



## Slutrapport

### *Projekttitel*

Betydelsen av utfodringsrutinen av råmjölk för utveckling av bakteriefloran i magtarmkanalen och andningsvägarna hos nyfödda kalvar.

**Projektnummer:** V1430021

**Projektperiod:** 2014-09-01 - 2018-12-30

### **Huvudsökande:**

Kerstin Svennersten Sjaunja, SLU, Institutionen för husdjurens utfodring och vård

### **Medsökande:**

Bengt-Ove Rustas, SLU, Institutionen för husdjurens utfodring och vård, bengt-ove.rustas@slu.se

Johan Dicksved, SLU, Institutionen för husdjurens utfodring och vård,

Lotta Berg, SLU, Inst f husdjurens miljö och hälsa

### **Del 1: Utförlig sammanfattning**

*Microbial colonization of the gastrointestinal tract (GIT) is important for calf wellbeing and crucial for proper development of the mucosal immune system. Development of the bacterial community within the GIT begins early in life with the introduction of colostrum to the calf. Way of feeding (esophageal tube vs bottle and suckling) colostrum affects site of initial ingestion and may alter the microbial establishment. The aim of this project was to characterize development of microbiota in calves and how it is influenced by feeding method. Calves received the first meal of colostrum (equal to 8.5% birth weight) with either oesophageal tube or bottle. Half of the bottle fed calves were allowed to suckle for 24 hours whereas the other calves were fed from nipple buckets onwards. Intestinal contents and mucosal scrapings were collected separately from six GIT segments (rumen, abomasum, duodenum, ileum, cecum and colon) from 13 2-d old and 12 7-d old calves after euthanasia. Additionally, feces samples from 22 heifer calves were collected at an age of 2, 7, 14, 28, 56 (weaning) and 90 days of age. Composition of microbiota in milk, intestinal content and mucosal scrapings from several intestinal sites, together with feces, were assessed by sequencing 16S rRNA gene amplicons using Illumina MiSeq. Metabolic profiles of intestinal samples were generated by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy. Clustering of bacterial communities and metabolic profiles among samples was assessed with principal coordinate analysis (PCoA) and analysis of similarity (ANOSIM). Sequencing revealed that the microbiota composition was strongly linked to both age and intestinal segment. There were large differences between the proximal and distal parts of the GIT, but with higher similarity in segments with close proximity to each other. The NMR*

Projekt har fått finansiering genom:



*data followed a similar pattern with differences in metabolic profiles between different GIT segments. Even though there were a large overlap in composition between mucosal scrapings and intestinal content, specific microbial groups were enriched in either mucosal scrapings or intestinal content. Results demonstrate that already at 2-d of age a niche adaptation of the microbiota is evident. Results do not support a major influence of microbial composition in colostrum, nor feeding method, on intestinal microbiota establishment. Intestinal microbiota and the influence it has on health in animal or man is getting more and more attention. An important outcome of this project is the clear patterns in microbiota development in young healthy calves. How these patterns relate to calf health and performance in general and how the information can be used to adopt management routines for improved calf health is a natural continuation of this project.*

## **Del 2: Rapporten (max 10 sidor)**

### **Inledning**

*Mikroberna i mag- tarmkanalen har viktiga funktioner och kan påverka hälsa och välbefinnande hos värddjuret på flera sätt. Mikroberna kan bland annat skydda mot skadliga mikroorganismer och inflammatoriska sjukdomar och spelar en viktig roll för utveckling av tarmslemhinnan och dess immunförsvar (Sommer & Bäckhed, 2013). Såväl genetiska (Mayer et al., 2012) som miljörelaterade (Mulder et al., 2009) faktorer påverkar mikrobiopopulationens sammansättning samt infästning till tarmslemhinnan och födan har en nyckelroll vid bakteriernas kolonisering av unga individer. Utvecklingen av bakteriepopulationen i tarmkanalen hos kalvar börjar i samband med intag av råmjölk (Song et al., 2019). Hur råmjölken påverkar det mikrobiella samhället som utvecklas i kalven är dock inte klarlagt.*

*Utfodring och skötsel under mjölkutfodringsperioden kan påverka djurets produktionskapacitet längre fram i livet. Kalvar med högre tillväxt före avvänjning tenderar att producera mer mjölk under första laktationen. Näringstillförseln är avgörande för tillväxten men även hälsan är viktig. En kvigkalv som är frisk under uppväxten har högre tillväxt vilket leder till ökad mjölkproduktion senare i livet (Soberon et al., 2012). Mikrobernas kolonisering av kalvens mag-tarmkanal kan påverka tillväxten, liksom mottaglighet för infektioner i tarmkanalen (Oikonomou et al., 2013). Mag-tarmsjukdomar är en av de vanligaste dödsorsakerna hos unga kalvar i Sverige (Svensson et al., 2006).*

*Den nyfödda kalven saknar nästan helt immunförsvar vid födseln och förses med antikroppar via råmjölken. Tarmslemhinnans genomsläpplighet för antikroppar minskar drastiskt under första levnadsdygnet och därför är det viktigt att kalven får råmjölk tidigt efter födseln. För att säkerställa tillförseln av råmjölk har det i en del länder, däribland Sverige, anammats rutiner där man förser samtliga nyfödda kalvar med råmjölk via svalgsond (Persson Waller et al., 2013). Utfodring med svalgsond är annars en metod för att förse svaga kalvar med råmjölk. Att utfodra alla kalvar med sond kan ifrågasättas ur djurvälståndssynpunkt, vilket undersöks i ett parallellt projekt*

vid SLU (Formas, Dnr 221-2013-308). Vid utfodring med flaska, eller vid digivning, stimuleras kalvens struprännna varvid mjölken hamnar direkt i löpmagen. Vid utfodring med svalgsond sluts inte struprännan vilket innebär att mjölken först hamnar i den utvecklade vommen, vilket skulle kunna påverka mikrobernas etablering i mage och tarm.

Syftet med det här projektet vara att undersöka hur mikrobpopulationen i olika delar av mag-tarmkanalen hos kalvar utvecklas under de första levnadsveckorna och då speciellt hur utfodringsrutinen av råmjölk påverkar utvecklingen.

## **Material och metoder**

### ***Djur, inhysning och skötsel***

I studien ingick tjur- och kvigkalvar födda vid Forskningscentrum för lantbrukets djur, SLU, i Lövsta utanför Uppsala. Kalvarna som inkluderades föddes utan komplikationer av friska kor som ej sintidsbehandlats. Totalt 25 tjurkalvar av rasen Svensk Holstein (SH, 10 st) och Svensk röd och vit boskap (SRB, 15 st) ingick i studien. Tio av tjurkalvarnas mödrar var förstagångskalvande kor och 15 var flergångskalvande. Av de 22 kvigkalvar som ingick i studien var 10 av rasen SH och 12 av rasen SRB. Av kvigkalvarnas mödrar var 8 förstagångskalvande och 14 flergångskalvande.

Inför kalvning placerades korna i ensamboxar. De utrustades med juvernät för att förhindra de nyfödda kalvarna från att dia. Ko och kalv stannade i kalvningsboxen i två timmar efter födsel. Korna mjölkades i boxen inom 1 timme efter kalvning. Råmjölken förvarades i spann och lagrades vid 4 ° C innan den, strax före utfodring, värmdes upp till 38 ° C. Den första råmjölksgivan, motsvarande 8,5 % av kalvens levandevikt, utfodrades 4 timmar efter födseln med en av följande utfodringsrutiner:

1. första målet råmjölk med svalgsond och följande mål med napphink,
2. första målet med nappflaska och därefter med napphink,
3. första målet med nappflaska, sedan digivning fram till ett dygn efter födseln och därefter med napphink.

De kalvar som diade återförenades med kon i kalvningsboxen efter första målet. Inför utfodring med napphink placerades kalvarna i individuella boxar inomhus. Utfodring skedde två gånger per dag, 07:00 och 18:00, med 3 kg mjölk per tillfälle. Kalvarna fick råmjölk från modern vid de fyra första målen och därefter blandad helmjök från besättningen. Tjurkalvarna utfodrades endast med mjölk medan kvigkalvarna hade fri tillgång till vatten, hö och koncentrat. Vid åtta dagars ålder flyttades kvigkalvarna till ensamboxar med hyddor utomhus. Avvänjning skedde vid åtta veckors ålder varefter kalvarna flyttades in i det isolerade stallet till en gruppbox där de stannade till sex månaders ålder.

### ***Provtagning***

Tjurkalvarna avlivades vid en ålder av 2 (13 st) respektive 7 (12 st) dagar. Träckprov togs i samband med avlivning. Obduktion med påföljande provtagning från mag-

tarmkanalen påbörjades direkt efter avlivning. Prover togs från vom, löpmage, tolvfingertarm, tunntarm, blindtarm och nedre tjocktarm. Från varje tarmsegment samlades prov från tarminnehåll och skarp från slemhinna, efter att slemhinnan tvättats med koksaltlösning. Efter uppsamling placerades proverna på is och inom 4 timmar ställdes de i frys (-80° C) där de lagrades fram till analys. Träckprov togs också från kvigkalvarna vid en ålder av 2, 7, 14 och 28 dagar samt vid avvänjning (8 veckor) och vid 3 månaders ålder. Träckprover hanterades som övriga prover.

### **Analys mikrobiota**

DNA isolerades från proverna med ett kommersiellt extraktionskit, QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Tyskland) enligt tillverkarens protokoll men med modifieringen att det enzym/värmebaserade lyseringssteget kompletterades med s.k. bead beating, en mekanisk metod för att krossa cellväggarna. Isolerat DNA lagrades vid -20° C fram till analys. PCR-fragment genererades med användning av 16S rRNA-genprimers 341F och 805R och DreamTaq PCR-kemi användes för PCR reaktionerna (Thermo-Fisher Life Sciences). PCR-produkterna renades fram och användes i en andra PCR-reaktion, där provspecifika taggar och adaptrar för Illumina-sekvensering fästes in till varje prov. Efter uppförökning renades dessa PCR-produkter med Ampure-rening, DNA-koncentrationen mättes och proverna slogs samman. Det sammanslagna provbiblioteket sekvenserades med Illumina MiSeq vid National Genomics-infrastrukturen, som är en del av Science for Life laboratoriet i Stockholm.

### **Sekvensering**

Illumina MiSeq med 300 baspars sekvensläsning processades enligt beskrivning av Sinclair et al. (2015). Sekvenserna grupperades i operativa taxonomiska enheter (OTU) med användning av 97% sekvenshomologi. Taxonomisk annotering av OTU:erna utfördes baserat på SILVA-databasen och prover som innehöll < 2000 sekvenser inkluderades inte i dataanalysen.

### **Analys av metabolomik**

Från totalt 160 prover genererades metabolitprofiler med hjälp av kärnmagnetisk resonansspektroskopi (NMR). Både prover från slemhinna och tarminnehåll analyserades. Proverna mixades med en fostatbuffert och centrifugerades varpå supernatanten analyserades med en Bruker Avance II 600MHz NMR spektrometer (Bruker Biospin AG, Fällanden, Switzerland). De genererade metabolitprofil-spektrumen analyserades med multivariat dataanalys.

### **Statistisk analys**

Mikrobiernas strukturella sammansättning analyserades med multivariata och univariata statistiska modeller. De multivariata modellerna involverade huvudkoordinatanalys (PCoA) baserat på Bray Curtis avstånd, och användes för att identifiera klustermönster bland prover. Analys av likhet (ANOSIM) med Bray Curtis avståndsmatriser användes för att utvärdera om det fanns skillnader mellan grupper / kluster. Univariata statistiska metoder användes för att testa skillnader och relativt överflöd mellan grupper. Mann-Whitney-testet användes vid jämförelse mellan två grupper, medan Kruskal-Wallis-testet användes vid jämförelse av mer än två grupper.

Wilcoxon-testet användes för parade tester. Endast mikrobiell taxa med i genomsnittlig > 1% relativt överflöd ingick i den univariata analysen. Alla statistiska tester utfördes med hjälp av den statistiska mjukvaran Past.

### **Avvikelser**

I ansökan angavs att vi även skulle ta prover från helt nyfödda kalvar och även prover från lunga. En stor utmaning med dessa prover är dock att mängden bakterier är väldigt låg, vilket skapar stora utmaningar vid analysen, något som vi arbetat mycket med i en nyligen publicerad studie (Dahlberg et al. 2019). Lungproverna samlades in, men vi valde att inte analysera de. Det var svårt att få till provtagningen på ett sterilt sätt och vi bedömde därför att det fanns stor risk att kontamination skulle kunna ha en betydande inverkan på analysresultaten. Samma bedömning gjordes för de helt nyfödda kalvarna och därför samlade vi inte in dessa prover.

## **Resultat och diskussion**

### **Mikrobiota hos tjurkalvar**

Två faktorer hade stor inverkan på mikrobiotans sammansättning. Dessa var ålder på kalv (2 respektive 7 dagar,  $p = 0,0001$ ), samt vilken del av tarmen som proverna härstammade från (vom, löpmage, tolvfingertarm, tunntarm, blindtarm, och tjocktarm,  $p = 0,0001$ ).

Flera bakteriesläkten skiljde sig mellan de två åldersgrupperna. Laktobaciller var det vanligast förekommande släktet och dominerade i både 2-dagars och 7-dagars kalvar, dock utan några signifikanta skillnader kopplat till ålder. Hos 2-dagar gamla kalvar hittades däremot en signifikant högre relativ andel av *Escherichia*, *Lachnospiraceae*, *Clostridiales*, *Ralstonia* och *Enterobacteriaceae*. Hos de 7 dagar gamla kalvarna fanns istället en signifikant högre andel av *Faecalibacterium*, *Lachnoclostridium*, *Alloprevotella*, *Pelistega* och *Campylobacter*. Resultaten visade att hos de yngre kalvarna så var det framförallt fakultativt anaeroba bakterier som dominerade medan hos de 7 dagar gamla kalvarna hade strikt anaeroba bakterier tagit över. Detta är i linje med vad tidigare studier visat där fakultativt anaeroba bakterier etableras först vilket bidrar till att skapa en anaerob miljö i tarmen som senare leder till en ökad kolonisering av strikt anaeroba bakterier, vilket är de bakteriegrupper som sedan dominerar i äldre individer.

Den multivariata analysen visade också en tydlig skillnad mellan tarmsegment där sammansättningen i de bakre delarna av tarmen (tjocktarm, blindtarm, slutet av tunntarmen samt träck) hade en liknande bakteriesammansättning, medan proverna insamlade från de främre delarna av mag-tarmkanalen, dvs löpmage, tolvfingertarm och vom, inte återspeglade denna sammansättning. I de främre delarna av mag-tarmkanalen var det hög likhet i sammansättning mellan löpmage och tolvfingertarm, medan vommens mikrobiota skilde ut sig.

Laktobaciller dominerade i löpmage och tolvfingertarm i både 2-dagars och 7-dagars kalvar och var närvarande i signifikant högre proportioner där jämfört med alla övriga

provtagna tarmsegment. Detta beror troligen på att råmjölk och mjölk innehåller höga koncentrationer av laktos och oligosackarider, vilket gynnar tillväxt av laktobaciller. De bakre tarmsegmenten hos två dagar gamla kalvar dominerades av *Escherichia*, med signifikant högre proportioner i slutet av tunntarm, blindtarm, tjocktarm och träck jämfört med vom, löpmage och tolvfingertarm. I mikrobiotan hos 7 dagar gamla kalvar fanns istället högre proportioner av *Faecalibacterium*, *Lachnospiraceae*, *Clostridiales*, *Lachnoclostridium* och *Butyricoccus* i de bakre tarmsegmenten (främst blindtarm, tjocktarm och träck) jämfört med de främre delarna (vom, löpmage, tolvfingertarm). Dessa bakteriegrupper associeras sedan tidigare med de bakre delarna av tarmen och är vanligtvis närvarande i fecesprover. Deras förekomst i den bakre delen av tarmen beror förmodligen på den anaeroba miljön och bakteriernas förmåga att utnyttja substrat som undkommer nedbrytning av enzymerna från matsmältningen i tunntarmen.

Vi undersökte även huruvida sammansättningen av bakterier som hittades i tarminnehåll avspeglade vad som hittades på tarmslemhinnan. Kolonisation av tarmslemhinna kan vara viktigt för bakteriers persistens i tarmen och det kan även innebära att bakterierna har en större inverkan på värdens slemhinna och dess funktion. Många patogena mikroorganismer måste normalt fästa vid slemhinnan för att kunna infektera dess värd. Vi fann att släktet *Lactobacillus* var närvarande i högre förekomst i tarminnehåll än i slemhinna. Vissa laktobaciller har förmåga att binda till slem, men det kan finnas skillnader mellan olika arter av laktobaciller. Däremot fann vi *Escherichia* i högre proportioner i slemhinneproverna. *Escherichia coli* är vanligtvis närvarande i tarmen, både som patogena och icke-patogena stammar. Infektionsvägen för patogena *E. coli*-stammar sker genom bindning till tarmslemhinnan. Det är sålunda troligt att även icke-patogena *E. coli*-stammar också har kapacitet att binda till slemhinnan.

Vi kunde inte finna några samband mellan utfodringsrutinen och sammansättningen av mikrobiotan i magtarmkanalen.. Däremot så kunde vi se att de kalvar som diade under första dygnet hade signifikant lägre andel laktobaciller i löpmage, jämfört med övriga kalvar. Skillnaden gällde framförallt tvådagarskalvarna och var bara kopplad till löpmagen, inte till övriga tarmsegment.

### **Metabolomik**

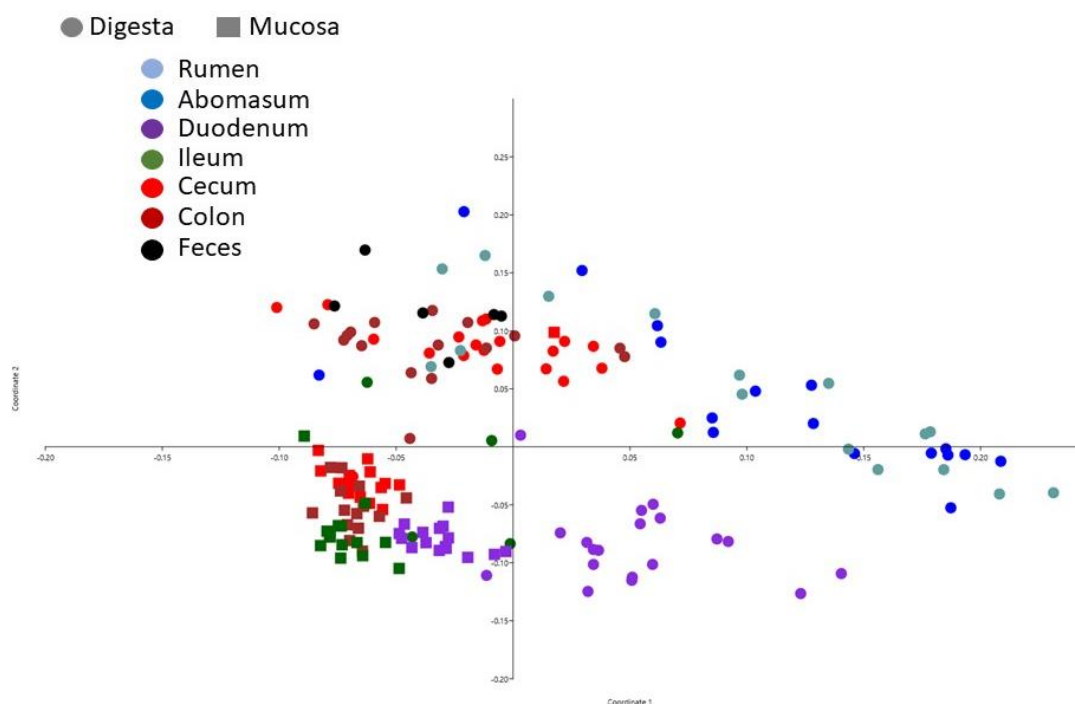
De metabolitprofiler som genererades vid NMR analysen analyserades med hjälp av multivariat statistik. PCoA användes för att studera hur provtyp och tarmsegment relaterade till metabolitprofilerna. Data visade tydligt på skillnader mellan slemskrap-prover och tarminnehålls-prover (Figur 1). Dataanalysen visade även att metabolitprofilerna i olika segment av tarmen skilde sig, och dessa skillnader var tydligare i tarminnehåll än i tarmslemhinneproverna. I kommande dataanalys kommer vi att identifiera specifikt vilka metaboliter som skiljer sig mellan proverna.

### **Mikrobiotan hos kvigkalvar**

Resultaten från sekvensanalysen av träckprover från kvigkalvarna visade på tydliga skillnader kopplad till ålder där det sker en utveckling av tarmfloran från de yngsta till de äldsta kalvarna, se figur 2. Liksom för tjurkalvarna var enterobakterier dominerande

dag 2 men minskade sedan i antal ju äldre kalven blev. Laktobaciller var också en dominerande grupp under den första levnadsveckan men även detta släkte minskade i mängd ju äldre kalven blev. Istället var det de strikt anaeroba bakterierna som tog överhanden och proverna som var insamlade efter avvänjning skiljde sig dramatiskt i sammansättning jämfört med de prover som samlades in under kalvens första levnadsvecka.

Vi försökte även studera om de olika utfodringsrutinerna för råmjölk hade någon påverkan på tarmfloras sammansättning, men vi fann inga sådana samband vilket ligger i linje med de data som erhållits från tjurkalvarna.

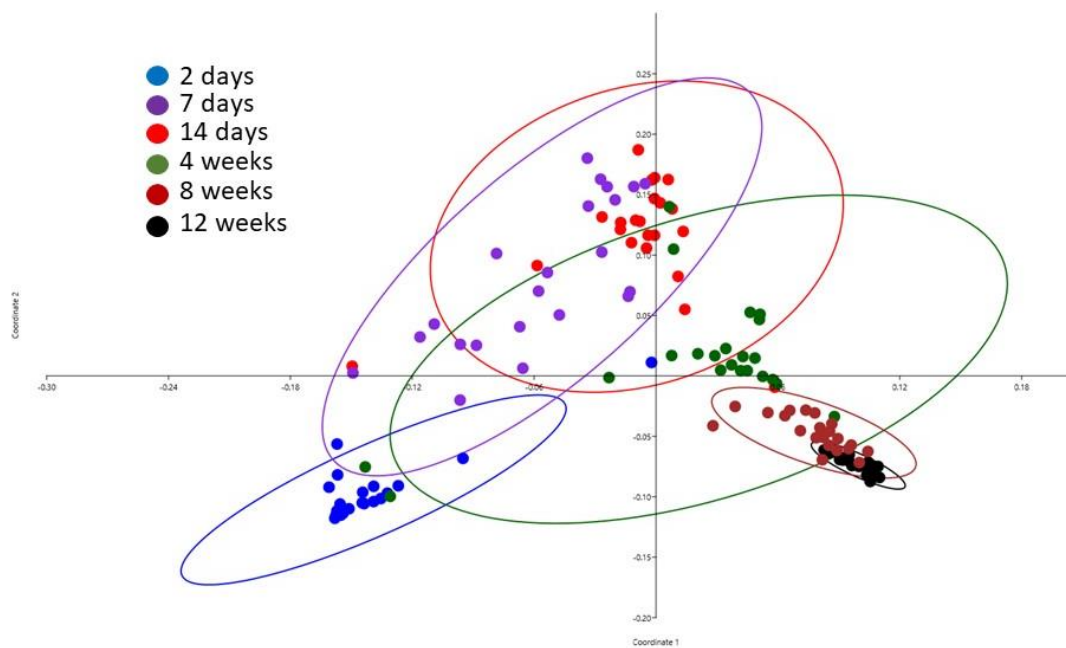


**Figur 1.** Principalkomponentanalys på metabolitprofildata från tjurkalvar genererad med NMR. Varje provs metabolitprofil representeras av en punkt och symboltyp representerar olika provtyper (tarmslemhinna representeras av fyrkantiga symboler och tarminnehåll representeras av cirkular). De olika färgerna på symbolerna representerar de olika tarmsegmenten (ljusblå; vom, blå; löpmage, lila; tolvfingertarm; grön; tunntarm, röd; blindtarm, brun; tjocktarm och svart; träck).

### Mikrobiota i mjölk

Vi analyserade även mikrobiota-sammansättningen i prover från råmjölk och blandad helmjölk från besättning. Flera av dessa prover var problematiska att analysera, troligen på grund av det låga antalet bakterier som finns i mjölk, vilket medför problem i analysen (Dahlberg et al 2019). De data som genererades från mjölkproverna visade att *Staphylococcus*, *Acinetobacter* och *Pseudomonas* var de dominerande bakteriegrupperna. Detta resultat är i linje med vad man skulle kunna förvänta sig att hitta i mjölkprover. Det var dock ganska stor variation mellan olika prover och det var

variation i sammansättningen från mjölkprover insamlade från samma ko. De bakterier som dominerade i mjölken var inte bland de bakterier som dominerar i tarmprover vilket inte tyder på att bakteriefloran i mjölk inte har särskilt stor inverkan för etablering av bakteriefloran i tarm.



**Figur 2.** Principalkomponentanalys av mikrobiota i träck från kvigkalvar. Varje symbol representerar ett prov och olika färger representerar olika åldrar (blå; 2 dagars ålder, lila; 7 dagars ålder, röd; 14 dagars ålder, grön; 4 veckors ålder, brun; 8 veckors ålder, svart; 12 veckors ålder).

## Slutsatser

- Den mikrobiella sammansättningen i mag-tarmkanalen hos unga kalvar genomgår en betydande förändring över tid fram till tre månaders ålder.
- Sammansättningen domineras initialt av fakultativt anaeroba bakterier, och dessa bakterier banar väg för strikt anaeroba bakterier som tar överhanden och dominerar hos äldre kalvar.
- Redan vid två dagars ålder finns tydligt utvecklade mikromiljöer i tarmen, där mikrobiell sammansättning såväl som metabolitprofiler är specifika för de olika segmenten av mag-tarmkanalen.
- Den mikrobiella sammansättningen i träck avspeglar inte sammansättningen i hela mag-tarmkanalen men ger en uppfattning om sammansättningen i tjocktarm och blindtarm samt och till viss del slutet av tunntarmen.
- Resultaten tyder inte på att den mikrobiella sammansättningen i mjölk har någon större betydelse för utvecklingen av mikrobiotan i mag-tarmkanalen.



- *Det fanns ingen påverkar av de olika utfodringsrutinerna på tarmfloras sammansättning. Det var däremot skillnad mellan kalvar som fått dia och kalvar som skildes direkt från modern men den skillnaden kunde bara ses i proverna från löpmagen, inte i övriga segment av tarmen.*

## Nytta för näringen och rekommendationer

*I flera studier har det visats att mikrobiotan och dess etablering i mag-tarmkanalen kan påverka hälsa och välbefinnande hos kalvar. Resultaten från det här projektet visar hur mikrosammansättningen utvecklas från födsel fram till avvänjningen hos friska kalvar i en besättning. Resultaten är en viktig referens i fortsatta studier av mikrobiotan och dess funktion hos kalvar. Ett nästa steg skulle kunna vara att studera kalvar i flera besättningar, såväl friska som sjuka, för att identifiera likheter och skillnader. Utifrån det skulle skötselrutiner och möjliga behandlingar (t ex pre- och/eller probiotika) som påverkar mikrosammansättningen i positiv riktning kunna identifieras.*

*Att kalvar som diade skiljde sig från övriga är intressant och värt att studera vidare. Kalvar som diar äter fler mål och mindre per tillfälle och får mer kontakt med kon. Det kan anses vara mer naturligt för kalven och man kan spekulera om även mikrobpopulationen utvecklas på ett för kalven mer gynnsamt sätt vid digivning. I den här studien diade kalvarna ett dygn. Det vore intressant att studera hur diande under längre tid påverkar mikrobiotan och om det har en positiv inverkan på kalvhälsan.*

## Referenser

- Dahlberg, J., Sun, L., Waller, K.P., Ostensson, K., McGuire, M., Agenas, S., Dicksved, J. 2019. Microbiota data from low biomass milk samples is markedly affected by laboratory and reagent contamination. *PLoS One*, 14(6), p. e0218257.
- Mayer, M., Abenthum, A., Matthes, J.M. 2012. Development and genetic influence of the rectal bacterial flora of newborn calves. *Veterinary Microbiology*, 161:179-185.
- Mulder, I.E., Schmidt, B., Stokes, C.R. 2009. Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. *BMC Biology*, 7:79 doi:10.1186/1741-7007-7-79
- Oikonomou, G., Teixeira, A.G.V., Foditsch, C. 2013. Fecal microbial diversity in pre-weaned dairy calves as described by pyrosequencing of metagenomic 16S rDNA. *Associations of Faecalibacterium Species with health and growth. PLOS ONE*, vol 8 e63157.
- Persson Waller, K., de Verdier, K., Persson, Y., et al. 2013. Sondmatning av råmjölk till mjölkkraskalvar – för- och nackdelar. *Sv Vet Tidn* 2:31-34
- Sinclair, L., Osman, O.A, Bertilsson, S., Eiler, A. 2015. Microbial community composition and diversity via 16S rRNA gene amplicons: evaluating the illumina platform. *PLoS One*, 10(2), p. e0116955.
- Soberon, F., Raffrenato, E., Everett, R.W. 2012. Prewaning milk replacer intake and effects on long-term productivity of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 95:783-793.
- Sommer, F., Bäckhed, F. 2013. The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), p. 227.
- Song, Y., Malmuthuge, N., Li, F., Guan, L.L. 2019. Colostrum feeding shapes the hindgut microbiota of dairy calves during the first 12 h of life. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 95 (2019), Article fty203.
- Svensson, C., Linder, A., Olsson, S.-O. 2006. Mortality in Swedish Dairy Calves and Replacement Heifers. *J. Dairy Sci.* 89:4769-4777.

## **Del 3: Resultatförmedling**

*Ange resultatförmedling av projektet, inklusive titel, referens, datum, författare/talare, och länk till presentation eller publikation om tillämpligt. Planerade publiceringar (med preliminära titlar) ska ingå i tabellen. Ytterligare rader kan läggas till i tabellen.*

<b>Vetenskapliga publiceringar</b>	Arapovic L., Hang B.P.T., Hernandez C.E., McGuire M.A., Rustas B.O. and Dicksved J. 2019. Development of the microbiota along the gastrointestinal tract of calves in early postnatal life. Manuscript in: Hang, B. P. T., 2019. Colostrum quality, intestinal microbiota and implications for health in young dairy calves. Dept. of Animal Nutrition and Management, SLU, Uppsala, Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Doctoral Thesis no. 2019:38. To be submitted.
	Hang, B. P. T., 2019. Colostrum quality, intestinal microbiota and implications for health in young dairy calves. Dept. of Animal Nutrition and Management, SLU, Uppsala, Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Doctoral Thesis no. 2019:38. <a href="https://pub.epsilon.slu.se/16124/">https://pub.epsilon.slu.se/16124/</a>
	Planerad. Mikrobiota composition and metabolic profiles in gastrointestinal content of young calves.
<b>Övriga publiceringar</b>	Arapovic, L., Thu Hang B.P., Hernandez, C., McGuire, M.K., Rustas, B.O., Dicksved, J. 2019. Development of the microbiota along the gastrointestinal tract of newborn calves. Book of abstract of 70th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science (EAAP), Ghent, Belgium, 26 - 30 Aug, 2019. Accepted for publication and poster presentation.
<b>Muntlig kommunikation</b>	Dicksved, J., Presentation vid möte med Feed Science Network, företagsnätverk i samarbete med Inst f husdjurens utfodring och vård, SLU, 2018-12-13.
<b>Studentarbete</b>	Augustsson, J. 2016. Utvecklingen av bakteriefloran i magtarmkanalen hos kalvar. Sveriges lantbruksuniversitet. Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för Husdjurens utfodring och vård. (Examensarbete 2016:33). <a href="https://stud.epsilon.slu.se/8811/7/augustsson_j_160202.pdf">https://stud.epsilon.slu.se/8811/7/augustsson_j_160202.pdf</a>
	Lenngren Hysing, P. 2016. Analysis of the methanogenic and acetogenic community structure in young calves. Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för Husdjurens utfodring och vård. (Examensarbete 2016:586). <a href="https://stud.epsilon.slu.se/9764/1/lenngren_hysing_p_161028.pdf">https://stud.epsilon.slu.se/9764/1/lenngren_hysing_p_161028.pdf</a>
<b>Övrigt</b>	