

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DESEMPENHO E UTILIZAÇÃO DE NUTRIENTES POR VACAS LEITEIRAS
SUPLEMENTADAS COM *BACILLUS SUBTILIS*

VERIDIANA LOURENÇO DE SOUZA

CURITIBA

2011

VERIDIANA LOURENÇO DE SOUZA



DESEMPENHO E UTILIZAÇÃO DE NUTRIENTES POR VACAS LEITEIRAS
SUPLEMENTADAS COM *BACILLUS SUBTILIS*

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração: Nutrição e Alimentação Animal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientação: Prof. Dr. José Antônio de Freitas

CURITIBA

2011




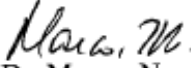
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **"DESEMPENHO E UTILIZAÇÃO DE NUTRIENTES POR VACAS LEITEIRAS SUPLEMENTADAS COM *Bacillus subtilis*"** apresentada pela Mestranda VERIDIANA LOURENÇO DE SOUZA declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09-CEPE/UFPR, considerou a candidata APTA para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 15 de dezembro de 2011


Professor Dr. José Antonio de Freitas
Presidente/Orientador


Professor Dr. Marcos Neves Pereira
Membro


Professor Dr. Rodrigo de Almeida
Membro

AGRADECIMENTOS

A “Deus” pela vida, saúde, proteção e sabedoria.

À minha família, meus amáveis pais Nelson e Maria, minhas irmãs Taynara, Francieli e Kátia, pelo amor, dedicação e por serem meu alicerce. Também as minhas sobrinhas Giovanna e Clara pela grande descontração.

A Universidade Estadual de Ponta Grossa - Castro, pelo início da graduação e direcionamento profissional na área de gado de leite.

A Universidade Federal do Paraná, por todas as oportunidades na graduação e pós-graduação.

Ao Prof. Dr. José Antônio pela brilhante orientação e pela confiança depositada em mim. Também pela amizade e grande dedicação nestes anos de convívio.

Ao Prof. Ph.D. Marcos Neves Pereira e sua esposa Renata pelo acolhimento, confiança e ensinamentos durante a realização do estudo, e pela importante contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rodrigo de Almeida, por te me dado a primeira oportunidade de estágio em pesquisas, pelo apoio, amizade e confiança no meu trabalho.

Aos integrantes do Grupo do Leite 2009/2010 da UFLA, pessoal da pós-graduação, funcionários da Fazenda São Francisco. Principalmente a Mariana, Iury, Ozana e Gilson.

A Universidade Federal de Lavras, pela estrutura nas análises bromatológicas, ao Vitor pelo apoio nas análises.

A Uniquímica e aos proprietários das fazendas São Francisco, Milca e StarMilk – Iguazu pelo apoio indispensável para a realização dos experimentos.

Aos meus queridos amigos Delma, Brendali, Emanuel, Edson, Giovana, Noellene, Isabel e Pedro pela amizade e companheirismo.

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente na realização desta conquista.

OBRIGADA!

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	10
2. O USO DE ESPOROS BACTERIANOS COMO PROBIÓTICO	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT	14
2.1 Introdução	15
2.2 Probióticos.....	16
2.3 Composição dos probióticos	17
2.4 Características desejáveis.....	18
2.5 Mecanismos de ação dos probióticos	18
2.6 Bactéria	20
2.7 Esporos bacterianos.....	21
2.8 Germinação dos esporos bacterianos.....	22
2.9 <i>Bacillus subtilis</i>	22
2.10 O uso de <i>Bacillus subtilis</i> como probiótico	24
2.11 Resposta ao uso de <i>Bacillus subtilis</i>	25
2.11.1 Não Ruminantes.....	25
2.11.2 Ruminantes	28
2.12 Considerações finais	30
REFERÊNCIAS	31
3. DESEMPENHO E DIGESTIBILIDADE EM VACAS LEITEIRAS SUPLEMENTADAS COM <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	36
RESUMO.....	37
ABSTRACT	38
3.1 Introdução	39
3.2 Material e Métodos.....	40
3.2.1 Experimento 1	40
3.2.2 Experimento 2	44
3.3 Resultados e discussão.....	46
3.4 Conclusões.....	55

REFERÊNCIAS.....	56
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
APÊNDICES.....	60

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. PRODUÇÃO DIÁRIA DE LEITE DE VACAS SUPLEMENTADAS (●) OU NÃO (◆) COM <i>BACILLUS SUBTILIS</i> . EXPERIMENTO 2.....	51
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DAS DIETAS OFERECIDAS EM INGREDIENTES E DAS DIETAS CONSUMIDAS EM NUTRIENTES. EXPERIMENTO 1.....	42
TABELA 2. COMPOSIÇÃO DA DIETA BASAL EM INGREDIENTES E NUTRIENTES. EXPERIMENTO 2	45
TABELA 3. ESPOROS DE <i>BACILLUS SUBTILIS</i> NAS FEZES DE VACAS SUPLEMENTADAS COM <i>B. SUBTILIS</i> OU PLACEBO. EXPERIMENTO 1	47
TABELA 4. DIGESTIBILIDADE APARENTE DOS NUTRIENTES NO TRATO DIGESTIVO TOTAL E TAXA FRACIONAL DE PASSAGEM DA DIGESTA DE VACAS SUPLEMENTADAS COM <i>BACILLUS SUBTILIS</i> OU PLACEBO. EXPERIMENTO 1	48
TABELA 5. DESEMPENHO DE VACAS SUPLEMENTADAS COM <i>B. SUBTILIS</i> OU PLACEBO. EXPERIMENTO 1	49
TABELA 6. ATIVIDADE MASTIGATÓRIA DE VACAS SUPLEMENTADAS COM <i>B. SUBTILIS</i> OU PLACEBO. EXPERIMENTO 1	50
TABELA 7. DESEMPENHO DE VACAS SUPLEMENTADAS COM <i>B. SUBTILIS</i> OU PLACEBO. EXPERIMENTO 2	50
TABELA 8. NÚMERO DE VACAS NOS TRATAMENTOS <i>B. SUBTILIS</i> E PLACEBO COM CULTIVO POSITIVO DE MICRORGANISMOS NO LEITE. EM PARÊNTESES O NÚMERO TOTAL DE AMOSTRAS NO DIA. EXPERIMENTO 2.....	53

RESUMO GERAL

Bacillus subtilis é uma bactéria gram positiva formadora de esporos. O interesse científico em espécies de *Bacillus* como probióticos para ruminantes ocorreu nos últimos anos, como forma de atuar sobre a função imune de bezerros e fermentação ruminal de vacas leiteiras. Objetivou-se avaliar o desempenho e a digestibilidade em vacas leiteiras suplementadas com *Bacillus subtilis*. O segundo capítulo é uma revisão bibliográfica que discute os principais aspectos da utilização de esporos bacterianos como probiótico, seus mecanismos de ação e principais respostas em humanos e animais, tanto no Brasil como em outros países. A seguir, a avaliação do desempenho e eficiência digestiva de vacas leiteiras suplementadas com *Bacillus subtilis* C-3102 a qual foram realizadas em 2 propriedades do estado de Minas Gerais. Na primeira, dezoito vacas Holandês receberam os tratamentos probiótico ou placebo em delineamento de Reversão Simples, com períodos de 39 dias. Na segunda, foram utilizadas trinta vacas Holandês recebendo os mesmos tratamentos por 16 semanas. A suplementação diária com 3×10^9 UFC de esporos viáveis de *Bacillus subtilis* C-3102 induziu aumento na produção de leite (23,6 vs. 25,3 kg, $P=0,02$) em vacas com contagem de células somáticas (CCS) superior a 700 mil células/mL. As produções de sólidos totais ($P=0,05$) e proteína ($P=0,01$) seguiram a mesma tendência. A resposta foi constante nas 16 semanas do período de comparação. Entretanto, esta resposta em produção de leite não foi repetida em vacas com CCS inferior a 100 mil células/mL. Não foi detectado ($P>0,05$) efeito de tratamento sobre o consumo, digestibilidade, taxa de passagem, atividade mastigatória e contagem de células somáticas do leite. Os estudos realizados foram importantes para avaliar as respostas do uso de *Bacillus subtilis* como probióticos para ruminantes e para fornecer bases iniciais para as futuras avaliações com esporos bacterianos em vacas lactantes.

Palavras-chave: contagem de células somáticas, digestibilidade, probiótico, vaca leiteira.

ABSTRACT

Bacillus subtilis is a gram positive spore forming bacteria. The scientific interest in *Bacillus* species as probiotics to ruminants occurred in the last years, as a way to act on the immune function of calves and rumen fermentation of dairy cows. The aim of this research was to evaluate the performance and digestibility in dairy cows supplemented with *Bacillus subtilis*. The second chapter is a review that discusses the main aspects of use bacterial spores as probiotics, action mechanisms and responses for humans and animals in Brazil and in other countries. On the following chapter, the evaluation of performance and digestive efficiency of dairy cows supplemented with *Bacillus subtilis* viable spores were conducted in two farms of the Minas Gerais state. In the first one, eighteen Holstein cows had received the probiotic or placebo treatments in a crossover design, with 39-day periods. In the second farm thirty Holsteins received the same treatments for 16 weeks. The results indicate that the supplementation with 3×10^9 CUF of *Bacillus subtilis* viable spores increased (23.6 vs. 25.3 kg, $P=0.02$) milk yield in cows with somatic cells count (SCC) above of 700 thousand cells/mL as well as total solids ($P=0.05$) and milk protein yield ($P=0.01$). The response was consistent across the 16 week comparison period. However, there was no significant effect of *B. subtilis* inclusion on milk yield in cows with SCC lower than 100 thousand cells/mL. There was no effect ($P>0.05$) of treatment on intake, digestibility, passage rate, chewing activity and somatic cell count. This work was important to evaluate the response of use of *Bacillus subtilis* as probiotics to ruminants and it provide the initial basis to further study using bacterial spores in lactating dairy cows.

Key-words: dairy cow, digestibility, probiotic, somatic cell count.

1. APRESENTAÇÃO

O uso de microrganismos vivos na alimentação animal é um assunto amplamente discutido, sendo coerente com a tendência do mercado consumidor de consumir alimentos mais saudáveis. São poucos os estudos que avaliaram somente o uso de bactérias probióticas na alimentação de ruminantes. A maioria das pesquisas avaliou probióticos compostos por bactérias e leveduras (KREHBIEL et al., 2003). Os probióticos compostos por bactérias e fungos apresentam distintos mecanismos de ação, não evidenciando a verdadeira atuação das bactérias probióticas, quando estas estão presentes no trato digestivo total de ruminantes.

As espécies de *Bacillus* são suplementadas na forma de esporos, apresentando o potencial de serem mais resistentes às barreiras gástricas de ruminantes, comparadas com bactérias que não formam esporos que são frequentemente usadas na alimentação animal como os *Lactobacillus spp.* Não é recente o uso de esporos de *Bacillus subtilis* como probiótico para humanos, aves e suínos (SANDERS et al., 2003; CUTTING, 2011), mas em ruminantes os estudos ainda são limitados. No Brasil, o estudo com vacas lactantes suplementadas com esporos de *Bacillus subtilis* é inédito.

O presente estudo visa avaliar a suplementação dietética de vacas leiteiras com 3×10^9 UFC de esporos viáveis de *Bacillus subtilis* C-3102. Os capítulos desta dissertação contextualizam o uso de esporos de *Bacillus subtilis* como probiótico e analisam os seus efeitos sobre o desempenho e utilização de nutrientes de vacas lactantes.

O Capítulo II é uma revisão bibliográfica que caracteriza e discute o uso de esporos bacterianos como probiótico. Na primeira parte, é realizada uma abordagem geral sobre os probióticos, bem como suas características desejáveis. Na segunda parte, são caracterizados os esporos bacterianos e suas características. Em seguida, o uso de *Bacillus subtilis* como probiótico na alimentação animal, assim como seus principais mecanismos de ação e respostas são discutidos. O conhecimento dos mecanismos de ação dos esporos bacterianos como probiótico é importante para o entendimento das suas principais respostas nos animais, e também para subsidiar futuros projetos de pesquisas que avaliem o uso de probiótico bacteriano para ruminantes.

No Capítulo III estudou-se a suplementação dietética de vacas leiteiras com 3×10^9 UFC de esporos viáveis de *Bacillus subtilis* C3102 em 2 propriedades de produção leiteira intensiva com confinamento do tipo *tie stall* no estado de Minas Gerais. Foi avaliado o desempenho das vacas em ambas as fazendas como produção de leite, proteína, gordura e lactose, contagem de células somáticas, nitrogênio uréico no leite, peso e escore de condição corporal. A utilização de nutrientes por vacas leiteiras suplementadas com *Bacillus subtilis* foi avaliada na primeira propriedade por meio da mensuração do consumo, digestibilidade, taxa de passagem e atividade mastigatória dos animais.

CAPÍTULO II

O USO DE ESPOROS BACTERIANOS COMO PROBIÓTICO REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. O USO DE ESPOROS BACTERIANOS COMO PROBIÓTICO

RESUMO

Os probióticos são microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas conferem um benefício à saúde do hospedeiro. Os esporos bacterianos são usados como probióticos em alimentos para animais, suplementos dietéticos humanos e também têm sido usados na medicina. Objetiva-se com esta revisão discutir o uso de esporos como probiótico e apontar as principais respostas em desempenho e saúde animal. Os esporos bacterianos são muito resistentes aos agentes antimicrobianos e tratamentos tais como desinfetantes, calor, radiação e alta pressão hidrostática. O uso de esporos tem inúmeras vantagens, a primeira é que o produto pode ser estocado na forma dessecada sem efeito deletério sobre a viabilidade, ou seja, uma dose especificada de esporos pode ser estocada sem refrigeração e a dose da bactéria ingerida alcançará o intestino delgado intacta. O esporo também é capaz de sobreviver ao baixo pH da barreira gástrica. O *B. subtilis* não é um organismo intestinal, mas por ingestão contínua no alimento pode reduzir o número ou a incidência de patógenos intestinais em aves e suínos, associados ou não a melhoras no desempenho. Já em ruminantes, a administração oral de esporos de *B. subtilis* resulta em aumento no desempenho e melhora na função imune. Os estudos sugerem que os esporos viáveis de *B. subtilis* são capazes de crescer dentro do trato intestinal e podem ser usados na alimentação como uma alternativa aos antibióticos e a outros probióticos bacterianos não formadores de esporos.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*, estimulação imune, patógenos entéricos.

THE USE OF BACTERIAL SPORES AS PROBIOTICS

ABSTRACT

Probiotics are live microbes, when administered in adequate amounts they may promote health benefits to the host animal. Bacterial spores are used as probiotic supplements for use in animal feeds, for human dietary supplements and also has been used in the medicine. The aim of this review is to discuss the use of spores as probiotic and to point out the main responses on performance and animal health. Bacterial spores are very resistant to antimicrobial agents, as well as to treatments such as disinfectants, heat, radiation and high hydrostatic pressure. Spores use has several advantages; the first one is that the product can be stored in the lyophilized form without deleterious effect on viability. Therefore, a specified dose of spores can be stored without refrigeration and the entire dose of ingested bacteria will reach the small intestine intact. The spores can also survive to low pH of the gastric barrier. *B. subtilis* is not an intestinal organism, but continuous feeding may reduce the number or incidence of intestinal pathogens in broiler and swine with or without improvement performance. However, in ruminants the oral administration of *B. subtilis* spores increase performance and improve immune function. Studies suggest that *B. subtilis* viable spores are able to grow within the intestinal tract and may be used in the feeding as one alternative to using antibiotics and other bacterial probiotics non-spore formers.

Key-words: *Bacillus subtilis*, enteric pathogens, immune stimulation.

2.1 Introdução

Os probióticos utilizados na alimentação animal vêm sendo pesquisados de modo racional e específico, visando substituir componentes de uso restrito ou parcialmente proibidos, a fim de manter a saúde e maximizar o desempenho animal. Observa-se uma grande tendência mundial no uso de diferentes espécies probióticas na alimentação animal, em lugar dos antibióticos, pois aqueles não deixam resíduo no ambiente, na carcaça dos animais e não provocam resistência cruzada no homem (GARCIA, 2008).

Os probióticos podem ser definidos como produtos constituídos por microrganismos vivos usados na alimentação com o objetivo de afetar benéficamente o animal hospedeiro, promovendo o equilíbrio da microbiota intestinal (FULLER, 1989). O uso de bactérias como aditivo alimentar se baseia nos possíveis efeitos benéficos como a melhora da eficiência alimentar, ganho diário de peso, aumento de peso da carcaça, redução da excreção fecal de *E. coli.*, mudança no perfil de fermentação ruminal, prevenção e controle de desordens metabólicas em bovinos confinados (GALYEAN e ENG, 1998; KREHBIEL et al., 2003; BEAUCHEMIN et al., 2003; GAGGIÀ et al., 2010).

Em bezerros, seu uso pode diminuir a incidência de diarreia, aumentar o ganho de peso, reduzir a utilização de antibióticos contra enfermidades respiratórias e digestivas (TIMMERMAN, 2005; GAGGIÀ et al., 2010). Já em vacas lactantes, a suplementação com probiótico pode ter um efeito positivo no pH ruminal de vacas lactantes com acidose subclínica (CHIQUELLE, 2009) e aumentar a produção de leite (KREHBIEL et al., 2003).

O gênero *Bacillus* são bactérias encontradas principalmente no solo, formadoras de endósporos. Em condições ambientais adversas, o metabolismo dessas células é reduzido para níveis baixíssimos e elas voltam à forma vegetativa quando encontram ambiente propício para reprodução (BARBOSA e TORRES, 2005). O *Bacillus subtilis* é um microrganismo transitório no trato gastrintestinal, não patogênico para os animais, capaz de formar esporos resistentes ao calor e frio e estocáveis sem refrigeração por longo período (SANDERS et al., 2003). Os esporos germinam quando chegam ao intestino, o que é necessário para a expressão da

resposta animal ao probiótico. A espécie necessita de reinoculação constante, já que a população dessas bactérias é reduzida após 24 horas da suplementação.

Em não ruminantes, a suplementação dietética de esporos viáveis de *Bacillus subtilis* tem melhorado o desempenho animal, principalmente em frangos de corte (FRITTS et al., 2000; BRITO et al., 2005; FLEMMING & FREITAS, 2005). Os principais mecanismos de ação pelo qual o *Bacillus spp.* promoveram ganho no desempenho animal seria por atuação sobre a atividade antimicrobiana e exclusão competitiva no intestino, e também pela estimulação imune (CUTTING, 2011).

Objetiva-se com esta revisão discutir a utilização de esporos viáveis de *Bacillus subtilis* como probiótico na alimentação animal e apontar os principais resultados na saúde e desempenho animal.

2.2 Probióticos

O termo “probiótico”, de origem grega, significa “para a vida”. A primeira informação sobre probióticos é oriunda do século 19, quando Metchnikoff (1907), cientista do Instituto Pasteur de Paris, observou que os camponeses da Bulgária que bebiam resíduo de leite fermentado com *Lactobacillus acidophilus* (produção de iogurte natural) tinham uma maior sobrevivência, sendo este efeito atribuído a ação colonizadora destes microrganismos, prevenindo a ação dos patógenos intestinais (BUTOLO, 2002).

A utilização do termo probiótico foi realizada pela primeira vez por LILLY e STILLWELL (1965), quando observaram a ação de microrganismos como promotores de crescimento. O início da utilização de probiótico na alimentação animal foi através da utilização do *Lactobacillus acidophilus* na década de 70. Este fato tem origem na preocupação com as rações que continham antibióticos em suas composições, já que estas substâncias poderiam apresentar menor eficácia quando utilizadas na terapêutica humana, se fossem utilizadas continuamente e em baixas concentrações nos animais (CARLI, 2006).

Em 1973 os probióticos ganharam destaque pelo experimento realizado por Nurmi e Rantala, os quais administraram conteúdo intestinal de aves adultas para aves com um e dois dias de idade oralmente, e observaram que o conteúdo

preveniu a infecção intestinal por *Salmonella infantilis*. Esta ação foi denominada como “Exclusão Competitiva”, sendo também conhecida como “conceito de Nurmi” (NURMI e RANTALA, 1973).

FULLER (1989) define que probióticos são produtos constituídos por microrganismos vivos que introduzidos no organismo animal afetam benéficamente o hospedeiro através da melhoria do balanço microbiano intestinal. Esta definição descreve a importância das células vivas como um componente essencial e efetivo do probiótico. Ainda em 1989 o FDA norte-americano sugeriu o uso do termo “direct-fed microbial” (DFM) seria mais adequado do que a de probióticos. O DFM é definido pela FDA como uma fonte viva (viável) de microrganismos de ocorrência natural (MARTIN & NISBET, 1992). A FAO/WHO (2002) posteriormente definiu que os probióticos são microrganismos vivos que administrados em quantidades adequadas conferem um benefício na saúde do hospedeiro.

2.3 Composição dos probióticos

Os principais constituintes dos probióticos comerciais são os *Lactobacillus*, *Streptococcus* e bifidobactérias. Os probióticos utilizados na alimentação animal estão disponibilizados de diversas maneiras e o tipo de preparado depende da finalidade requerida, podendo ser fornecidos na forma de cápsulas, pasta, pó e grânulos, podendo ser incluídos na sua alimentação (CARLI, 2006).

BUTOLO (2002) descreve que as espécies de bactérias mais utilizadas na preparação de probióticos são o *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis* e *Bifidobacterium* spp.. Todas estas são cepas intestinais, com exceção da *L. bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* que são utilizados na produção de iogurte. Segundo o autor as preparações contendo múltiplas espécies são mais efetivas e abrangem uma ação mais ampla nas diferentes espécies animais.

As espécies de *Bacillus* têm sido usadas como probiótico por no mínimo 50 anos com o produto italiano conhecido como Enterogermina[®], registrado em 1958 na Itália como um suplemento medicinal. O interesse científico nas espécies de *Bacillus*

como probióticos ocorreu nos últimos 15 anos. Das espécies que tem sido mais consideravelmente reconhecida estão o *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans* e *Bacillus licheniformis*. Estas espécies têm sido usadas como probiótico na alimentação de aves, suínos e bezerros (CUTTING, 2010).

2.4 Características desejáveis

Os microrganismos probióticos devem sobreviver ao ecossistema intestinal, não ser tóxico nem patogênico, ser estável durante a estocagem, permanecer viável nas condições normais de estocagem, promovendo efeitos comprovadamente benéficos ao hospedeiro (GIBSON e ROBERFROID, 1995). Nos EUA, o FDA classifica os microrganismos probióticos como substâncias GRAS (Generally Regarded as Safe) o que torna o seu uso seguro (PELICANO et al. 2002).

Segundo BUTOLO (2002) um probiótico deve conter as seguintes propriedades desejáveis:

- Conter cepas capazes de promover efeitos benéficos para o hospedeiro, ou seja, melhor eficiência alimentar e maior resistência a doenças;
- Não devem ser patogênicos e tóxicos para o homem e animal;
- Apresentar o maior número possível de células viáveis, pelo fato do não conhecimento da mínima dose efetiva;
- Devem apresentar condições de permanecer no ecossistema intestinal, sendo resistente ao pH baixo e ácidos orgânicos;
- Ser estáveis e capazes de permanecer viáveis por longos períodos, nas condições normais de estocagem.

2.5 Mecanismos de ação dos probióticos

Os microrganismos probióticos apresentam diferentes mecanismos de ação, sendo que cada um destes podem ser expressos em maior ou menor intensidade no animal hospedeiro.

A competição por sítios de ligação consiste na ocupação física dos sítios de ligação do epitélio intestinal pelas bactérias probióticas, as quais formam uma barreira física contra as bactérias patogênicas. Este foi denominado “conceito de Nurmi” ou Exclusão Competitiva (NURMI e RANTALA, 1973). Estudos mostram que são necessárias aproximadamente 40 bactérias para recobrir a superfície de um enterócito (PELICANO, 2002).

Os probióticos também competem com as bactérias indesejáveis pelos nutrientes disponíveis no nicho ecológico, a relação simbiótica impede uma produção excessiva de nutrientes, a qual pode favorecer o estabelecimento de competidores microbianos com potencial patogênico ao hospedeiro (SAAD, 2006).

A produção de substâncias antibacterianas e enzimas é outro mecanismo de ação dos probióticos. Os ácidos orgânicos e bacteriocinas (substâncias antibacterianas), e a beta glucuronidase e hidrolases de sais biliares (enzimas) podem ser produzidas pelos probióticos (BUTOLO, 2002). Outra vantagem da utilização dos probióticos é que a hidrólise enzimática bacteriana pode aumentar a biodisponibilidade de proteínas e de gordura e aumentar a liberação de aminoácidos livres (SAAD, 2006).

Na ação dos probióticos, é esperado que estes influenciem a atividade imune por uma ativação dos macrófagos, por aumento dos níveis de citocinas, por um aumento natural das células destruidoras naturais (NK - “natural killer”) e/ou dos níveis de imunoglobulinas (SAAD, 2006). O estímulo ocorre através da ativação dos macrófagos, proliferação de células T e produção de interferon (BUTOLO, 2002).

O sistema imune consiste de órgãos e de vários tipos de células. O antígeno em interação com estas células induz uma resposta imune celular mediada por células ativadas e uma resposta imune mediada por anticorpos. As interações celulares são aumentadas por adesão de moléculas, assim as células ativadas liberam diferentes citocinas. Estas complexas interações celulares induzem uma resposta imune sistêmica (PERDIGÓN et. al., 1995).

Segundo PELICANO et al. (2002) as bactérias probióticas atuam como antígeno estimulando o sistema imune das aves e assim o organismo já estaria preparado para reagir com esses antígenos, com isso ocorreria neutralização destes

sem que haja uma ativação excessiva. DALLOU et al. (2003) utilizando probiótico a base de *Lactobacillus* em aves verificaram que o probiótico, através de ativação do sistema imune local do intestino, protegeu contra a infecção de *Eimeria acervulina*.

Em ruminantes KREHBIEL et al. (2003) descreveram que o mecanismo de ação dos probióticos não está bem esclarecido, mas que a adesão, colonização, ação inibitória e estimulação da função imune são todos importantes para melhorar a saúde.

2.6 Bactéria

As bactérias são microrganismos procariotos, caracterizados por apresentar uma única molécula de DNA, e por serem desprovidos de membrana nuclear. Cada célula é independente quanto a seus processos vitais de obtenção de energia, crescimento e reprodução.

A parede celular de bactérias gram-positivas é formada quase que exclusivamente por peptidoglicano ou mucopeptídeo, e apresenta uma grande quantidade de ácidos teicóicos que pode chegar a 50% de sua massa seca. Os ácidos teicóicos são polímeros com aproximadamente 30 resíduos de glicerol unidos por ligações fosfodiéster, eles são responsáveis pela especificidade antigênica, ou seja, eles apresentam radicais que induzem uma resposta imunológica e também contribuem para a rigidez da parede celular. Em bactérias patogênicas, como *Staphylococcus* e *Streptococcus* estes ácidos atuam como adesinas, permitindo a fixação das células a superfícies epiteliais.

A parede celular das bactérias gram-negativas tem uma composição mais complexa, a camada de peptidoglicano é menos espessa e não tem contato direto com o meio ambiente. A maioria das bactérias gram-negativas representadas por *E. coli* e *Salmonella* apresentam uma membrana externa formada por lipopolissacarídeo e lipoproteínas que ligam a membrana externa aos peptidoglicano.

O polissacarídeo do lipopolissacarídeos da membrana externa da bactéria consiste em duas porções, o core e o polissacarídeo "O". O polissacarídeo tem propriedades antigênicas importantes e pode variar nas espécies, por exemplo, a *Escherichia coli* tem mais de 150 antígenos "O" diferentes. A membrana externa de

algumas bactérias gram-negativas também apresenta toxinas solúveis, geralmente proteínas. Entretanto, todas apresentam uma endotoxina constituída pela porção lipídica do lipopolissacarídeos localizada na própria parede celular. A liberação da endotoxina ocorre em grandes quantidades quando a célula da gram-negativa é lisada.

A ação tóxica da endotoxina é atribuída à capacidade de induzir a produção e liberação de citocinas (interferons, interleucinas e o fator necrotizante tumoral) produzidas por macrófagos sob o estímulo de agentes indutores como vírus, bactérias gram positivas, sendo que os lipopolissacarídeos das bactérias gram negativas é o mais potente indutor (BARBOSA e TORRES, 2005).

2.7 Esporos bacterianos

Os esporos bacterianos são produzidos na natureza como um meio para sobreviver às extremas condições do meio ambiente, permitindo um longo prazo de sobrevivência em condições que as células vegetativas das bactérias morreriam (NICHOLSON et al., 2000).

As bactérias formadoras de esporos são encontradas principalmente no solo. Em condições ambientais adversas o metabolismo dessas células é reduzido para baixíssimos níveis e no interior da bactéria desenvolve o esporângio. O processo de esporulação termina com a desintegração do esporângio e liberação de esporos para o meio (BARBOSA e TORRES, 2005).

Na forma de esporos, as células são metabolicamente inativas, possuindo maior resistência aos efeitos letais (calor, frio, barreiras gástricas) podendo ser estocadas sem refrigeração por longos períodos (SANDERS, 2003), sendo também resistentes a agentes antimicrobianos, desinfetantes, radiação e pressão hidrostática (CHAVES-LÓPEZ et al., 2009).

Com essa grande resistência os esporos têm sua viabilidade preservada, existem casos descritos de endósporos que permaneceram viáveis por até 500 anos. Inúmeros fatores podem ser responsáveis pela resistência térmica dos esporos, entre elas estão a presença de enzimas termoestáveis, ausência de água livre, alto conteúdo de vários minerais como o cálcio e a presença do ácido

dipicolínico. Existem evidências que o nível de resistência dos esporos podem estar ligado a deficiência de cálcio do meio (BARBOSA e TORRES, 2005).

O uso de probióticos na forma de esporos vem sendo avaliado em diferentes pesquisas. Em um estudo utilizando *Bacillus*, os resultados demonstraram ótima tolerância desses às condições ácidas do estômago, sais biliares e atividade antimicrobiana (PATEL et al., 2009). Os esporos apresentam uma alta resistência a agentes físicos e químicos, enquanto que esporos germinados não são resistentes (CHAVES-LÓPEZ et al., 2009).

2.8 Germinação dos esporos bacterianos

A germinação dos esporos ocorre por um mecanismo complexo envolvendo três estágios: ativação, germinação e crescimento. O esporo germinará se for ativado por calor ou substâncias químicas de maneira satisfatória. Com a ativação ocorre a quebra da permeabilidade das barreiras do esporo pela ativação de enzimas líticas, a ruptura química da capa e do córtex e a ativação do metabolismo de carboidratos.

A germinação é caracterizada pelo intumescimento do esporo, com a formação de um sulco na capa do esporo, o qual pode servir para a entrada de água e nutrientes. Com a entrada de água ocorre o início da oxidação da glicose, com o aumento do consumo de oxigênio e a eliminação de aproximadamente 30% da massa seca do esporo.

A massa seca perdida pelo esporo na germinação é representada pelo dipicolinato de cálcio, proteínas, aminoácidos e glicopeptídeos. Nesta fase, a termorresistência, incolorabilidade e refratibilidade já foram perdidas. Na fase de crescimento, a partir do fim da germinação é indispensável um meio de cultura completo para que a célula germinada apresente a capacidade de se multiplicar (BARBOSA e TORRES, 2005).

2.9 *Bacillus subtilis*

Pertencentes à família *Bacillaceae*, o gênero *Bacillus* é geneticamente e fenotipicamente muito heterogêneo (tipo respiratório, metabolismo dos açúcares, composição da parede, etc.). As espécies deste gênero são bastonetes de tamanhos variáveis, quase sempre móveis por possuir cílios peritríquios (GOMES, 2011).

O *B. subtilis* é classicamente considerado um aeróbio obrigatório, mas ele também pode sobreviver e replicar-se dentro do ambiente gastrointestinal de pouco oxigênio, quando eles podem usar o nitrito ou nitrato (em substituição ao oxigênio) como um aceptor terminal de elétrons durante a respiração anaeróbia, ou por fermentação (NAKANO et al., 1997; NAKANO e ZUBER, 1998). Entretanto, algumas linhagens de *B. subtilis* podem exibir limitado crescimento sobre condições anaeróbias, indicando diferenças entre linhagens quanto à tolerância de condições anaeróbias (BARBOSA et al., 2005).

O *Bacillus subtilis* é caracterizado por ser um bacilo gram positivo, de solo e não patogênico, não possui a capacidade de colonizar tecidos, com capacidade de capturar o DNA exógeno e formar esporos. O gênero *Bacillus* também é reconhecido por bactérias que possuem a capacidade de síntese de bacteriocininas que tem efeito bactericida. As bacteriocininas são proteínas bacterianas com ação antagonista sobre as outras bactérias (BARBOSA e TORRES, 2005). O *B. subtilis* ATCC 6633 tem a capacidade de produzir naturalmente, por meio da síntese nos ribossomos, uma substância com capacidade de inibir células vegetativas em crescimento, denominada subtilina (LIU & NORMAN HANSENG, 1992).

O *Bacillus subtilis* é considerada como modelo de estudo de bactéria gram-positiva, sendo que há várias décadas os *B. subtilis* são usados para a secreção de proteases usadas nas indústrias de fabricação de detergentes e sabão em pó, e para fins industriais e laboratoriais. As proteínas secretadas por *Bacillus subtilis* acumulam no meio extracelular e com isso também podem ser purificadas a baixo custo (WONG, 1995). Assim, diferentes espécies de *Bacillus* estão associadas com a produção de enzimas, antibióticos e químicas industriais (SANDERS et al., 2003). Entre as enzimas secretadas por *B. subtilis* podem ser destacadas a amilase e celulase, com capacidade de solubilizar o fósforo e enxofre *in vitro*. Esta bactéria pode apresentar crescimento em temperatura entre 25 a 65°C em pH entre 5 a 11 (SWAIN e RAY, 2009).

As células de *Bacillus subtilis* são induzidas para diferenciar-se em esporos por limitação de carbono, nitrogênio e algumas vezes pela fonte de fósforo. A formação do esporo ocorre em aproximadamente 7 horas em 37°C (PIGGOT & HILBERT, 2004).

2.10 O uso de *Bacillus subtilis* como probiótico

O *Bacillus subtilis* é um microrganismo transitório no trato gastrintestinal, não patogênico para os animais, capaz de formar esporos resistentes ao calor e frio e estocáveis sem refrigeração por longo período. Os esporos germinam quando chegam ao intestino, o que é necessário para a expressão da resposta animal ao probiótico (SANDERS et al., 2003). A espécie necessita de reinoculação constante, já que a população dessas bactérias é reduzida após 24 horas da suplementação.

As bactérias mais comuns usadas como probiótico incluem as bactérias produtoras de ácido láctico (lactobacilli, enterococcus, streptococcus e bifidobactéria). Entretanto, a maior vantagem dos probióticos compostos por *Bacillus*, quando comparado com a bactéria ácido láctica, está na capacidade de esporular, com uma potencial vantagem que o esporo pode sobreviver o trânsito pelo estômago intacto (HOAL et al., 2000).

Esporos de diferentes linhagens de *Bacillus subtilis* apresentaram excelente resistência a bile e as condições gástricas parcialmente simuladas. A tolerância às condições ácidas e aos sais biliares sugere que para a aplicação como probiótico, o *Bacillus* deve ser administrado na forma de esporos para um melhor resultado (PATEL et al., 2009). BARBOSA et al. (2005) também encontraram uma redução na viabilidade da célula vegetativa maior que 98% dentro de 5 minutos expostas as condições de estresse.

Os principais mecanismos de ação da espécie *Bacillus* são a estimulação imune, atividade antimicrobiana e exclusão competitiva. A maior vantagem das bactérias probióticas formadoras de esporos é que ela pode ser facilmente produzida e a estabilidade do produto final pode ser segura, por ser ofertado na forma de esporos bacterianos resistentes (CUTTING, 2011).

Inicialmente o *Bacillus subtilis* foi utilizado como probiótico em humanos. Esta bactéria foi usada na fermentação de soja, a qual é usada para preparar um alimento básico Japonês (SANDERS, 2003; CUTTING, 2011). Neste alimento, todas as linhagens de *B. subtilis* produzem a protease serina, a qual é nomeada Nattokinase. Tal enzima é secretada em maior quantidade pela célula vegetativa de *B. subtilis* var. *Natto*, e tem sido associada com estimulação do sistema imune (CUTTING, 2011) e com capacidade benéfica de reduzir os coágulos sanguíneos ligados a enfermidades cardiovasculares, isso por ser considerada uma enzima fibrolítica (SUMI et al., 2004; HSIA et al., 2009). O *Bacillus subtilis* também atua estimulando o sistema imune, atuando na proliferação de leucócitos mononucleares, elevando os interferons e as células T, fato que ainda não está esclarecido (SANCHES, 2004).

O *Bacillus subtilis* C-3102 (Calsporin, Calpis Co. Ltda., Tokyo, Japão) é um ingrediente ativo na forma de “direct-fed microbial”. Os esporos são selecionados e apropriados para inclusão em premixes. O probiótico ajuda a criar uma condição anaeróbica na digesta que é favorável para o *Lactobacilli* nativo. Estas espécies se proliferam e produzem ácido láctico, o qual pode inibir espécies de *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* e *Campylobacter jejuni* (HOOGE, 2008).

2.11 Resposta ao uso de *Bacillus subtilis*

2.11.1 Não ruminantes

MARUTA et al. (1996) estudando a influência do *B. subtilis* C-3102 na exclusão de patógenos intestinais de frangos observaram uma diminuição na taxa de identificação do *Campylobacter*, *Salmonella*, *Clostridium perfringens* e *Enterobacteriaceae*. Na microflora intestinal foi observado um aumento no número de *Lactobacilli*, demonstrando a eficiência do *B. subtilis* C-3102 como um aditivo probiótico.

A utilização de *Bacillus subtilis* C-3102 (Calsporin) em frangos de corte foi testada em dois experimentos, na quantidade de 30 g por tonelada (300.000 UFC/g

de alimento). O probiótico aumentou o ganho de peso em 42 dias, melhorou a conversão alimentar dos 21 aos 42 dias, não apresentando diferenças na mortalidade. Os dados combinados de ambos os experimentos demonstraram redução significativa na contagem de coliformes (não *E. coli*) e *Campylobacter* nas carcaças processadas (FRITIL'S et al., 2000).

LA RAGIONE et al. (2001) objetivando avaliar o efeito do *B. subtilis* contra a colonização de *Escherichia coli* O78:K80 verificaram que uma única inoculação oral de $2,5 \times 10^8$ foi suficiente para reprimir todos os aspectos da infecção de *E. coli* O78:K80. O uso de esporos de *Bacillus subtilis* em aves também tem apresentado uma redução na infecção por *Salmonella enterica serotype Enteritidis*, *Clostridium perfringens* (LA RAGIONE e WOODWARD, 2003).

BUDIÑO et al. (2004) avaliando as atividades das enzimas digestivas e os parâmetros sanguíneos em leitões recém-desmamados, e utilizando probiótico constituído de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* ($3,2 \times 10^9$ UFC/g) em comparação com prebiótico frutoligossacarídeo (FOS) e a associação de probiótico + prebiótico (simbiótico), não encontraram efeito do probiótico sobre as atividades específicas das enzimas da mucosa, valores de hemograma, proteínas séricas totais e globulinas.

SANCHES (2004) avaliou a utilização de probiótico a base de *B. subtilis*, em rações de leitões ao desmame e observou que o aditivo testado não apresentou diferença sobre o ganho de peso, o consumo de ração e a conversão alimentar. No estudo também não foi encontrada diferença para a altura das vilosidades, a profundidade das criptas, mas a utilização de probiótico melhorou a microbiota de leitões na fase pós-desmame com o aumento do número de bactérias lácteas no jejuno.

No estudo realizado por BRITO et al. (2005) com utilização de probiótico à base de *Bacillus subtilis*, na proporção de 1×10^{10} UFC/g, foi observado que no período total (1 a 43 dias de idade), houve efeito entre os tratamentos para ganho de peso e consumo de ração, no qual as aves alimentadas com promotor de crescimento ou probiótico apresentaram melhores desempenhos em relação ao grupo controle. O *B. subtilis* pode substituir o promotor de crescimento olaquinox na dieta de frangos de corte, pois não influenciou a digestibilidade dos nutrientes e a energia metabolizável da ração.

FLEMMING & FREITAS (2005) comparando o uso de probióticos à base de *B. subtilis* e *Bacillus licheniformis* (mínimo de $3,2 \times 10^9$ de esporos viáveis por kg do produto), com prebióticos e antibióticos em frangos de corte, demonstraram que a conversão alimentar na primeira semana foi mais desejável para o probiótico comparado com o antibiótico. Na fase inicial o probiótico também apresentou maior ganho de peso, quando comparado com o grupo controle e antibiótico. No período total o probiótico composto por *Bacillus* apresentou melhores resultados para o ganho de peso em relação ao controle.

CARDOSO (2006) avaliando a utilização de *B.subtilis*, cepa DSM 17299 (8×10^5 CFUs/g de alimento e 3×10^5 CFUs/g de alimento) em frangos de corte observou que o probiótico não resultou em melhora no ganho de peso comparando com o controle e com a utilização de antibióticos, mas a utilização deste promoveu melhora na conversão alimentar em relação ao tratamento controle.

Em estudo comparando probiótico a base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, os probióticos não promoveram nenhum benefício ao desempenho de leitões recém-desmamados. Como o desempenho dos animais não foi melhorado, o probiótico utilizado pode não ter sido adequado à situação de desafio microbiano do experimento. Os probióticos não foram eficazes na alteração da microbiota intestinal e frequência de diarréias (UTIYAMA et al., 2006).

BUDIÑO et al. (2006) verificaram em seu estudo que os melhores resultados de desempenho foram obtidos com a utilização do prebiótico e simbiótico, comparado com a utilização de probiótico a base de *Bacillus licheniformis* + *Bacillus subtilis* - $3,2 \times 10^9$ UFC/g. No estudo não foi verificada influência do probiótico sobre a incidência de diarreia, sendo que a adição de probiótico na dieta preveniu o aumento na colonização intestinal por bactérias patogênicas dos 7 aos 14 dias pós-desmame.

BARROS (2007) estudando o efeito do *Bacillus subtilis* e prebiótico na ração de matrizes suínas e seu efeito sobre a leitegada verificou que as concentrações (no 14º dia de lactação) de *Clostridium perfringens* foram menores nas matrizes e nos leitões que receberam probióticos. No período de 15 a 21 dias, os leitões que receberam o tratamento com probiótico a base de *B. subtilis* apresentaram maior ganho de peso em comparação aos demais.

HOOGE (2008) analisando por meio de metanálise os resultados de oito experimentos em aves utilizando esporos de *Bacillus subtilis*, verificou que a

suplementação com até 300.000 UFC/g de alimento proporcionou maior peso corporal (+ 2,52%) e redução favorável na taxa de conversão alimentar (- 1,12%). Para os experimentos com adição de até 500.000 UFC/ g de alimento verificou-se melhorias no peso corporal (+ 1,55%) e a conversão alimentar (- 2,63%) e para o experimento onde foram utilizados 1.000.000 de UFC/ g de alimento, também foi verificado benefícios em peso corporal (+ 2,70%) e taxa de conversão alimentar (- 2,75%).

A germinação dos esporos de *B. subtilis* pode ocorrer rapidamente no trato gastrointestinal de aves, com células vegetativas superando o número de esporos depois de 20 horas que as doses são administradas. Este fato pode ser devido à germinação dos esporos, embora replicação das células dentro do ambiente gastrointestinal pode ser outro fator contribuinte (CARTMAN et al., 2008).

2.11.2 Ruminantes

MCGILIARD & STALLINGS (1998) objetivando avaliar um produto da fermentação de *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Aspergillus oryzae* e uma cultura de levedura (21,2 g/vaca/dia) em 3.417 vacas lactantes, verificaram aumento na produção de leite de 31 rebanhos (17 significativamente), e reduziu a produção de leite de 15 rebanhos (7 significativamente). As produções de proteína e gordura diferiram pouco com ou sem o suplemento, mas a porcentagem de gordura reduziu.

GARCIA (2008), objetivando determinar *in vitro* o efeito inibitório de *Bacillus subtilis* contra bactérias patogênicas e avaliar o desempenho de bezerros, verificou que o *B. subtilis* foi mais efetivo contra o *Clostridium perfringens*. A taxa de crescimento *in vitro* do *B. subtilis* mostrou a capacidade de multiplicação em taxa mais rápida que a passagem gastrointestinal de 2 a 5% por hora. No estudo também foi observado aumento no consumo de matéria seca, no ganho de peso e no perímetro torácico de bezerros alimentados com *B. subtilis*.

No experimento de SUN et al. (2010) a suplementação diária de 10^9 ufc de *Bacillus subtilis natto* no leite em bezerros Holandês aumentou o desempenho por melhora no ganho médio diário e eficiência alimentar. Os pesquisadores não encontraram diferenças em IgE, IgA, e IgM sérico, enquanto o IgG e níveis de IFN- γ

foram maiores nos bezerros alimentados com *B. subtilis* comparado ao grupo controle. O estudo sugere que as características do probiótico viável de *Bacillus subtilis natto* beneficia a função imune de bezerros durante a fase de pré-desmame.

Em estudo realizado por QIAO et al. (2010) avaliando o efeito adição de 100 gramas de cultura de *Bacillus subtilis* (2×10^{11} células vivas) duas vezes ao dia na dieta de vacas Holandês produzindo aproximadamente 24,5 kg de leite/dia alimentadas com dieta baseada em silagem de milho e feno de alfafa picado não observaram efeito sobre a ingestão de matéria seca, produção e composição do leite, eficiência alimentar e peso corporal. A mesma dose de cultura de *Bacillus subtilis* para vacas secas Holandês não teve efeito sobre a ingestão (kg/dia), passagem para o duodeno (kg/dia) e digestibilidade aparente no rúmen (%) da matéria orgânica, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido e nitrogênio. A quantidade de nitrogênio bacteriano para o duodeno também não alterou com a suplementação da cultura de *Bacillus subtilis*. O pH ruminal e as concentrações de ácidos graxos totais, acetato, propionato e butirato não foram alteradas pelo probiótico bacteriano. Uma limitação dos estudos é o baixo número de animais por tratamento, o qual utilizou $n=10$ para mensurar o desempenho e $n=3$ para a digestibilidade aparente e características ruminais.

Do mesmo modo, PENG et al. (2011) avaliando o efeito de 0, 6 e 12 g/vaca/dia produto da fermentação de *Bacillus subtilis natto* ($8,3 \times 10^9$ de esporos de *B. subtilis* por grama do produto) para vacas Holandês produzindo aproximadamente 35 Kg de leite/dia alimentadas com dieta misturada total (TMR) baseada em silagem de milho, observaram que a produção de leite foi 3,1 e 3,2 Kg/dia maior para vacas suplementadas com 6 e 12 g/vaca/dia do produto comparado com o grupo controle. Diferenças em produção de leite foram observadas a partir da quinta semana experimental. As concentrações de ácidos graxos não esterificados do sangue e acetato ruminal reduziram. A conclusão desses autores é que o provável modo de ação do probiótico foi alteração do padrão de fermentação ruminal pela maior produção de propionato ruminal, o qual foi associado com maior conteúdo de lactose e produção de leite.

Neste estudo, um aspecto importante a ser considerado é que o *B. subtilis* usado foi previamente selecionado para alta atividade de protease e celulase. Outra consideração é que os esporos foram ofertados em forma de produto da fermentação bacteriana, o qual pode conter as celulasas e proteases já secretadas

pela bactéria, resultando em um maior efeito ruminal. As doses de esporos no produto também foram altas (6 g do produto= $49,8 \times 10^9$ e 12 g do produto= $99,6 \times 10^9$ de esporos de *B. subtilis* por dia). A alta quantidade de esporos de *B. subtilis natto* no produto e a seleção de bactérias com alta atividade enzimática pode ter contribuído para a alteração do padrão de fermentação ruminal e alta resposta em leite.

2.12 Considerações finais

O *B. subtilis* não é um organismo intestinal, mas por ingestão contínua no alimento pode reduzir o número ou a incidência de patógenos intestinais em aves e suínos, acompanhado ou não de ganho no desempenho animal. Em ruminantes a administração oral de esporos de *B. subtilis* pode resultar em aumento no desempenho e melhora na função imune. Os estudos apresentam que os esporos viáveis de *Bacillus subtilis* são capazes de crescer dentro do trato intestinal. Portanto, estudos sugerem que os esporos viáveis de *B. subtilis* podem ser usados na alimentação como uma alternativa aos antibióticos e a outros probióticos bacterianos não formadores de esporos. Em ruminantes o número de trabalhos realizados é bastante limitado havendo, deste modo, a necessidade de se realizar mais trabalhos de pesquisa na área, haja visto a eficácia do uso do *B. subtilis* em não ruminantes além da obtenção de novas informações e resultados mais precisos com relação ao uso do referido probiótico no intuito de melhorar os índices produtivos.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, H.R.; TORRES, B.B. **Microbiologia básica**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.
- BARBOSA, T.M.; SERRA, C.R.; LA RAGIONE, R.M.; WOODWARD, M.J.; HENRIQUES, A.O. Screening for *Bacillus* Isolates in the broiler gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.2, p.968–978, 2005.
- BARROS, D.S. de. **Probiótico e prebiótico na ração de matrizes suínas e seu efeito sobre a leitegada e intervalo desmama estro**. Dissertação (Mestre em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso, 2007.
- BEAUCHEMIN, K.A.; YANG, W.Z.; MORGAVI, D.P.; GHORBANI, G.R.; KAUTZ, W.; LEEDLE, J.A.Z. Effects of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. **Jornal Animal Science**, v.81, p.1628-1640, 2003.
- BRITO, A.B. ; LEANDRO, N.S.M.; STRINGHINI, J.H.; BASTOS, C.A.A.; CUNHA, W.P.; CAFÉ, M.B. Desempenho e digestibilidade de nutrientes para frangos alimentados com rações contendo promotor de crescimento (Olaquinox) e probiótico (*Bacillus subtilis*). **Acta Scientiarum Animal Science**, v.27, p.327-332, 2005.
- BUDIÑO, F.E.L.; THOMAZ, M.C.; KRONKA, R.N.; JÚNIOR, J.M.P.; SANTANA, Á. E.; TUCCI, F.M.; FRAGA, A.L.; SCANDOLERA, A.J.; HUAYNATE, R.A.R. Influência da adição de probiótico e/ou prebiótico em dietas de leitões desmamados sobre as atividades das enzimas digestivas e parâmetros sanguíneos. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.26, n.4, p.529-536, 2004.
- BUDIÑO, F. E. L.; THOMAZ, M. C.; KRONKA, R. N.; TUCCI, F. M.; FRAGA, A. L.; SCANDOLERA, A. J.; HUAYNATE, R. A. R.; NADAL, A.; CORREIA, R.C. Efeito da adição de probiótico e/ou prebiótico em dietas de leitões desmamados sobre o desempenho, incidência de diarréia e contagem de coliformes totais. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.43, p.59-67, 2006.
- BUTOLO, J.E. **Qualidade de ingredientes na alimentação animal**. Ed. OESP. Campinas, 2002. p.325-330.
- CARDOZO, E.C. **Utilização de Probiótico (*Bacillus subtilis*) como aditivo alimentar em dietas de frangos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

CARLI, E. M. de. **Utilização de *Lactobacillus paracasei* como probiótico para o controle de *Salmonella* spp. em frangos de corte.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. Janeiro, 2006.

CARTMAN, S.T.; LA RAGIONE, R.M.; WOODWARD, M.J. *Bacillus subtilis* spores germinate in the chicken gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.16, p.5254–5258, 2008.

CHAVES-LÓPEZ, C.; LANCIOTTI, R.; SERIO, A.; PAPARELLA, A.; GUERZONI, E.; SUZZI, G. Effect of high pressure homogenization applied individually or in combination with other mild physical or chemical stresses on *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* spore viability. **Food Control**, v.20, p.691–695, 2009.

CHIQUETTE, J. Evaluation of the protective effect of probiotics fed to dairy cows during a subacute ruminal acidosis challenge. **Animal Feed Science and Technology**, v.153, p.278–291, 2009.

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

DALLOUL, R.A.; LILLEHOJ, H.S.; SHELLEM, T.A.; DOERR, J.A. Enhanced mucosal immunity against *Eimeria acervulina* in broilers fed a *Lactobacillus*-based probiotic. **Poultry Science**, v.82, p.62-66, 2003.

FAO/WHO Food and Agriculture Organization/World Health Organization. 2002. Report of a Joint FAO/ WHO **Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. Disponível em: http://www.who.int/food_safety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf Acesso em: 23 de junho de 2011.

FLEMMING, J.S.; FREITAS, R.J.S. Avaliação do efeito de prebióticos (MOS), probióticos (*bacillus lecheniformes* e *bacillus subtilis*) e promotor de crescimento na alimentação de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n.2, p.41-47, 2005.

FRITTS, C.A. ; KERSEY, J.H.; MOTL, M.A. et al. *Bacillus subtilis* C-3102 (Calsporin) improves live performance and microbiological status of broiler chickens. **Journal of Applied Poultry Research**, v.9, n.2, p.149-155, 2000.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, New York, v.66, p. 356-378, 1989.

GAGGIÀ, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, p.15–28, 2010.

GALYEAN, M.L. & ENG, K.S. Memorial Symposium on Metabolic Disorders of Feedlot Cattle Application of research findings and summary of research needs: Bud Britton. **Jornal Animal Science**, v.7, p.323-327, 1998.

GARCIA, G.R. **Caracterização microbiológica e avaliação de uma cepa de *Bacillus subtilis* no desempenho de bezerras da raça Holandesa**. 68p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – UNESP, Jaboticabal – SP, 2008.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, p. 1401-1412, 1995.

GOMES, M.J.P. **Gênero *Bacillus* spp.** Veterinária da UFRGS. Microbiologia Clínica. 2011. Disponível em: <http://www6.ufrgs.br/labacvet/files/Bacillus201102.pdf>
Acesso em: 17 de novembro de 2011.

HOAL, N.T.; BACCIGALUPI, L.; HUXHAM, A., et al. Characterization of *Bacillus* species used of oral bacteriotherapy and bacterioprophylaxis of gastrointestinal disorders. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.12, p.5241-5247, 2000.

HOOGE, D. *Bacillus subtilis* spores may. Nutrition & Health: Poultry. **Feedstuffs**, p.22-23, 21 de Janeiro, 2008.

HSIA, C.; SHEN, M.; LINC, J. et al. Nattokinase decreases plasma levels of fibrinogen, factor VII, and factor VIII in human subjects. **Nutrition Research**, v.29, p.190–196, 2009.

KREHBIEL, C.R.; RUST, S.R.; ZHANG, G.; GILLILAND, S.E. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. **Journal Animal Science**, v.81 (supplement 2), p.E120-E132, 2003.

LA RAGIONE, R.M.; CASULA, G.; CUTTING, S.M.; WOODWARD, M.J. *Bacillus subtilis* spores competitively exclude *Escherichia coli* 070:K80 in poultry. **Veterinary Microbiology**, v.79, p.133-142, 2001.

LA RAGIONE, R.M.; WOODWARD, M.J. Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* and *Clostridium perfringens* in young chickens. **Veterinary Microbiology**, v.94, p.245-256, 2003.

LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v.147, p.747-748, 1965.

LIU, W.; NORMAN HANSENG, J. Enhancement of the chemical and antimicrobial properties of subtilin by site-directed mutagenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v.267, n.35, p.25078-25085, 1992.

MARTIN, S.A.; NISBET, D.J. Effect of direct-fed microbials on rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.1736-1744, 1992.

MARUTA, K.; MIYAZAKI, H.; MASUDA, S.; TAKAHASHI, M.; MARUBASHI, T.; TADANO, Y.; TAKAHASHI, H. Exclusion of Intestinal Pathogens by Continuous Feeding with *Bacillus subtilis* C-3102 and its Influence on the Intestinal Microflora in Broilers. **Animal Science and Technology (Jpn.)**, v.67, n.3, p.273-280, 1996.

MCGILLIARD, M.L.; STALLINGS, C.C. Increase in milk yield of commercial dairy herds fed a microbial and enzyme supplement. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.1353-1357, 1998.

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.

NAKANO, M. M.; ZUBER, P. Anaerobic growth of a “strict aerobe” (*Bacillus subtilis*). **Annual Review of Microbiology**, v52, p.165–190, 1998.

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, p.548-572, 2000.

NURMI E. & RANTALA, M. New aspects of Salmonella infection in broiler production. **Nature**, v.241, p.210-211, 1973.

PATEL, A.K.; DESHATTIWAR, M.K.; CHAUDHARI, B.L.; CHINCHOLKAR, S.B. Production, purification and chemical characterization of the catecholate siderophore from potent probiotic strains of *Bacillus* spp. **Bioresource Technology**, v.100, p.368–373, 2009.

PELICANO, E.R.L.; SOUZA, P.A. de; SOUZA, H.B.A. de. Prebióticos e probióticos na nutrição de aves. **Ciências Agrárias e da Saúde**, v.2, p.59–64, jan-jun, 2002.

PENG, H.; WANG, J.Q.; KANG, H.Y. et al. Effect of feeding *Bacillus subtilis* natto fermentation product on milk production and composition, blood metabolites and rumen fermentation in early lactation dairy cows. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. 2011. doi: 10.1111/j.1439-0396.2011.01173.x

PERGIGÓN, G.; ALVAREZ, S.; RACHID, M.; AGUERO, G.; GOBBATO, N. Immune System Stimulation by Probiotics. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.78, p.1597-1606, 1995.

PIGGOT, P.J.; HILBERT, D.W. Sporulation of *Bacillus subtilis*. **Current Opinion in Microbiology**, v.7, p.579–586, 2004.

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, p.429–436, 2010.

SAAD, S.M.I.; Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.1, jan./mar., 2006

SANCHES, A. L. **Probiótico, Prebiótico e Simbiótico em rações de leitões ao desmame**. 63p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2004.

SANDERS, M. E.; MORELLI, L.; TOMPKINS, T. A. Sporeforms as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** – Institute of Food Technologists. v.2, p.101-110, 2003.

SUMI, H.; YANAGISAWA, Y.; YATAGAI, C. et al. Natto *Bacillus* as an Oral Fibrinolytic Agent: Nattokinase Activity and the Ingestion Effect of *Bacillus subtilis natto*. **Food Science Technology Research**, v.10, n.1, p.17–20, 2004.

SUN, P.; WANG, J.Q.; ZHANG, H.T. Effects of *Bacillus subtilis natto* on performance and immune function of preweaning calves. **Journal Dairy Science**, v.93, p.5851-5855, 2010.

SWAIN, M.R.; RAY, R.C. Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. **Microbiological Research**, v.164, p.121-130, 2009.

UTIYAMA, C.E.; OETTING, L.L.; GIANI, P.A.; SANTOS RUIZ, U. dos; MIYADA, V. S. Efeitos de antimicrobianos, prebióticos, probióticos e extratos vegetais sobre a microbiota intestinal, a frequência de diarreia e o desempenho de leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.2359-2367, 2006.

TIMMERMAN, H.M. ; MULDER, L.; EVERTS, H.; VAN ESPEN, D.C.; VAN DER WAL, E.; KLAASSEN, G.; ROUWERS, S.M.G.; HARTEMINK, R.; ROMBOUTS, F.M.; BEYNEN A.C. Health and Growth of Veal Calves Fed Milk Replacers With or Without Probiotics, **Journal Dairy Science**, v.88, p.2154–2165, 2005.

WONG, S.L. Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expression and secretion of heterologous proteins. **Current Opinion in Biotechnology**, v.6, p.517-522, 1995.

CAPÍTULO III

DESEMPENHO E DIGESTIBILIDADE EM VACAS LEITEIRAS SUPLEMENTADAS COM *BACILLUS SUBTILIS*

3. DESEMPENHO E DIGESTIBILIDADE EM VACAS LEITEIRAS SUPLEMENTADAS COM *BACILLUS SUBTILIS*

RESUMO

Para avaliar o desempenho e a eficiência digestiva de vacas leiteiras suplementadas com esporos de *Bacillus subtilis* foram realizados dois experimentos. No primeiro, dezoito vacas Holandês receberam os tratamentos probiótico ou placebo em delineamento de reversão simples, com períodos de 39 dias, e resposta avaliada na quinta semana. Os tratamentos foram: 0,3 g de esporos viáveis de *Bacillus subtilis* C-3102 (3×10^9 ufc/dia) ou Placebo. Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) nas produções diárias de leite e de sólidos, de nitrogênio ureico no leite e da contagem de células somáticas. O consumo diário de matéria seca foi 18,3 kg em ambos os tratamentos ($P = 0,91$). A digestibilidade aparente da FDN no trato digestivo total foi 52,6% com *Bacillus subtilis* e 55,8% para o Placebo ($P = 0,28$). Não foi detectada diferença entre os tratamentos na taxa de passagem da digesta e atividade mastigatória ($P > 0,05$). No segundo experimento, trinta vacas Holandês receberam os mesmos tratamentos por 16 semanas, os dados foram coletados como medidas repetidas ao longo do tempo. A suplementação do probiótico aumentou as produções diárias de leite (25,3 vs. 23,6 kg, $P = 0,02$), proteína (0,816 vs. 0,763 kg, $P = 0,01$), energia do leite (14,5 vs. 13,5, $P = 0,02$) e não teve efeito sobre a gordura do leite ($P = 0,39$). O probiótico tendeu a reduzir o nitrogênio uréico no leite (19,3 vs. 20,8, $P = 0,06$). A suplementação com *Bacillus subtilis* aumentou a produção de leite em um dos experimentos, mas o mecanismo de resposta positiva não foi elucidado.

Palavras-chave: Contagem de células somáticas, digestibilidade, probiótico, vaca de leite.

PERFORMANCE AND DIGESTIBILITY IN DAIRY COWS SUPPLEMENTED WITH *BACILLUS SUBTILIS*

ABSTRACT

Performance and digestive efficiency of dairy cows supplemented with *Bacillus subtilis* were evaluated in two trials. In the first one, eighteen Holstein cows received probiotic or placebo treatments in a crossover design, with 39-day periods and response evaluated on the fifth week. Treatments were: 0.3 g of *Bacillus subtilis* C-3102 viable spores (3×10^9 cfu/day) or Placebo. There was no treatment effect ($P > 0.05$) on the daily production of milk and solids, milk urea nitrogen, and somatic cell count. Daily dry matter intake was 18.3 in both treatments ($P = 0.91$). Total tract apparent digestibility of the NDF was 52.6% with *Bacillus subtilis* and 55.8 for the Placebo ($P = 0.28$). There was no treatments effect on passage rate and chewing activity ($P > 0.05$). In experiment 2, thirty Holsteins received same treatments for 16 weeks and data were collected as repeated measures over time. In experiment 2, the supplementation of the probiotic increased the daily secretions of milk (25.3 vs. 23.6 kg, $P = 0.02$), protein (0.816 vs. 0.763 kg, $P = 0.01$), energy milk (14.5 vs. 13.5, $P = 0.02$), and had no effect on milk fat ($P = 0.39$). The probiotic tended decreased milk urea nitrogen content ($P = 0.06$). The supplementation of *Bacillus subtilis* increased milk yield in one experiment, but the mechanism for the response was not elucidated.

Key-words: Dairy cow, digestibility, probiotic, somatic cells count.

3.1 Introdução

A produção de alimentos a partir de animais suplementados com microrganismos vivos é coerente à tendência naturalista do mercado consumidor. Os probióticos são substâncias constituídas por microrganismos vivos usados na alimentação com o objetivo de beneficiar o animal hospedeiro, por impacto positivo sobre o intestino e o sistema imune (REID, 2008). O termo “direct-fed microbials” (DFM) também é conhecido como probiótico e tem sido usado como alternativa para os antibióticos na alimentação animal (PENG et al., 2011). Entretanto, os termos probiótico e DFM não são verdadeiramente sinônimos pelo fato de alguns probióticos também possuir enzimas e extratos de cultura microbiana. Já o DFM deve conter somente uma fonte viva de microrganismos de ocorrência natural (McALLISTER et al., 2011).

O *Bacillus subtilis* é um microrganismo transitório no trato gastrintestinal, que forma esporos resistentes ao calor, frio e barreiras gástricas, podendo ser estocado sem refrigeração por longos períodos (SANDERS et al., 2003; CUTTING, 2010; CARLIN, 2011). A colonização intestinal pelos esporos requer reinoculação constante, já que a população dessas bactérias é reduzida após 24 horas da suplementação. Probióticos à base de esporos bacterianos podem sobreviver à passagem pelo estômago (HOAL, et al., 2000), tendo potencial para serem mais resistentes às barreiras gástricas de ruminantes, comparativamente a probióticos suplementados na forma de células vegetativas.

A suplementação dietética de *Bacillus subtilis* tem melhorado o desempenho de não ruminantes (FRITTS et al., 2000; HOOGE, 2008), bezerros (SUN et al., 2010; GARCIA 2008) e de vacas leiteiras (PENG et al., 2011). Um mecanismo proposto para como o *Bacillus subtilis* induziria ganho no desempenho seria por proporcionar anaerobiose na digesta, favorável à proliferação de Lactobacilli nativos capazes de produzir ácido láctico e causar inibição do crescimento de bactérias patogênicas (MARUTA et al., 1996; SANDERS et al., 2003), um mecanismo semelhante ao de leveduras vivas (BITTENCOURT et al., 2011) e questionável quanto à patogenicidade bacteriana presente no rúmen.

Para vacas Holandesas produzindo 35 kg de leite/dia o uso de 6 e 12 g/vaca/dia do produto da fermentação de *Bacillus subtilis natto* ($8,3 \times 10^9$ de esporos

de *Bacillus subtilis* por grama do produto) pode resultar em aumento da produção de leite em 3,1 e 3,2 kg/dia. Outro provável modo de ação do probiótico pode estar ligado à alteração do padrão de fermentação ruminal pela maior produção de propionato ruminal (PENG et al., 2011).

Já em vacas Holandês com produção média de 24,5 kg de leite/dia a suplementação de 2×10^{11} células vivas de *Bacillus subtilis* não influenciou a produção e composição do leite, e eficiência alimentar. A mesma dose da cultura bacteriana para vacas não lactantes não alterou a digestibilidade aparente no rúmen da matéria orgânica e fibra em detergente neutro. As concentrações de ácidos graxos totais, acetato, propionato e butirato ruminal também não foram alteradas com o uso de células vegetativas de *Bacillus subtilis* como probiótico (QIAO et al., 2010).

Os dois principais estudos com o uso de *Bacillus subtilis* para vacas lactantes avaliaram a bactéria na forma de produto da fermentação bacteriana e células vivas, entretanto, somente o uso de esporos bacterianos ainda não foi avaliado. Diferenças entre a forma de oferta do *Bacillus subtilis*, dose e linhagem parece influenciar as respostas produtivas. Tanto a eficácia quanto o mecanismo de ação dos esporos de *Bacillus subtilis* sobre a digestão, e conseqüentemente o desempenho de vacas leiteiras, não foram extensivamente avaliados.

Objetiva-se avaliar o efeito sobre o desempenho e a digestão de vacas leiteiras da suplementação com esporos de *Bacillus subtilis*.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Experimento 1

O experimento foi realizado de fevereiro a abril de 2009 e utilizou 18 vacas da raça Holandesa em lactação, com 246 ± 150 dias em lactação, produzindo média de $29,7 \pm 5,8$ kg de leite, com contagens médias de células somáticas do leite (CCS) abaixo de 100 mil células/ml, formaram-se nove blocos de dois animais com base na ordem de parto (primíparas ou múltíparas) e na produção diária de leite. Dentro de cada bloco, os animais foram aleatoriamente alocados a uma de duas

sequências de tratamentos, em delineamento de Reversão Simples (Cross-over), com dois períodos de 39 dias. Entre os dois períodos experimentais foi adotado um período “washout” de dez dias, no qual os animais receberam a dieta controle. Neste delineamento, os animais que foram alocados no tratamento Placebo no primeiro período, passaram para o tratamento probiótico no segundo período e vice-versa.

Os tratamentos foram: 0,3g de esporos viáveis de *Bacillus subtilis* (Calsporin, Uniquimica, São Paulo, SP) diluído em carbonato de cálcio (*B. subtilis*) ou Placebo. O produto foi formulado por diluição da cepa de *Bacillus subtilis* C-3102 (Calpis Co. Ltda, Tóquio, Japão) para propiciar consumo mínimo diário de 3×10^9 UFC de esporos viáveis. A dose do probiótico de cada vaca foi alocada por meio de capsulas por administração oral forçada. A resposta aos tratamentos foi avaliada na quinta semana de cada período experimental.

As vacas foram alimentadas individualmente, duas vezes ao dia (5:00h e às 13:00h) em confinamento total do tipo *tie stall* com camas de areia. A Dieta Completa (TMR) foi ofertada duas vezes por dia em quantidade suficiente para prover 15% do ofertado como sobra diária (Tabela 1). As proporções dos volumosos da dieta foram ajustadas uma vez por semana de acordo com a variação no seu teor de matéria seca. A quantidade de dieta oferecida e as sobras alimentares de cada vaca foram mensuradas diariamente.

Entre os dias 28 e 33 de cada período, amostras de cada ingrediente concentrado, bem como das sobras alimentares de cada vaca foram coletadas diariamente e congeladas. Uma amostra composta de cada período foi formada com base em quantidades idênticas de matéria natural.

Estas amostras foram pré-secas em estufa ventilada por 72 horas a 55°C, trituradas em peneira de 1 mm em moinho do tipo Thomas-Willey, e uma sub-amostra foi desidratada a 100°C por 24 horas para determinação do teor de matéria seca. A proteína bruta foi analisada por um destilador a vapor do tipo Microkjeldhal (A.O.A.C., 1975). As análises de extrato etéreo foram realizadas segundo o A.O.A.C. (1990). As cinzas foram determinadas por incineração da amostra a 550°C por 8 horas. O teor de fibra em detergente neutro (FDN) foi determinado por um determinador de fibra TE-149 (Tecnal, Piracicaba, SP), usando amilase e sulfito de sódio. O consumo de matéria seca (CMS) foi calculado pela diferença entre as

somas dos oferecidos diários de matéria seca de cada alimento e a sobra diária de matéria seca de cada animal.

Tabela 1. Composição das dietas oferecidas em ingredientes e das dietas consumidas em nutrientes. Experimento 1

Ingredientes	<i>B. subtilis</i>	Placebo
	% na MS	
Silagem de milho	50,0	
Feno de tifton	4,1	
Farelo de soja	20,2	
Polpa cítrica	10,2	
Milho rehidratado ensilado	11,2	
Uréia	0,4	
Oxido de magnésio	0,3	
Sabão de cálcio com 40% de linoleato ¹	1,3	
Calcário calcítico	0,8	
NaCl	0,3	
Bicarbonato de sódio	0,8	
Minerais e vitaminas ²	0,4	
	Nutrientes	
Proteína bruta	17,2	17,1
FDN total	33,7	33,5
FDN oriundo silagem de milho	24,67	24,67
FDN oriundo de forragens	26,8	26,7
Extrato etéreo	4,8	4,8
Cinzas	9,3	9,3
Carboidratos não-fibrosos ³	35,0	35,3

¹ Megalac (Química Geral do Nordeste SA, Nova Ponte, MG)

² Minerais e vitaminas: 18,5% de Ca; 15% de P; 3,0% de Mg; 3,0% de S; 240 ppm de Co; 3000 ppm de Cu; 8000 ppm de Mn; 12000 ppm de Zn; 90 ppm de Se; 180 ppm de I; 1.000.000 UI/kg Vit. A; 250.000 UI/kg Vit. D; 6.250 UI/kg Vit E.

³ Carboidratos não-fibrosos = 100 – (PB + FDN + EE + Cinzas)

As vacas foram ordenhadas três vezes por dia. A produção de leite foi formada pela média das pesagens de 12 ordenhas consecutivas entre os dias 27 a 31 de cada período. Amostras de 6 ordenhas consecutivas foram obtidas entre os dias 29 a 31 de cada período para determinação dos teores de proteína, gordura, lactose, sólidos totais e nitrogênio uréico (NUL) e da contagem de células somáticas (CCS) (Laboratório Centralizado da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa, Curitiba, Paraná).

As análises de sólidos foram realizadas por equipamento Bentley 2000 (Bentley Instruments[®]), através de sistemas ópticos e infravermelhos. A CCS foi determinada no equipamento Somacount (Bentley Instruments[®]), através da citometria de fluxo. Já para a análise de NUL foi utilizado o Chemspec 150 (Bentley

Instruments[®]), através da metodologia de Berthelot. A secreção diária de energia no leite foi calculada pela equação: $[(0,0929 \times \% \text{ gordura}) + (0,0547 \times \% \text{ de proteína}) + (0,0395 \times \% \text{ de lactose})] \times \text{kg de leite}$ (NRC, 2001). A CCS foi transformada em uma escala linear de 0 a 9 (CCS linear), sendo o ponto médio de cada escore linear representado pelos seguintes valores de CCS ($\times 1.000$ células/mL): 12,5 para CCS linear 0; 25 para CCS linear 1; 50 para CCS linear 2; 100 para CCS linear 3; 200 para CCS linear 4; 400 para CCS linear 5; 800 para CCS linear 6; 1.600 para CCS linear 7; 3.200 para CCS linear 8 e 6.400 para CCS linear 9.

O peso vivo e o escore de condição corporal (ECC) de cada vaca foram mensurados no dia 35 de cada período, visando descrever as unidades experimentais. A condição corporal foi avaliada visualmente em escala de 1 a 5, sendo 1 atribuído a vacas magras e 5 para obesas (WILDMAN et al., 1982). Os mesmos três avaliadores avaliaram cada vaca independentemente e o escore médio foi utilizado. O peso foi determinado imediatamente após a ordenha da manhã.

A digestibilidade aparente no trato digestivo total da matéria seca, da matéria orgânica, da FDN e da matéria orgânica não-FDN foi determinada por mensuração da produção fecal por coleta total de fezes realizada por 8 horas ininterruptas nos dias 33 a 35 de cada período. A coleta de fezes em cada dia foi iniciada com 8 horas de atraso com relação ao dia anterior, visando obter uma amostragem representativa das 24 horas do dia sem causar distúrbio no consumo de alimentos e na produção de leite dos animais. As fezes de cada vaca foram congeladas após cada dia de coleta e formaram uma amostra composta ao final de cada período. Os compostos fecais foram desidratados e o teor de FDN e cinzas foram determinados como anteriormente descrito.

O consumo diário de matéria orgânica digestível (CMOD) foi calculado por meio da multiplicação do consumo de matéria orgânica mensurado entre os dias 28 a 33 de cada período pela digestibilidade da matéria orgânica mensurada entre os dias 33 a 35 de cada período. A eficiência alimentar foi calculada pela relação entre a produção de leite e o CMS.

A taxa fracional de passagem (kp) da digesta foi estimada pela queda na concentração fecal de cromo após administração oral em dose única de 25 g de óxido crômico. A amostragem fecal ocorreu 12, 18, 24, 36, 48 e 84 horas após a administração do marcador. O kp foi estimado pela inclinação da regressão linear ao longo do tempo do logaritmo natural da concentração fecal de cromo. O coeficiente

de determinação médio das regressões foi 0,97. Para determinação do teor de cromo nas fezes, 1 g de amostra pré-seca foi incinerada a 550°C por 8 horas, e submetida a digestão com solução combinada de 1.000 ml de ácido fosfórico (85%), 30 ml de sulfato de manganês (10%) e 4 ml de bromato de potássio (4,5%), em banho de areia, até terminar efervescência. A esta solução foi adicionada 25 ml de cloreto de cálcio (4000 ppm) e o volume foi completado para 100 ml com água destilada, para posterior filtragem em papel de filtro (Whatman nº40) e análise da solução por espectrofotometria de absorção atômica.

No dia 28 de cada período foi avaliada a atividade mastigatória por observação visual da atividade bucal de cada animal a cada cinco minutos do dia por 24 horas contínuas. As atividades bucais consideradas foram de ingestão de alimento, de ingestão de água, de ruminação e de ócio. O tempo de mastigação em minutos por dia foi definido como a soma dos tempos de ingestão de alimento e de ruminação. Os tempos de mastigação, ingestão e ruminação por unidade de matéria seca consumida foram calculados utilizando-se o consumo de matéria seca mensurado no dia da determinação da atividade mastigatória.

A concentração de *Bacillus subtilis* (C-3102) foi analisada através da diluição em solução tampão e incubação a 65°C por 35 minutos e uma alíquota foi incubada em meio de cultura Trypticase Soy Broth (BBL)[®] com 2% agar para posterior contagem das unidades formadoras de colônia de *Bacillus subtilis*.

Os dados foram analisados pelo procedimento GLM do pacote estatístico SAS (1988) com o seguinte modelo: $Y_{ijkl} = \mu + B_i + V_{j(i)} + P_k + T_l + e_{ijkl}$, em que: μ = média geral; B_i = efeito de bloco ($i = 1$ a 9); $V_{j(i)}$ = efeito de vaca dentro de bloco ($j = 1$ a 18); P_k = efeito de período ($k = 1$ ou 2); T_l = efeito de tratamento ($l = B. subtilis$ ou Placebo) ; e_{ijkl} = erro experimental, assumido independente e identicamente distribuído em uma distribuição normal com média zero e variância σ^2 .

3.2.2 Experimento 2

O segundo experimento foi realizado de fevereiro a maio de 2009 e utilizou 30 vacas Holandês, sete primíparas, com 161 ± 72 dias em lactação no início do período experimental, foram blocadas em 15 grupos de dois animais com base na

contagem de células somáticas e produção diária de leite. As vacas foram aleatoriamente alocadas a um tratamento por 16 semanas em delineamento em blocos casualizados.

A CCS média na blocagem foi 716 mil células/mL no tratamento *Bacillus subtilis* e 734 mil no Placebo, enquanto a produção de leite foi 29,6 e 29,9 kg, respectivamente. Os dados obtidos na blocagem foram utilizados como covariável no modelo de análise estatística.

Nos dois experimentos, os tratamentos, o tipo de instalação e o manejo alimentar foram os mesmos. No segundo estudo, a dose de *Bacillus subtilis* de cada vaca foi adicionada ao alimento oferecido pela manhã. A composição da dieta basal é relatada na Tabela 2.

Tabela 2. Composição da dieta basal em ingredientes e nutrientes. Experimento 2

Ingredientes	% da matéria seca
Silagem de milho	42,4
Farelo de soja	21,8
Polpa de citros	15,8
Milho moído fino	15,6
Uréia	0,4
Sabão de cálcio com 40% de linoleato ¹	1,3
Calcário calcítico	0,8
Sal	0,4
Bicarbonato de sódio	0,9
Minerais e vitaminas ²	0,6
Nutrientes	
Proteína bruta	17,7
FDN total	30,1
FDN oriundo de silagem de milho	22,1
Extrato etéreo	5,2
Cinzas	8,8
Carboidratos não-fibrosos ³	38,5
	% da matéria natural
Matéria seca	48,7

¹ Megalac (Química Geral do Nordeste SA, Nova Ponte, MG)

² Minerais e vitaminas: 18,5% de Ca; 15% de P; 3,0% de Mg; 3,0% de S; 240 ppm de Co; 3000 ppm de Cu; 8000 ppm de Mn; 12000 ppm de Zn; 90 ppm de Se; 180 ppm de I; 1.000.000 UI/kg Vit. A; 250.000 UI/kg Vit. D; 6.250 UI/kg Vit E.

³ Carboidratos não-fibrosos = 100 – (PB + FDN + EE + Cinzas)

As vacas foram ordenhadas duas vezes por dia e amostras foram obtidas para análise laboratorial a cada sete dias do período experimental, como anteriormente descrito. O peso vivo e o ECC foram determinados a cada quatro semanas.

As variáveis foram analisadas como medidas repetidas pelo procedimento Mixed do SAS (LITTEL et al., 1998) com modelo contendo o efeito aleatório de covariável (medida da mesma variável obtida na blocagem) e os efeitos fixos de bloco (1 a 15), tratamento (*Bacillus subtilis* ou Controle), semana (1 a 16) e a interação entre tratamento e semana. A estrutura de covariância utilizada foi definida pelo critério de informação de Akaike (WOLFINGER, 1993), dentre autoregressiva de primeira ordem, não-estruturada e simetria composta. O quadrado médio para o efeito de vaca dentro de tratamento foi utilizado como medida de erro para testar o efeito de tratamento.

3.3 Resultados e discussão

Apesar de poucos estudos com probióticos bacterianos na alimentação de vacas lactantes, KREHBIEL et al. (2003) observaram um aumento na produção de leite em 704 observações provenientes de cinco estudos com probióticos bacterianos com ou sem leveduras. Segundo este autor, uma limitação desta análise é que poucos estudos avaliaram somente o uso de bactérias probióticas. Bactérias apresentam mecanismo de ação distinto do de leveduras (BITTENCOURT et al., 2011; NOCEK & KAUTZ, 2006). A associação entre microrganismos utilizada em vários produtos comerciais não evidencia a verdadeira atuação das bactérias probióticas.

Outro aspecto é que *Bacillus* são diferentes das bactérias produtoras de ácido láctico, tradicionalmente usadas como probiótico (NOCEK & KAUTZ, 2006). Preparações de esporos bacterianos podem sobreviver à passagem pelo trato digestivo (HOAL, et al., 2000), tendo potencial para serem mais resistentes à digestão ruminal, comparativamente a probióticos bacterianos suplementados na forma de células vegetativas.

Os valores de recuperação do *Bacillus subtilis* nas fezes das vacas (Tabela 3) sugere que os esporos passaram pelo trato gastrointestinal sem comprometimento em taxa mais rápida que a de passagem gastrointestinal, ao redor de 2 a 5% por hora (GARCIA, 2008). A taxa de passagem da digesta nestas vacas leiteiras (Tabela 4) foi aparentemente adequada ao crescimento e multiplicação do

Bacillus subtilis. Estes resultados suportam os de BARBOSA et al. (2005), CARTMAN et al. (2008) e PATEL et al. (2009), os quais demonstraram a resistência do *Bacillus subtilis* à bile e às condições gástricas de monogástricos, e também evidenciam a resistência dos esporos ao metabolismo ruminal.

Apesar da viabilidade no trato digestivo da cepa de *Bacillus subtilis* suplementada, não se verificou resposta ao probiótico em desempenho animal (Tabela 5), atividade mastigatória (Tabela 6) e digestibilidade (Tabela 4) no Experimento 1. No Experimento 2, foi observada resposta positiva de 1,7 kg de leite para a suplementação com o probiótico *Bacillus subtilis* (Tabela 7). As produções diárias de sólidos totais do leite e de proteína seguiram a mesma tendência. A resposta em secreção de leite foi consistente ao longo das 16 semanas experimentais (Figura 1). O baixo teor de gordura no leite nos Experimentos 1 (Tabela 5) e 2 (Tabela 7) pode ter sido resultado da suplementação com sabão de cálcio rico em ácidos graxos insaturados (DIAS JÚNIOR, 2011), já que sintomas clínicos de acidose ruminal não foram observados nos experimentos. Os valores de nitrogênio uréico do leite apresentaram tendência de diminuir após a suplementação com *Bacillus subtilis* no segundo estudo (Tabela 7), entretanto, não diferiu no primeiro experimento (Tabela 5).

Tabela 3. Esporos de *Bacillus subtilis* nas fezes de vacas suplementadas com *B. subtilis* ou Placebo. Experimento 1

Tratamentos	Número Amostras	Cultivo positivo	Cultivo positivo (%)	Log ₁₀ número de <i>B. subtilis</i> detectada/g de fezes ¹
Placebo	9	2	22	3,66 ± 0,02
<i>B.subtilis</i>	9	6	67	3,48 ± 0,17

¹Média (Log UFC/g) ± Desvio padrão.

Tabela 4. Digestibilidade aparente dos nutrientes no trato digestivo total e taxa fracional de passagem da digesta de vacas suplementadas com *Bacillus subtilis* ou Placebo. Experimento 1

	<i>B. subtilis</i>	Placebo	EPM ¹	P Trat ²
	% do ingerido			
DMS	69,4	71,0	0,86	0,20
DMO	72,1	72,6	1,65	0,69
DFDN	52,6	55,8	4,36	0,28
DMOnFDN	84,5	84,7	1,33	0,81
	% por hora			
Taxa de passagem da digesta	-4,66	-4,28	0,197	0,21

¹ EPM: Erro padrão das médias.

² P Trat: Valor de probabilidade para o efeito de tratamento.

³ DMS: Digestibilidade da matéria seca. DMO: Digestibilidade da matéria orgânica. DFDN: Digestibilidade da FDN. DMOnFDN: Digestibilidade da matéria orgânica não-FDN.

A suplementação dietética de *Bacillus subtilis* tem induzido resposta positiva sobre o desempenho de animais não ruminantes (FRITTS et al., 2000; HOOGE, 2008), o sistema imune de bezerros (SUN et al., 2010) e a produção de leite de vacas (PENG et al., 2011). MCGILIARD & STALLINGS (1998) avaliaram um produto da fermentação de *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Aspergillus oryzae* e uma cultura de levedura (21,2 g/vaca/dia) em 3.417 vacas lactantes e verificaram aumento na produção de leite de 31 rebanhos (17 significativamente).

A suplementação com 2×10^{11} células vivas de *Bacillus subtilis* não influenciou a produção e composição do leite de vacas Holandês produzindo 24,5 kg de leite/dia alimentadas com dieta baseada em silagem de milho e feno de alfafa. Em vacas Holandês não lactantes a mesma dose de cultura de *Bacillus subtilis* não teve efeito sobre a fermentação ruminal e digestibilidade aparente no rúmen da matéria orgânica e fibra em detergente neutro (QIAO et al., 2010).

PENG et al. (2011) verificaram que a produção de leite foi 3,1 e 3,2 kg/dia maior para vacas Holandês de alta produção suplementadas com 6 e 12 g/vaca/dia produto da fermentação de *Bacillus subtilis natto* ($8,3 \times 10^9$ de esporos de *B. subtilis* por grama do produto) alimentadas com dieta baseada em silagem de milho. A alteração do padrão de fermentação ruminal pela maior produção de propionato ruminal de vacas suplementadas com o produto da fermentação de *Bacillus subtilis* foi associada com maior produção de leite. No estudo de PENG et al. (2011) a dose de esporos de *Bacillus subtilis natto* no produto foi alta (6 g do produto = $49,8 \times 10^9$ e

12 g do produto= $99,6 \times 10^9$ de esporos de *B. subtilis* por dia) e a cepa de *Bacillus subtilis* foi selecionada para alta atividade de protease e celulase, o que pode ter contribuído para a alta resposta em produção de leite. Já QIAO et al. (2010) avaliaram doses inferiores de *Bacillus subtilis* (2×10^{11}) na forma de células vivas, e estas podem ser menos resistentes ao metabolismo ruminal resultando em ausência de resposta. A forma de oferta do *Bacillus subtilis*, dose e cepa devem ser consideradas nos estudos.

Tabela 5. Desempenho de vacas suplementadas com *B. subtilis* ou Placebo. Experimento 1

	<i>B. subtilis</i>	Placebo	EPM ¹	P Trat ²
CMS (kg/d) ³	18,3	18,3	0,16	0,91
CMO (kg/d) ³	16,6	16,4	0,31	0,67
CMOD (kg/d) ³	11,99	11,94	0,263	0,90
CMS (% do peso corporal)	3,07	3,08	0,078	0,89
CMS (gramas de MS/kg ^{0,75})	155,9	155,9	3,37	0,97
Produção de leite (kg/d)	25,4	25,2	0,38	0,66
Produção de gordura (kg/d)	0,700	0,683	0,0137	0,39
Produção de proteína (kg/d)	0,787	0,790	0,0160	0,89
Produção de lactose (kg/d)	1,094	1,079	0,0211	0,61
Produção de sólidos totais (kg/d)	2,871	2,845	0,0467	0,69
Porcentagem de gordura	2,90	2,90	0,060	0,94
Porcentagem de proteína	3,28	3,33	0,023	0,17
Porcentagem de lactose	4,41	4,39	0,038	0,73
Porcentagem de sólidos totais	11,49	11,47	0,100	0,89
Energia do leite (Mcal/d)	15,8	15,6	0,25	0,60
CCS linear ⁴ (0 a 9)	2,48	2,55	0,171	0,76
CCS ⁵ (x 1000 células/mL)	97	99	16,2	0,91
N ureico no leite (mg/dL)	17,5	17,0	0,40	0,39
Escore de condição corporal (1 a 5)	3,8	3,8	0,05	0,95
Peso (kg)	673	668	7,3	0,65
Eficiência (kg leite/ kg CMS)	1,39	1,37	0,023	0,53

¹EPM: Erro padrão das médias.

²P Trat: Valor de probabilidade para o efeito de tratamento.

³CMS: Consumo de matéria seca. CMO: Consumo de matéria orgânica. CMOD: Consumo de matéria orgânica digestível.

⁴CCS: Contagem de células somáticas do leite.

Tabela 6. Atividade mastigatória de vacas suplementadas com *B. subtilis* ou Placebo. Experimento 1

	<i>B. subtilis</i>	Placebo	EPM ¹	P Trat ²
	min/d			
Ingestão	260	258	8,2	0,92
Ruminação	432	421	12,3	0,54
Mastigação ³	691	679	14,9	0,58
	min/kg de CMS ⁴			
Ingestão	14,2	14,0	0,40	0,74
Ruminação	23,8	23,1	0,62	0,42
Mastigação	38,0	37,1	0,68	0,35

¹EPM: Erro padrão das médias.

²P Trat: Valor de probabilidade para o efeito de tratamento.

³ Mastigação: Ingestão + ruminação.

⁴Atividade mastigatória em minutos por kg de consumo de matéria seca (CMS).

Tabela 7. Desempenho de vacas suplementadas com *B. subtilis* ou Placebo. Experimento 2

	<i>B. subtilis</i>	Placebo	EPM ¹	P Trat ²	P Sem ²	P Int ²
	kg/d					
Produção de leite	25,3	23,6	0,42	0,02	<0,01	0,90
Produção de gordura	0,605	0,572	0,0228	0,35	<0,01	0,97
Produção de proteína	0,816	0,763	0,0127	0,01	<0,01	0,98
Produção de lactose	1,074	1,050	0,0238	0,52	<0,01	0,69
Produção de sólidos totais	2,718	2,566	0,0476	0,05	<0,01	0,88
Energia no leite (Mcal/d)	14,5	13,5	0,25	0,02	<0,01	0,94
	%					
Gordura	2,41	2,52	0,070	0,30	<0,01	0,74
Proteína	3,29	3,31	0,047	0,83	<0,01	0,20
Lactose	4,26	4,35	0,023	0,02	<0,01	0,55
Sólidos totais	10,80	10,95	0,135	0,48	<0,01	0,44
ECC (1 a 5) ³	3,64	3,65	0,061	0,91	<0,01	0,08
Peso (kg)	635	623	7,9	0,33	<0,01	0,97
CCS linear ⁴ (0 a 9)	5,34	4,81	0,339	0,31	<0,01	0,86
CCS ⁴ (x 1000 células/mL)	952	747	233,3	0,56	0,07	0,78
N ureico no leite (mg/dL)	19,3	20,8	0,46	0,06	<0,01	0,34

¹EPM: erro-padrão da média; ²P Trat: valor de probabilidade para o efeito de tratamento. P Sem: valor de probabilidade para o efeito de semana. P Int: valor de probabilidade para a interação entre tratamento e semana; ³ECC: Escore de condição corporal. ⁴CCS: contagem de células somáticas do leite.

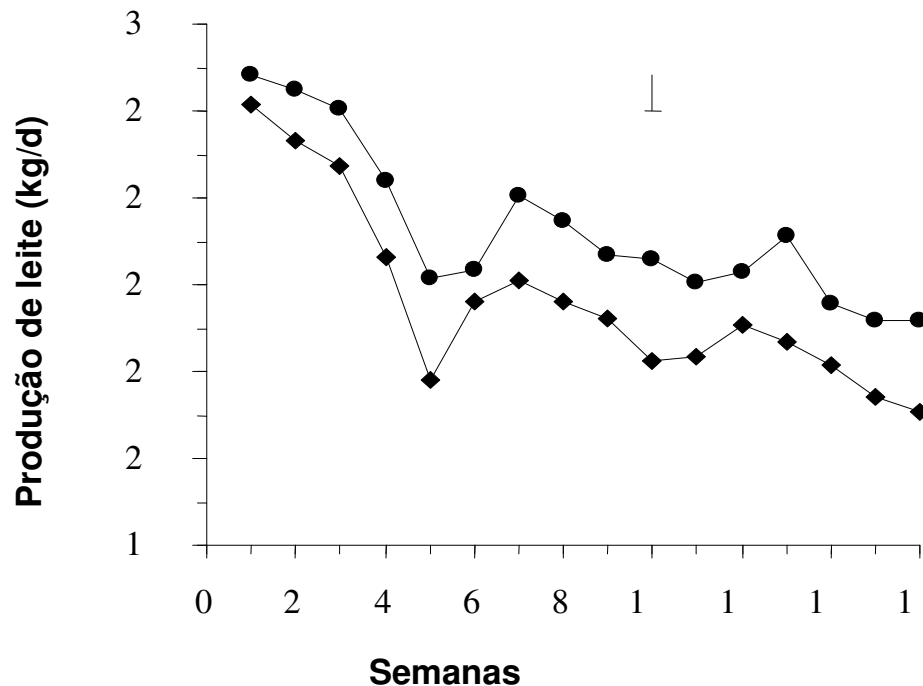


Figura 1. Produção diária de leite de vacas suplementadas (●) ou não (◆) com *Bacillus subtilis*. Experimento 2.

A suplementação com este probiótico bacteriano não induziu ganho em CMS (Tabela 5), semelhantemente ao observado por PENG et al. (2011) e QIAO et al., (2010). GARCIA (2008) verificou aumento no consumo de matéria seca de bezerros Holandês suplementados com *Bacillus subtilis*, sugerindo que animais jovens podem ser mais beneficiados pela ação do probiótico que vacas leiteiras. A semelhança entre tratamentos na atividade mastigatória (Tabela 6) reflete a semelhança na ingestão diária de alimentos. Ganho em digestibilidade, mensurada no Experimento 1 (Tabela 4), também não foi uma explicação plausível para a resposta positiva em leite e sólidos detectada, no Experimento 2 (Tabela 7). Em não ruminantes, o uso de *Bacillus subtilis* como probiótico pode melhorar o desempenho, sem influenciar a digestibilidade de nutrientes (BRITO et al., 2005).

Vale ressaltar que as dietas formuladas nos dois experimentos eram similares, apesar da maior inclusão de forragem no Experimento 1 (Tabelas 1 e 2), bem como o nível de produção de leite dos animais (Tabelas 5 e 7). A diferença marcante entre estes dois experimentos foi a CCS dos animais (Tabelas 5 e 7). A CCS do leite foi abaixo de 100 mil células/mL no Experimento 1 e acima de 700 mil

células/mL no Experimento 2 (Tabelas 5 e 7). No Experimento 1, a ausência de efeito de tratamento sobre o desempenho pode estar ligada ao baixo desafio imunológico para a glândula mamária neste trabalho.

O modo de ação proposto do “direct-fed microbials” (DFM) para ruminantes envolve a alteração da fermentação ruminal, aumento da digestão da fibra, intensificação do ecossistema ruminal, efeitos antimicrobianos, absorção de nutrientes, função imune intestinal e exclusão competitiva de microrganismos do trato intestinal. Alguns DFM também podem permanecer viáveis depois da passagem pelo trato intestinal e serem excretados nas fezes (McALLISTER et al., 2011).

Segundo CUTTING (2010), dentre os mecanismos de ação de probióticos compostos por espécies de *Bacillus* estão a atividade antimicrobiana, exclusão competitiva e estimulação imune. A suplementação de *Bacillus subtilis* em aves tem reduzido a infecção por *Salmonella enterica serotype Enteritidis*, *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli* (LA RAGIONE et al., 2001; LA RAGIONE e WOODWARD, 2003). O *Bacillus subtilis* pode apresentar maior eficácia contra bactérias gram-positivas, como *Clostridium perfringens*, e menor contra bactérias gram-negativas, como *Echerichia coli* e *Salmonella* (GARCIA, 2008). A menor presença de microrganismos patogênicos no intestino pode melhorar a saúde animal e aumentar a absorção de nutrientes (SAAD, 2006). O *Bacillus subtilis* C-3102 pode induzir anaerobiose na digesta, resultando no aumento da população de lactobacilli, modificando o ambiente intestinal (MARUTA et al., 1996). Entretanto, propor que o mecanismo de ação do *Bacillus subtilis* envolveu a ação sobre patógenos intestinais de vacas adultas, seria mera especulação.

Apenas vacas de alta CCS responderam ao probiótico. Ação sobre a função imune parece pouco provável, a se julgar pela ausência de efeito detectável do probiótico sobre o teor de CCS do leite (Tabelas 5 e 7) e sobre a frequência de cultivos positivos de bactérias ao longo do tempo (Tabela 8).

Tabela 8. Número de vacas nos tratamentos *B. subtilis* e Placebo com cultivo positivo de microrganismos no leite. Em parêntesis o número total de amostras no dia. Experimento 2

Dia Experimental	<i>Streptococcus</i>		<i>Staphylococcus</i>		<i>Bacillus subtilis</i>	
	Placebo	<i>B. subtilis</i>	Placebo	<i>B. subtilis</i>	Placebo	<i>B. subtilis</i>
37	10 (10)	9 (10)	10 (10)	10 (10)	ND ¹	ND ¹
81	10 (10)	10 (10)	10 (10)	7 (10)	ND ¹	ND ¹
112	6 (8)	8 (10)	2 (8)	2 (8)	ND ¹	ND ¹

¹ND: Não detectado.

No presente estudo as doses do probiótico foram ofertadas em capsulas por administração oral forçada e os animais foram alojados em confinamento do tipo *tie stall*, sem contato com as fezes do tratamento *Bacillus subtilis*. A recuperação do *Bacillus* em animais do tratamento Placebo (Tabela 3) pode indicar que está bactéria pode ser de ocorrência natural no ambiente intestinal de ruminantes, podendo estar presentes nos alimentos volumosos, já que as bactérias formadoras de esporos são encontradas principalmente no solo (BARBOSA e TORRES, 2005).

BARBOSA et al. (2005) descreve ter isolado esporos aeróbios das fezes de ovinos e bovinos. SWAIN e RAY (2009) também isolaram cinco microrganismos identificados como linhagens *Bacillus subtilis* no esterco (mistura de fezes e urina) de vacas lactantes. Embora espécies de *Bacillus* tenham sido isoladas do rúmen eles estão em baixos números e podem representar pouca função na degradação da parede celular da planta (McALLISTER et al., 2011). Estes estudos sugerem que vacas já podem ter *Bacillus subtilis* de ocorrência natural, entretanto, linhagens da bactéria podem apresentar diferenças.

A capacidade das espécies de *Bacillus* para formar endoesporo termotolerante e estável ao meio ambiente tem vantagem de assegurar sua sobrevivência durante a peletização do alimento e em longos períodos de estocagem (McALLISTER et al., 2011). Esporos de *Bacillus subtilis* cepa 3102 são selecionados por um processo industrial para intensificar sua atividade, sendo adequado para inclusão em premix por sua alta resistência (HOOGE, 2008). No presente estudo, esporos desta cepa também apresentaram resistência ao rúmen

(Tabela 3) e não foram detectados no leite de vacas suplementadas com esporos de *Bacillus subtilis* ou Placebo (Tabela 8). Entretanto, há necessidade de estudos que isolem cepas de *Bacillus subtilis* nativa de bovinos com o intuito de avaliar seu efeito como DFM sobre as respostas produtivas de vacas lactantes.

3.4 Conclusões

A suplementação de vacas leiteiras com esporos viáveis de *Bacillus subtilis* aumentou a produção de leite em um dos experimentos conduzidos. O mecanismo para ação positiva do probiótico não foi elucidado.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, H.R.; TORRES, B.B. *Microbiologia básica*. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.
- BARBOSA, T.M.; SERRA, C.R.; LA RAGIONE, R.M. et al. Screening for *Bacillus* Isolates in the broiler gastrointestinal tract. *App. Environ. Microbiol.*, v.71, p.968–978, 2005.
- BITENCOURT, L.L.; SILVA, J.R.M.; OLIVEIRA, B.M.L. et al. Diet digestibility and performance of dairy cows supplemented with live yeast. *Sci. Agric.*, v.68, p.265-393, 2011.
- BRITO, A.B. ; LEANDRO, N.S.M.; STRINGHINI, J.H. et al. Desempenho e digestibilidade de nutrientes para frangos alimentados com rações contendo promotor de crescimento (Olaquinox) e probiótico (*Bacillus subtilis*). *Acta. Sci. Anim. Sci.*, v.27, p.327-332, 2005.
- CARTMAN, S.T.; LA RAGIONE, R.M.; WOODWARD, M.J. *Bacillus subtilis* spores germinate in the chicken gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.74, n.16, p.5254–5258, 2008.
- CUTTING, S.M., *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*, v.28, p.214-220, 2011.
- DIAS JUNIOR, G.S. *Desempenho de vacas leiteiras suplementadas com sal de cálcio rico em ácido linoléico ou grão de soja tostado*. 2011. 75f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- FRITTS, C.A.; KERSEY, J.H.; MOTL, M.A. et al. *Bacillus subtilis* C-3102 (Calsporin) improves live performance and microbiological status of broiler chickens. *J. Appl. Poultry Res.*, v.9, p.149-155, 2000.
- GARCIA, G.R. *Caracterização microbiológica e avaliação de uma cepa de Bacillus subtilis no desempenho de bezerros da raça Holandesa*. 68p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – UNESP, Jaboticabal – SP, 2008.
- HOAL, N.T.; BACCIGALUPI, L.; HUXHAM, A., et al. Characterization of *Bacillus* species used of oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.66, p.5241-5247, 2000.
- HOOGE, D. *Bacillus subtilis* spores may. *Nutrition & Health: Poultry. Feedstuffs*, p.22-23, 21 de janeiro, 2008.
- KREHBIEL, C.R.; RUST, S.R.; ZHANG, G. et al. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. *J. Anim. Sci.*, v.81, p.120-132, 2003.

LA RAGIONE, R.M., CASULA, G., CUTTING, S.M. et al. *Bacillus subtilis* spores competitively exclude *Escherichia coli* 070:K80 in poultry. *Vet. Microbiol.*, v.79, p.133-142, 2001.

LA RAGIONE, R.M., WOODWARD, M.J. Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* and *Clostridium perfringens* in young chickens. *Vet. Microbiol.*, v.94, p.245-256, 2003.

LITTELL, R.C.; HENRY, P.R.; AMMERMAN, C.B. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.*, v.76, p.1216-1231, 1998.

MARUTA, K.; MIYAZAKI, H.; MASUDA, S. et al. Exclusion of intestinal pathogens by continuous feeding with *Bacillus subtilis* C-3102 and its influence on the intestinal microflora in broilers. *Anim. Sci. Technol.(Jpn.)*, v.67, p.273-280, 1996.

McALLISTER, T.A.; BEAUCHEMIN, K.A.; ALAZZEH, A.Y. et al. Review: The use of direct fed microbials to mitigate pathogens and enhance production in cattle. *Can. J. Anim. Sci.* v.91, p.193-211, 2011.

MCGILLIARD, M.L.; STALLINGS, C.C. Increase in milk yield of commercial dairy herds fed a microbial and enzyme supplement. *J. Dairy Sci.*, v.81, p.1353-1357, 1998.

NOCEK, J.E.; KAUTZ, W.P. Direct-fed microbial supplementation on ruminal digestion, health, and performance of pre- and postpartum dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v.89, p.260–266, 2006.

OFFICIAL methods of analysis. 12.ed. v.1, Washington: AOAC, 1975.

OFFICIAL methods of analysis. 15.ed., v.1, Washington: AOAC, 1990.

PATEL, A.K.; DESHATTIWAR, M.K.; CHAUDHARI, B.L. et al. Production, purification and chemical characterization of the catecholate siderophore from potent probiotic strains of *Bacillus* spp. *Bioresour. technol.*, v.100, p.368–373, 2009.

PENG, H.; WANG, J.Q.; KANG, H.Y. et al. Effect of feeding *Bacillus subtilis* natto fermentation product on milk production and composition, blood metabolites and rumen fermentation in early lactation dairy cows. *Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2011. doi: 10.1111/j.1439-0396.2011.01173.x

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. *Anim Physiol. Anim. Nutr.*, v.94, p.429–436, 2010.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v.42, n.1, 2006.

SAS Institute. *SAS® user's guide: statistics*. Release 6.03 ed. Cary, 1988.1028 p.

SUN, P.; WANG, J.Q.; ZHANG, H.T. Effects of *Bacillus subtilis natto* on performance and immune function of preweaning calves. *J. Dairy Sci.*, v.93, p. 5851–5855, 2010.

SWAIN, M.R.; RAY, R.C. Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. *Microbiological Research*, v.164, p.121–130, 2009.

WILDMAN, E.E.; JONES, G.M.; WAGNER, P.E. et al. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *J. Dairy Sci.*, v.65, p.495-501, 1982.

WOLFINGER, R.D. Covariance structure selection in general mixed models. *Communications in Statistics Simulation and Computation*, Ontario, v.22, n.4, p.1079-1106, 1993.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os esporos de *Bacillus subtilis* foram resistentes ao metabolismo ruminal e não foram isolados no leite de vacas Holandês confinadas. A suplementação de esporos viáveis de *Bacillus subtilis* para vacas leiteiras com baixa CCS não influenciou o desempenho e a digestibilidade da dieta. Já em vacas com alta CCS resultou em melhora nas produções de leite, proteína e sólidos totais.

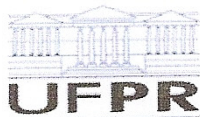
Sugere-se que a suplementação com esporos de *Bacillus subtilis* de longa duração pode ser mais efetiva para evidenciar respostas na produção de leite, enquanto que as respostas em curto prazo podem ser menores.

APÊNDICES

APÊNDICE I 61
APÊNDICE II 62
APÊNDICE III 63

APÊNDICE I

Aprovação no Comitê de Ética do Setor de Ciências Agrárias da UFPR.



Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Agrárias
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo no. 050/2010, referente ao projeto “Desempenho e utilização de nutrientes por vacas leiteiras suplementadas com *Bacillus subtilis*”, sob a responsabilidade de José Antônio de Freitas, na forma que foi apresentado, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 18 de Outubro de 2010. Este certificado expira em 18 de outubro de 2011.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 050/2010, regarding the project “Performance e nutrient utilization of cows supplemented with *Bacillus subtilis*”, in charge of José Antônio de Freitas, in the terms it was presented, was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Southern Brazil) during session on October 2010. This certificate expires on October, 2011.

Curitiba, 18 de outubro de 2010.

Geraldo Camilo Alberton
Presidente

Patrick Schmidt
Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais
Setor de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Paraná.

APÊNDICE II

Instalação do tipo *tie-stall* do experimento 1.
Fazenda São Francisco, Ijací, Minas Gerais, Brasil.



APÊNDICE III

Instalação do tipo *tie-stall* do experimento 2.
Fazenda Milca, Nepomuceno, Minas Gerais, Brasil.

