	0.00000	0.00101	0.00000
Lactobacillus crispatus	0.00000	0.27079	0.34078	0.07231	0.00000
Enterococcus sp	0.00000	0.14733	0.16631	0.23668	0.07135
Peptostreptococcus russellii	0.00362	0.05845	0.55866	0.00000	0.00000
Pseudomonas sp	0.60664	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Bacteroides fluxus	0.00000	0.26029	0.14848	0.13239	0.04897
Lactococcus lactis	0.58536	0.00086	0.00000	0.00000	0.00000
Alistipes shahii	0.00000	0.04407	0.15256	0.12211	0.19895
Dietzia sp	0.49505	0.00000	0.00590	0.00000	0.00000
Faecalicoccus pleomorphus	0.00000	0.27665	0.05801	0.08280	0.05599
Blautia producta	0.00000	0.01469	0.02015	0.41958	0.01210
Erysipelatoclostridium ramosum	0.00000	0.02090	0.08384	0.32597	0.03317
Intestinimonas sp	0.00000	0.08365	0.09305	0.11108	0.17580
Alistipes sp	0.00000	0.00342	0.03877	0.10809	0.29769
Parasutterella excrementihominis	0.00000	0.13211	0.04033	0.19574	0.06961

Atopostipes sp	0.42470	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Lactobacillus sp	0.00734	0.12596	0.09845	0.09386	0.09657
Streptococcus gallolyticus	0.03027	0.06541	0.16210	0.11640	0.03483
Paraprevotella sp	0.00000	0.00000	0.00258	0.12029	0.25061
Parabacteroides goldsteinii	0.00000	0.04780	0.13292	0.08601	0.09615
Sutterella stercoricanis	0.00000	0.01786	0.04603	0.25500	0.03968
Corynebacterium xerosis	0.32283	0.00000	0.00295	0.00093	0.00000
Brevundimonas sp	0.32540	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Corynebacterium sp	0.32506	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Turicibacter sp	0.29052	0.00000	0.00000	0.01308	0.00191
Eubacterium tenue	0.29258	0.00000	0.00000	0.00201	0.00287
Anoxybacillus sp	0.27943	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Clostridium methylpentosum	0.00000	0.00000	0.03162	0.05258	0.19343
Luteimonas sp	0.27738	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Olsenella umbonata	0.00000	0.00086	0.00119	0.08878	0.18612
Gallibacterium anatis	0.00000	0.17922	0.06583	0.00754	0.00000
Sphingomonas sp	0.24945	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Bacteroides eggerthii	0.00000	0.10114	0.02437	0.01700	0.08309
Flavonifractor plautii	0.00000	0.04788	0.09268	0.05985	0.02492
Flavobacterium sp	0.22364	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Blautia obeum	0.00000	0.01089	0.00119	0.20511	0.00608
Brachybacterium sp	0.22269	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Barnesiella intestinihominis	0.00000	0.00000	0.00214	0.03111	0.18147
Lactococcus garvieae	0.21224	0.00171	0.00000	0.00000	0.00000
Campylobacter jejuni	0.00000	0.11010	0.09607	0.00206	0.00000
Marixanthomonas sp	0.20562	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Desulfovibrio sp	0.00000	0.00209	0.10218	0.04770	0.04410
Ruminococcus bromii	0.00000	0.00000	0.00000	0.04025	0.15473
Gemmatimonas sp	0.17912	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Subdoligranulum variabile	0.00000	0.03254	0.03078	0.05871	0.05449
Stenotrophomonas sp	0.17549	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Succinivibrio sp	0.00000	0.00000	0.00000	0.14030	0.02922
Roseburia sp	0.02803	0.00000	0.00519	0.00307	0.12659
Citrobacter sp	0.16200	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Actinomyces sp	0.15941	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Treponema berlinense	0.00000	0.00000	0.00000	0.00101	0.15796
Myxococcus sp	0.15864	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Luteimonas terricola	0.15093	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Eubacterium coprostanoligenes	0.00000	0.00000	0.00000	0.11370	0.03041
Denitrobacterium detoxificans	0.00000	0.00000	0.00000	0.00673	0.13731

Georgenia sp	0.14364	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Homoserinibacter gongjuensis	0.14041	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Treponema porcinum	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.13893
Tepidimonas ignava	0.13557	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Bacteroides heparinolyticus	0.00000	0.00441	0.09138	0.03792	0.00000
Bacteroides caecigallinarum	0.05583	0.00000	0.00000	0.06439	0.01227
Gelidibacter mesophilus	0.13057	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Enterococcus faecalis	0.12925	0.00000	0.00000	0.00114	0.00000
Sphingobacterium sp	0.12919	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Bacteroides intestinalis	0.00000	0.00171	0.08582	0.03676	0.00255
Tannerella sp	0.00000	0.00000	0.00000	0.12026	0.00580
Altererythrobacter sp	0.12533	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Oscillibacter sp	0.00000	0.00257	0.01238	0.03289	0.07637
Lysobacter sp	0.12067	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Aequorivita sp	0.11994	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Lactobacillus coleohominis	0.00000	0.08808	0.02692	0.00309	0.00000
Micrococcus sp	0.11448	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Sediminibacterium sp	0.11287	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Candidatus Brocadia caroliniensis	0.11211	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Veillonella caviae	0.00000	0.05597	0.02791	0.02651	0.00000
Howardella ureilytica	0.00000	0.03961	0.01506	0.04673	0.00846
Devosia submarina	0.10861	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Jeotgalicoccus sp	0.10804	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Devosia sp	0.10532	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Cellulomonas sp	0.10255	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Lactobacillus delbrueckii	0.00000	0.00457	0.00931	0.08747	0.00000
Pullulanibacillus sp	0.09842	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Clostridium glycyrrhizinilyticum	0.00000	0.00332	0.04699	0.01775	0.02924
Nocardioides sp	0.09726	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Hirschia sp	0.09634	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Parabacteroides faecis	0.00000	0.01140	0.01023	0.03580	0.03585
Sarcina sp	0.00000	0.00000	0.00000	0.04625	0.04696
Chryseomicrobium imtechense	0.08811	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Blastococcus sp	0.08443	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Subdoligranulum sp	0.00000	0.01746	0.02071	0.01259	0.03175
Slackia piriformis	0.00000	0.00530	0.00000	0.00000	0.07681
Piscinibacter aquaticus	0.08175	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Thermicanus aegyptius	0.08103	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000

Lactobacillus salivarius	0.00000	0.03422	0.02751	0.01392	0.00484
Facklamia sp	0.07911	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Eubacterium sp	0.00000	0.00313	0.01860	0.01922	0.03602
Nocardioides solisilvae	0.07667	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Sphingobacterium alimentarium	0.07658	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Oceanobacillus sp	0.07462	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Eggerthella lenta	0.00000	0.00518	0.05012	0.01504	0.00373
Rubrivirga marina	0.07240	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Akkermansia muciniphila	0.00000	0.02870	0.02182	0.02073	0.00000
Clostridium colicanis	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.06886
Empedobacter falsenii	0.06854	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Massilia sp	0.06799	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Rhodococcus sp	0.06787	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Segetibacter sp	0.06773	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Aquiflexum sp	0.06700	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Sutterella sp	0.00000	0.01026	0.04804	0.00516	0.00000
Coprobacillus sp	0.00000	0.00000	0.00000	0.00237	0.06089
Candidatus Alysiosphaera europeae	0.06306	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Olsenella scatoligenes	0.00000	0.00000	0.00000	0.02381	0.03684
Bibersteinia trehalosi	0.06014	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Clostridium chartatabidum	0.03211	0.00684	0.00199	0.00101	0.01779
Oceanobacillus luteolus	0.05612	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Rickettsiella sp	0.05605	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Coprobacter fastidiosus	0.00000	0.00000	0.00593	0.01952	0.03041
Falsiporphyromonas endometrii	0.00000	0.01026	0.03828	0.00714	0.00000
Flaviflexus salsibiostraticola	0.05511	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Hydrogenophaga sp	0.05480	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Bifidobacterium sp	0.00000	0.00660	0.00172	0.04311	0.00255
Salegentibacter sp	0.05372	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Devosia albogilva	0.05362	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Neisseria cinerea	0.05351	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Candidatus Mycoplasma haemobos	0.05283	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Candidatus Lariskella arthropodarum	0.05251	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Clostridium bornimense	0.00000	0.00000	0.00000	0.03924	0.01118
Comamonas sp	0.04684	0.00000	0.00298	0.00000	0.00000
Erythrobacter sp	0.04953	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Hungatella hathewayi	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.04686

Actinomyces hyovaginalis	0.00000	0.02315	0.01586	0.00779	0.00000
Candidatus Alistipes marseilloanorexicus	0.00000	0.00000	0.00000	0.04094	0.00523
Thermanaerothrix sp	0.04613	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Neisseria sp	0.04603	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Aerococcus sp	0.04565	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Haemophilus influenzae	0.04561	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Pedobacter sp	0.04532	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Pseudochrobactrum sp	0.04433	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Marmoricola sp	0.04379	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Acetivibrio sp	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.04339
Azohydromonas sp	0.04322	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Taibaiella yonginensis	0.04294	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Victivallis vadensis	0.04035	0.00000	0.00239	0.00000	0.00000
Kopriimonas sp	0.01050	0.00000	0.00000	0.01207	0.01754
Pseudomonas pertucinogena	0.03842	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Rikenella sp	0.03527	0.00000	0.00000	0.00000	0.00284
Novosphingobium sp	0.03759	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Eubacterium contortum	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.03634
Anaerostipes caccae	0.00000	0.00000	0.03631	0.00000	0.00000
Thermomicrobium sp	0.03620	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Senegalimassilia anaerobia	0.00000	0.00000	0.00219	0.00503	0.02869
Eubacterium fissicatena	0.00000	0.00000	0.00241	0.01879	0.01462
Aeromicrobium flavum	0.03562	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Sphaerobacter thermophilus	0.03538	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Fusobacterium sp	0.00000	0.00000	0.00718	0.00000	0.02806
Aminobacter sp	0.03503	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Coprococcus sp	0.00000	0.00342	0.00537	0.00438	0.02168
Lysinibacillus massiliensis	0.03482	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Parabacteroides sp	0.00000	0.00428	0.02864	0.00115	0.00000
Megamonas funiformis	0.00000	0.01864	0.00349	0.00810	0.00300
Prevotella copri	0.00000	0.00000	0.00239	0.02047	0.01016
Alistipes indistinctus	0.00000	0.00171	0.01769	0.01321	0.00000
Intestinimonas butyriciproducens	0.00000	0.00000	0.00000	0.03027	0.00218
Flavisolibacter sp	0.03228	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Macrococcus caseolyticus	0.03190	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Parabacteroides chinchillae	0.00000	0.00257	0.01771	0.00000	0.01117
Erythromicrobium ramosum	0.03095	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Dialister sp	0.00000	0.03065	0.00000	0.00000	0.00000
Pseudonocardia sp	0.02978	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000

Pseudofulvimonas gallinarii	0.02978	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Alistipes obesi	0.00000	0.00000	0.00000	0.02918	0.00000
Anaerotruncus sp	0.00000	0.00000	0.00000	0.00906	0.01975
Catenibacterium mitsuokai	0.00000	0.00000	0.00000	0.00547	0.02294
Ornithinimicrobium sp	0.02803	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Jeotgalibaca dankookensis	0.02764	0.00000	0.00037	0.00000	0.00000
Eubacterium limosum	0.00000	0.00546	0.01533	0.00687	0.00000
Mycobacterium sp	0.02738	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Olsenella sp	0.00000	0.00000	0.00000	0.00259	0.02435
Exiguobacterium sp	0.02649	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Flavisolibacter ginsengisoli	0.02598	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Brevundimonas terrae	0.02482	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Prevotella maculosa	0.00000	0.00000	0.00000	0.02161	0.00219
Intestinibacter bartlettii	0.00000	0.01338	0.00000	0.00682	0.00350
Sporobacter sp	0.00000	0.00000	0.00214	0.00923	0.01224
Ruminococcus flavefaciens	0.00000	0.00000	0.00000	0.00201	0.02104
Clostridium clostridioforme	0.00000	0.00000	0.01648	0.00569	0.00000
Petrimonas sp	0.02211	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Halomonas sp	0.02170	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Aquabacterium sp	0.02156	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Enorma massiliensis	0.00000	0.00000	0.00000	0.00759	0.01396
Sphaerobacter sp	0.02117	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Hymenobacter kanuolensis	0.02100	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Christensenella minuta	0.00000	0.00171	0.00060	0.00948	0.00902
Porphyrobacter mercurialis	0.02045	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Anaerovibrio sp	0.00000	0.00171	0.00821	0.00515	0.00522
Pelobacter sp	0.02016	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Lysobacter panaciterrae	0.02016	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Clostridium symbiosum	0.00000	0.00000	0.01749	0.00114	0.00086
Anaerotruncus colihominis	0.01935	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Rubellimicrobium sp	0.01855	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Oerskovia sp	0.01853	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Pelistega europaea	0.00000	0.01073	0.00179	0.00206	0.00383
Deinococcus sp	0.01824	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Paenalcaligenes hominis	0.01824	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Microvirga sp	0.01810	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Ottowia sp	0.01772	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Caulobacter sp	0.01769	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Candidatus Soleaferrea massiliensis	0.00000	0.00000	0.00649	0.00201	0.00917
Clostridium spiroforme	0.00000	0.00379	0.00000	0.00910	0.00426

Sugarcane phytoplasma	0.01706	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Raoultella sp	0.01693	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Paludibacter sp	0.01326	0.00000	0.00000	0.00201	0.00085
Wautersiella sp	0.00000	0.00000	0.00000	0.00721	0.00852
Planomicrobium sp	0.01570	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Alistipes senegalensis	0.00000	0.00086	0.00534	0.00379	0.00560
Brevibacterium jeotgali	0.01534	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Adhaeribacter sp	0.01518	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Alcaligenes sp	0.01460	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Alloprevotella sp	0.00000	0.00000	0.00000	0.01304	0.00000
Holdemania filiformis	0.00000	0.00000	0.00000	0.00872	0.00410
Eisenbergiella tayi	0.00000	0.00000	0.00107	0.00573	0.00569
Nocardiopsis sp	0.01226	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Butyricimonas virosa	0.00000	0.00086	0.01014	0.00101	0.00000
Jannaschia sp	0.01168	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Telmatobacter sp	0.01161	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Haemophilus pittmaniae	0.01101	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Cecembia lonarensis	0.01067	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Bilophila ; Bilophila sp	0.00000	0.00086	0.00776	0.00206	0.00000
Peptococcus sp	0.00000	0.00000	0.00000	0.00704	0.00360
Holdemania massiliensis	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.01056
Sandaracinus sp	0.00993	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Prevotella ruminicola	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00942
Janibacter cremeus	0.00940	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Agromyces humatus	0.00934	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Amphibacillus iburiensis	0.00904	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Iamia sp	0.00876	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Cesiribacter andamanensis	0.00876	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Burkholderia sp	0.00867	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Bacteroides sartorii	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00861
Hydrogenoanaerobacterium saccharovorans	0.00000	0.00000	0.00000	0.00372	0.00464
Alkanindiges illinoisensis	0.00829	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Lactococcus sp	0.00825	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Staphylococcus sp	0.00550	0.00000	0.00268	0.00000	0.00000
Faecalibacterium sp	0.00000	0.00181	0.00060	0.00578	0.00000
Streptococcus suis	0.00032	0.00090	0.00582	0.00114	0.00000
Clostridium saccharolyticum	0.00000	0.00000	0.00060	0.00180	0.00550
Lactobacillus mucosae	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00776
Carnobacterium sp	0.00774	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Aliidiomarina taiwanensis	0.00774	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000

Campylobacter sp	0.00000	0.00000	0.00000	0.00588	0.00181
Salisaeta sp	0.00759	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Undibacterium oligocarboniphilum	0.00608	0.00122	0.00000	0.00000	0.00000
Treponema succinifaciens	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00722
Elusimicrobium sp	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00628
Ornithinicoccus hortensis	0.00584	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Solirubrobacter sp	0.00584	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Pusillimonas sp	0.00571	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Rhizobium sp	0.00556	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Synergistes sp	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00555
Bdellovibrio sp	0.00553	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Clostridium innocuum	0.00000	0.00000	0.00000	0.00548	0.00000
Lactobacillus fermentum	0.00000	0.00227	0.00000	0.00279	0.00000
Xanthobacter sp	0.00497	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Tumebacillus sp	0.00276	0.00000	0.00000	0.00201	0.00000
Haliangium sp	0.00467	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Serratia sp	0.00467	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Dielma fastidiosa	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00465
Catabacter hongkongensis	0.00000	0.00086	0.00193	0.00057	0.00095
Clostridium scindens	0.00000	0.00086	0.00060	0.00285	0.00000
Hyphomonas sp	0.00409	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Clostridium indolis	0.00000	0.00000	0.00000	0.00402	0.00000
Campylobacter lanienae	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00396
Clostridium hylemonae	0.00000	0.00000	0.00060	0.00324	0.00000
Cerasicoccus sp	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00383
Acidobacterium sp	0.00378	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Methylobacterium sp	0.00334	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Lactobacillus johnsonii	0.00000	0.00314	0.00000	0.00000	0.00000
Alkalibacter sp	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00314
Mobiluncus curtisii	0.00000	0.00303	0.00000	0.00000	0.00000
Lactobacillus saerimneri	0.00000	0.00303	0.00000	0.00000	0.00000
Lactonifactor longoviformis	0.00000	0.00000	0.00000	0.00300	0.00000
Paraeggerthella hongkongensis	0.00000	0.00000	0.00299	0.00000	0.00000
Lentzea sp	0.00292	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Cytophaga sp	0.00292	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Rhodothermus sp	0.00292	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Burkholderia tropica	0.00292	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Anaerorhabdus furcosa	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00287
Planctomyces sp	0.00276	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000

Aquamicrobium sp	0.00276	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Thermomonas brevis	0.00276	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Rufibacter glacialis	0.00234	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Phormidium sp	0.00234	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Vibrio sp	0.00226	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Oceanimonas sp	0.00221	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Ralstonia solanacearum	0.00205	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Pseudoflavonifractor sp	0.00000	0.00000	0.00000	0.00114	0.00091
Catenibacterium sp	0.00000	0.00000	0.00000	0.00201	0.00000
Pelomonas sp	0.00201	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Mogibacterium sp	0.00000	0.00000	0.00199	0.00000	0.00000
Oscillibacter ruminantium	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00195
Butyricicoccus pullicaecorum	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00191
Syntrophococcus sp	0.00000	0.00000	0.00000	0.00186	0.00000
Oxalobacter sp	0.00000	0.00000	0.00000	0.00186	0.00000
Arenimonas donghaensis	0.00175	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Litoribacter alkaliphilus	0.00153	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Olivibacter sp	0.00117	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Candidatus Protochlamydia sp	0.00117	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Sporacetigenium mesophilum	0.00117	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Hespellia porcina	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00086
Trichococcus sp	0.00070	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Aeromonas sp	0.00070	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Mitsuokella jalaludinii	0.00000	0.00000	0.00000	0.00057	0.00000
Cronobacter sakazakii	0.00056	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Anaerorhabdus sp	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Enterococcus cecorum	0.01680	0.26911	0.35967	0.41226	0.00000
Barnesiella sp	0.75720	0.00000	0.00000	0.14489	0.15033
Sharpea azabuensis	0.00000	0.02114	0.07027	0.51180	0.42380
Acinetobacter sp	1.01315	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Pontibacter sp	0.98910	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Bacteroides salyersiae	0.00000	0.37401	0.30780	0.04097	0.26220
Parabacteroides distasonis	0.00000	0.19757	0.34151	0.28757	0.09839
Arthrobacter sp	0.91568	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Alistipes onderdonkii	0.00000	0.00880	0.52690	0.10902	0.26112
Phascolarctobacterium succinatutens	0.00000	0.06817	0.25393	0.27413	0.26848
Kocuria sp	0.84688	0.00000	0.00000	0.00114	0.00000
Mycoplasma wenyonii	0.72600	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Prevotella sp	0.01766	0.00000	0.01020	0.11450	0.58307

Bacillus sp	0.70453	0.00606	0.00000	0.00101	0.00000
Lactobacillus crispatus	0.00000	0.27079	0.34078	0.07231	0.00000
Enterococcus sp	0.00000	0.14733	0.16631	0.23668	0.07135
Peptostreptococcus russellii	0.00362	0.05845	0.55866	0.00000	0.00000
Pseudomonas sp	0.60664	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Bacteroides fluxus	0.00000	0.26029	0.14848	0.13239	0.04897
Lactococcus lactis	0.58536	0.00086	0.00000	0.00000	0.00000
Alistipes shahii	0.00000	0.04407	0.15256	0.12211	0.19895
Dietzia sp	0.49505	0.00000	0.00590	0.00000	0.00000
Faecalicoccus pleomorphus	0.00000	0.27665	0.05801	0.08280	0.05599
Blautia producta	0.00000	0.01469	0.02015	0.41958	0.01210
Erysipelatoclostridium ramosum	0.00000	0.02090	0.08384	0.32597	0.03317
Intestinimonas sp	0.00000	0.08365	0.09305	0.11108	0.17580
Alistipes sp	0.00000	0.00342	0.03877	0.10809	0.29769
Parasutterella excrementihominis	0.00000	0.13211	0.04033	0.19574	0.06961
Atopostipes sp	0.42470	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Lactobacillus sp	0.00734	0.12596	0.09845	0.09386	0.09657
Streptococcus gallolyticus	0.03027	0.06541	0.16210	0.11640	0.03483
Paraprevotella sp	0.00000	0.00000	0.00258	0.12029	0.25061
Parabacteroides goldsteinii	0.00000	0.04780	0.13292	0.08601	0.09615
Sutterella stercoricanis	0.00000	0.01786	0.04603	0.25500	0.03968
Corynebacterium xerosis	0.32283	0.00000	0.00295	0.00093	0.00000
Brevundimonas sp	0.32540	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Corynebacterium sp	0.32506	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Turicibacter sp	0.29052	0.00000	0.00000	0.01308	0.00191
Eubacterium tenue	0.29258	0.00000	0.00000	0.00201	0.00287
Anoxybacillus sp	0.27943	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Clostridium methylpentosum	0.00000	0.00000	0.03162	0.05258	0.19343
Luteimonas sp	0.27738	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Olsenella umbonata	0.00000	0.00086	0.00119	0.08878	0.18612
Gallibacterium anatis	0.00000	0.17922	0.06583	0.00754	0.00000
Sphingomonas sp	0.24945	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Bacteroides eggerthii	0.00000	0.10114	0.02437	0.01700	0.08309
Flavonifractor plautii	0.00000	0.04788	0.09268	0.05985	0.02492
Flavobacterium sp	0.22364	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Blautia obeum	0.00000	0.01089	0.00119	0.20511	0.00608
Brachybacterium sp	0.22269	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Barnesiella intestinihominis	0.00000	0.00000	0.00214	0.03111	0.18147
Lactococcus garvieae	0.21224	0.00171	0.00000	0.00000	0.00000

Campylobacter jejuni	0.00000	0.11010	0.09607	0.00206	0.00000
Marixanthomonas sp	0.20562	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Desulfovibrio sp	0.00000	0.00209	0.10218	0.04770	0.04410
Ruminococcus bromii	0.00000	0.00000	0.00000	0.04025	0.15473
Gemmatimonas sp	0.17912	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Subdoligranulum variabile	0.00000	0.03254	0.03078	0.05871	0.05449
Stenotrophomonas sp	0.17549	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Succinivibrio sp	0.00000	0.00000	0.00000	0.14030	0.02922
Roseburia sp	0.02803	0.00000	0.00519	0.00307	0.12659
Citrobacter sp	0.16200	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Actinomyces sp	0.15941	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Treponema berlinense	0.00000	0.00000	0.00000	0.00101	0.15796
Myxococcus sp	0.15864	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Luteimonas terricola	0.15093	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Eubacterium coprostanoligenes	0.00000	0.00000	0.00000	0.11370	0.03041
Denitrobacterium detoxificans	0.00000	0.00000	0.00000	0.00673	0.13731
Georgenia sp	0.14364	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Homoserinibacter gongjuensis	0.14041	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Treponema porcinum	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.13893
Tepidimonas ignava	0.13557	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Bacteroides heparinolyticus	0.00000	0.00441	0.09138	0.03792	0.00000
Bacteroides caecigallinarum	0.05583	0.00000	0.00000	0.06439	0.01227
Gelidibacter mesophilus	0.13057	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Enterococcus faecalis	0.12925	0.00000	0.00000	0.00114	0.00000
Sphingobacterium sp	0.12919	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Lysobacter sp	0.12067	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000

[1]Día 1: dieta solamente con calostro; día 7: dieta solamente con leche; día 14: dieta a base de leche e introducción de alimento concentrado iniciador *ad libitum*; día 21 y día 28: dieta a base de leche y alimento concentrado iniciador *ad libitum*.
[2]Clasificación de OTU basada en la base de datos SILVA (versión 128) con 97% de similaridad.