

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Efeito do uso de um produto probiótico a base de duas cepas de bacillus sp.
na produção leiteira e ingestão de matéria seca de vacas no período de
transição**

Matheus Wrege Meireles Barbosa

Pelotas, 2023

Matheus Wrege Meireles Barbosa

**Efeito do uso de um produto probiótico a base de duas cepas de bacillus sp.
na produção leiteira e ingestão de matéria seca de vacas no período de
transição**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia (Biotecnologia aplicada à produção animal).

Orientador: Marcio Nunes Corrêa

Coorientador: Uriel Secco Londero

Pelotas, 2023

Matheus Wrege Meireles Barbosa

**Efeito do uso de um produto probiótico a base de duas cepas de bacillus sp.
na produção leiteira e ingestão de matéria seca de vacas no período de
transição**

Dissertação submetida, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 21/12/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcio Nunes Corrêa – UFPel - Orientador

Membro 1: Francisco Augusto Burkert Del Pino

Membro 2: Viviane Rolding Rabassa

Membro 3: Eliza Rossi Komninou

Suplente: Thaís Casarin da Silva

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

B238e Barbosa, Matheus Wrege Meireles

Efeito do uso de um produto probiótico a base de duas cepas de *Bacillus* sp. sobre a eficiência alimentar e produção leiteira de vacas da raça Holandês no período de transição. [recurso eletrônico] / Matheus Wrege Meireles Barbosa ; Marcio Nunes Corrêa, orientador ; Uriel Secco Londero, coorientador. — Pelotas, 2023.

56 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Aditivos. 2. *Bacillus subtilis*. 3. *Bacillus licheniformis*. 4. Pecuária Leiteira. I. Corrêa, Marcio Nunes, orient. II. Londero, Uriel Secco, coorient. III. Título.

CDD 636.208557

Para meus pais (Abelardo e Suleni), a Laís Anastácio, meus familiares e amigos.

Dedico.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, que tem me guiado sempre da melhor maneira possível em todos os meus passos. Me dando oportunidade de crescer onde preciso crescer, aprender onde é preciso aprender e mesmo que com muita batalha, muita luta e abdições, tem me dado as oportunidades certas nos momentos certos.

Após Deus, agradecer as pessoas que fizeram isso ser possível, meus pais (Abelardo e Suleni). Nunca foi um sonho meu fazer mestrado, mas com o brilho nos olhos que eu via quando vocês me falavam para fazer mestrado, que ia ser importante e que não ia me arrepender, ao longo do tempo, isso foi se tornando cada vez mais verdadeiro e hoje estamos aqui, com a dissertação escrita. Espero que um dia, eu e a Laís possamos ser pais tão incríveis como vocês foram e sempre serão para mim. Amo vocês!!

Por falar em Laís, como não agradecer a pessoa que mais me apoio durante esses dois anos, que segurou firme as pontas, não me deixou desistir e mesmo com a distância que se instaurou nesse tempo, nunca deixou de estar presente, sendo dado carinho, afeto, puxões de orelha e muito amor. Esse título é tanto meu, quanto é seu. Te amo e obrigado por ser tudo que tu é!!

Agradeço ao meu grupo de pesquisa e em especial ao meu orientador, professor Dr. Marcio Nunes Corrêa, que está comigo nessa caminhada há 5 anos. Muito lhe tenho a agradecer pelos puxões de orelha, frases de efeito, ensinamentos profissionais e pessoais que ao longo do tempo se tornaram cada vez mais frequentes e que com certeza modularam quem sou hoje!! Agradeço também ao Uriel e a Eliza, que me acompanharam durante esses anos e ainda mais agora no mestrado, orientando, incentivando e cobrando quando necessário era. Agradecer também a minha banca, por se disponibilizar em fazer parte desse momento tão especial e de tanta contribuição como esse. Obrigado por toda a contribuição!!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Você só é livre quando faz o que não quer”
Immanuel Kant

Resumo

BARBOSA, Matheus Wrege Meireles. **Efeito do uso de um produto probiótico a base de duas cepas de bacillus sp. na produção leiteira e ingestão de matéria seca de vacas no período de transição.** 2023. 56f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Durante o período de transição que normalmente ocorrem a maioria dos desafios ligados a saúde das vacas leiteiras. Visando melhorar a saúde da vaca leiteira nesse período, tem se buscado alternativas para contornar os problemas, dentre elas estão o uso de probióticos. Vinte e seis vacas da raça Holandês foram separadas conforme o peso e número de lactações em dois grupos, 30 dias antes do parto: Grupo Bovacillus (n=13; Peso vivo: 723 ± 103) recebia uma dieta totalmente misturada (TMR) mais a adição de 3g/vaca/dia de um probiótico (Bovacillus, Christian Hansem, cidade, USA) a base de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*; e Grupo Controle (n=13; Peso vivo: 708 ± 90) recebia somente a TMR, sem a adição do probiótico. Os animais foram alocados em galpões do tipo *compost barn* no início do experimento e foram acompanhados entre o período de trinta dias pré parto e sessenta dias pós-parto. Diariamente era mensurado o consumo de matéria verde e feitas coletas da dieta para mensuração diária da matéria seca. Também era feito diariamente o controle da produção de leite individual. Nos dias -30, -14, -4, 0, 4, 14, 30 e 60, as vacas foram pesadas com utilização de fita métrica e tiveram seu escore de condição corporal (ECC) avaliado, em escala de 1 a 5. Cada animal contou com 5 coletas de leite cru para análise de composição do leite (gordura, proteína, lactose, CCS, ST e ESD). Após a obtenção dos resultados de produção de leite, consumo de matéria e composição do leite, foi calculada a eficiência alimentar, o leite corrigido para gordura e energia. Todos os dados foram analisados através da análise de variância (modelo misto) e teste de T de Tukey para dados pareados no *software* estatístico JMP® PRO 17 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). Todas as variáveis foram analisadas com o teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade. Foi possível observar que o uso de um probiótico à base de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* foi capaz de aumentar a produção de leite, quantidade de Leite Corrigido para Gordura (LCG) e Leite Corrigido para Energia (LCE), além de aumentar a ingestão de matéria seca e diminuir os níveis de CCS ($p < 0,05$). Esses resultados demonstram que a utilização do probiótico é capaz de auxiliar as vacas no período de transição, aumentando a produção de leite, o consumo de matéria seca e diminuindo a CCS.

Palavras-chave: Aditivos, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, Pecuária de Leite.

Abstract

BARBOSA, Matheus Wrege Meireles. **The effect of using a probiotic product (Bovacillus) based on two strains of *Bacillus* sp. on the performance and eating behavior of cows during the transition period.** 2023. p. 56. Dissertation (Master's degree) – Program of Post Graduation in Biotechnology. Federal University of Pelotas.

During the transition period, which typically encompasses most challenges related to the health of dairy cows, efforts have been made to find alternatives to address these issues. One such alternative is the use of probiotics. Twenty-six Holstein cows were separated based on weight and number of lactations into two groups, 30 days before calving: the Bovacillus Group (n=13; Live weight: 723 ± 103) received a total mixed ration (TMR) along with the addition of 3g/cow/day of a probiotic (Bovacillus, Christian Hansem, city, USA) based on *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. The Control Group (n=13; Live weight: 708 ± 90) received only the TMR without the addition of the probiotic. The animals were housed in compost barns at the beginning of the experiment and were monitored from 30 days pre-calving to 60 days post-calving. Daily measurements included the consumption of green matter, diet collections for daily measurement of dry matter, and individual milk production monitoring. On days -30, -14, -4, 0, 4, 14, 30, and 60, the cows were weighed using a measuring tape, and their body condition score (BCS) was evaluated on a scale from 1 to 5. Each animal underwent 5 raw milk samples for analysis of milk composition (fat, protein, lactose, SCC, TS, and ESD). After obtaining the results for milk production, feed consumption, and milk composition, feed efficiency, milk corrected for fat, and energy were calculated. All data were analyzed using analysis of variance (mixed model) and Tukey's paired T-test in the statistical software JMP® PRO 17 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Normality was assessed using the Shapiro-Wilk test for all variables. It was observed that the use of a probiotic based on *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* was able to increase milk production, the quantity of Milk Corrected for Fat (MCF), and Milk Corrected for Energy (MCE). Additionally, it increased dry matter intake and decreased SCC levels (p<0.05). These results demonstrate that the use of the probiotic can assist cows during the transition period by increasing milk production, dry matter intake, and reducing SCC.

Key words: Additives, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, Dairy Farming.

Lista de Figuras

Figura 1: Produção de leite (A), CCS (B), Eficiência alimentar (C), Leite corrigido para energia (D), Leite corrigido para gordura 3,5 (E), de vacas suplementadas com probióticos a base de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* ou controle, durante o período pós-parto.....36

Figura 2: Consumo de matéria seca (A), Peso vivo (B) e Escore de condição corporal (C), de vacas suplementadas com probióticos a base de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* ou controle, durante o período pós-parto.....38

Lista de Tabelas

Tabela 1: Quantidade, ingredientes e análise bromatológica da dieta de vacas em lactação utilizadas no estudo.....	30
Tabela 2: Média da produção/composição do leite e eficiência alimentar de vacas alimentadas com probiótico a base de <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus licheniformis</i> ou controle.....	35
Tabela 3: Média do consumo, Peso vivo, ECC, escore fecal e pH fecal, durante os períodos pré, pós e soma dos períodos de avaliação de vacas alimentadas com probiótico a base de <i>Bacillus licheniformis</i> e <i>Bacillus subtilis</i> ou controle.....	38

Lista de Abreviaturas

- AGNE - Ácidos graxos não esterificados
- ATP - Adenosina tri-fosfato
- BEN - Balanço energético negativo
- BHBA - β -hidroxibutirato
- CCS - Contagem de células somáticas
- CMS - Consumo de matéria seca
- DEL - Dias em lactação
- ECC - Escore de condição corporal
- EST - Extrato seco desengordurado
- FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
- IgA - imunoglobulina A
- IMS - Ingestão de matéria seca
- LCE - Leite corrigido para energia
- LCG - Leite corrigido para gordura
- ST - Sólidos totais
- WHO - Organização mundial da saúde

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Período de transição	15
2.2 Comportamento alimentar durante o período de transição	15
2.3 Produção e composição do leite	17
2.4 Probióticos na nutrição animal	19
2.5 Bacillus sp	21
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS	23
3.1 Hipótese	23
3.2 Objetivo Geral	23
3.3 Objetivos Específicos	23
4 capítulos	24
4.1 Artigo 1	24
Efeito do uso de um produto probiótico (Bovacillus) a base de duas cepas de <i>bacillus</i> sp. no desempenho produtivo, parâmetros de qualidade do leite e comportamento alimentar de vacas da raça holandês no período de transição.	24
4.1.1 Introdução	28
4.1.2 Metodologia	29
4.1.3 Resultados	31
4.1.4 Discussão	35
4.1.5 Conclusão	37
5 CONCLUSÃO GERAL	38
6 REFERÊNCIAS	39
7 ANEXOS	50
Anexo A – Parecer de aprovação do CEEA	50

1 INTRODUÇÃO GERAL

A população mundial tem aumentado cada vez mais ao longo dos anos, gerando diretamente uma maior demanda por produtos de origem animal, o que tem sido um desafio para todos os produtores em todo o mundo (FAO, 2015). Embora a cadeia produtiva do leite tenha grande expressividade na produção de alimentos, o setor vem passando por uma forte queda em seus valores de comercialização. No mês de setembro de 2023 foi registrada a quinta queda consecutiva no preço do leite cru captado, chegando ao patamar de R\$ 2,05 /L de leite, na “média Brasil” (CEPEA, 2023). Juntamente com uma redução no preço do produto, ocorreu também uma redução na margem de lucro do produtor, onde no Brasil houve um recuo de 19% na receita líquida e de 55% na margem bruta (CEPEA, 2023). Dessa forma, torna-se cada vez mais necessário que se produza mais leite e de maneira mais eficiente, buscando a maior aproveitamento da vaca leiteira.

Durante a vida produtiva da vaca leiteira, ela acaba por passar por diversas fases que causam grandes desafios, como o desmame, puberdade e principalmente o período de transição (SERRENHO et al., 2022). Durante essa fase, a vaca leiteira passa por diversas adaptações hormonais, físicas e comportamentais que levam a alterações em parâmetros comportamentais normais e assim, podendo impactar negativamente na sua vida produtiva (PROUDFOOT, 2023). É dito que o sucesso da produção leiteira está na capacidade do animal em se adaptar às mudanças que ocorrem nessa fase produtiva e, ainda assim, voltar a ter um consumo adequado da dieta e desempenhar uma produção de leite satisfatória (DENIZ et al., 2020).

Tendo em vista a importância da saúde da vaca leiteira no período de transição para sua vida produtiva, tem-se buscado alternativas nutricionais para reduzir o impacto dessa fase (VÁRHIDI et al., 2022). Os probióticos são definidos como organismos vivos que, quando consumidos em concentrações apropriadas, são benéficos à saúde de quem os consome (SANDERS, 2008). Estes são organismos viáveis e não patogênicos, sendo sua suplementação benéfica ao hospedeiro, além de competir com microrganismos patogênicos (UYENO et al., 2015). Entre os tipos de constituintes, destacam-se os *Bacillus sp.*, que são gêneros de bactérias gram-positivas capazes de esporular e sobreviver em ambientes onde normalmente outros gêneros de bactérias não seriam capazes de sobreviver (BERNARDEAU et al., 2017; NICHOLSON et al., 2000). Dentre as diversas espécies de *Bacillus sp.*, o uso de

Bacillus licheniformis e *Bacillus subtilis* tem demonstrado efeitos positivos na produção de leite, leite corrigido para gordura, leite corrigido para energia e também componentes do leite, como gordura, proteína e lactose (LAMONTAGNE et al., 2023), além de também serem capazes de melhorar a degradabilidade dos alimentos a nível ruminal (QIAO et al., 2010). Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do uso combinado de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* no desempenho produtivo, qualidade do leite e comportamento alimentar de vacas da raça Holandês em período de transição.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Período de transição

Há muito tempo busca-se compreender mais e melhor o período de transição de vacas leiteiras, o qual compreende as três semanas que antecedem e as três semanas posteriores ao parto (GRUMMER, 1995). Nesse período, a vaca leiteira passa por diversas adaptações fisiológicas e metabólicas, pois começa a se preparar para as mudanças que ocorrem ao passar de um animal gestante não lactante, que dispunha sua energia para manutenção e desenvolvimento fetal, para um animal lactante não gestante, necessitando de energia para a sua manutenção e reparação tecidual, assim como, energia para a síntese de colostro e posteriormente de leite (BAUMAN & CURRIE, 1980; AKBAR et al., 2015).

A saúde do animal durante o período de transição é fundamental para o seu desempenho produtivo e reprodutivo durante a lactação. Entretanto, devido às mudanças que ocorrem no metabolismo do animal e os desafios que ocorrem durante essa fase, acabam por gerar diversas desordens metabólicas e conseqüentemente, aumentam a ocorrência de doenças, principalmente doenças metabólicas como hipocalcemia, deslocamento de abomaso, cetose e esteatose hepática (BOMBA, et al., 2015; NETO et al., 2011).

Alguns estudos estimam que vacas leiteiras que sofrem mais com os impactos do período de transição, devido a sua menor capacidade de adaptação à transição de gestantes para posteriormente lactantes, podem deixar de produzir de 5 a 9 litros de leite por dia, durante o pico de lactação (WALLACE et al., 1996). Nos dias atuais, onde o preço dos insumos e os custos para manter a atividade leiteira quase ultrapassam o valor recebido pela comercialização do leite, tornando-se fundamental que se tenha melhor aproveitamento dos insumos e materiais utilizados na atividade e também se consiga obter um melhor desempenho dos animais durante esses períodos de maior desafio (MARCONI & TEODORO, 2023).

2.2 Comportamento alimentar durante o período de transição

A queda no consumo de matéria seca é uma característica muito conhecida durante o período de transição das vacas leiteiras. O consumo de matéria seca e a ingestão de energia são relativamente constantes durante o período seco até os 10 dias pré-parto, quando ocorre uma redução de 20%, podendo chegar até 40% no

consumo na semana anterior ao parto (KUHLA., 2015), sendo essa redução do consumo mais pronunciada em vacas com excesso de condição corporal (GRUMMER et al., 2004). Após o parto, a vaca leiteira começa a recuperar gradualmente sua capacidade de ingestão de matéria seca, chegando ao ápice do seu consumo entre o terceiro e o sexto mês após o parto (SIGNORETTI et al.,2010).

Os fatores relacionados à redução na ingestão de alimentos durante o período de transição são tanto metabólicos quanto físicos. Dentro dos fatores metabólicos envolvidos na regulação do consumo de alimentos, os níveis de grelina, leptina, hormônios da tireoide, insulina e estrogênio tem seus efeitos bem descritos na literatura (MCNABB et al., 2010). Outra explicação para essa diminuição na ingestão de alimentos é a teoria da oxidação hepática, proposta por ALLEN e BRADFORD (2009). Segundo essa teoria, o centro de saciedade no cérebro regula o comportamento alimentar, sendo influenciado pelo nervo vago hepático, que responde à concentração de trifosfato de adenosina (ATP) no fígado. Uma maior produção de ATP, resultado da oxidação de carboidratos, lipídeos e proteínas, leva a uma menor estimulação do centro de saciedade, enquanto níveis mais baixos de ATP estimulam a ingestão de alimentos (KUHLA et al., 2016). No período de transição, onde a vaca leiteira mobiliza ácidos graxos não esterificados (AGNE) do tecido adiposo para compensar o déficit de energia da dieta, é gerada uma produção de ATP oriunda desses AGNE, e também há uma liberação de leptina dos adipócitos, causando um *feedback* negativo no centro da saciedade, ajudando na redução do consumo de alimentos (GRUMMER et al., 2004). No entanto, o mecanismo exato dessa regulação não é totalmente compreendido.

Se tratando de fatores físicos, o terço final da gestação é o momento ao qual o feto já está desenvolvido e está ganhando peso antes do seu nascimento. Devido a isso, seu tamanho é cada vez maior, chegando a ter 60% do crescimento fetal nesse período e conseqüentemente ele ocupa mais espaço dentro da cavidade abdominal, levando a compressão das vísceras e dos órgãos do trato digestório (ROTTA et al., 2015). A compressão desses órgãos, principalmente do rúmen, faz com que a capacidade de ingestão de matéria seca fique reduzida, devido à menor capacidade física que o órgão apresenta, o que reflete diretamente no comportamento alimentar do animal (BAUMAN & CURRIE, 1980; FORBES, 1987). Após o parto, os órgãos ainda apresentam um tamanho reduzido, embora não haja o feto lhes comprimindo, mas conforme vão passando-se os dias, os órgãos do trato digestório começam a

restabelecer suas capacidades físicas normais e as mudanças hormonais acabam sendo menos intensas (FORBES. et al., 1987).

A redução no consumo de alimentos consequente do período de transição, acaba por causar uma diminuição na quantidade de energia e de proteína que o animal consome por meio da dieta, que concomitante ao aumento no requerimento energético, devido a produção de leite, proteína do leite, gordura e lactose, causam um quadro de balanço energético (BEN) e proteico negativo, assim como uma resistência periférica à insulina (BEAUCHEMIN, 2018; MCCABE & BOERMAN, 2020). O BEN está diretamente relacionado com muitas das doenças que ocorrem durante o período de transição, como: cetose, deslocamento de abomaso e acidose ruminal (ESPOSITO et al., 2014; HERDT, 2000).

2.3 Produção e composição do leite

Durante o início do período produtivo das vacas leiteiras, a demanda por energia e proteína são aumentadas para acompanhar a produção do leite que a cada dia é mais acentuada (NASEM, 2021). Além do aumento no requerimento nutricional para suprir a demanda da produção leiteira, nesse período também ocorre uma maior demanda para suprir as necessidades de manutenção dos animais, que podem aumentar de 3 a 5 vezes nas primeiras semanas de lactação, uma vez que, a vaca precisa que seus órgãos e funções vitais voltem às condições normais que apresentavam antes da gestação e do parto (MCNAMARA, 2004). Entretanto, sabe-se que o consumo de matéria seca nas primeiras semanas após o parto é reduzido, fazendo com o BEN perdure até a 4ª e 8ª semanas pós parto (HEUER, C. et al., 2001. MCGUIRE et al., 2004).

Os efeitos do BEN são observados no desempenho produtivo da vaca no pós-parto recente. Vacas diagnosticadas com valores de β -hidroxibutirato (BHBA) acima de 1,2 mmol/L, sem sinais clínicos, caracterizando cetose subclínica, tiveram uma redução de 0,5kg/dia para cada aumento de 0,1mmol/L de BHBA no sangue, durante os primeiros 30 dias pós-parto (MCART et al., 2012). O aumento dos corpos cetônicos no sangue, são em decorrência da lipólise exacerbada para a produção de energia no fígado devido ao menor consumo de matéria seca característico do momento. Os AGNES que são mobilizados são mobilizados para a produção de energia pelos músculos, incorporados na gordura do leite e absorvidos pelo fígado como triacilgliceróis (LOMANDER et al., 2012; PICKETT et al., 2003), entretanto, quando a

sua absorção acaba superando a capacidade do fígado em converter esses triacilgliceróis em energia, leva a um acúmulo de gordura no fígado e um dos mecanismos que o organismo adota para reduzir o acúmulo dessas substâncias é as convertendo em corpos cetônicos (Acetona, Acetoacetato, BHBA; MCNAMARA., 2000).

Efeitos do período de transição também são observados na qualidade de leite. A mobilização de AGNES das reservas corporais de gordura, utilizados para suprir a demanda energética no período de transição estão associados a um aumento no teor de gordura do leite, decorrente do aumento no teor de Ácidos Graxos Livres (AGL) circulantes, entretanto, esse aumento de AGL na corrente circulatória e no fígado causam uma redução na produção de leite e no teor de proteína desse leite (SUN et al., 2019). BOBE e colaboradores (2004) identificaram que quanto maior a concentração de lipídios no fígado, maior foi a redução na produção de leite dessas vacas; fato esse decorrente da sobrecarga hepática causada pelo excesso de lipídeos presentes no órgão, superando a capacidade do mesmo em oxidar e secretar esses lipídeos (DRACKLEY, 1999; GRUMMER et al.,1993).

O teor de gordura e proteína no leite estão intimamente relacionados e são negativamente correlacionados com o balanço energético negativo. Quando a quantidade de gordura é bem mais alta que a quantidade de proteína no leite, é um indicativo de BEN severo (STEENSELS et al., 2017). A quantidade de gordura do leite/quantidade de proteína do leite deve apresentar ideais entre 1,05 a 1,13, valores acima de 1,3 ou 1,5 podem indicar um BEN severo (ĐURIČIĆ et al., 2020).

Para que ocorra o aumento na produção de leite, é necessário que o animal consiga utilizar melhor a energia disponibilizada por meio da dieta; seja pelo aumento no consumo de matéria seca ou por um incremento calórico da dieta; como também por um melhor uso da gordura mobilizada para suprir a demanda energética, tornando assim, mais eficientes e produtivas (OPSOMER, 2015). Embora o aumento no consumo de matéria seca seja o mais indicado, sabe-se que a vaca leiteira possui suas limitações nesse período, sendo assim, necessário melhorar a qualidade dos alimentos consumidos. O uso de probióticos na alimentação de ruminantes é grande aliado na melhora da digestibilidade dos alimentos ofertados na dieta (CHAUCHEYRAS-DURAND et al., 2008), podendo assim, aumentar o desempenho produtivo desses animais.

2.4 Probióticos na nutrição animal

O termo probióticos é originário de duas palavras Gregas (pro e bios) e significam “para vida”. Esse termo foi provavelmente inventado por FERDINAND VERGIN (1954) em seu estudo avaliando o efeito negativo de antibióticos e outros antimicrobianos em comparação ao uso de bactérias benéficas. De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, e a Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO), os probióticos são definidos como organismos vivos que quando consumidos em concentrações apropriadas, são benéficos a saúde de quem os consome (SANDERS, 2008). Os probióticos são organismos viáveis e não patogênicos, sua suplementação é benéfica ao hospedeiro, além de competir com microrganismos patogênicos (UYENO et al., 2015).

No Brasil, o mercado para o uso de probióticos tem crescido, uma vez que, os consumidores estão cada vez mais conscientes dos benefícios que os probióticos trazem à saúde (LIONG, 2011). A indústria de alimentos tem estado atenta a esse movimento da sociedade em torno dos probióticos e tem se preparado para esse cenário, aumentando a oferta de produtos contendo esse tipo de aditivo (PIMENTEL et al., 2017). Além dos benefícios dos probióticos na saúde humana, o uso de antibióticos em subdosagens como promotores de crescimento na cadeia pecuária gerou há alguns anos uma preocupação dos consumidores devido a transferência de genes de resistência da microbiota animal para humana (MATHUR & SINGH., 2005). Esses fatores colaboraram para que começasse a utilizar alternativas para o uso de antibióticos na dieta, abrindo espaço para outros compostos como probióticos, prebióticos e simbióticos (GAGGIA et al., 2010).

O uso de probióticos em ruminantes tem crescido cada vez mais devido aos seus efeitos benéficos na modulação da microbiota do trato gastrointestinal e de ser um possível substituto aos tradicionais antibióticos (HAUCHEYRAS-DURAND; DURAND., 2010). Os probióticos surgiram como um complemento alimentar para ruminantes em áreas tropicais buscando melhorar seu desempenho produtivo (MAHESH et al., 2021). Seus efeitos no organismo do animal são diversos: são capazes de melhorar a digestibilidade e o aproveitamento dos nutrientes, modular a flora microbiana do rúmen e estabilizar o pH ruminal, reduzir a quantidade de ácido lático e a chance de desenvolver acidose ruminal subaguda (CHAUCHEYRAS-DURAND et al., 2008; VYAS et al., 2014).

Vários mecanismos foram identificados para explicar os efeitos dos probióticos dentro do ambiente ruminal. Os probióticos aumentam a quantidade de protozoários ruminais e ambos os microrganismos competem com as bactérias *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus* pela utilização da glicose livre no rúmen, diminuindo assim a produção de ácido láctico que seria produzido por essas bactérias (CHAUCHEYRAS et al., 1996; NAGARAJA, 2012). Alguns probióticos podem produzir Malato e outros pequenos peptídeos que são capazes de induzir o consumo do L-Lactato (um precursor do ácido láctico), pelas bactérias *Megasphaera elsdenii* and *Selenomonas ruminantium* (NAGARAJA, 2012). Os protozoários ruminais que são mobilizados pelos probióticos, fazem a fermentação do amido de modo mais lento, não causando uma queda brusca no pH ruminal (MENDOZA et al. 1993)

Além da modulação ruminal, os probióticos também têm efeito positivo na digestão dos alimentos no rúmen. PAN et al., (2022), observou em seu estudo uma melhora na digestibilidade *in-vitro* da fibra e do amido de dietas contendo probióticos a base de *Bacillus*. Eles colonizam o trato gastrointestinal e tornam-se parte da microbiota normal do hospedeiro (SPANOVÁ et al., 2015). Eles também possuem efeito ativo, tendo a capacidade de aumentar a atividade enzimática no trato gastrointestinal e melhoram a capacidade de digestibilidades de alimentos ingeridos pelo hospedeiro, um exemplo é com estudo em bezerras búfalas que demonstrou que a alimentação probiótica contendo *Lactobacillus acidophilus* poderia garantir maior ingestão de matéria seca, eficiência de conversão alimentar diária e digestibilidade aparente de nutrientes em comparação ao grupo não suplementado (SHARMA et al., 2018). Os principais efeitos benéficos na saúde e produção da utilização de probióticos na dieta de ruminantes foram observados quando estes foram utilizados em animais que estavam passando por um período estressante para os animais, como o desmame, início da lactação e durante períodos que ocorrem trocas significativas em suas dietas (HAUCHEYRAS-DURAND; DURAND., 2010)

Dentro dos probióticos utilizados na dieta para ruminantes, incluem principalmente as bactérias pertencentes aos gêneros *Streptococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium* e *Prevotella bryantii*, além de espécies de fungos, incluindo *Saccharomyces* e *Aspergillus* (GAGGIA et al., 2010).

2.5 *Bacillus* sp

O gênero *Bacillus* sp. são um gênero de bactérias gram-positivas, capazes de produzir esporos bacterianos e são encontradas em todos os ambientes, podendo ser encontrados no solo, nas rochas, na poeira, ambientes aquáticos e no intestino de animais/insetos (FELSKE, 2004). Esse gênero de bactérias é normalmente encontrado em ambientes aeróbicos, entretanto, alguns estudos identificaram que essas bactérias são capazes de crescer e esporular em ambientes anaeróbicos (NAKANO et al., 1997; TAM et al., 2006) e também resistir a sucos gástricos (DUC et al., 2003; SPINOSA et al., 2000). Essas bactérias normalmente são encontradas na sua forma esporulada ou na sua forma vegetativa, sendo a forma esporulada a mais comumente encontrada nos probióticos (CUTTING, 2011).

Os esporos são uma forma desidratada que as bactérias gram-positivas entram quando a uma diminuição na quantidade de nutrientes no meio e também o ambiente em que ela se encontra apresenta condições capazes de matar essas bactérias quando se encontram na sua forma vegetativa (NICHOLSON et al., 2000). O esporo bacteriano é formado por um córtex rico em peptidoglicano, uma membrana celular, uma parede celular e uma capa protetora, que fornecem proteção ao interior do esporo, onde se encontra um núcleo, composto por um cromossomo condensado e inativado (HENRIQUES & MORAN, 2007). Essas bactérias quando em seu estado de esporo, são resistentes a uma variedade de condições ambientais, como pH ácido, ambientes anaeróbicos, altas temperaturas e a exposição de raios UV (BERNARDEAU et al., 2017; NICHOLSON et al., 2000). Os esporos quando encontram condições adequadas para a sua sobrevivência voltam a germinar, quebrando suas camadas protetoras, permitindo a entrada de água e outras substâncias como Aminoácido e açúcares que causaram uma ativação do núcleo que se encontra inativo, fazendo com que a bactéria retorne a sua fase vegetativa (MOIR, 2006). Uma vez ativadas, essas bactérias são capazes de germinar, proliferar e esporular novamente no ambiente em que encontram (TAM et al., 2006).

Dentro do gênero *Bacillus* sp, duas cepas merecem destaque, sendo elas as bactérias do gênero *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*. Essas bactérias, quando fornecidas em conjunto, fornecem diversos efeitos benéficos ao hospedeiro (BERNARDEAU et al., 2017). Elas são capazes de formar biofilme no ambiente em que estão presentes. Esse biofilme formado gera uma proteção contra a adesão de bactérias maléficas aos hospedeiros, reduzindo o risco de danos à saúde (SEGURA

et al., 2020). Essa combinação também é capaz de induzir a produção de mucina, que serve como uma barreira no epitélio ruminal, servindo como reservatório de peptídeos e imunoglobulinas A (IgA), que auxiliam no combate de patógenos presentes no lúmen intestinal (SANTANO et al., 2020).

Outro efeito benéfico da utilização de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*, é perante as características digestivas dos animais. GUOHUA & ANSHAN (2007) citam que a utilização de um probiótico à base de *Bacillus licheniformis* foi capaz de aumentar a quantidade de microrganismos ruminais, maior quantidade de ácidos graxos saturados e de propionato, além de diminuir as concentrações de amônia e ácido láctico. Nesse mesmo estudo, foi observado que o uso de *Bacillus licheniformis* foi capaz de aumentar a produção de leite e o teor de proteína do leite. *Bacillus sp.* produzem enzimas que podem facilitar o acesso dos microrganismos aos nutrientes, melhorando assim, a digestibilidade de forragens e concentrados (PECH-CERVANTES et al., 2019). PAN e colaboradores (2022), constataram que o uso combinado de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* aumentou a digestibilidade *in vitro* da matéria seca e fibra em detergente neutro (FDN) em 8 de 10 fontes diferentes de forragem.

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

A hipótese do trabalho é que o uso de um probiótico à base de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* é capaz de diminuir os efeitos do período de transição frente ao desempenho zootécnico, aumentar a produção e o teor de sólidos do leite, aumentar o consumo de matéria seca, melhorar a eficiência da produção de leite.

3.2 Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do uso combinado de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* no desempenho produtivo, qualidade do leite e eficiência alimentar de vacas da raça Holandês em período de transição.

3.3 Objetivos Específicos

1. Avaliar o efeito do probiótico no aumento da produção de leite de vacas leiteiras no período de transição
2. Avaliar o efeito do probiótico no aumento no teor de sólidos do leite de vacas leiteiras no período de transição
3. Avaliar o efeito do probiótico no consumo de matéria seca de vacas leiteiras no período de transição
4. Avaliar o efeito do probiótico no pH e escore fecal de vacas leiteiras no período de transição
5. Avaliar o efeito do probiótico frente ao peso e escore de condição corporal de vacas leiteiras no período de transição

4 CAPÍTULOS

4.1 Artigo 1

Efeito do uso de um produto probiótico a base de duas cepas de *Bacillus* sp. sobre a eficiência alimentar e produção leiteira de vacas da raça Holandês no período de transição

este artigo será submetido à revista Animals

Efeito do uso de um produto probiótico (Bovacillus) a base de duas cepas de *bacillus* sp. no desempenho produtivo, parâmetros de qualidade do leite e comportamento alimentar de vacas da raça holandês no período de transição.

BARBOSA, M. W. M., LONDERO, U. S.; MARINS, L; NICOLA, M. S.; VELASQUEZ, B.; CORRÊA, M. N.

Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária – NUPEEC, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

*Autor para correspondência: Marcio Nunes Corrêa
Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Capão do Leão, RS,
Brasil, Cep: 96010-000.
E-mail: marcio.nunescorreia@gmail.com

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do uso combinado de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* no desempenho produtivo, qualidade do leite e eficiência alimentar de vacas da raça Holandês em período de transição. Vinte e seis vacas da raça Holandês, 30 dias antes do parto, foram separadas conforme o peso e número de lactações em dois grupos: Grupo Bovacillus (n=13; Peso vivo: 723 ± 103), recebendo uma dieta totalmente misturada (TMR) com a adição de 3g/vaca/dia de um probiótico comercial a base de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*; Grupo Controle (n=13; Peso vivo: 708 ± 90), recebendo somente a TMR, sem a adição do probiótico. Os animais foram alocados em galpões do tipo *compost barn* no início do experimento e foram acompanhados entre o período de trinta dias pré-parto e sessenta dias pós-parto. Diariamente era mensurado o consumo de matéria verde e feitas coletas da dieta para mensuração diária da matéria seca. Também era feito diariamente o controle da produção de leite individual. Nos dias -30, -14, -4, 0, 4, 14, 30 e 60 as vacas foram pesadas com utilização de fita métrica e também tiveram seu escore de condição corporal (ECC) avaliado entre 1 e 5. Cada animal contou com 5 coletas de leite cru para análise de composição (gordura, proteína, lactose, Contagem de Células Somáticas (CCS), Sólidos Totais (ST) e Extrato Seco Desengordurado (EST)). Após a obtenção dos resultados de produção de leite, consumo de matéria seca e composição do leite, foi calculada a eficiência alimentar, o leite corrigido para gordura e energia. Foi possível observar que o uso de um probiótico à base de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* foi capaz de aumentar a produção de leite, quantidade de Leite Corrigido para Gordura (LCG) e Leite Corrigido para Energia (LCE), além de aumentar a ingestão de matéria seca e diminuir os níveis de CCS (p<0,05), entretanto, a eficiência alimentar foi maior no grupo que não recebeu a suplementação com o probiótico (p<0,05). Não houve efeito do probiótico sobre os teores de proteína, gordura, lactose, EST, ST, L pH e escore de fezes, assim como, peso e ECC. A partir disto conclui-se que o uso de um probiótico a base de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* é capaz de aumentar o consumo de matéria seca, produção de leite, diminuir os valores de CCS do leite e melhorar os valores de LCG e LCE.

Palavras-chave: Aditivos, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, Pecuária de Leite.

Abstract

The present study aimed to evaluate the effect of the combined use of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* on the productive performance, milk quality and feed efficiency of Holstein cows in the transition period. Twenty-six Holstein cows, 30 days before calving, were separated by weight and number of lactations into two groups: Bovacillus Group (n=13; Live weight: 723 ± 103), receiving a fully mixed diet (TMR) with the addition of 3g/cow/day of a commercial probiotic based on *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*; Control Group (n=13; Body weight: 708 ± 90), receiving only the TMR, without the addition of the probiotic. The animals were placed in compost barns at the beginning of the experiment and were monitored between thirty days pre-partum and sixty days post-partum. Green matter consumption was measured daily, and dietary samples were taken to measure daily dry matter. Individual milk production was also monitored daily. On days -30, -14, -4, 0, 4, 14, 30 and 60, the cows were weighed using a measuring tape and also had their body condition score (BCS) evaluated between 1 and 5. Each animal was contoured with 5 collections of raw milk for composition analysis (fat, protein, lactose, Somatic Cell Count (SCC), Total Solids (TS) and Defatted Dry Extract (EST)). After obtaining the results of milk production, dry matter consumption and milk composition, feed efficiency was calculated, the milk corrected for fat and energy. It was possible to observe that the use of a probiotic based on *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* was able to increase milk production, the amount of Milk Corrected for Fat (LCG) and Milk Corrected for Energy (LCE), in addition to increasing the intake of dry matter and decreased CCS levels ($p < 0.05$), however, feed efficiency was higher in the group that did not receive probiotic supplementation ($p < 0.05$). There was no effect of the probiotic on the levels of protein, fat, lactose, EST, ST, L pH and stool score, as well as weight and BCS. From this it can be concluded that the use of a probiotic based on *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* can increase dry matter consumption, milk production, reducing milk SCC values and improving LCG and LCE values.

Key words: Additives, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, Dairy Farming.

4.1.1 Introdução

Durante a vida produtiva das vacas leiteiras, existem diversas fases em que os animais são desafiados (SERRENHO et al., 2022). Dentre essas fases, o período de transição é a mais desafiadora para os bovinos leiteiros, pois passam por diversas alterações físicas, hormonais, metabólicas, dietéticas e de manejo (PROUDFOOT, 2023). Redução na ingestão de matéria seca (IMS), balanço energético negativo (BEN), redução nas taxas reprodutivas, menor desempenho produtivo e ocorrência de doenças metabólicas são problemas relacionados ao período de transição (BOMBA, et al., 2015; KUHLA., 2015; NETO et al., 2011, LEBLANC, 2023), sendo a gravidade de cada um desses fatores relacionados com a adaptação da vaca às mudanças ocorridas nessa fase (DENIZ et al., 2020).

Tendo em vista a importância da saúde da vaca leiteira no período de transição para sua vida produtiva, tem-se buscado alternativas nutricionais para reduzir o impacto dessa fase (VÁRHIDI et al., 2022). Os probióticos são definidos como organismos vivos que quando consumidos em concentrações apropriadas, são benéficos à saúde de quem os consome (SANDERS, 2008). Estes são organismos viáveis e não patogênicos, sendo sua suplementação benéfica ao hospedeiro, além de competir com microrganismos patogênicos (UYENO et al., 2015). Seus efeitos no organismo do animal são diversos, pois são capazes de melhorar a digestibilidade e o aproveitamento dos nutrientes, modular a flora microbiana do rúmen e estabilizar o pH ruminal, reduzindo a quantidade de ácido lático e a chance de desenvolver acidose ruminal subaguda (CHAUCHEYRAS-DURAND et al., 2008; VYAS et al., 2014).

Entre esses estão os *Bacillus sp.*, que são gêneros de bactérias gram-positivas capazes de se esporular e sobreviver em ambientes onde normalmente outros gêneros de bactérias não seriam capazes de sobreviver (BERNARDEAU et al., 2017; NICHOLSON et al., 2000). Dentre as diversas espécies de *Bacillus*, o uso de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* tem demonstrado efeitos positivos na produção de leite, leite corrigido para gordura, leite corrigido para energia e também componentes do leite, como gordura, proteína e lactose (LAMONTAGNE et al., 2023), além de também serem capazes de melhorar a degradabilidade dos alimentos a nível ruminal (QIAO et al., 2010). Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do uso combinado de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* sobre a eficiência alimentar e desempenho produtivo de vacas da raça Holandês em período de transição.

4.1.2 Metodologia

O estudo foi realizado em uma fazenda comercial de bovinos leiteiros localizada no Sul do Brasil (32°16' S, 52° 32' W). Todos os procedimentos utilizando animais foram aprovados pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Pelotas, sob o número 016526/2023-64.

Vinte e seis vacas da raça Holandês, 30 dias antes do parto, foram separadas conforme o peso e número de lactações (1 a 4 lactações) em dois grupos: Grupo Bovacillus (n=13; Peso vivo: 723 ± 103), recebendo uma dieta totalmente misturada (TMR; Tabelas 1) mais a adição de 3g/vaca/dia (3,20 × 10⁹ esporos viáveis/g) de um probiótico comercial (Bovacillus, Christian Hansem, cidade, USA) a base de *Bacillus licheniformise Bacillus subtilis*, inserido no vagão misturador responsável pela mistura da dieta do grupo; e Grupo Controle (n=13; Peso vivo: 708 ± 90), recebendo somente a TMR, sem a adição do probiótico. As vacas foram alojadas em galpão coberto do estilo *compost-barn*. Todas as vacas a partir do dia do parto (D0) até os 60 dias pós-parto (D60) foram ordenhadas três vezes ao dia, tendo as produções de leite registradas individualmente em litros e somados para ter os valores de produção diária (litros/dia), os procedimentos de ordenha foram realizados conforme manda a legislação vigente no Brasil (IN 77) para boas práticas agropecuárias para fornecedores de leite.

Tabela 1: Quantidade, ingredientes e análise bromatológica da dieta de vacas em lactação utilizadas no estudo.

Ingredientes	Matéria Seca (%)	Quantidade incluída na dieta (kg)
Silagem de milho	32,5	42,0
Ração comercial para alta lactação	88,7	10,5
Resíduo Cervejaria Úmido	25,0	6,0
Pré-secado de azevem e trevo persa	44,2	5,5
Análise bromatológica		
Nutrientes	Unidade	Quantidade
Matéria Seca	%	42,02
Umidade	%	57,98
Energia da forragem	mcal/kg	1,67

Proteína bruta ajustada	%	16,49
Proteína degradável no rúmen	%	11,03
Proteína não degradável no rúmen	%	5,55
Solubilidade da Proteína degradável no rúmen	%	4,29
Solubilidade da proteína (% da PB)	ratio	25,88
Solubilidade da proteína degradável no rúmen (% da PB)	ratio	66,51
Solubilidade da proteína não degradável no rúmen (% da PB)	ratio	33,48
Nitrogênio não protéico	%	0,40
Histamina	g/kg	2,35
Metionina	g/kg	2,51
Lignina	%	0,54
FDA	%	20,15
FDN	%	32,84
FDN de Forragem	%	22,58
Digestibilidade da FDN	%	17,69
FDN efetiva	%	25,52
FDN fisicamente efetiva	%	19,91
Total de AGV no rúmen	g/kg	254,03
Gordura	%	3,91
Gordura insaturada	%	2,91

Uma vez ao dia, no período da manhã, a TMR era fornecida separadamente para cada um dos grupos experimentais nos cochos mensuradores de consumo (Intergado®, Brasil). A preparação da dieta era feita utilizando vagões misturadores diferentes para cada tratamento, fazendo com que não houvesse resíduos do probiótico na dieta do grupo Controle e assim, não podendo interferir no seu desempenho. Além disso, também era fornecida separadamente as dietas por estágio produtivo, onde as vacas pré-parto [D-30 até o dia do parto (D0)] recebiam TMR calculada para vacas pré-parto e as vacas pós-parto (D0 a D60), recebiam dieta para vacas em pico de lactação. A separação por estágio produtivo era feita no cocho, onde

os animais possuíam um brinco eletrônico e esse brinco fazia a abertura do cocho que continha a dieta de acordo com o estágio produtivo da vaca.

As dietas foram formuladas para atender ou exceder os requerimentos para vacas secas e lactantes, conforme o NRC 2021 conforme apresentado na tabela 1. Todos os animais possuíam livre acesso a água limpa e fresca *ad libitum*. O consumo da dieta era mensurado conforme o acesso dos animais nos cochos, os quais coletavam informações referentes ao consumo de matéria verde de cada animal por dia.

A matéria seca da dieta era determinada diariamente, sendo coletada separadamente por grupo e estágio produtivo, resultando em quatro análises de matéria seca diárias. A mesma era mensurada em aparelho elétrico com ventilação forçada (AirFryer), onde era pesado 100g da matéria verde coletada da dieta e submetida ao aquecimento em ventilação forçada a 120°C por 30 minutos, após a matéria era pesada e posto novamente ao aquecimento por mais 5 minutos (RIBEIRO, 2019). O processo era repetido até que o peso da amostra apresentasse um valor constante, sendo esse, o valor da matéria seca da mesma.

O consumo de matéria seca (CMS) dos animais era mensurado individualmente e estimado de acordo com o consumo de matéria verde obtido pelo cocho mensurador de consumo e pelo valor da matéria seca da respectiva dieta consumida. A mensuração era feita de acordo com a equação: $CMS = (\text{consumo de matéria verde} \times \text{valor da matéria seca}) / 100$. Já a eficiência alimentar foi calculada como a quantidade de leite produzida no dia (kg) dividido pelo consumo de matéria seca por dia (Kg).

Nos dias -30, -14, -4, 0, 4, 14, 30 e 60, as vacas foram pesadas com utilização de fita métrica (HEINRICHS et al., 2007) e também tiveram seu escore de condição corporal (ECC) avaliado entre 1 e 5 (EDMONSON et al., 1989). Foi considerado ganho de peso e ganho de ECC, valores de peso e ECC maiores do que as vacas apresentavam no dia de entrada no estudo (D-30), já a perda de peso e ECC, se dava quando os animais apresentavam esses parâmetros inferiores aos observados no dia de entrada do experimento. Além do peso e do ECC, nesses dias, também era feita a coleta individual de fezes e também avaliação do escore fecal. As fezes eram coletadas individualmente por meio de estímulo retal e armazenamento dessas em saco plástico esterilizado. O pH era medido por meio de um pHmetro digital (pHmetro digital portátil pHteck, Brasil), inserindo o mesmo nas fezes coletas; já o escore foi

avaliado conforme a metodologia descrita por LITHERLAND, 2007., conforme a seguinte pontuação do escore fecal: escore fecal 1: o estrume é muito líquido (diarreia), indicando excesso de proteína ou amido; escore fecal 2: o estrume aparece solto, não forma uma pilha, muitas vezes causados por uma falta de fibra efetiva na dieta; escore fecal 3: esta é a pontuação ideal, este estrume vai empilhar entorno de 5cm de altura, com vários anéis concêntricos com uma pequena depressão da covinha no meio; escore fecal 4: este estrume é mais espesso e forma pilhas de mais de 5cm (vacas secas devem ter essa pontuação); escore fecal 5: este estrume aparece como espessas bolas fecais

Semanalmente, eram realizadas coletas individuais de leite cru, nas três ordenhas do dia. Embora as amostras fossem coletadas nas três ordenhas, era feita uma média dos resultados obtidos nessas representando os valores para cada vaca no dia coletado, no total foram obtidas 5 coletas para cada animal. As amostras coletadas eram armazenadas em recipiente contendo bronopol como conservante antimicrobiano e enviadas para o laboratório Uniánalises, credenciado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e Acreditado no Inmetro sob número CRL 0754. Foi quantificado contagem de células somáticas (CCS), concentrações de gordura, proteína, lactose, extrato seco desengordurado (ESD) e sólidos totais (ST).

Após a obtenção dos resultados da composição do leite e também de produção do leite, foi calculado os valores do leite corrigido para gordura em 3,5% (LTG) e também do leite corrigido para energia (LCE), conforme as equações:

$$LCG\ 3,5\% = (0,4255 \times \text{kg leite}) + [16,425 \times (\% \text{ gordura} , 100) \times \text{kg leite}]$$

$$LCE = (12.82 \times \text{gordura, kg/L}) + (7.13 \times \text{proteína, kg/L}) + (0.23 \times \text{produção de leite, kg})$$

Todos os dados foram analisados através da análise de variância (modelo misto) no *software* estatístico JMP® PRO 17 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). Todas as variáveis foram analisadas com o teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade. Somente a variável CCS que não apresentou distribuição normal, foi transformada em LOG para a realização do teste estatístico e depois transformada novamente em numeral para apresentação dos dados.

As variáveis independentes usadas foram: vaca, grupo, semana/dia de coleta. Já as variáveis dependentes foram: peso, ECC, produção de leite, gordura, proteína,

lactose, CCS, consumo de matéria seca, eficiência alimentar, escore fecal, pH fecal, leite corrigido para gordura, leite corrigido para energia, sólidos totais, extrato seco desengordurado. Todas as variáveis dependentes também foram avaliadas considerando as semanas e/ou dias, sendo que a comparação entre os grupos considerou pontos de todas as coletas, dependendo das variáveis analisadas (Dias pré-parto e/ou DEL ou 1, 2, 3, 4 e 5 semanas). A significância foi determinada em $p < 0,05$ e as tendências em $p < 0,10$.

4.1.3 Resultados

Sobre a produção de leite (tabela 2), a suplementação de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* foi capaz de aumentar a produção de leite ($p < 0,001$), mas não foi possível observar efeito na interação entre os grupos e dias em lactação (Figura 1A). A CCS foi diferente entre os grupos ($p = 0,0370$), onde o grupo suplementado com probiótico apresentou menor CCS que o grupo Controle (Figura 1B), já os teores de gordura, proteína, lactose, ESD e ST, não apresentaram diferença entre os grupos ($p > 0,05$).

Já a eficiência alimentar (tabela 2), valores de leite corrigido para gordura em 3,5% e leite corrigido para energia também foram diferentes entre os grupos ($p < 0,001$), onde o grupo alimentando com probiótico a base de esporos de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* apresentou melhor eficiência alimentar (Figura 1C) e maiores volumes de leite corrigido para gordura em 3,5% (Figura 1D) e leite corrigido para energia (Figura 1E).

Tabela 2: Valores médios da produção de leite cru, leite corrigido para gordura, leite corrigido para energia, composição do leite e eficiência alimentar de vacas alimentadas ou não com probiótico a base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*.

Parâmetros	Bovacillus ³ Controle		Valores de P		
			Grupo	Semana/ dia	Grupo* Semana/dia
Produção de Leite (L)	40,33	35,39	<0,001	<0,001	1
LCG (3,5%) (L) ¹	40,90	37,14	<0,001	<0,001	1
LCE (L) ²	36,63	33,07	<0,001	<0,001	1
Eficiência alimentar (L/Kg)	1,98	2,25	<0,001	-	-
Gordura%	3,58	3,8	0,11	0,77	0,90
Proteína%	3,07	3,05	0,68	0,01	0,74
Lactose%	4,53	4,48	0,19	0,13	0,79
CCS (x1000 cél./mL)	944,61	1616,60	0,04	0,95	0,90
Sólidos Totais%	12,16	12,3	0,40	0,40	0,85
Extrato Seco%	8,62	8,56	0,37	0,54	0,53
Desengordurado%					

¹Leite Corrigido para gordura em 3,5%. ²Leite Corrigido para energia. ³Bacillus licheniformis e Bacillus subtilis.

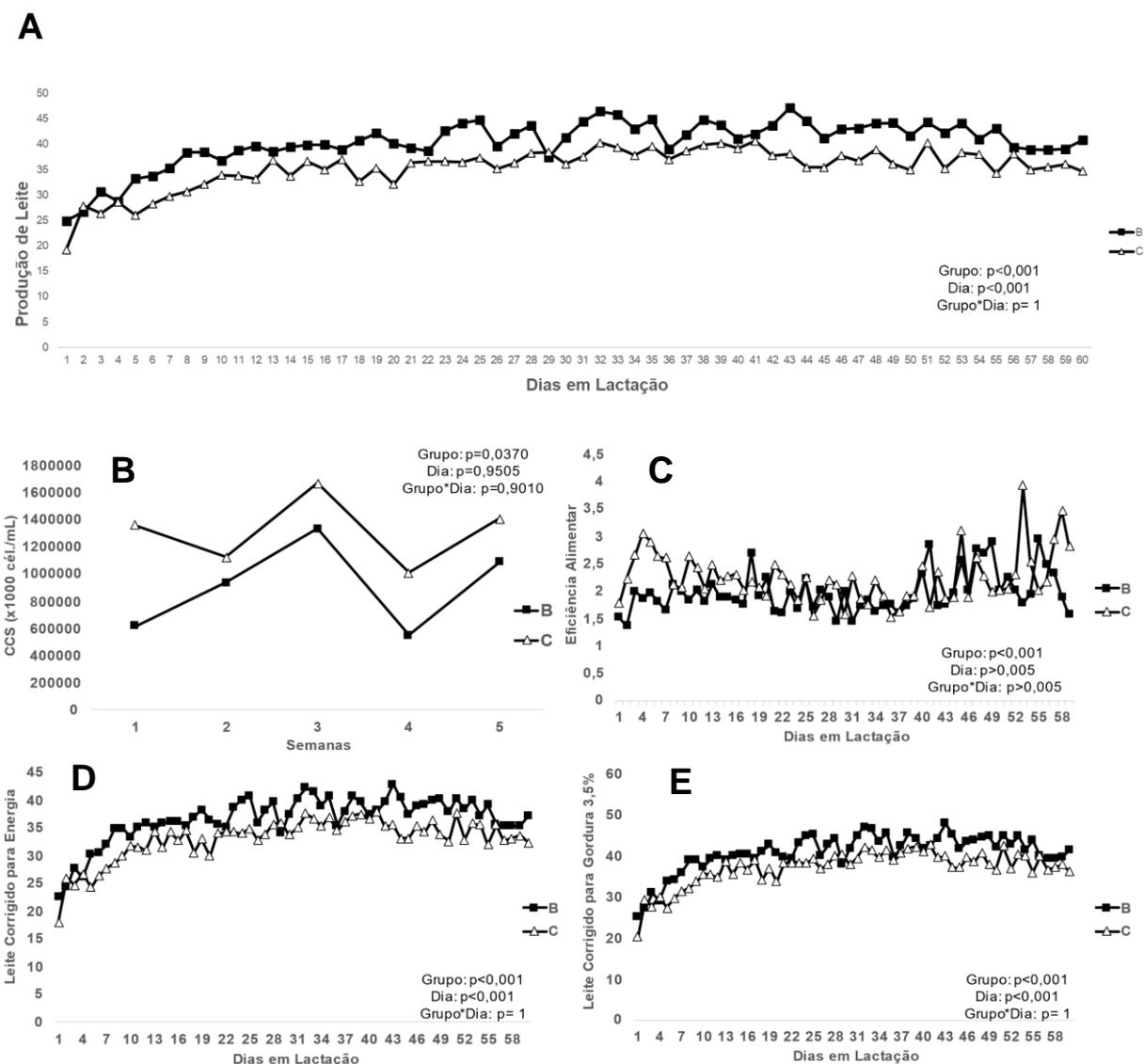


Figura 1: Produção de leite (A), contagem de células somáticas (B), eficiência alimentar (C), leite corrigido para energia (D) e leite corrigido para gordura 3,5 (E), de vacas suplementadas com probiótico a base de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* durante o período de transição.

Os parâmetros de desempenho zootécnico estão descritos na tabela 3. O consumo de matéria seca foi diferente no pré e pós-parto, como também na soma dos períodos ($p < 0,001$), tendo o grupo Bovacillus apresentado um consumo maior de matéria seca (Figura 2A). O peso vivo não foi diferente no período pré-parto ($p > 0,005$), entretanto, apresentou diferença no período pós-parto e na soma dos períodos ($p < 0,005$; Figura 2B). O escore de condição corporal não apresentou diferença durante o período pré-parto, tampouco na somando dos períodos ($p > 0,005$); sendo diferente somente no período pós-parto ($p < 0,005$; figura 2C). O escore fecal foi

diferente apenas no período pós-parto ($p < 0,005$) e o pH fecal não demonstrou diferença ($p > 0,005$).

Tabela 3: Média do consumo, Peso vivo, ECC, escore fecal e pH fecal, durante os períodos pré, pós e soma dos períodos de avaliação de vacas alimentadas com probiótico a base de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* ou controle.

Parâmetros	Bovacillus ³	Controle	Valores de P		
			Grupo	Coleta	Grupo*Coleta
Pré-Parto					
CMS ¹ (Kg)	15,2164	12,474	<0,001	0,0813	0,698
Peso Vivo (Kg)	737	724	0,1738	0,7823	0,8577
ECC ²	3,45	3,59	0,8253	0,4988	0,8397
Escore Fecal	2,77	2,25	0,8781	0,6377	0,5593
Ph Fecal	6,66	6,64	0,8781	0,6377	0,5593
Pós-Parto					
CMS ¹ (Kg)	21,82	18,08	<0,001	<0,001	0,3977
Peso Vivo (Kg)	731,65	676,24	0,001	0,5244	0,9887
ECC ²	3,23	3	0,0153	0,4739	0,2749
Escore Fecal	2,65	2,34	0,0097	<0,001	0,1573
Ph Fecal	6,42	6,41	0,8401	<0,0001	0,5952
Todo o período					
CMS ¹ (Kg)	19,34	16,19	<0,001	<0,001	0,8
Peso Vivo (Kg)	731,65	676,24	0,001	0,1359	0,0879
ECC ²	3,23	3	0,07	0,01	0,27
Escore Fecal	2,65	2,34	0,9405	<0,0001	0,8429
Ph Fecal	6,42	6,41	0,801	<0,0001	0,7684

¹Consumo de Matéria Seca. ² Escore de Condição Corporal. ³Bacillus licheniformis e Bacillus subtilis.

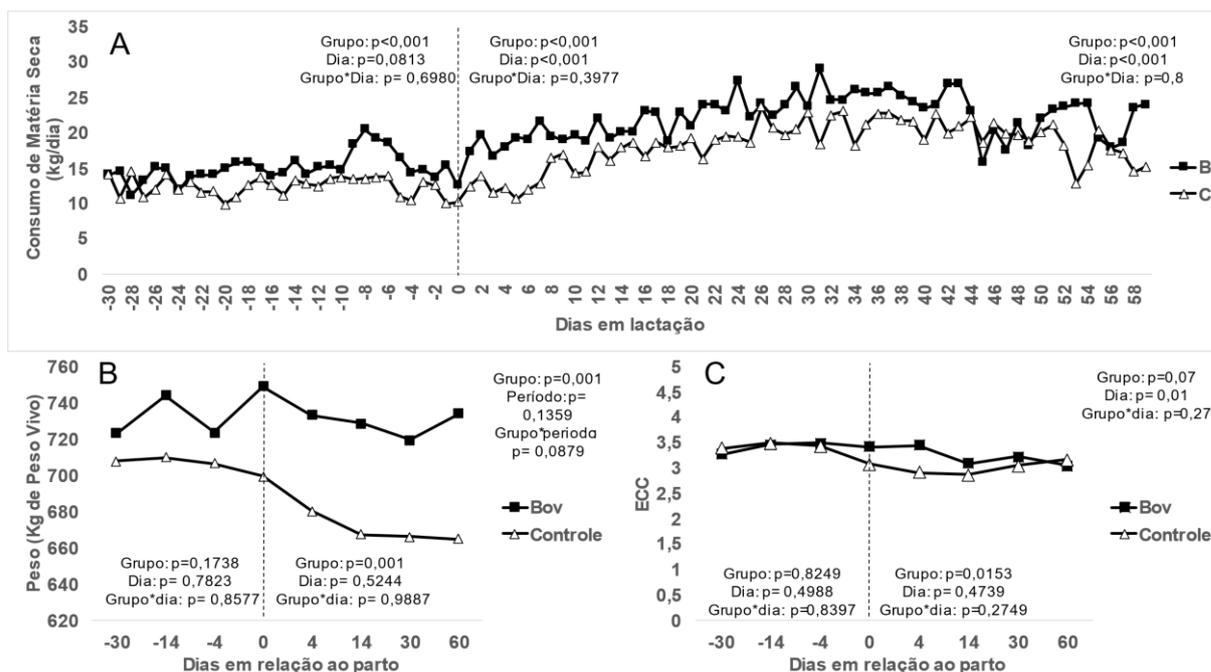


Figura 2: Consumo de matéria seca (A), Peso vivo (B) e Escore de condição corporal (C), de vacas suplementadas com probióticos a base de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* ou controle, durante o período pós-parto.

4.1.4 Discussão

Foi possível observar que o uso de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* foi capaz de aumentar o CMS, aumentou a produção de leite, LCG, LCE e apresentou melhor eficiência alimentar que o grupo controle. A produção de leite foi maior para o grupo que recebeu a suplementação com o probiótico, o que corrobora com os resultados achados em outros estudos, embora nosso período de suplementação tenha sido maior que os estudos citados (SOUZA et al., 2017; JIA et al., 2022; LAMONTAGNE et al., 2022). O aumento na produção de leite é possivelmente decorrente do menor custo energético com resposta imune, da maior ingestão dos alimentos e também pela maior absorção dos nutrientes no intestino, deixando uma maior quantidade de nutrientes disponíveis para síntese de leite na glândula mamária (SUN et al., 2013; JIA et al., 2022).

Os efeitos no CMS da suplementação de probióticos a base de *Bacillus* sp. não é consistente na literatura, onde estudos apresentaram redução no CMS (GOETZ et al., 2022), aumento no CMS (JIA et al., 2022) e até mesmo não demonstrando efeito (SOUZA et al., 2017; LAMONTAGNE et al., 2022). Porém, nossos resultados vão de

encontro com o que é abordado na literatura, uma vez que a produção de leite está diretamente ligada ao consumo de matéria seca, que acaba disponibilizando maior quantidade de energia para síntese de leite na glândula mamária (KRAATZ et al., 2009). Embora não tenham observado maior CMS, outros estudos observaram um aumento na produção, no LCE e LCG (SUN et al., 2013; SOUZA et al., 2017; JIA et al., 2022). JIA e colaboradores (2022), acreditam que o efeito do maior consumo de matéria seca é decorrente do efeito da melhora da imunidade e uma sobra de energia que seria destinada ao combate de enfermidades, também devido a melhora da digestão dos alimentos no rúmen e da maior absorção dos nutrientes a nível intestinal. Entretanto, mais estudos são necessários para compreender esse dinamismo.

Juntamente ao maior consumo de matéria seca, uma menor resposta inflamatória também pode ser fator responsável pelo aumento na produção de leite. Durante o período de transição, ocorrem diversos tipos de estresses, como estresses ambientais, sociais, nutricionais e fisiológicos, que acabam por afetar a integridade da barreira intestinal e gerar ativação do sistema imune, causando um processo inflamatório no local (BERTONI et al., 2018). Vacas mesmo que saudáveis acabam passando por um processo inflamatório após o parto (TREVISI et al., 2012), sendo diferente apenas a gravidade da resposta inflamatória (HUZZEY et al., 2009). O custo para gerar um processo inflamatório robusto é energeticamente caro e tem preferência sobre a síntese de leite (JOHNSON, 2012; KVIDERA, et al., 2017), o que corrobora com os resultados obtidos, pois as vacas do grupo com suplementação com probiótico, além de aumentar a produção de leite, também tiveram uma redução CCS, que é o principal marcador de processo inflamatório na glândula mamária. CCS alta no parto e depois deve diminuir, por alta concentração de células epiteliais, e não leucócitos. CCS x produção de leite

No presente estudo, as vacas suplementadas com as duas espécies de bacillus apresentaram menor quantidade de células somáticas no leite, demonstrando menor custo energético com processos inflamatórios. A CCS é um importante marcador da saúde do úbere por quantificar as células somáticas presentes no leite, constituídas principalmente por células epiteliais descamadas, macrófagos e neutrófilos (ALHUSSIEN; DANG., 2018). Animais que apresentam maiores níveis de CCS podem possuir concentrações aumentadas de NEFA e BHB devido ao maior requerimento energético causado pela inflamação na glândula mamária (BOUVIER-MULLER et al., 2016). Nossos resultados vão ao encontro de outro trabalho que aborda o uso de

Bacillus subtilis, em que diminuiu a CCS do leite, mas o mecanismo de ação não é claro (SUN et al., 2013).

Um impacto benéfico do uso de probióticos à base de *Bacillus* na resposta imune foi obtido usando ratos como modelo para doença intestinal (SELVAM et al., 2009) e em porcas gestantes (ZHANG et al., 2020). O uso de *Bacillus subtilis* é capaz de reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ e aumentar os níveis de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (SELVAM et al., 2009).

O pH fecal é um parâmetro que se observa uma redução acentuada no pós-parto recente devido a transição de uma dieta rica em fibras para uma dieta adensada em energia e proteína para suprir as demandas da lactação (MCCARTHY et al., 2020). Esperava-se que a suplementação com *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* fosse aumentar o pH fecal, demonstrando um aumento na saúde intestinal (ABEYTA et al., 2023). Entretanto, no presente estudo não é possível observar diferença no pH fecal entre os grupos. O escore fecal foi diferente durante o período pós-parto, mas sem demonstrar diferença no período pré-parto e durante o período de transição como um todo. Uma redução no escore fecal normalmente pode estar relacionado com uma maior taxa de passagem de carboidratos do ambiente ruminal para o lúmen intestinal, que por consequência, aumenta a fermentação desse nutriente no lúmen intestinal e causa acúmulo de ácidos orgânicos, levando a uma disbiose da microbiota local (GRESSLEY et al., 2011; PLAIZIER et al., 2017). O aumento da acidez e da osmolaridade do intestino grosso causada pelo acúmulo de AGNES, acaba não apenas dificultando a fermentação e a absorção de nutrientes (HOLTUG et al., 1992; PLAIZIER et al., 2008), mas também pode anular os mecanismos de defesa da mucosa, causando secreção patológica de muco e fluidos, levando a diarreia (PLAIZIER et al., 2008).

Esses resultados demonstram que os animais tratados com o Bovacillus sofreram menos os efeitos do período de transição, sendo mais eficientes na produção de leite, consumindo maior quantidade de matéria seca, também apresentando uma maior resposta imune, o que acaba por utilizar melhor a energia disponível sem necessitar mobilizar as reservas corporais de maneira robusta.

4.1.5 Conclusão

A adição de um probiótico à base de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* foi capaz de aumentar o consumo de matéria seca pré e pós-parto, aumentar a produção de leite, leite corrigido para gordura 3,5% e leite corrigido para energia, reduzir os valores de CCS do leite, melhorar a eficiência alimentar.

4.1.6 Referencias

ABEYTA, M. A.; HORST, E. A.; GOETZ, B. M.; RODRIGUEZ-JIMENEZ, S.; MAYORGA, E. J.; AL-QAISI, M.; BAUMGARD, L. H. Effects of hindgut acidosis on inflammation, metabolism, and productivity in lactating dairy cows fed a high-fiber diet. **Journal of Dairy Science**, v. 106, n. 4, p. 2879-2889, 2023.

ALHUSSIEN, M. N.; DANG, A. K. Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview. **Veterinary world**, v. 11, n. 5, p. 562, 2018.

BERNARDEAU, M. LEHTINEN, M. J., FORSSTEN, S. D., & NURMINEN, P. Importance of the gastrointestinal life cycle of *Bacillus* for probiotic functionality. **Journal of food science and technology**, v. 54, n. 8, p. 2570-2584, 2017.

BERTONI, G.; TREVISI, E.; HAN, X.; BIONAZ, M. Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 91, n. 9, p. 3300-3310, 2008.

BOMBA, Lorenzo et al. Relative extended haplotype homozygosity signals across breeds reveal dairy and beef specific signatures of selection. **Genetics Selection Evolution**, v. 47, p. 1-14, 2015.

BOUVIER-MULLER, J.; ALLAIN, C.; ENJALBERT, F.; TABOURET, G.; PORTES, D.; CAUBET, C; RUPP, R Response to dietary-induced energy restriction in dairy sheep divergently selected for resistance or susceptibility to mastitis. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 1, p. 480-492, 2016.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; WALKER, N. D.; BACH, A. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, n. 1-4, p. 5-26, 2008.

DENIZ, A.; AKSOY, K.; METIN, M. Transition period and subclinical ketosis in dairy cattle: association with milk production, metabolic and reproductive disorders and economic aspects. **Medycyna Weterynaryjna**, v.76, n.9, p.495-502, 2020.

GOETZ, B. M.; ABEYTA, M. A.; RODRIGUEZ-JIMENEZ, S.; MAYORGA, E. J.; OPGENORTH, J.; JAKES, G. M.; BAUMGARD, L. H.. Effects of *Bacillus subtilis* PB6 supplementation on production, metabolism, inflammatory biomarkers, and gastrointestinal tract permeability in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 2023

GRESSLEY, T. F.; HALL, M. B.; ARMENTANO. "Ruminant nutrition symposium: productivity, digestion, and health responses to hindgut acidosis in ruminants." **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 4, p. 1120-1130, 2011.

HOLTUG, K.; CLAUSEN, M. R.; HOVE, H.; CHRISTIANSEM, J.; MORTENSEN, P. B. The colon in carbohydrate malabsorption: short-chain fatty acids, pH, and osmotic diarrhoea. **Scandinavian journal of gastroenterology**, n.27, v.7, p.545-552, 1992.

HUZZEY, J. M.; DUFFIELD, T. F.; LEBLANC, S. J.; VEIRA, D. M.; WEARY, D. M.; VON KEYSERLINGK, M. A. G. Haptoglobin as an early indicator of metritis. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 2, p. 621-625, 2009.

JIA, P.; TU, Y.; LIU, Z.; LI, F.; YAN, T.; MA, S. Diets supplementation with *Bacillus subtilis* and *Macleaya cordata* extract improve production performance and the metabolism of energy and nitrogen, while reduce enteric methane emissions in dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 294, p. 115481, 2022.

JOHNSON, R. W. Fueling the immune response: what's the cost?. **Feed efficiency in swine**, p. 211-223, 2012.

KRAATZ, S.; BERG, W.; BRUNSCH, R. Factors influencing energy demand in dairy farming. **South African Journal of Animal Science**, v. 39, n. sup-1, p. 137-140, 2009.

KUHLA, B.; METGES, C. C.; HAMMON, H. M. Endogenous and dietary lipids influencing feed intake and energy metabolism of periparturient dairy cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 56, p. 2-10, 2016.

KVIDERA, S. K.; DICKSON, M. J.; ABUAJAMIEH, M.; SNIDER, D. B.; FERNANDEZ, M. S.; JOHNSON, J. S.; BAUMGARD, L. H. Intentionally induced intestinal barrier

dysfunction causes inflammation, affects metabolism, and reduces productivity in lactating Holstein cows. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 5, p. 4113-4127, 2017.

LAMONTAGNE, J.; RICO, D. E.; PERDOMO, C. M.; RONHOLM, J.; GERVAIS, R., CHOUINARD, P. Y. Effects of direct-fed *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on production performance and milk fatty acid profile in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 106, n. 3, p. 1815-1825, 2023.

LITHERLAND, N. Oklahoma Dairy Report – A dairy nutrition newsletter. **Oklahoma State University** n. 2, vol. 1, 2007.

MCCARTHY, C. S. et al. Energetic metabolism, milk production, and inflammatory response of transition dairy cows fed rumen-protected glucose. *Journal of dairy science*, v. 103, n. 8, p. 7451-7461, 2020.

NETO, A. C.; da Silva, J. F. C.; Deminicis, B. B.; Fernandes, A. M., Jardim, J. G., Amorim, M. M., & Guimarães Filho, C. C. Problemas metabólicos provenientes do manejo nutricional incorreto em vacas leiteiras de alta produção recém paridas. **REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 12, n. 11, p. 1-25, 2011.

NICHOLSON, W. L.; MUNAKATA, N.; HORNECK, G.; MELOSH, H. J.; SETLOW, P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 64, n. 3, p. 548-572, 2000.

PLAIZIER, J. C.; SHUCONG, L.; HEIN, M. T.; KHAFILOUR, E. "Nutritional models of experimentally-induced subacute ruminal acidosis (SARA) differ in their impact on rumen and hindgut bacterial communities in dairy cows." **Frontiers in Microbiology**, v.7, p.2128, 2017.

PROUDFOOT, K. L. ADSA Foundation Scholar Award: What makes for a good life for transition dairy cows? Current research and future directions. **Journal of Dairy Science**, v.106, n.9, p. 5896-5907, 2023.

QIAO, G. H.; SHAN, A. S.; MA, N.; MA, Q. Q.; SUN, Z. W. Effect of supplemental *Bacillus* cultures on rumen fermentation and milk yield in Chinese Holstein cows. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 94, n. 4, p. 429-436, 2010.

RIBEIRO, D. H. **Composição química bromatológica de *Andropogon gayanus* cultivar planaltina predita pelo NIRS e analisada por via úmida**. 2019. 30 f. TCC (Graduação) - Curso de Zootecnia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019

SANDERS, M. E. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. Supplement_2, p. 58-61, 2008.

SELVAM, R.; MAHESWARI, P.; KAVITHA, P.; RAVICHANDRAN, M.; SAS, B.; RAMCHAND, C. N. Effect of *Bacillus subtilis* PB6, a natural probiotic on colon mucosal inflammation and plasma cytokines levels in inflammatory bowel disease. **INDIAN Journal Of Biochemistry & Biophysic**, v. 46, n. 1, p. 79-85, 2009.

SERRENHO, R. C, Williamson, M., Berke, O., LeBlanc, S. J., DeVries, T. J., McBride, B. W., & Duffield, T. F. An investigation of blood, milk, and urine test patterns for the diagnosis of ketosis in dairy cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 9, p. 7719-7727, 2022.

SOUZA, V. L. LOPES, N. M.; ZACARONI, O. F.; SILVEIRA, V. A.; PEREIRA, R. A. N.; FREITAS, J. A.; PEREIRA, M. N. Lactation performance and diet digestibility of dairy cows in response to the supplementation of *Bacillus subtilis* spores. **Livestock Science**, v. 200, p. 35-39, 2017.

SUN, X.; WANG, Y.; LOOR, J. J.; BUCKTROUT, R.; SHU, X.; JIA, H.; LI, X. High expression of cell death-inducing DFFA-like effector a (CIDEA) promotes milk fat content in dairy cows with clinical ketosis. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 2, p. 1682-1692, 2019.

SUN, P.; WANG, J. Q.; DENG, L. F. Effects of *Bacillus subtilis* natto on milk production, rumen fermentation and ruminal microbiome of dairy cows. **animal**, v. 7, n. 2, p. 216-222, 2013.

TREVISI, E.; AMADORI, M., COGROSSI, S.; RAZZUOLI, E.; BERTONI, G Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows. **Research in veterinary science**, v. 93, n. 2, p. 695-704, 2012.

UYENO, Yutaka; SHIGEMORI, Suguru; SHIMOSATO, Takeshi. Effect of probiotics/prebiotics on cattle health and productivity. **Microbes and environments**, v. 30, n. 2, p. 126-132, 2015.

VÁRHIDI, Z.; MÁTÉ, M.; ÓZSVÁRI, L. The use of probiotics in nutrition and herd health management in large hungarian dairy cattle farms. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 957935, 2022.

VYAS, D.; UWIZEYE, A.; MOHAMMED, R.; YANG, W. Z.; WALKER, N. D.; BEAUCHEMIN, K. A. The effects of active dried and killed dried yeast on subacute ruminal acidosis, ruminal fermentation, and nutrient digestibility in beef heifers. **Journal of animal science**, v. 92, n. 2, p. 724-732, 2014.

WALLACE, R. L. et al. Effect of adverse health events on dry matter consumption, milk production, and body weight loss of dairy cows during early lactation. **Journal of dairy science**, v. 79, n. Suppl 1, p. 205, 1996.

ZHANG, Q.; LI, J.; CAO, M.; LI, Y.; ZHUO, Y.; FANG, Z.; WU, D. Dietary supplementation of *Bacillus subtilis* PB6 improves sow reproductive performance and reduces piglet birth intervals. **Animal Nutrition**, v. 6, n. 3, p. 278-287, 2020

5 CONCLUSÃO GERAL

No presente estudo, o uso de um probiótico à base de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* foi capaz de aumentar a produção de leite, quantidade de LCG e LCE, além de aumentar a ingestão de matéria seca, eficiência alimentar e diminuir os níveis de CCS. Esses resultados demonstram que a utilização de composto é capaz de auxiliar as vacas no período de transição a produzir mais leite e também ter uma melhor qualidade de vida devido a maior saúde da glândula mamária e menor ocorrência de inflamação nessa região. Entretanto, mais estudos são necessários para saber com clareza quais os mecanismos de ação deste probiótico frente a digestão dos nutrientes e da resposta imune.

6 REFERÊNCIAS

AKBAR, H.; BATISTEL, F.; DRACKLEY, J. K.; LOOR, J. J. Alterations in hepatic FGF21, co-regulated genes, and upstream metabolic genes in response to nutrition, ketosis and inflammation in Periparturient Holstein cows. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. 0139963, 2015.

ALLEN, M. S.; BRADFORD, B. J. Control of eating by hepatic oxidation of fatty acids. A note of caution. **Appetite**, v. 53, n. 2, p. 272-273, 2009.

BAUMAN, D. E.; CURRIE, W. B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. **Journal of dairy science**, v. 63, n. 9, p. 1514-1529, 1980.

BEAUCHEMIN, K. A. Invited review: Current perspectives on eating and rumination activity in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 6, p. 4762-4784, 2018.

BERNARDEAU, M. LEHTINEN, M. J., FORSSTEN, S. D., & NURMINEN, P. Importance of the gastrointestinal life cycle of *Bacillus* for probiotic functionality. **Journal of food science and technology**, v. 54, n. 8, p. 2570-2584, 2017.

BERRY, D. P.; LEE, J. M.; MACDONALD, K. A.; STAFFORD, K.; MATTHEWS, L.; ROCHE, J. R. Associations among body condition score, body weight, somatic cell count, and clinical mastitis in seasonally calving dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 2, p. 637-648, 2007.

BOBE, G.; YOUNG, J. W.; BEITZ, D. C. Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 87, n. 10, p. 3105-3124, 2004.

BOMBA, Lorenzo et al. Relative extended haplotype homozygosity signals across breeds reveal dairy and beef specific signatures of selection. **Genetics Selection Evolution**, v. 47, p. 1-14, 2015.

Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada-ESALQ/USP (CEPEA). **BOLETIM DO LEITE, NOVEMBRO 2023**, n.341, 2023. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/upload/revista/pdf/0868051001700674306.pdf>.

Acesso em: 05 de Dezembro de 2023.

CHAUCHEYRAS, F.; FONTY, G.; GOUET, P.; BERTIN, G.; SALMON, J. M. Effects of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* (Levucell® SC), a microbial additive for ruminants, on lactate metabolism in vitro. **Canadian journal of microbiology**, v. 42, n. 9, p. 927-933, 1996.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; WALKER, N. D.; BACH, A. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, n. 1-4, p. 5-26, 2008.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; DURAND, H. Probiotics in animal nutrition and health. **Beneficial microbes**, v. 1, n. 1, p. 3-9, 2010.

CUTTING, S. M. Bacillus probiotics. **Food microbiology**, v. 28, n. 2, p. 214-220, 2011.

DENIZ, A.; AKSOY, K.; METIN, M. Transition period and subclinical ketosis in dairy cattle: association with milk production, metabolic and reproductive disorders and economic aspects. **Medycyna Weterynaryjna**, v.76, n.9, p.495-502, 2020.

DRACKLEY, J. K. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier?. **Journal of dairy science**, v. 82, n. 11, p. 2259-2273, 1999.

DUC, L. H.; HONG, H. A.; CUTTING, S. M. Germination of the spore in the gastrointestinal tract provides a novel route for heterologous antigen delivery. **Vaccine**, v. 21, n. 27-30, p. 4215-4224, 2003.

ĐURIČIĆ, D.; LJUBIĆ, B. B.; VINCE, S.; TURK, R.; VALPOTIĆ, H.; ŽAJA, I. Ž.; SAMARDŽIJA, M. Effects of dietary clinoptilolite supplementation on β -hydroxybutirate serum level and milk fat to protein ratio during early lactation in Holstein-Friesian cows. **Microporous and mesoporous materials**, v. 292, p. 109766, 2020.

ESPOSITO, G.; IRONS, P. C.; WEBB, E. C.; CHAPWANYA, A. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. **Animal reproduction science**, v. 144, n. 3-4, p. 60-71, 2014.

FELSKE, A. D. M. Ecology of Bacillus species in soil. **Bacterial spore formers: probiotics and emerging applications**, p. 35-44, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, FAO. World agriculture towards 2015/2030: an FAO perspective. London UK: FAO; 2015.

FORBES, J. M. Voluntary food intake and reproduction. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 46, n. 2, p. 193-201, 1987.

GAGGIÀ, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International journal of food microbiology**, v. 141, p. S15-S28, 2010.

GOLDHAWK, C.; CHAPINAL, N.; VEIRA, D. M.; WEARY, D. M.; VON KEYSERLINGK, M. A. G. Prepartum feeding behavior is an early indicator of subclinical ketosis. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 10, p. 4971-4977, 2009.

GONZÁLEZ, L. A.; TOLKAMP, B. J.; COFFEY, M. P.; FERRET, A.; KYRIAZAKIS, I. Changes in feeding behavior as possible indicators for the automatic monitoring of health disorders in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 91, n. 3, p. 1017-1028, 2008.

GRUMMER, R. R. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 76, n. 12, p. 3882-3896, 1993.

GRUMMER, R.R. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. **Journal of Animal Science**, v.73, n.9, p.2820-2833, 1995.

GRUMMER, R. R.; MASHEK, D. G.; HAYIRLI, A. Dry matter intake and energy balance in the transition period. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 20, n. 3, p. 447-470, 2004.

GUOHUA, Q.; ANSHAN, S. Study of the effect of probiotics on performance and rumen fermentation in dairy cattle. **China Dairy Cattle**, v. 3, p. 10-4, 2007.

HENRIQUES, A. O.; MORAN JR, C. P. Structure, assembly, and function of the spore surface layers. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 61, p. 555-588, 2007.

HERDT, T. H. Ruminant adaptation to negative energy balance: Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 16, n. 2, p. 215-230, 2000.

HEUER, C.; VAN STRAALLEN, W. M.; SCHUKKEN, Y. H.; DIRKZWAGER, A.; NOORDHUIZEN, J. P. T. M. Prediction of energy balance in high yielding dairy cows with test-day information. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 2, p. 471-481, 2001.

KEHRLI, M. E.; NEILL, J. D.; BURVENICH, C.; GOFF J. P.; LIPPOLIS, J. D.; REINHARDT, T. A.; NONNECKE, B. J. Energy and protein effects on the immune system. **Ruminant physiology. Digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress**, p. 455-471, 2006.

KUHLA, B.; METGES, C. C.; HAMMON, H. M. Endogenous and dietary lipids influencing feed intake and energy metabolism of periparturient dairy cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 56, p. S2-S10, 2016.

LEBLANC, S. J. Symposium Review: Relationship of peripartum inflammation with reproductive health in dairy cows. **JDS communications**, v.4, n. 3, p. 230-234, 2023.

LAMONTAGNE, J.; RICO, D. E.; PERDOMO, C. M.; RONHOLM, J.; GERVAIS, R., CHOUINARD, P. Y. Effects of direct-fed *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on production performance and milk fatty acid profile in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 106, n. 3, p. 1815-1825, 2023.

LIONG, M. -T. (Ed.). **Probiotics: biology, genetics and health aspects**. Springer Science & Business Media, 2011.

LOMANDER, H.; FRÖSSLING, J.; INGVARTSEN, K. L.; GUSTAFSSON, H.; SVENSSON, C. Supplemental feeding with glycerol or propylene glycol of dairy cows in early lactation—Effects on metabolic status, body condition, and milk yield. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 5, p. 2397-2408, 2012.

MAHESH, M. S.; MOHANTA, Ranjan K.; PATRA, Amlan K. Probiotics in livestock and poultry nutrition and health. **Advances in Probiotics for Sustainable Food and Medicine**, p. 149-179, 2021.

MARCOMINI, G. R.; TEODORO, V. A. DIAGNÓSTICO ECONÔMICO-FINANCEIRO DA PRODUÇÃO LEITEIRA NO BRASIL. **Gestão e Desenvolvimento em Revista**, v. 9, n. 1.

MATHUR, S.; SINGH, R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. **International journal of food microbiology**, v. 105, n. 3, p. 281-295, 2005.

MCNAMARA, J. P. Integrating the effects of genotype and nutrition on utilization of body reserves during lactation of dairy cattle. In: **Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction**. Wallingford UK: CABI, 2000. p. 353-369.

MCNAMARA, J. P. Research, improvement and application of mechanistic, biochemical, dynamic models of metabolism in lactating dairy cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v. 112, n. 1-4, p. 155-176, 2004

MCART, J. A. A.; NYDAM, D. V.; OETZEL, G. R. Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 9, p. 5056-5066, 2012.

MCCABE, Conor J.; BOERMAN, Jacquelyn P. Invited Review: Quantifying protein mobilization in dairy cows during the transition period. **Applied Animal Science**, v. 36, n. 3, p. 389-396, 2020.

MCGUIRE, Mark A. et al. Controlling energy balance in early lactation. **Advances in Dairy Technology**, v. 16, p. 241-252, 2004.

MENDOZA, G. D.; BRITTON, R. A.; STOCK, R. A. Influence of ruminal protozoa on site and extent of starch digestion and ruminal fermentation. **Journal of animal science**, v. 71, n. 6, p. 1572-1578, 1993.

MOIR, Anne. How do spores germinate?. **Journal of applied microbiology**, v. 101, n. 3, p. 526-530, 2006.

NAGARAJA, T. A microbiologist's view on improving nutrient utilization in ruminants. In: 23rd Annual Florida Nutrition Symposium proceeding, Gainesville, Florida, p. 135-161, 2012.

NAKANO, M. M.; DAILLY, Y. P.; ZUBER, P.; CLARK, D. P. Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. **Journal of bacteriology**, v. 179, n. 21, p. 6749-6755, 1997.

NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE. 2021. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Eighth Revised Edition**. Washington, DC: The National Academies Press.

NICHOLSON, W. L.; MUNAKATA, N.; HORNECK, G.; MELOSH, H. J.; SETLOW, P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 64, n. 3, p. 548-572, 2000.

NETO, A. C.; da Silva, J. F. C.; Deminicis, B. B.; Fernandes, A. M., Jardim, J. G., Amorim, M. M., & Guimarães Filho, C. C. Problemas metabólicos provenientes do manejo nutricional incorreto em vacas leiteiras de alta produção recém paridas. **REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 12, n. 11, p. 1-25, 2011.

OSPINA, P. A.; NYDAM, D. V.; STOKOL, T.; OVERTON, T. R. Association between the proportion of sampled transition cows with increased nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate and disease incidence, pregnancy rate, and milk production at the herd level. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 8, p. 3595-3601, 2010.

PAN, Liyi et al. Effects of a Bacillus-based direct-fed microbial on in vitro nutrient digestibility of forage and high-starch concentrate substrates. **Translational Animal Science**, v. 6, n. 2, p. txac067, 2022

PECH-CERVANTES, A. A.; OGUNADE, I. M.; JIANG, Y.; IRFAN, M.; ARRIOLA, K. G.; AMARO, F. X.; ADESOGAN, A. T. An expansin-like protein expands forage cell walls and synergistically increases hydrolysis, digestibility and fermentation of livestock feeds by fibrolytic enzymes. **PLoS One**, v. 14, n. 11, p. e0224381, 2019.

PICKETT, M. M.; PIEPENBRINK, M. S.; OVERTON, T. R. Effects of propylene glycol or fat drench on plasma metabolites, liver composition, and production of dairy cows during the periparturient period. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 6, p. 2113-2121, 2003.

PIMENTEL, T.C.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S.H. Produtos lácteos funcionais. In *Produção, Processamento e Fiscalização de Leite e Derivados* (Eds. Nero, LA, Cruz, AG & Bersot, LS). Atheneu: São Paulo, SP, Brazil.

PROUDFOOT, K. L. ADSA Foundation Scholar Award: What makes for a good life for transition dairy cows? Current research and future directions. **Journal of Dairy Science**, v.106, n.9, p. 5896-5907, 2023.

QIAO, G. H.; SHAN, A. S.; MA, N.; MA, Q. Q.; SUN, Z. W. Effect of supplemental Bacillus cultures on rumen fermentation and milk yield in Chinese Holstein cows. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 94, n. 4, p. 429-436, 2010.

ROTTA, P. P. et al. Effects of day of gestation and feeding regimen in Holstein×Gyr cows: I. Apparent total-tract digestibility, nitrogen balance, and fat deposition. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 5, p. 3197-3210, 2015.

SANDERS, M. E. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. Supplement_2, p. 58-61, 2008.

SEGURA, A.; MILORA, N.; QUEIROZ, O.; CANTOR, M. D.; COPANI, G. In vitro evaluation of Bacillus licheniformis and Bacillus subtilis enzyme activity, Clostridium perfringens Type A inhibition, and biofilm formation. **Journal of Dairy Science**, v. 103, p. 89-89, 2020.

SERRENHO, R. C.; CHURCH, C.; MCGEE, D.; DUFFIELD, T. F. Environment, nutrition, and management practices for far-off, close-up, and fresh cows on Canadian dairy farms—A retrospective descriptive study. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 2, p. 1797-1814, 2022.

SHARMA, A. N.; KUMAR, S.; TYAGI, A. K. Effects of mannan-oligosaccharides and *Lactobacillus acidophilus* supplementation on growth performance, nutrient utilization and fecal characteristics in Murrah buffalo calves. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 102, n. 3, p. 679-689, 2018.

SIGNORETTI, R. D. Manejo Nutricional de vacas leiteiras em produção - Coan Consultoria, 2010. Disponível em: <http://www.coanconsultoria.com.br/noticias.asp?id=102>. Acesso em: 05 de outubro de 2023.

ŠPANOVÁ, Alena et al. Selection of potential probiotic *Lactobacillus* strains of human origin for use in dairy industry. **European Food Research and Technology**, v. 241, p. 861-869, 2015.

SPINOSA, M. R.; BRACCINI, T.; RICCA, E.; DE FELICE, M.; MORELLI, L.; POZZI, G.; OGGIONI, M. R. On the fate of ingested *Bacillus* spores. **Research in microbiology**, v. 151, n. 5, p. 361-368, 2000.

STEENSELS, M.; MALTZ, E.; BAHR, C.; BERCKMANS, D.; ANTLER, A.; HALACHMI, I. Towards practical application of sensors for monitoring animal health; design and validation of a model to detect ketosis. **Journal of Dairy Research**, v. 84, n. 2, p. 139-145, 2017.

TAM, N. K.; UYEN, N. Q.; HONG, H. A.; DUC, L. H.; HOA, T. T.; SERRA, C. R.; HENRIQUES, A. O.; CUTTING, S. M. The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 7, p. 2692-2700, 2006.

TYRRELL, H. F.; MOE, P. W. Effect of intake on digestive efficiency. **Journal of Dairy Science**, v. 58, n. 8, p. 1151-1163, 1975.

UYENO, Yutaka; SHIGEMORI, Suguru; SHIMOSATO, Takeshi. Effect of probiotics/prebiotics on cattle health and productivity. **Microbes and environments**, v. 30, n. 2, p. 126-132, 2015.

VÁRHIDI, Z.; MÁTÉ, M.; ÓZSVÁRI, L. The use of probiotics in nutrition and herd health management in large hungarian dairy cattle farms. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 957935, 2022.

VYAS, D.; UWIZEYE, A.; MOHAMMED, R.; YANG, W. Z.; WALKER, N. D.; BEAUCHEMIN, K. A. The effects of active dried and killed dried yeast on subacute ruminal acidosis, ruminal fermentation, and nutrient digestibility in beef heifers. **Journal of animal science**, v. 92, n. 2, p. 724-732, 2014.

WALLACE, R. L. et al. Effect of adverse health events on dry matter consumption, milk production, and body weight loss of dairy cows during early lactation. **Journal of dairy science**, v. 79, n. Suppl 1, p. 205, 1996.

7 ANEXOS

Anexo A – Parecer de aprovação do CEEA



PARECER N° 130/2023/CEUA/REITORIA
PROCESSO N° 23110.016526/2023-64

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "Utilização de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* na alimentação durante o periparto de vacas leiteiras e seus efeitos sobre parâmetros alimentares, comportamentais, produtivos", registrada com o n° 23110.016526/2023-64, sob a responsabilidade de Marcio Nunes Corrêa - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer FAVORÁVEL a sua execução pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas.

Finalidade	(x) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	Início: 30/06/2023 Término: 01/06/2024
Espécie/linhagem/raça	<i>Bos taurus</i> / Holandês
N° de animais	90
Idade	2 a 6 anos
Sexo	Fêmeas
Origem	Granja 4 Irmãos Agropecuária (coordenadas geográficas 32°16'S, 52°32'E). Localização: Rio Grande/RS.

Código para cadastro n° CEUA 016526/2023-64

Priscila Marques Moura de Leon

Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON, Professor do Magistério Superior, em 30/06/2023, às 16:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 48, § 3º, do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site: http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 2241870 e o código CRC 3A15BE1A.