



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0922723-7 B1



(22) Data do Depósito: 02/12/2009

(45) Data de Concessão: 19/10/2021

(54) Título: MÉTODOS PARA FAZER UMA ALIMENTAÇÃO DIRETA MICROBIANA

(51) Int.Cl.: C12P 1/04; G01N 33/554.

(30) Prioridade Unionista: 02/12/2008 US 61/119,256.

(73) Titular(es): LALLEMAND, INC.; DUPONT NUTRITION BIOSCIENCE APS.

(72) Inventor(es): KEITH J. MERTZ; THOMAS G. REHBERGER.

(86) Pedido PCT: PCT US2009066392 de 02/12/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/065625 de 10/06/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 01/06/2011

(57) Resumo: CEPAS E MÉTODOS PARA MELHORAR A SAÚDE E/OU O DESEMPENHO DE RUMINANTES. A presente invenção refere-se a cepas incluindo cepa 8G-1 de *Enterococcus faecium* (NRRL B-50173), cepa 8G-73 de *Enterococcus faecium* (NRRL B-50172), cepa 8G-134 de *Bacillus pumilus* (NRRL B-50174) e cepas com todas as características de identificação de cada uma dessas cepas. Uma ou mais cepas podem ser usadas para tratar ou prevenir a acidose. Elas também podem ser usadas para melhorar outras medidas de saúde e/ou desempenho de ruminantes. Métodos de usar as cepas, sozinhas ou e em combinação, estão descritos. Métodos de fazer as cepas também são fornecidos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
“MÉTODOS PARA FAZER UMA ALIMENTAÇÃO DIRETA MICROBIANA”.

REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica prioridade sob 35 U.S.C. §119(e) para o Pedido de Patente Provisória dos EUA N° 61/119,256, arquivado em 2 de dezembro de 2008, a inteireza do qual está incorporada por referência aqui no presente.

BIBLIOGRAFIA

[0002] Citações bibliográficas completas das referências referidas aqui no presente pelo primeiro sobrenome do autor e ano de publicação podem ser encontradas na seção Bibliografia, imediatamente precedendo as reivindicações.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0003] A presente invenção refere-se a cepas e métodos para controlar acidose. Mais particularmente, a invenção refere-se cepas bacterianas úteis para melhorar a saúde e/ou desempenho de ruminantes e métodos de fazer e utilizar as cepas.

DESCRIÇÃO DA TÉCNICA RELACIONADA

[0004] O suprimento de altas concentrações de carboidratos fermentáveis a ruminantes tem se tornado uma prática comum na indústria de carne e pecuária leiteira ao longo dos últimos 50 anos. A necessidade de melhorar a eficiência da produção e qualidade da carne levou a esta tendência. Melhoramento na produção não tem ocorrido sem certas dificuldades. Aumentar o consumo de ruminantes de carboidratos fermentáveis pelo suprimento de níveis mais altos de grãos de cereais tem resultado em incidência aumentada de distúrbios metabólicos tais como acidose. A relação entre o consumo de concentrado e acidose ruminal tem sido bem documentada em revisões (Dunlop, 1972; Slyter, 1976). Muitos pesquisadores têm mostrado um

declínio no pH ruminal em seguida ao suprimento de altos níveis de carboidratos prontamente fermentáveis (RFC) para o gado e a subsequente ruptura de microbiota ruminal e mudanças fisiológicas ocorrendo no animal (Allison, et. al., 1975, Hungate et.al., 1952; Elam, 1976). A maioria tem atribuído este declínio a uma superprodução de ácidos orgânicos através de bactérias ruminais tais como *Streptococcus bovis*. No entanto, o efeito de carboidrato excessivo na microbiota ruminal que inicia esta resposta não tem sido bem documentado.

[0005] No passado, o gerenciamento intensivo do suprimento tem sido o único método para combater acidose. Mais especificamente, os grãos são diluídos com forragem e o aumento na percentagem de concentrado na dieta é cuidadosamente controlado em um método de etapa por etapa para garantir uma transição suave para altos níveis de concentrado ao longo de um período de 14-21 dias. A maioria dos confinamentos comerciais formula e entrega várias dietas de "adaptação" que contêm diferentes proporções de grãos e forragem.

[0006] Embora a gestão de suprimento intensivo seja, geralmente, bastante eficaz no controle da acidose, é muito cara para o produtor devido ao alto custo de produção, transporte, corte de forragem, a eliminação de resíduos animais aumentados e eficiência de produção mais baixa. Produtores e gestores de confinamentos necessitam implementar estratégias que permitam a produção eficiente de rações de alto concentrado de alimentação da criação.

[0007] Outras estratégias têm sido combinar o uso de dietas de adaptação com suprimento de componentes antimicrobianos como ionóforos. Ionóforos inibem o consumo e reduzem a produção de ácido láctico no rúmen, reduzindo as populações ruminais de bactérias gram-positivas, organismos produtores de ácido láctico, como *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus* spp. (Muir et al. 1981).

[0008] Embora o uso de ionóforos tenha reduzido a incidência de

acidose aguda em confinamentos, a preocupação dos consumidores com o uso de antibióticos na produção de carne e a necessidade dos gestores de confinamentos, para continuamente encontrar formas de reduzir custos e melhorar o desempenho animal e a composição da carcaça, tem levado ao exame de métodos alternativos para reduzir a acidose e melhorar o desempenho de bovinos em confinamento.

[0009] O uso de antimicrobianos na alimentação direta como um método para modular a função ruminal e melhorar o desempenho de bovinos vem ganhando crescente aceitação nos últimos 10 anos. Existem duas tecnologias básicas de alimentação direta microbianas que estão atualmente disponíveis para a indústria de carne bovina para o controle da acidose ruminal: (1) usando tecnologia DFM para produzir ácido láctico (2) adição de espécies específicas de bactérias capazes de utilizar o ácido láctico ruminal. Embora o modo de ação relatado de cada uma destas tecnologias seja diferente, ambas tentam resolver o acúmulo de ácido láctico no rúmen.

[00010] A primeira abordagem, ou seja, utilizando-se tecnologia DFM para produção de ácido láctico, tenta aumentar a taxa de utilização de ácido láctico no rúmen, estimulando a microbiota nativa ruminal. Conforme relatado, a adição de bactérias produtoras de ácido láctico de crescimento relativamente lento, como as espécies de *Enterococcus*, produz uma concentração ligeiramente elevada de ácido láctico no rúmen. O aumento gradual força a adaptação da microflora ruminal a uma maior porção de utilizadores de ácido láctico tolerante a ácido. Não entanto, essas cepas de *Enterococcus* não permitem controlar adequadamente e evitar a acidose.

[00011] A segunda abordagem, ou seja, acrescentar espécies de bactérias específicas capazes de utilizar o ácido láctico no rúmen, é baseada na constatação de que espécies de *Propionibacterium* significativamente minimizam o acúmulo de ácido láctico ruminal,

durante um desafio de acidose com uma grande quantidade de carboidratos prontamente fermentáveis (RFC). *Propionibacterium* são habitantes naturais do rúmen, em ambos os produtos lácteos e carne bovina e funcionam no rúmen por meio de ácido láctico para a produção de importantes ácidos graxos voláteis, como acetato e propionato.

[00012] As tecnologias atuais de DFM desenvolvidas até agora têm sido desenvolvidas com base em um entendimento microbiológico antiquado da incidência de acidose no rúmen. Até recentemente, métodos de estudar a ecologia microbiana do rúmen têm se baseado em técnicas de cultivo. Estas técnicas têm sido limitadas devido às exigências de crescimento desconhecidas e a inadequadas condições anaeróbicas para grande parte dos micro-organismos ruminais. Assim, estudos ecológicos com base nessas técnicas de cultivo foram baseados em uma compreensão limitada da microbiota ruminal.

[00013] DFMs atuais, quando utilizados sozinhos ou com fermento para minimizar o risco de acidose ruminal e para melhorar a utilização de uma dieta de bovinos em confinamento, com alto teor de concentrado, proveem resultados mistos. No entanto, um estudo de cepas DFM de *Propionibacterium* P15, e de *Enterococcus faecium* EF212, e de *E. faecium* EF212, alimentado sozinho ou combinado com uma levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, indicou que a adição de DFM combinado com ou sem levedura não teve nenhum efeito na prevenção de acidose ruminal (Yang, W., 2004).

[00014] Em vista do exposto, seria desejável prover uma ou mais cepas para prevenir e / ou tratar a acidose. Seria vantajoso se a uma ou mais cepas também melhorassem outras medidas de saúde e / ou desempenho de ruminantes. Também seria desejável prover métodos de produzir e usar as cepas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[00015] A invenção, que é definida pelas reivindicações

estabelecidas ao final desta descrição, destina-se a solucionar pelo menos alguns dos problemas citados acima. Cepas isoladas são fornecidas, incluindo a cepa 8G-1 de *Enterococcus faecium* (NRRL B-50173), uma cepa com todas as características identificadoras da cepa 8G-1 de *Enterococcus faecium* (NRRL B-50173), cepa 8G-73 de *Enterococcus faecium* (NRRL B-50172), uma cepa com todas as características identificadoras da cepa 8G-73 de *Enterococcus faecium* (NRRL B-50172), cepa 8G-134 de *Bacillus pumilus* (NRRL B-50174), uma cepa com todas as características identificadoras da cepa 8G-134 de *Bacillus pumilus* (NRRL B-50174), e combinações das mesmas.

[00016] Além disso, é provido um conjunto incluindo uma ou mais das cepas acima e monensina.

[00017] Também é fornecido um método de administrar uma quantidade eficaz de uma ou mais das cepas acima listadas para um animal, e um método de administrar para um animal uma combinação incluindo uma quantidade eficaz de uma ou mais das cepas acima listadas e monensina.

[00018] Em pelo menos algumas modalidades, a administração de uma ou mais cepas para o animal apresenta, pelo menos, um dos seguintes benefícios em ou para o animal, quando comparado a um animal ao qual não se administrou a cepa: (a) reduz a acidose, (b) estabiliza o metabolismo ruminal, como indicado pelo acúmulo retardado de ácido láctico e produção prolongada de ácidos graxos voláteis, (c) recuperação mais rapidamente do desafio da acidose conforme medido pela recuperação do pH e declínio do ácido láctico, (d) reduz a exposição de sinais clínicos associados com acidose (e) produção de leite aumentada em vacas leiteiras em lactação, (f) gordura de leite aumentada em vacas leiteiras em lactação, (g) diminuição da contagem de células somáticas (SCC) em vacas leiteiras em lactação, (h) melhoria da resposta imunológica e da saúde como evidenciado pela

diminuição da SCC e (i) eficiência aumentada da produção de leite em vacas leiteiras em lactação.

[00019] Também é fornecido um método de fazer uma alimentação direta microbiana. No método, uma cepa selecionada do grupo consistindo em cepa 8G-1 de *Enterococcus faecium* (NRRL B-50173), cepa 8G-73 de *Enterococcus faecium* (NRRL B-50172), e cepa 8G-134 de *Bacillus pumilus* (NRRL B-50174) é cultivada em um caldo líquido de nutrientes. A cepa é separada do caldo de nutrientes líquidos para fazer a alimentação direta microbiana. Em pelo menos algumas modalidades do método, a cepa é liofilizada.

[00020] Além disso, é fornecido um método de fazer uma alimentação direta microbiana. No método, uma cepa selecionada do grupo consistindo em cepa 8G-1 de *Enterococcus faecium* (NRRL B-50173), cepa 8G-73 de *Enterococcus faecium* (NRRL B-50172), e cepa 8G-134 de *Bacillus pumilus* (NRRL B-50174) é cultivada em um caldo líquido de nutrientes. A cepa é separada do caldo de nutrientes líquidos para fazer a alimentação direta microbiana. A monensina é adicionada à alimentação direta microbiana.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[00021] Modalidades exemplares preferidas aqui descritas estão ilustradas nos desenhos que acompanham, nos quais, como números de referência representam como peças em um todo e nos quais:

[00022] A figura 1 é um gráfico que mostra diferenças de pH entre populações experimentadoras (não acidóticos; grupo 2) e acionadoras (acidóticos; grupo 1).

[00023] A figura 2 é um gráfico que mostra diferenças do acúmulo de ácido láctico entre as populações experimentadoras (não acidóticos; grupo 2) e acionadoras (acidose; grupo 1).

[00024] A figura 3 é um gráfico que mostra glicose *in vitro* pelo tratamento ao longo do tempo.

[00025] A figura 4 é um gráfico que mostra acúmulo de ácido láctico *in vitro* pelo tratamento ao longo do tempo.

[00026] A figura 5 é um gráfico que mostra acumulação total de VFA (acetato + propionato + butirato) ao longo do tempo.

[00027] A figura 6 é um gráfico que mostra pH ruminal médio ao longo do tempo em bovinos DFM de controle e candidatos.

[00028] A figura 7 é um gráfico que mostra a média de lactato ruminal ao longo do tempo em bovinos DFM de controle e candidatos.

[00029] A figura 8 é um gráfico que mostra as concentrações ruminais de VFA ao longo do tempo de tratamento. (VFA total = acetato + propionato + butirato).

[00030] Antes de explicar as modalidades aqui descritas em detalhes, é para ser entendido que a invenção não está limitada na sua aplicação aos detalhes de construção e arranjo dos componentes estabelecidos na descrição a seguir ou ilustrados nos desenhos. A invenção é capaz de outras modalidades ou ser praticada ou realizada de várias formas. Além disso, é para se entender que a fraseologia e a terminologia utilizada neste documento é para fins de descrição e não deve ser considerada como uma limitação.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[00031] Fornecidas aqui estão cepas. Métodos de produzir e usar as cepas também são fornecidos.

[00032] Em pelo menos algumas modalidades, uma alimentação direta microbiana (DFM) feita com uma ou mais das cepas fornecidas neste documento permite que os produtores de carne e produtos lácteos continuem a gerir regimes de suprimento para otimizar o crescimento e desempenho sem sacrificar a saúde, devido a problemas digestivos associados com acidose ruminal . Pelo menos algumas modalidades dos DFMS foram selecionadas com base na gestão de concentrações de lactato ruminal através da utilização de lactato ou condicionamento

do rúmen para manter o lactato utilizando microflora. Pelo menos algumas modalidades dos DFMS foram desenvolvidas para gerenciar concentrações de energia ruminal. Ao contrário dos DFMS atualmente comercializados para produtores de gado para aliviar a acidose, pelo menos, algumas das modalidades da invenção não foram desenvolvidas para gerenciar um problema depois que ele ocorre, mas sim para aliviar o problema antes que aconteça.

Cepas:

[00033] As cepas fornecidas neste documento incluem cepa 8G-1 de *Enterococcus faecium*, cepa 8G-73 de *Enterococcus faecium*, e cepa 8G-134 de *Bacillus pumilus*, que também são referidos aqui no presente como 8G-1, 8G-73, e 8G-134, respectivamente.

[00034] Cepas 8G-1 de *Enterococcus faecium*, 8G-73 de *Enterococcus faecium*, e 8G-134 de *Bacillus pumilus* foram depositados em 29 de agosto de 2008, na Coleção de Cultura do Serviço de Pesquisa Agrícola (Agricultural Research Service Culture Collection) (NRRL), 1815 North University Street, em Peoria, Illinois, 61604 e os números de adesão dados B-50173, 50172 B-e B-50174, respectivamente. Os depósitos foram feitos ao abrigo das disposições do Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de Micro-organismos para fins de procedimento de patente. Uma ou mais cepas aqui no presente providas podem ser usadas como uma alimentação direta microbiana (DFM).

[00035] Para os propósitos desta descrição, uma "cepa biologicamente pura", significa uma cepa que não contém outras cepas bacterianas em quantidades suficientes para interferir com a replicação da cepa ou para ser detectáveis por técnicas bacteriológicas normais. "Isoladas" quando usado em conexão com os organismos e as culturas aqui descritos incluem não apenas uma cepa biologicamente pura, mas também qualquer cultura de organismos que se cultivam ou mantém

com exceção de como é encontrado na natureza. Em algumas modalidades, as cepas são mutantes, variantes, ou derivadas de cepas 8G-1, 8G-73, ou 8G-134 que também oferecem benefícios comparáveis aos fornecidos por 8G-1, 8G-73, e 8G-134. Em algumas modalidades, as cepas são cepas com todas as características de identificação de cepas 8G-1, 8G-73, ou 8G-134. Além disso, cada cepa individual (8G-1, 8G-73, ou 8G-134) ou qualquer combinação destas cepas também pode fornecer um ou mais dos benefícios descritos neste documento. Também será claro que a adição de outras cepas microbianas, veículos, aditivos, enzimas, leveduras, ou similares também fornecem o controle da acidose e não constituem uma DFM substancialmente diferente.

[00036] Cepas de *Bacillus* tem muitas qualidades que os tornam úteis como DFMs. Por exemplo, várias espécies de *Bacillus* também têm status de GRAS, isto é, eles são geralmente reconhecidos como seguros pela Food and Drug Administration dos EUA e também são aprovados para uso na alimentação animal pela Association of American Feed Control Officials (AAFCO). As cepas de *Bacillus* aqui descritas são esporuladas aeróbicas e facultativas e, portanto, são estáveis. Espécies de *Bacillus* são os únicos esporulados que são considerados GRAS. Uma cepa de *Bacillus* encontrada para prevenir ou tratar a acidose é a cepa 8G-134 de *Bacillus pumilus*.

[00037] Cepas de *Enterococcus* também tem muitas qualidades que as tornam úteis como DFMs.

[00038] Cepas de *Enterococcus* são conhecidas por habitar o trato gastrointestinal de monogástricos e ruminantes e que serão adequadas para sobreviver neste ambiente. *Enterococcus* foram mostrados por ser organismos anaeróbicos facultativos, tornando-os estáveis e ativos sob condições aeróbicas e anóxicas. 8G-1 de *Enterococcus faecium* e cepa 8G-73 de *Enterococcus faecium* foram identificadas pelos inventores como sendo úteis para esses fins.

Preparação das Cepas:

[00039] Em pelo menos uma modalidade, cada uma das cepas aqui descritas é cultivada individualmente usando técnicas convencionais de fermentação líquida ou sólida. Em pelo menos uma modalidade, a cepa de *Bacillus* e cepas de *Enterococcus* são cultivadas em um caldo de nutrientes líquidos, no caso de *Bacillus*, a um nível em que o maior número de esporos é formado. A cepa de *Bacillus* é produzida pela fermentação da cepa de bactérias, que podem ser iniciadas pela intensificação de uma cultura de sementes. Isto envolve repetidamente e assepticamente transferir a cultura para um volume cada vez maior para servir de inóculo para a fermentação, que pode ser realizada em grandes fermentadores de aço inoxidável em meio contendo proteínas, carboidratos e minerais necessários para um crescimento ótimo. Exemplos não limitantes de meios exemplares são MRS ou TSB. No entanto, outros meios também podem ser usados. Após o inóculo ser adicionado ao tanque de fermentação, a temperatura e agitação são controladas para permitir o crescimento máximo. Em uma modalidade, as cepas são cultivadas a 32° até 37° sob agitação. Uma vez que a cultura atinja uma densidade máxima de população, a cultura é colhida, separando as células do meio de fermentação. Isto é comumente feito por centrifugação.

[00040] Em uma modalidade, para preparar a cepa de *Bacillus*, a cepa de *Bacillus* é fermentada a um nível 5×10^8 CFU / ml a cerca de 4×10^9 CFU / ml. Em pelo menos uma modalidade, um nível de 2×10^9 CFU / ml é utilizado. As bactérias são colhidas por centrifugação, e o sobrenadante é removido. As bactérias peletizadas podem então ser usadas para produzir uma DFM. Em pelo menos algumas modalidades, as bactérias peletizadas são liofilizadas e depois usadas para formar uma DFM. No entanto, não é necessário liofilizar os *Bacillus* antes de usá-los. As cepas também podem ser usadas com ou sem

conservantes, e nas formas concentrada, não concentrada, ou diluída.

[00041] A contagem da cultura pode então ser determinada. CFU ou unidades formadoras de colônia é a contagem de células viáveis de uma amostra resultante de métodos de chapeamento microbiológico padrões. O termo é derivado do fato de que uma única célula, quando semeada em meio adequado, vai crescer e tornar-se uma colônia viável no meio de ágar. Uma vez que múltiplas células podem dar origem a uma colônia visível, o termo unidade formadora de colônia é uma unidade de medida mais útil do que número de células.

Usando as Cepas:

[00042] Em pelo menos algumas modalidades, uma ou mais cepas são utilizadas para formar uma DFM. Um ou mais veículos, incluindo, mas não limitado à, sacarose, maltodextrina, pedra calcária, casca de arroz, pode ser adicionado à cepa.

[00043] Para misturar a cepa(s) e veículos (onde usados), elas podem ser adicionadas a um misturador de fita ou de pá e misturadas, de preferência por cerca de 15 minutos, embora o tempo pode ser aumentado ou diminuído. Os componentes são misturados de tal modo que resulta uma mistura uniforme das culturas e dos veículos. O produto final é de preferência um pó seco e fluido, podendo ser formulado com base na concentração final da DFM desejada no produto final.

[00044] Em pelo menos uma modalidade de um método de fazer uma DFM, uma cepa aqui descrita é cultivada em um meio, como o caldo de líquido nutriente. A cepa é separada do caldo de nutrientes líquidos para fazer a alimentação direta microbiana. A cepa pode ser liofilizada, depois que ela é separada do caldo.

[00045] Uma ou mais das cepas 8G-1 de *Enterococcus faecium*, 8G-73 de *Enterococcus faecium*, e 8G-134 de *Bacillus pumilus* pode ser administrada a animais para reduzir ou mesmo eliminar a ocorrência de acidose. Para isso, uma quantidade eficaz de uma ou mais destas cepas

é administrada aos animais. Após a administração aos animais, a cepa (s), provê pelo menos um dos seguintes benefícios em ou aos animais: (a) reduz a acidose nos animais, (b) estabiliza o metabolismo ruminal, como indicado pelo acúmulo retardado de ácido láctico e a produção prolongada de ácidos graxos voláteis, (c) recuperação mais rápida do desafio da acidose medida pela recuperação do pH e declínio de ácido láctico, e (d) não apresentam sinais clínicos associados com acidose.

[00046] Os animais podem ser gado, incluindo bovinos, tanto de carne como gado leiteiro, ou seja, um ou mais touros, bois, novilhas, bezerros, ou vacas, cabras, ovelhas, lhamas, alpacas, outros animais com quatro compartimentos de estômago, e ruminantes, que podem defrontar-se com desequilíbrio ruminal quando alimentados com carboidratos facilmente fermentáveis (RFC).

[00047] Em pelo menos uma modalidade, quando a cepa 8G-1 de *Enterococcus faecium* ou a cepa 8G-73 de *Enterococcus faecium* é alimentada, a cepa é administrada aos animais a um nível tal que os animais recebem uma dose diária de cerca de 5×10^8 CFU / animal / dia a cerca de 5×10^{10} CFU / animal / dia. Em pelo menos uma modalidade, quando a cepa 8G-134 de *Bacillus pumilus* é alimentada, a cepa é administrada aos animais a um nível tal que os animais recebem uma dose diária de cerca de 5×10^8 CFU / animal / dia a cerca de 5×10^{10} CFU / animal / dia. Em pelo menos uma modalidade, duas ou mais cepas 8G-1 de *Enterococcus faecium*, 8G-73 de *Enterococcus faecium* e 8G-134 de *Bacillus pumilus* são alimentadas, e as cepas são administradas aos animais a um nível tal que os animais recebem uma dose diária com cerca de 5×10^8 CFU / animal / dia a cerca de 5×10^{10} CFU / animal / dia, como dose total de cepas combinadas. Outros níveis de uma ou mais cepas podem ser fornecidos aos animais. A cepa pode ser administrada aos animais desde cerca de 30 dias de idade até o restante da vida produtiva de ruminante adulto ou por outros períodos

diferentes.

[00048] Em pelo menos uma modalidade, a cepa é alimentada como uma alimentação direta microbiana (DFM), e a DFM é usada como uma cobertura sobre a ração diária. Além disso, a cepa pode ser alimentada com ração completa misturada, alimentos peletizados para animais, alimentos misturados com líquidos, misturados em uma pré-mistura de proteínas, oferecido através de uma pré-mistura de vitamina e mineral.

[00049] Em pelo menos uma modalidade, a cepa é alimentada como uma DFM, e a DFM é alimentada em combinação com monesina Artigo Medicado Tipo A (Rumensin[®]), com uma dose diária de cerca de 50mg a 660 mg por cabeça. A monensina é alimentada para aumentar a eficiência alimentar. A monensina, como um ionóforo, cria permeabilidade da membrana celular bacteriana criando um desequilíbrio de íons entre os espaços intra e extracelulares. Esta resposta afeta populações de microbiota ruminal e influencia a fermentação de ingredientes para melhorar a eficiência alimentar do gado.

[00050] Em pelo menos uma modalidade, a cepa é alimentada como uma DFM, e a DFM é alimentada em combinação com fosfato de tilosina Artigo Medicado Tipo A (Tylan[®]), com uma dose diária de cerca de 60 a 90 mg / cabeça. Fosfato de tilosina é alimentado ao gado bovino para reduzir abscessos do fígado causados por *Fusobacterium necrophorum* e *Actinomyces pyogenes*.

EXEMPLOS

[00051] Os exemplos a seguir são fornecidos apenas para fins ilustrativos. Os exemplos estão incluídos aqui no presente apenas para ajudar em uma compreensão mais completa da invenção aqui descrita. Os exemplos não se limitam ao escopo aqui descrito ou aqui reivindicado de qualquer maneira.

Exemplo 1

Projeto Experimental do Modelo de Acidose:

[00052] Dez animais cruzados foram bloqueados por peso e distribuídos em dois currais. A ração diária fornecida para todos os grupos de tratamento antes do desafio consistiu de 45% de forragem e 55% de concentrado com base na matéria seca. O gado foi alimentado 6,8 Kg (15 libras) / cabeça / dia de ração, uma vez de manhã e teve o restante dos alimentos deslocado mais perto do suprimento no suporte no final da tarde. Ambas os currais foram mantidos em jejum por 24 horas antes do desafio com os tratamentos de dieta concentrada. O tratamento de dieta de concentrado consistia de fontes de carboidratos altamente fermentáveis de milho floculado em 90% como base alimentar. Após jejum de 24 horas, a dieta de concentrado foi alimentada *ad libitum* a 45,36 Kg (100 lbs) / curral para todos os currais (0h). O consumo de ração do desafio foi monitorado visualmente e alimentação adicional acrescentado em uma base se necessário.

[00053] As amostras de líquido ruminal foram obtidas de animais individuais através de intubação oral, utilizando um tubo de coleta ligado a um balão de vácuo. Diferentes frascos e tubos de coleta foram utilizados para cada curral para minimizar a contaminação cruzada de microbiota entre tratamentos. O líquido ruminal coletado em frascos a vácuo foi decantado em tubos Falcon de 50 ml estéreis rotulados com o tempo de amostragem e número de identificação dos animais (número da etiqueta de orelha). Amostras de líquido ruminal foram coletadas de todos os currais em -36h, -24h e -12h. As amostras de -36h e -24h representaram a base fisiológica para cada animal. As amostras de -12h representaram o líquido ruminal no estado em jejum para cada animal. 0 hora de tempo foi designada como o início do desafio de suprimento. Amostras de líquido ruminal foram coletadas de todos os animais a cada 4 horas +6 a +22 horas. Todos os currais foram amostrados em +28, +36 e +48 horas. O pH das amostras ruminais individuais foram

analisadas imediatamente após a aquisição. Todas as amostras foram congeladas e preparadas para envio para Agtech Products, Inc. (Waukesha, WI), para posterior análise.

[00054] Ácidos graxos voláteis e concentrações de carboidratos foram medidos em amostras individuais de líquido ruminal. As amostras foram preparadas para análise por HPLC assepticamente removendo amostras duplicadas de 1,0 ml do líquido ruminal coletado de cada animal em cada período de tempo. As amostras foram colocadas em um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml e os destroços foram peletizados por centrifugação (10 minutos, a 12,500 rpm). O fluido sobrenadante (750 µL) foi transferido para um tubo limpo e acidificado com igual volume de 5 mM de H₂SO₄. O fluido acidificado foi homogeneizado e filtrado completamente através de filtro de 0,2 µm diretamente em um frasco de autoamostra de 2 ml de HPLC e tampado. As amostras foram analisadas através de um sistema de HPLC Waters 2690 (Waters Inc., Milford, MA). As amostras foram injetadas em fase móvel de 5 mM de H₂SO₄ aquecidas a 65° C e separadas utilizando um BioRad HPX-87H em Coluna (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). A HPLC foi normalizada, utilizando um conjunto de concentrações para cada composto de interesse. Compostos utilizados como padrões incluem dextrose (glicose), lactato, metilglioxal, butirato, propionato e acetato.

Descoberta de Genes de Bactérias na Microflora Ruminal de Gado Não Acidótico:

Hibridização subtrativa supressiva:

[00055] O kit de Subtração de Genoma (Clontech, Palo Alto, CA) foi utilizado para determinar as diferenças da população microbiana entre dois conjuntos de amostras compostas ruminal. Análise hierárquica de agrupamento foi realizada para determinar as semelhanças e diferenças entre os animais com base em perfis de pH e ácido láctico ao longo do tempo. A análise de agrupamento posicionou bovinos 2069, 2071, 2078,

2113 e 2127 no grupo 1 e bovinos 2107, 2115, 2088, 2133 e 2124 no grupo 2. Repetidas análises de medidas foram realizadas para comparar pH e ácido láctico do grupo 1 e grupo 2. Todas as variáveis foram analisadas separadamente. O grupo 1 teve um perfil de ácido láctico médio significativamente maior do que o grupo 2 ($P = 0,0004$), acompanhado com menor média de pH ($P = 0,0075$) ao longo do período de dieta desafio (figuras 1 e 2). O líquido de rúmen de cada animal foi agrupado no grupo para os procedimentos de hibridização subtrativa supressiva (SSH).

[00056] As estratégias de hibridação de subtração supressiva (SSH) foram desenvolvidas para comparar amostras compostas de DNA do rúmen de bovinos no grupo 1 àquelas do grupo 2 nos períodos de amostra +6 h, +10 h, +14 h, e +18 h. Hibridação de subtração supressora foi realizada utilizando o grupo 2 como o testador (bovinos não acidóticos) e grupo 1 como o acionador (gado acidótico). Foi levantada a hipótese de que a SSH resulta em fragmentos de DNA únicos a partir de organismos que resulta em níveis mais baixos de ácido láctico e um maior pH (organismo de modulação de energia ruminal). Ao efetuar subtrações usando amostras a partir do período +10 h, os fragmentos de DNA (genes) encontrados, foram a partir de organismos que foram capazes de modular a utilização do excesso de energia no ambiente ruminal em forma de RFC e aliviar os efeitos potenciais de acidose.

Clonagem e Análise da Biblioteca de Sequência de Experimentador Único:

[00057] Sequências específicas de DNA de cepas que são recuperadas após a subtração foram clonadas para posterior análise. Sequências de DNA foram inseridas em um vetor pCR2,1 (Invitrogen) e transformadas em células E. coli TOP10 quimicamente competentes. A mistura de transformação foi semeada em placas agar LB de 22 x 22

cm contendo 50 µg / ml de canamicina e sobreposta com 40 mg / ml de X-gal em DMF. As placas foram incubadas a 37° C por 24h. Colônias recombinantes (colônias brancas) foram colhidas em placas de microtitulação estéreis contendo meio LB e canamicina a 50 µg / ml. Todas as cavidades contendo produtos recombinantes PCR foram separadas em alíquotas de 1 ml. Uma alíquota foi purificada usando o kit de Purificação Qiaquick PCR (Qiagen), com a segunda alíquota peletizada através de centrifugação, ressuspensa em LB + Kan + glicerol a 10% e armazenada a -80° C.

Hibridação de Southern:

[00058] Hibridações *slot-blot* foram conduzidas utilizando protocolos padrão. Para confirmar a especificidade das inserções de DNA clonado, membranas Blotting Zeta-Probe® carregadas positivamente (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) foram hibridizadas com sondas feitas a partir do *experimentador* e *driver* original de DNA digerido com Alu I e rotulados com o kit de rotulagem DIG High Prime DNA (Roche Diagnostics Corporation, Indianápolis, IN). Inserções recombinantes mostrando homologia de sequência com o DNA experimentador, mas não o DNA acionador foi selecionado para a análise da sequência. Hibridações foram realizadas em inserções clonadas. Em cada período, foi realizada a subtração, SSH 6, 10, 14 e 18. De SSH 6, 10, 14 e 18, havia 12, 29, 105 e 29 inserções clonadas, respectivamente, que foram específicos do experimentador.

[00059] A sequência de DNA de cada inserção do experimentador positiva foi determinada (Lark Tecnologias; Houston, TX). A sequência de cada pastilha foi comparada com sequências do banco de dados do NCBI usando a função blastX. Sequências nucleotídicas foram traduzidas e a função do gene foi deduzida comparando sequências àquelas encontradas na base de dados do NCBI usando a função blastX. A função do gene foi colocada em uma categoria de genes

utilizando o site da web Clusters of Orthologous Groups (COG). Genes do COG específicos identificados foram utilizados para construir sondas de oligonucleotídeos para a hibridização de colônias e de experimentos de hibridização slot blot. Quatro genes dos vinte e nove foram selecionados a partir de SSH 10 para ser utilizados para hibridação de colônias com base em atributos funcionais, baseados na seleção de bovinos não acidóticos. Os genes foram selecionados a partir de clones 79, 84, 94 e 110 e foram identificados através da utilização da função blastX do NCBI com funções atribuídas: beta-xilosidase, veículo de glicose / galactose, 4-alfa glucanotransferase, e 4-alfa glucanotransferase, respectivamente. Todos os genes selecionados para a hibridação de colônia tinham propriedades atribuídas conforme identificadas pelo COG como função Metabolismo de Carboidrato e Transporte, que teria fornecido para as bactérias que contêm esses genes uma vantagem em metabolizar o excesso de energia como o encontrado no rúmen, quando desafiados com RFC.

Hibridação de Colônia:

[00060] Líquido do rúmen colhido durante a experiência de acidose de gado, nos períodos +10 h, +14 e +18 h foram utilizados. Bovinos 2107, 2124, 2115, 2088 e 2133 foram selecionados de cada um destes períodos de tempo. Estes animais são representativos de animais que foram previamente selecionados para a população "testador" ou grupo de não acidose. Amostras individuais foram tomadas no rúmen a -20 ° C e deixadas para descongelar à temperatura ambiente. Amostras descongeladas do rúmen foram individualmente semeadas em três meios distintos em duplicata. Os meios utilizados consistiram em ágar lactato de sódio (ELN), agar Lactato *Propionibacterium* seletivo (LPSA), reforçada e meio Clostridial reforçado modificado (RCS). O RCS foi elaborado de modo similar aos meios Clostridial reforçados disponíveis comercialmente sem glicose. Assim, a principal fonte de carboidratos no

RCS é o amido. A tabela 1 abaixo indica as condições de incubação e diluições de líquido ruminal semeado em cada meio.

Tabela 1. Condições de incubação e diluições				
Condições de incubação				
Meio	02 condições	Tempo de incubação	Temperatura de incubação	Diluições semeadas
LPSA	Anaeróbica	7 dias	32° C	10-1, 10-2
NLA	Anaeróbica	5 dias	37° C	10-2, 10-3
RCS	Anaeróbica	48 horas	37° C	10-1, 10-2

[00061] Após a incubação, colônias individuais foram apanhadas de cada placa e inoculadas em tubos de 10 ml de caldo composto dos meios respectivos, exceto o LPSA, que foi inoculado em NLB. As colônias foram selecionadas de cada período de tempo e cada animal (cinco bovinos x três períodos de tempo). Para o meio RCS, cinco colônias foram escolhidas para cada animal - período de tempo. O LPSA apresentou menos colônias e diversidade nas placas e o número de colônias selecionadas por período de tempo - animal foi variável. Duas colônias por período de tempo - animal foram selecionadas do meio NLA, com exceção dos animais 2107 no período de tempo 18. Seis colônias foram colhidas deste período de tempo - animal devido à diversidade visível aumentada. Nem todos os tubos inoculados exibiram crescimento após incubação.

[00062] Tubos mostrando crescimento foram separados em duas alíquotas separadas de 9 ml e 1 ml. A alíquota de 1 ml foi utilizado para os procedimentos de isolamento de DNA utilizando o kit de Preparação de Modelo High Pure PCR (Roche Molecular Biochemicals; Mannheim, Alemanha). A alíquota de 9 ml foi transferida para um tubo estéril Falcon de 15 ml e centrifugada até que uma pélete sólida foi formada. A pelota foi então reconstituída em caldos NLB ou RCS contendo glicerol a 10%. A amostra reconstituída foi colocada em -80 ° C para uso futuro. O DNA

extraído foi então, utilizado para análise de RAPD-PCR de isolados individuais para determinar as relações filogenéticas. A análise foi realizada utilizando Bio-Numerics (Applied Maths Inc., Austin, TX) nos padrões de bandas RAPD DNA para determinar o parentesco entre os isolados. O coeficiente de similaridade dos isolados foi determinado através do coeficiente de Dice e um método de grupo de par não ponderado (UPGMA). A similaridade de 80% ou mais foi usado para agrupar os isolados 109 em 65 grupos separados. Dos 65 grupos, 23 cresceram apenas no RCS, 11 cresceram apenas em LPSA, 14 cresceram apenas em NLA, 4 grupos cresceram tanto em RCS e LPSA, 6 cresceram em ambos RCS e NLA, 3 cresceram tanto em LPSA e ELN, e 4 grupos foram encontrados estando presentes em todos os três meios.

[00063] Hibridações *slot blot* foram preparadas utilizando o aparelho de microfiltração Bio-Dot SF (Bio-Rad, Hercules, CA). O DNA genômico de um único isolado dentro de um grupo foi selecionado para representar o agrupamento e manchado sobre as membranas. As sondas foram preparadas para a hibridização utilizando o Kit de Sonda de Síntese PCR DIG (Roche Molecular Biochemicals; Mannheim, Alemanha). Sondas selecionadas foram derivadas da análise de inserções de clonados descrita acima e constou de quatro inserções de clone (Clones 79, 84, 94 e 110) de SSH10. Sondas marcadas foram reunidas antes de hibridações. As hibridações foram conduzidas a 45° C por 5 horas. Reações colorimétricas foram deixadas para se desenvolver durante a noite sobre as membranas. Trinta dos 37 isolados (grupos) na membrana RCS apresentaram hibridização como identificado pela reação colorimétrica e 25 dos 28 isolados na membrana LPSA NLA /

[00064] Isolados que apresentaram hibridização foram então preparados para sequenciamento do rRNA 16s. Resumidamente, o

rRNA 16s de cada um dos 55 isolados foi amplificado via PCR usando os primeiros 8F (AGAGTTTGTATYMTGGCTCAG) e 1406R (ACGGGCGGTGTGTRC). O produto da PCR foi purificado usando o kit de purificação QIAquick PCR (Qiagen, Valencia, CA). O produto purificado foi analisado por eletroforese em gel. Quando o produto estava disponível o suficiente, a amostra purificada foi enviada durante a noite sobre o gelo para o sequenciamento de uma única passagem (Lark Technologies, Houston, TX). As sequências 16S de cada grupo foram comparadas com sequências do banco de dados do NCBI usando a função blastn. Organismos de interesse surgidos adiante desta comparação consistiram de cepa 8G-1 de *Enterococcus faecium*, cepa 8G-73 de *Enterococcus faecium*, e cepa 8G-134 de *Bacillus pumilus*.

Exemplo 2

Teste de Cepa *In vitro*:

[00065] Fluido ruminal foi coletado para ensaios *in vitro* de duas novilhas sobreano Hereford. Os animais foram identificados por etiquetas de identificação e foram referenciados como 101 e 133. As novilhas foram alimentadas 2,7 Kg (6 libras) / cabeça / dia de grãos secos de destilaria (DDGS) e tiveram acesso a pré-selagem de livre escolha.

[00066] O protocolo *in vitro* foi seguido tão de perto quanto possível para diminuir o erro experimental entre cada tentativa. Resumidamente, o fluido ruminal foi coletado de cada novilha e colocado em garrafas térmicas marcadas, preaquecidas. As garrafas térmicas foram transportadas para a Agtech Products, Inc. para processamento. O fluido ruminal foi adicionado em duplicata para frascos contendo tampão de McDougall e glicose a 3,0% (concentração final após o tampão de McDougall e fluido ruminal misturado a um volume de 180 ml), que tinha sido temperado a 39 ° C. Cepas DFM candidatas, 8G-1 de *Enterococcus*

faecium, 8G-73 de *Enterococcus faecium*, e 8G-134 de *Bacillus pumilus*, foram adicionadas às garrafas designadas a $1,0 \times 10^7$ CFU / ml (concentração final). A unidade de observação foi a garrafa, e os tratamentos foram realizados em quadruplicata. Os tratamentos consistiram de controle (glicose adicionada, mas não DFM), cepa 8G-1 de *Enterococcus faecium*, cepa 8G-73 de *Enterococcus faecium*, e cepa 8G-134 de *Bacillus pumilus*. As garrafas foram então purgadas com CO₂ e tampadas. As garrafas foram mantidas em agitador de banho-maria a 39° C e 140 rpm. Aproximadamente 10 minutos antes da amostragem, as garrafas foram rapidamente abertas para liberação de gases produzidos como um subproduto da fermentação. O fluido ruminal foi retirado de cada frasco inicialmente, a cada 6 horas até a marca de 36 horas. O pH ruminal e os ácidos graxos voláteis foram medidos e registrados. A análise estatística foi realizada através da análise de medidas repetidas para determinar os efeitos DFM ao longo do tempo ou ANOVA de mão única para determinar se o tratamento afeta em pontos específicos no tempo.

[00067] O foco dos experimentos ruminais *in vitro* foi determinar se as cepas DFM candidatas, 8G-1 de *Enterococcus faecium*, 8G-73 de *Enterococcus faecium*, e 8G-134 de *B. pumilus*, poderiam influenciar positivamente a fermentação ruminal em um ambiente de excesso de energia. O excesso de glicose foi adicionado a cada ruminal *in vitro*, para replicar o ingurgitamento de bovinos com um carboidrato facilmente fermentável. Conforme mostrado na figura 3, a adição de cada uma das cepas candidatas significativamente aumentaram a utilização da glicose ao longo do tempo ($P = 0,0001$). Em comparação ao controle (figura 4), a influência sobre a produção de ácido láctico ao longo do tempo também foi significativamente impactado pela adição de DFM candidato ao modelo desafio *in vitro* ($P = 0,0025$). Na marca de 36 horas, houve a produção de ácido láctico 17% menos no *B. pumilus* e

32% menos acúmulo de ácido láctico em ambos os *Enterococcus* candidatos.

[00068] A análise de ácidos graxos voláteis foi realizada por HPLC. Total de VFA (acetato + propionato + butirato) foi significativamente afetado pela adição dos *Enterococcus* candidatos ($P = 0,0279$) (figura 5). Os *Enterococcus* candidatos, 8G-1 e 8G-73, pareceram aumentar a quantidade de VFA total produzido ao longo do tempo. Não houve efeito significativo sobre a produção total de VFA quando comparamos o candidato *B. pumilus* ao do controle.

[00069] Os resultados *in vitro* indicaram que os candidatos DFMs 8G-1, 8G-73, e 8G-134 afetaram positivamente a fermentação ruminal, aumentando a utilização da glicose sem um aumento correspondente na produção de ácido láctico em comparação à do tratamento controle. O excesso de glicose no rúmen é normalmente fermentado rapidamente com a produção de ácido láctico. É o acúmulo de ácido láctico que leva a uma resposta aguda de acidose. Através da utilização de glicose, sem a concomitante produção de ácido láctico, os DFMS candidatos têm demonstrado o potencial de aliviar os efeitos da acidose. O modelo ruminal *in vitro* sugeriu que estas cepas podem ser capazes de modular com sucesso a energia ruminal em excesso em bovinos alimentados com quantidades elevadas de carboidratos prontamente fermentáveis.

Exemplo 3

Teste de DFM Candidato em Bovinos Alimentados Com um Carboidrato Facilmente Fermentável - um Desafio de Acidose Aguda:

Materiais e Métodos:

Bovinos e Atribuições de Currais:

[00070] Vinte novilhos cruzados foram comprados em celeiros de venda local. Os bovinos foram alojados no centro de investigação por um período de duas semanas antes do início do experimento para a

observação de morbidade e mortalidade. Os bovinos foram aleatoriamente bloqueados através de tratamento por peso. Cinco cabeças de gado foram atribuídas a um curral e currais designados para um dos quatro tratamentos. Os tratamentos consistiram de três currais cada um recebendo um DFM diferente, como está detalhado a seguir, com o quarto curral que não recebendo nenhum DFM (controle). As atribuições de tratamento podem ser vistas na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2. indicações de tratamento por curral			
Id do curral	DFM candidato (TX)	Dose mínima (CFU/cabeça/Dia)	Identificação rRNA 16s
1	Nenhum	0	Nenhum (controle)
2	8G-1	5×10^{10}	<i>Enterococcus spp.</i>
3	8G-73	5×10^{10}	<i>Enterococcus spp.</i>
4	8G-134	5×10^9	<i>Bacillus pumillis</i>

[00071] A ração diária para todos os grupos de tratamento antes do desafio, consistiu de 62,5% de forragem e 30% de milho moído e 7,5% de suplemento protéico (tabela 3) abaixo. O suplemento de proteína continha monensina (Rumensin[®]) alimentada em 375 mg / cabeça / dia. O suplemento de proteína também continha fosfato de tilosina (Tylan[®]).

Tabela 3. Composição da ração de desafio		
	Ingrediente	% de dieta (DM)
Dieta predesafio	Feno moído	62,5
	Milho quebrado	30
	Steakmaker [®] K+45-25 R500 T180*	7,5
Dieta do desafio	Milho floculado a vapor	87,4
	Péletes de Alfafa	5,1
	Steakmaker [®] K+45-25 R500 T180*	7,5

* ambas as rações contém Rumensin e Tylan

[00072] O gado foi alimentado a 6,8 KG (15 libras) / cabeça / dia de ração, uma vez de manhã e teve qualquer alimento remanescente deslocado mais perto do suprimento no suporte no final da tarde.

Quatorze dias antes do jejum, os grupos de tratamento foram alimentados com DFMs candidatos na dose designada na tabela 2 acima como uma cobertura sobre a ração diária.

[00073] A cepa 8G-134 de *Bacillus pumilus* foi alimentada com um mínimo de 5×10^9 CFU / cabeça / dia. Os *Enterococcus* candidatos 8G-1 e 8G-73 foram alimentados a 5×10^{10} CFU / cabeça / dia.

Preparação de DFM Candidato:

[00074] Cepas DFM candidato, previamente selecionadas para a experiência de desafio, eram *Enterococcus spp.* 8G-1 e 8G-73 e cepa 8G-134 de *Bacillus pumilus*. As cepas foram armazenadas a -80°C . Cada cultura foi inoculada em tubos de 10 ml de caldo contendo MRS (Man, Rogosa e Sharp) ou TSB (caldo tripticase de soja). Tubos de caldo foram incubados por 24 horas a 32° e 37°C para os candidatos *Bacillus* e *Enterococcus*, respectivamente. As culturas foram colocadas para isolamento no respectivo meio ágar e incubadas. Uma colônia isolada foi colhida em 10 ml de caldo e deixada para crescer até meados da fase log (18 a 24 h) e transferidos para caldo fresco (10% vol / vol de transferência). Candidatas *Enterococcus* foram cultivadas a 37°C em caldo MRS. *Bacillus* foram cultivadas em uma incubadora de agitação a 130 rpm a 32°C em tubos horizontais TSB. Para o crescimento de *Enterococcus*, 2 ml foram transferidos para um frasco de 250 ml contendo 198 ml de caldo e incubados por 18hrs.

[00075] Os 200 ml de cultura foram inoculados em um frasco de 2 L contendo 1,8 L de caldo e deixados a incubar durante 18hr. Para os candidatos *Bacillus*, 5 ml foram transferidos para um balão 250 contendo 50 ml de TSB e, em seguida foi incubado a 32°C em uma incubadora de agitação a 130 rpm por 24 horas. Os 50 ml foram usados para inocular um frasco de 1L contendo 600 ml e deixados a incubar por outras 24 horas.

[00076] A densidade óptica (OD) da cultura 18 horas de candidatos

Enterococcus foi tomada antes da colheita das células. A OD foi comparada com as curvas de crescimento anterior para determinar o ufc / ml da cultura. As amostras foram semeadas para a enumeração e impressão digital genética. O controle de qualidade foi assegurado entre cada lote de fermentação através da análise RAPD-PCR. Com uma meta mínima de $5,0^{10}$ ufc / cabeça / dia para os candidatos *Enterococcus*, o valor calculado da cultura foi dispensado em uma garrafa de centrifugação Nalgen de 250 ml e girada a 4° C por 10 min a 4500 rpm. A meta mínima para os candidatos *Bacillus* foi de $5,0^9$ ufc / cabeça / dia, e um total de 100 ml da cultura de *Bacillus* foi girada para baixo de modo semelhante ao *Enterococcus*. O sobrenadante foi descartado. A pelota foi ressuspensa em 30 ml de meio de cultura contendo glicerol a 10%. Esta quantidade foi transferida para um tubo cônico de 50 ml. Os frascos de centrífuga foram lavados com 10 ml de caldo e transferidos para o mesmo tubo cônico. As amostras foram rotuladas com as cepas, a data que o candidato foi colhido, e o número de lote de fermentação. Contagens de placas foram usadas para determinar o ufc total em cada tubo. Os tubos foram combinados para oferecer a contagem de um mínimo de $5,0^{10}$ ufc / cabeça / dia para os candidatos *Enterococcus* e $5,0^9$ ufc / cabeça / dia para os candidatos *Bacillus*. Todos os tubos cônicos foram congelados a -20° C

Dieta do Desafio e Fase de Coleta do Fluido Ruminal:

[00077] As amostras de fluido ruminal foram obtidas de animais individuais, através de intubação ruminal, usando um tubo de coleta ajustado com um coador e acoplado a uma fonte a vácuo através de um frasco a vácuo. O pH foi medido imediatamente após a aquisição do fluido ruminal e as amostras foram congeladas para serem transportadas para a Agtech Products, Inc. para a análise de VFA. Foram coletadas amostras de todos os bovinos nos períodos de amostragem -12h, +6h, +10h, +14h, +18h, +22h, +30h, +36h e 48 h,

com a hora 0h representando o início do desafio. Toda a alimentação foi removida do gado no período de -24 horas para iniciar o jejum e incentivado o gado para absorver a ração desafio no momento 0.

[00078] Todos os currais foram mantidos em jejum por 24 horas antes do desafio com a ração concentrada (momento 0). A ração concentrada constituída de 12,70 (28 lbs) de peso de flocos de milho em flocos (tabela 3 acima). A ração de desafio foi fornecida para distribuir 9,07 Kg (20 lbs) / cabeça. O consumo de ração do desafio foi monitorado visualmente e alimentação adicional acrescentada em uma base como necessário pelo restante da experiência.

[00079] Amostras de fluido ruminal foram coletadas a cada quatro horas de todos os bovinos de + 6 até +22 horas. O pH de cada amostra ruminal foi analisado logo após a aquisição. O fluido ruminal foi então congelado e transportado para a Agtech Products, Inc. para análise de VFA através de HPLC. Análise de medidas repetidas foi realizada no pH, VFA, e os níveis de glicose usando animal individual como unidade de observação. Comparações em pares foram realizadas ao longo do tempo entre cada curral de tratamento candidato DFM e o curral de controle para determinar a eficácia dos candidatos em alterar os padrões de fermentação ruminal.

Resultados e Discussão:

[00080] Vinte cabeças de gado de corte mestiços pesando em média 332 Kg (731,95 libras) foram aleatoriamente bloqueadas por peso entre os tratamentos de tal forma que não houve diferenças significativas em peso entre os grupos de tratamento (tabela 4). Havia 3 currais de tratamento e um curral de controle com cinco cabeças / curral. O tratamento atribuído por curral pode ser visto na tabela 2 acima.

Tabela 4. tratamento atribuído por curral				
Curral	Tratamento	N	Pesos médio por curral em KG (lbs (SD))	Consumo médio de alimentação n/novilho ¹ (% de peso corporal)
1	Controle	5	331,85 (731,6 (79,94))	4,8

2	8G-1	5	338,38 (741,6 (94,03))	3,9
3	8G-73	5	331,85 (731,6 (70,12))	3,7
4	8G-134	5	330,03 (727,6 (72,71))	3,6
¹ o consumo médio de alimento/novilho foi calculado como uma porcentagem do peso médio do novilho para aquele curral				

[00081] Os bovinos foram alimentados com ração desafio no momento 0 e líquido ruminal foi coletado em pontos de tempo designados para medir valores de fermentação ruminal. O consumo de ração por curral foi monitorado e registrado após 24 horas. O consumo médio de ração / boi foi calculado como uma porcentagem da média do peso para aquele curral (tabela 4 acima). O curral de controle (curral 1) parecia ter o mais alto consumo de ração em comparação com os outros grupos de tratamento com o boi médio consumindo 4,8% de seu peso corporal. O menor consumo de ração desafio / curral estava no curral 4 com o boi médio comendo cerca de 3,6% do seu peso corporal. O gado em todos os currais, em média, teria consumido aproximadamente 2,55 Kg (5,625 libras) de concentrado / dia, como parte da ração predesafio, a qual, em média, teria constituído 0,8% do peso corporal médio dos bois. Apesar da variação de consumo de ração desafio dos currais, a diferença não foi maior do que o aumento no consumo de concentrado da ração predesafio e não seria causador de diferenças de fermentação entre currais.

[00082] Após 24 horas, a alimentação foi retirada do gado e feno de solo de pradaria foi alimentado *ad libitum*. Foi dado ao gado feno de livre escolha, como precaução contra o pH do rúmen diminuindo continuamente. A adição de feno estimularia mastigação adicional de ruminação e contribuiria para suavizar o rúmen. Apesar da adição de feno, o pH ruminal continuou a declinar.

[00083] Imediatamente após a coleta do líquido ruminal, o pH da amostra foi analisado. Todos os grupos de tratamento apresentaram um declínio do pH ruminal, como pode ser observado na figura 6. O pH para o grupo de controle atingiu o ponto mais baixo, no momento 30 horas,

e começou a subir gradualmente depois disso. Até a última coleta de amostra de rúmen o pH médio para o curral controle ainda estava agudamente acidótico com um pH de 4,94. Acidose aguda está associada com o pH que permanece abaixo de 5,2 e acidose subaguda ou crônica é caracterizada por um pH abaixo de 5,6 (Owens, et. al., 1998). Tendências de médias numericamente maiores apareceram para as cepas 8G-1, 8G-73, e 8G-134 nos currais 2, 3 e 4, quando comparadas às do controle do momento +22 ao +48. Isto sugere que o gado tratado com DFMs candidatos nestes currais recuperaram mais rapidamente do desafio de acidose. O pH médio para o gado tratado com 8G-1, 8G-73, e 8G-134 no momento +48 foi de 5,96, 6,02 e 6,14, respectivamente, o que é superior 1,0 unidade de pH acima do curral de controle. Análise de medidas repetidas destas três cepas ao longo do tempo (+6 a +48) não apresentou diferenças significativas quando comparadas com o curral de controle. Não entanto, quando as comparações de pH de currais tratados com 8G-1, 8G-73, e 8G-134 em relação ao curral de controle nos momentos +22 a +48 h foram realizadas, as diferenças foram ou se aproximaram da significância ($P = 0,1562$, $0,0965$ e $0,0466$ para 8G-1, 8G-73, e 8G-134, respectivamente).

[00084] Os perfis médios de ácido láctico para todos os grupos de tratamento estão mostrados na figura 7. O acúmulo médio de ácido láctico ruminal chega ao pico a 105 mM para o curral de controle 30 horas após receber ração desafio. As cepas DFM candidatas 8G-1, 8G-73, e 8G-134 novamente exibiram visíveis diferenças numéricas médias em acúmulo de lactato em comparação com o curral de controle. O acúmulo médio de ácido láctico foi similar entre os animais de controle e os bovinos tratados com 8G-1 nas primeiras 14 horas do desafio. Os níveis de acumulação posteriores para o restante do ensaio foram muito menos nos bovinos tratados com 8G-1, embora não significativos ($P =$

0,1892). Os currais de tratamento com 8G-73 demonstraram diminuição dos níveis de acúmulo de ácido láctico no momento 30 e manteve-se inferior ao curral de controle pelo restante do experimento. Cepa candidata 8G-134 também apresentaram diminuição dos níveis de ácido láctico a partir de +22 h, e permaneceram consistentemente inferiores ao do curral de controle completamente até +48 h.

[00085] VFAs individuais foram medidos e analisados. As concentrações de ácidos graxos voláteis (VFA) aumentaram no curral de controle e nos tratamentos 8G-73 e 8G-134 e atingiram um máximo na marca seis horas (figura 8). Depois de seis horas cada um dos currais de tratamento mostrou declínio dos níveis de VFA total (acetato, propionato e butirato). Não houve diferenças significativas entre estes tratamentos e o controle. O tratamento 8G-1, no entanto, apresentou um atraso no declínio de VFA, que não ocorreu até +14 h. Ao longo da experiência não houve diferenças significativas na concentração de VFA totais ou nível de AVG individuais (composto de acetato, propionato, e butirato).

[00086] Além de monitoração e medição das características de fermentação ruminal no decorrer da experiência de acidose, o gado foi observado durante toda a experiência com relação a efeitos clínicos visíveis associados com acidose. Logo no início do desafio de acidose (+0 h a +14 h), os efeitos da dieta desafio foram mínimos. O gado não apresentou sinais de depressão e continuou a se alimentar de ração desafio. Por volta de +22 horas após receber a ração desafio todo o gado, exceto aqueles recebendo tratamento 8G-1 apresentavam sinais de depressão, dor, e tinham excreção fecal líquida, solta. O gado no curral 2 não estava consumindo mais alimentos, mas não apresentava sintomas clínicos, apesar de, da mesma forma terem semelhante declínio dos níveis de pH.

[00087] Acidose ruminal aguda, por definição, é o declínio no pH

ruminal a níveis deletérios não apenas na função do rúmen, mas também na saúde dos animais. Acidose aguda é marcada pelo acúmulo de ácido láctico e o declínio na produção de VFA. Função ruminal apropriada é uma combinação de gestão da energia disponível e de componentes de nitrogênio disponíveis em alimentos. Quando ocorrem desequilíbrios no metabolismo ruminal, problemas digestivos tipicamente se seguem e podem se manifestar na forma de acidose. Neste experimento, as cepas 8G-1, 8G-73, e 8G-134 aumentaram a recuperação de função do rúmen, conforme indicado por parâmetros de fermentação ruminal.

[00088] Bovinos alimentados com 8G-1, *Enterococcus faecium*, em média, se recuperaram mais rapidamente do desafio acidose medido pela recuperação do pH e declínio de ácido láctico. Além dos padrões de fermentação ruminal medidos, bovinos alimentados com DFM 8G-1 candidatos não apresentaram sinais clínicos associados com acidose.

[00089] A cepa candidata 8G-73, *Enterococcus faecium*, melhorou a fermentação ruminal no decorrer do experimento. Os níveis médios de ácido láctico foram os mais baixos para todas as cepas candidatas testadas a +48 h, em 12,54 mM. Um aumento correspondente no pH também foi associado com a recuperação com um pH final de 6,02, que foi de 1,08 unidades de pH maior que o do controle.

[00090] A cepa candidata 8G-134, *Bacillus pumilus*, igualmente, aumentou a recuperação ruminal, durante o desafio de acidose. Os níveis médios de ácido láctico, em bovinos alimentados com 8G-134, chegaram ao pico a 89mM no momento +22 h, enquanto o curral de controle continuou a aumentar e atingiu um pico a 105mm no momento +30 horas. Os níveis médios de ácido láctico caíram para 57 mM a +30 horas. Assim como com o acúmulo de ácido láctico, o pH ruminal em bovinos alimentados com 8G-134 se recuperou mais rapidamente do que o controle e verificou-se ser significativamente diferente a partir de

+22 a +48 h ($P = 0,0466$).

Exemplo 4

Sumário:

[00091] Trinta vacas primíparas e multíparas da raça Holandesa foram bloqueadas por lactação anterior e prevista capacidade de produção (PPA) e atribuídas a um dos três tratamentos. Dez vacas foram distribuídas por tratamento e os tratamentos consistiram de um grupo de controle (tratamento 1), que recebeu ração basal total misturada (TMR), tratamento 2 e tratamento 3, que receberam ração basal total mista TMR e foram alimentados com *Bacillus pumilus* 8G-134, 5×10^9 e 1×10^{10} CFU / cabeça / dia, respectivamente, de 3 semanas pré-parto a 22 semanas após o parto. O objetivo principal foi avaliar os efeitos de *B. pumilus* 8G-134 na produção de leite de vaca leiteira e desempenho acima do gado de controle durante este período de tempo. O objetivo secundário foi determinar se houve uma resposta de dose associada com o suprimento de *B. pumilus* 8G-134. Os esquemas de *B. pumilus* 8G-134 aumentaram significativamente a produção de leite, gordura de leite e diminuíram da contagem de células somáticas. Estes significativos efeitos de *B. pumilus* 8G-134 na produção não veio à custa de pontuação da condição corporal das vacas, peso corporal, aumentos na ingestão de matéria seca ou de alterar significativamente os perfis sanguíneos metabólitos, e poderia indicar que *B. pumilus* 8G-134 também forneceu às vacas leiteiras benefícios de eficiência.

Materiais e Métodos:

Animais:

[00092] Trinta vacas foram aleatoriamente designadas para um dos três tratamentos dietéticos, em experimento de aleitamento contínuo de três semanas antes do parto até 22 semanas após o parto. Não houve diferenças significativas para o rendimento de leite anterior para as

vacas mais velhas e segundo ou para capacidade prevista para produzir (PPA) para as vacas de primeira lactação para os diferentes grupos de tratamento. O número de animais de primeira e segunda lactação foi desviado entre os grupos, mas não influenciou a produção média geral, como a lactação foi ajustada no modelo estatístico. Os animais estavam em estudo de aproximadamente três semanas pré-parto até 22 semanas após o parto.

Nutrição:

[00093] Os ingredientes dietéticos e a composição formulada de rações misturadas totais (TMRs) estão apresentados na tabela 5 abaixo para vacas secas e lactantes, respectivamente. O TMR base era a mesma para cada grupo e diferente em tratamento de cobertura. Cada grupo recebeu uma cobertura de 8 onças de milho finamente moído ao qual se acrescentou uma onça de maltodextrina (tratamento 1, controle), *Bacillus spp*, 5×10^9 CFU / cabeça / dia (tratamento 2) e *Bacillus spp* em 1×10^{10} CFU / cabeça / dia (tratamento 3).

Tabela 5. Composição Formulada de TMR Oferecida para Vacas Secas e Lactantes.

	Período seco	Período de Lactação

Ingredientes, % base DM		
Silagem de milho	52,57	39,14
Silagem de centeio	18,54	
Forragem de alfafa	.	16,52
Forragem de capim	14,45	1,77
SBM48	5,74	10,77
Farinha de sangue	4,41	
AminoPlus	.	6,01
Milho	2,41	21,07
Gordura	0,65	1,42

calcário	.	1,26
Bicarbonato de sódio	.	0,84
MagOx	0,65	0,42
Sal	0,32	0,53
TMin Vit	0,27	0,26
Composição, % DM		
CP	16,50	16,64
SP, % CP	32,29	28,58
NDF	41,06	30,65
Amido	19,56	29,82
Açúcar	3,19	2,68
NFC	33,47	41,87
Gordura	3,82	4,15
Ca	0,31	0,87
P	0,29	0,34
Mg	0,54	0,42
K	1,72	1,33
NeL, mcal/kg	1,60	1,74

Coleta de Amostra e de Dados:

[00094] Amostras diárias TMR e recusas foram coletadas e compostas semanalmente, compostos semanais combinados mensalmente e amostragens mensais foram analisadas em relação à matéria seca (MS), proteína bruta (PB), proteína ligada à fibra em detergente ácido (ADF-PB), proteína ligada à fibra em detergente neutro (FDN-PB), proteína solúvel (SP), fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro (FDN), lignina, gordura, amido, açúcar, cinzas, cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg), potássio (K), enxofre (S), sódio (Na), cloro (Cl), ferro (Fe), manganês (Mn), MD zinco (Zn) e cobre (Cu) por Cumberland Valley Analytical Services, Maugansville, MD.

[00095] As vacas foram ordenhadas duas vezes por dia, e o volume de leite foi registrado eletronicamente em cada ordenha e os montantes

manhã-tarde, somados para o total diário. Uma vez por semana amostras de leite da manhã e tarde foram compostas para análise do teor de gordura, proteína, células somáticas, teor de sólidos não gordos, e nitrogênio ureico no leite (MUN) pelo laboratório de leite Dairy One no State College, PA usando um Fossomatic 4000 (FOSS, Eden Prairie, MN).

[00096] Os animais estavam em estudo de cerca de três semanas pré-parto até 22 semanas após o parto. O peso dos animais foi estimado pela circunferência do perímetro torácico nas semanas 1, 3, 7, 11, 15 e 18 pós-parto. A condição corporal foi avaliada por dois observadores independentes ao mesmo tempo, à medida que o peso corporal foi coletado.

[00097] Amostras de sangue foram colhidas da veia coccígea, o soro colhido congelado e analisado para determinação de glicose, beta-hidroxi butirato (BHB), e ácidos graxos não esterificados (AGNE) na semana 2 e 8 pós-parto. Glicose e BHB foram analisados utilizando um medidor Abbott Precision Xtra® (Abbott Diabetes Care Inc., Alameda, CA). Um kit de ensaio Randox (Cat. HN 1530, Randox Laboratories, Irlanda do Norte) foi usado para medir a concentração de ácidos graxos não esterificados (AGNE) em soro adaptadas para um leitor de placas para teste ELISA (enzyme linked immunosorbant assay) com um comprimento de onda de 550 nm para múltiplas amostras. O kit Randox usa Acil CoA sintetase e oxidase para converter NEFA para 2,3-trans-enoil-CoA mais peróxido, peróxido mais N-etil-N-(2-hidroxi-3 sulfopropil) m-tolueno leva a um produto roxo, que é o indicador de concentração de AGNE no soro.

Modelos Estatísticos.

[00098] A produção de leite e escore de teor, peso corporal e condição corporal foram analisados usando o procedimento misto do programa estatístico SAS. Vaca foi o sujeito repetido com o conjunto de

matriz de covariância à estrutura de correlação do tipo 1. Observações de leite diárias foram agregadas por semana pós-parto. O modelo estatístico utilizado foi o seguinte:

$$Y_i = u_i + TRT_j + Lact_k + Week_l + TRT_j * Lact_k + TRT_j * Week_l + TRT_j * Lact_k * Week_l + e_{jklm}$$

Onde

Y_i = média quadrada mínima de variáveis dependentes de produção;

u_i = média geral das várias variáveis de produção;

TRT_j = efeito de tratamento de j th, 1, 2, 3;

$Lact_k$ = lactação k th, 1, 2+;

$Week_l$ = semana l th, 1., 22;

Termos de interação ($TRT_j * Lact_k + TRT_j * Week_l + TRT_j * Lact_k * Week_l$)

e_{jklm} = erro

[00099] Amostras mensais de TMR e recusa alimentar para cada tratamento foram testadas para determinar a diferença através de procedimentos de meios em SAS.

[000100] As concentrações sanguíneas de glicose, BHB e NEFA, foram analisadas utilizando os modelos lineares generalizados em software estatístico SAS. As variáveis de classe foram vaca, semana e tratamento. O tratamento foi aninhado em vaca e foi o termo de erro para testar a importância do tratamento. Tratamento por interação semanal foi testado para determinar significância estatística através do erro residual.

Resultados

[000101] A composição média de TMR para TMRs secas e lactantes é apresentada na Tabela 6, ao longo do estudo. A composição não foi diferente entre os grupos de tratamento.

Tabela 6. Composição analisada de TMR para vacas secas e lactantes

	Tratamento, % base DM			
Item	1	2	3	SEM
TMR seca				
N	3	3	3	
CP	13,64	13,17	13,11	0,14
ADF	29,55	28,37	27,88	0,53
NDF	48,54	48,04	47,14	0,93
Lignina	3,64	3,52	3,58	0,09
Amido	18,74	18,19	17,97	0,87
Açúcar	6,71	6,15	6,57	0,23
Cinzas	8,44	7,56	7,79	0,10
NFC	39,49	36,93	38,20	0,86
Ca	0,49	0,46	0,47	0,01
P	0,37	0,35	0,35	0,004
TMR lactante				
N	9	9	9	
CP, %	14,54	14,81	14,37	0,10
ADF, %	21,54	21,38	21,64	0,25
NDF, %	33,51	33,21	33,30	0,32
Lignina, %	3,27	3,27	3,26	0,06
amido, %	25,36	26,52	25,48	0,38
açúcar, %	6,25	6,15	6,25	0,15
gordura, %	3,69	3,65	3,62	0,04
cinzas, %	8,73	8,67	8,60	0,09
NFC, %	41,22	42,02	41,44	0,34
Ca, %	0,95	0,97	0,96	0,005
P, %	0,36	0,36	0,36	0,003

Médias de erro padrão (SEM),

NFC, carboidrato não fibroso

NDF, fibra em detergente neutro

ADF, fibra em detergente ácido

Tratamento de controle 1; Tratamento 2, *Bacillus pumilus* em 8G-134 5

x 10⁹; Tratamento 3, *Bacillus pumilus* 8G-134 a 1 x 10¹⁰.

[000102] Uma vaca de controle (Tratamento 1) apresentou produção de leite anormal e os dados dela foram removidos da análise de dados. A análise de produção de leite foi repetida em 29 vacas. A produção de leite foi significativamente influenciada pelo tratamento (Tabela 7 abaixo). As vacas alimentadas com o *Bacillus pumilus* 8G-134 a 5 x 10⁹ CFU/cabeça/dia (Tratamento 2), e *Bacillus pumilus* 8G-134 a 1 x 10¹⁰ CFU/cabeça/dia (Tratamento 3) produziram significativamente mais leite do que as vacas alimentadas com o controle de placebo. Vacas nos Tratamentos 2 e 3 produziram aproximadamente 2 kg mais leite do que as do tratamento 1 (Tabela 7). Havia uma significativa interação com paridez. Aumentos na produção foram significativos em vacas de segunda paridez em 5,2 kg, mas nenhuma diferença significativa na produção de leite em vacas de primeira paridez.

Tabela 7. Produção de leite de média quadrada mínima em vacas Holstein a partir de bezerros até 22 semanas pós-parto alimentados com aditivo microbial.

Efeito	Tratamento	Lactação	Leite, kg/d	sem	Mudança relativa ao controle	sem
			kg/d		kg/d	
Tratamento	1		33,12 ^a	0,65	0,00	0,66
Tratamento	2		35,38 ^b	0,60	2,30*	0,60
Tratamento	3		35,08 ^b	0,61	1,99*	0,61
Lactação	1		31,59 ^a	0,47	-0,83	0,47
Lactação	2		36,84 ^b	0,39	3,09*	0,39
Interação	1	1	32,44 ^a	1,07	0,00	1,07
	2		31,70 ^a	0,93	-0,72	0,93
	3	1	31,36 ^a	0,93	-1,07	0,93
	1	2	33,80 ^b	0,74	0,00	0,74
	2	2	39,06 ^c	0,76	5,24*	0,76
	3	2	38,79 ^c	0,79	5,17*	0,79

Médias dentro do grupo com sobrescrição diferente diferem, $P < 0,05$

Mudança de meio com * difere significativamente de 0

Tratamento 1 controle; Tratamento 2, *Bacillus pumilus* a 8G-134 5×10^9 ;

Tratamento 3, *Bacillus pumilus* 8G-134 a 1×10^{10} .

[000103] Gordura de leite e rendimento são apresentados na Tabela 8 abaixo. A gordura do leite foi significativamente aumentada pelos Tratamentos 2 e 3 acima do controle. Respostas de rendimento resultaram do rendimento do leite com rendimento de gordura aumentado nos grupos de tratamento de alimentação *Bacillus pumilus* 8G-134. Gado de *Bacillus pumilus* 8G-134 para tratamento 2 e 3 rendeu significativamente percentagem de gordura mais alta que o controle com 0,24% e 0,31% de níveis mais altos, respectivamente (Tabela 8). Acoplado com o aumento significativo em produção de leite, o rendimento de gordura diária para ambos os tratamentos 2 e 3 proveu aumentos significativos em produção de gordura diária acima daquela do controle (Tabela 8).

Table 8. Teor de gordura de leite por grupos de tratamento.

Efeito	Tratamento	Lactação	gordura, %	sem	rend.gordura, kg/d	sem
Tratamento	1		3,57 ^a	0,09	1,206 ^a	0,042
	2		3,81 ^b	0,08	1,351 ^b	0,039
	3		3,88 ^b	0,08	1,351 ^b	0,039
Lactação		1	3,76	0,06	1,159 ^a	0,030
		2	3,78	0,05	1,395 ^b	0,025

Médias dentro da coluna com sobrescritos diferentes diferem por by $P < 0,05$

Controle de Tratamento 1; Tratamento 2, *Bacillus pumilus* a 8G-134 5×10^9 ; Tratamento 3, *Bacillus pumilus* 8G-134 a 1×10^{10} .

[000104] Log de pontuação de contagem linear de células somáticas (LogSCC) foram diferentes por tratamento e lactação. Os tratamentos de *Bacillus pumilus* 8G-134 (Tratamentos 2 e 3) tiveram pontuação de

log linear significativamente menor do que as vacas de controle (Tabela 9 abaixo). Vacas dos tratamentos 2 e 3 tiveram LogSCC de 4,97 e 4,96, respectivamente, quando comparados àquelas vacas do controle a 5,92. Vacas de segunda paridez tiveram pontuação de log linear significativamente maior que as vacas de primeira lactação. Contagem de células somáticas está associada com infecção, bem como estado imunológico e a saúde da vaca leiteira em lactação. SCC adicionalmente aumentado é um indicativo de respostas inflamatórias a uma infecção. Diminuição em SCC demonstrado aqui pode indicar que vacas alimentadas com o *Bacillus pumilus* 8G-134 são melhores imunologicamente para lidar com desafio infeccioso durante a lactação e manter a saúde do úbere e da vaca.

Tabela 9. Efeitos do Tratamento na Contagem de Células Somáticas (SCC).

Efeito	Tratamento	Lactação	LogSCC	Sem
Tratamento	1		5,92 ^a	0,32
	2		4,97 ^b	0,30
	3		4,96 ^b	0,30
Lactação		1	5,27 ^a	0,23
		2	5,86 ^b	0,19

LogScc = log de contagem de célula somática

Controle de Tratamento 1; Tratamento 2, *Bacillus pumilus* a 8G-134 5 x 10⁹; Tratamento 3, *Bacillus pumilus* 8G-134 a 1 x 10¹⁰.

[000105] Os dados de DMI para grupos de períodos de seca e em lactação na Tabela 10 abaixo. O consumo de matéria seca em vacas secas variou de 10,79 a 11,64 kg / d entre os grupos. Grupos em lactação consumiram 22,02, 21,31 e 21,48 kg / d para os grupos de tratamento 1, 2 e 3, respectivamente (Tabela 10). O DMI previsto com base na equação do NRC para vacas por semana pós-parto é apresentado na Tabela 10. A ingestão para o tratamento 1 foi 0,83 kg maior do que o previsto; a ingestão do Tratamento 2 foi -1,37 kg inferior

ao previsto; a ingestão do Tratamento 3 foi -1,04 kg inferior ao previsto. O aumento na produção de leite nos Tratamentos 2 e 3 foi realizada sem aumento no DMI. Na verdade, o DMI previsto ou esperado com base em previsões NRC, comparado com a ingestão média do grupo, sugere que essas vacas consumiram 1,0 a 1,5 kg/d menos DMI. Assim, a eficiência de utilização de DM foi aumentada nos Tratamentos 2 e 3.

Tabela 10. Médias quadradas mínimas para consumo do grupo alimentação, soro de glicose, beta-hidróxi-butirato, ácidos graxos não esterificados, por grupo de Tratamento.

Item	Grupo de Tratamento					
	1	sem	2	sem	3	sem
Ingestão de matéria seca, kg/d						
Vacas secas	10,79	0,27	11,64	0,25	11,12	0,25
Vacas lactantes	22,02	0,11	21,31	0,11	21,48	0,11
DMI previsto, kg/d	21,19	0,58	22,68	0,57	22,52	0,58
Valores de soro						
de glicose, mg/dl	53,95	1,98	51,5	1,98	53,5	1,98
Beta-OH butirato, mg/dl	1,05	0,15	0,88	0,15	1,15	0,15
NEFA, ueq/ml	0,23	0,04	0,16	0,04	0,17	0,04
Valores de soro por semana, 2, 8;						
Glicose, mg/dl,	52,90	2,80	47,00	2,80	48,90	2,80
	55,00	2,80	56,00	2,80	58,10	2,80
BHB, mg/dl	0,92	0,21	0,86	0,21	1,39	0,21
	1,17	0,21	0,89	0,21	0,91	0,21
NEFA, ueq/ml	0,41	0,05	0,23	0,05	0,28	0,05
	0,07	0,05	0,10	0,05	0,07	0,05

BHB = butirato de beta-hidróxi

Controle de Tratamento 1; Tratamento 2, *Bacillus pumilus* a 8G-134 5 x 10⁹; Tratamento 3, *Bacillus pumilus* 8G-134 a 1 x 10¹⁰.

DMI previsto = (,372 * FCM + 0,0968 * BWT (kg) ^,75) * (1 - exp(-0,192 * (Week+3,67)))

[000106] As diferenças de DMI e os valores de produção poderiam sugerir que as vacas nos Tratamentos 2 e 3 poderiam ter mobilizado mais tecido do corpo do que as vacas do controle para produzir mais leite e comer menos do que o esperado. No entanto, soros NEFA, glicose e BHB sugerem que estas vacas estavam em estado de energia semelhantes às vacas controle (Tabela 10 acima). Além disso, o peso corporal e BCS foram similares para os grupos de *Bacillus* em relação ao grupo de controle (Tabela 11 abaixo). Isto sugere que elas não mobilizaram mais tecido do corpo para produzir o volume adicional de leite, indicando a eficiência da conversão alimentar nos Tratamentos 2 e 3 de alimentação a vacas, independentemente da dose.

Tabela 11. Peso corporal em média quadrada mínima (lb) e escore de condição corporal por grupos de tratamento. Escore de condição corporal é o escore médio de dois observadores.

Efeito	Tratamento	Lactação	Wt	sem	BCS	sem
				(lb)		
Tratamento	1		609,22 (1343,10)	28,49	2,92	0,03
	2		600,83 (1324,60)	27,54	3,13	0,03
	3		629,59 (1388,02)	27,73	3,06	0,03
Lactação		1	554,88 (1223,31)	21,87	3,04	0,02
		2	669,78 (1476,62)	17,94	3,01	0,02
Interação Tratamento x lactação						
	1	1	531,06 (1170,78)	27,72	3,06	0,05
	2	1	563,65 (1242,64)	25,26	3,17	0,05
	3	1	548,17 (1208,50)	24,00	2,94	0,05
	1	2	674,05 (1486,02)	19,33	2,78	0,04
	2	2	637,94 (1406,42)	19,96	3,10	0,04
	3	2	702,09 (1547,85)	20,79	3,19	0,04

Wt = peso, Kg (libras)

BCS = escore da condição corporal, escala 1 a 5 por 0,25 ponto;
1=emaciado, 2=magro, 3= médio, 4= gordo, 5=obeso

Controle de Tratamento 1; Tratamento 2, *Bacillus pumilus* a 8G-134 5 x 10⁹; Tratamento 3, *Bacillus pumilus* 8G-134 a 1 x 10¹⁰.

[000107] Entende-se que as diversas modalidades preferenciais estão mostradas e descritas acima para ilustrar diferentes possíveis características aqui descritas e as diferentes maneiras em que esses

recursos podem ser combinados. Além de combinar os diferentes recursos das modalidades acima de diversas formas, outras modificações também são consideradas dentro do escopo aqui descrito. A invenção não se destina a limitar-se às modalidades preferidas descritas acima.

BIBLIOGRAFIA

Allison, M.J., M. Robinson, R.W. Dougherty, and J.A. Bucklin. 1975. Grain overload in cattle and sheep: Changes in microbial populations in the cecum and rumen. *Amer. J. Vet Res.* 36:181.

Dunlop, R.H.. 1972. Pathogenesis of ruminant lactic acidose. *Adv. Vet Sci. Comp Med.* 16:259.

Elam, C.J. 1976. Acidose in feedlot cattle: Practical observations. *J. Anim. Sci.* 43:898.

Hungate, R.E., R.W. Dougherty, M.P. Bryant , and R.M. Cello. 1952. Microbiological and physiological changes associated with acute indigestion in sheep. *Cornell Vet.* 42:423.

Muir, L.A., E.L. Rickes, P.F. Duquette, and G.E. Smith. 1981. Prevention of induced lactic acidose in cattle by thiopeptin. *J. Anim. Sci.* 52:635.

Owens, F.N., Secrist, D.S., Hill, W.J., Gill, D.R. 1998. Acidose in cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 76:275-286.

Slyter, L.L. 1976. Influence of acidose on rumen function. *J. Anim. Sci.* 43:910.

Yang, W., 2004. Effects of direct-fed microbial supplementation on ruminal acidose, digestibility, and bacterial protein synthesis in continuous culture. *Animal Feed Science and Technology*, 114(4): 179 - 193.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para fazer uma alimentação direta microbiana, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) cultivar em um caldo de nutrientes líquidos uma cepa selecionada do grupo consistindo em cepa 8G-1 de *Enterococcus faecium* (NRRL B-50173), cepa 8G-73 de *Enterococcus faecium* (NRRL B-50172), cepa 8G-134 de *Bacillus pumilus* (NRRL B-50174), e

(b) separar a cepa do caldo de nutrientes líquidos para fazer a alimentação direta microbiana.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda liofilização da cepa.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a cepa é cepa 8G-1 de *Enterococcus faecium* (NRRL B-50173).

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a cepa é cepa 8G-73 de *Enterococcus faecium* (NRRL B-50172).

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a cepa é cepa 8G-134 de *Bacillus pumilus* (NRRL B-50174).

6. Método para fazer uma alimentação direta microbiana, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) cultivar em um caldo de nutrientes líquidos uma cepa selecionada do grupo consistindo em cepa 8G-1 de *Enterococcus faecium* (NRRL B-50173), cepa 8G-73 de *Enterococcus faecium* (NRRL B-50172), cepa 8G-134 de *Bacillus pumilus* (NRRL B-50174);

(b) separação da cepa do caldo de nutrientes líquidos para fazer a alimentação direta microbiana; e

(c) a adição de monensina à alimentação direta microbiana.

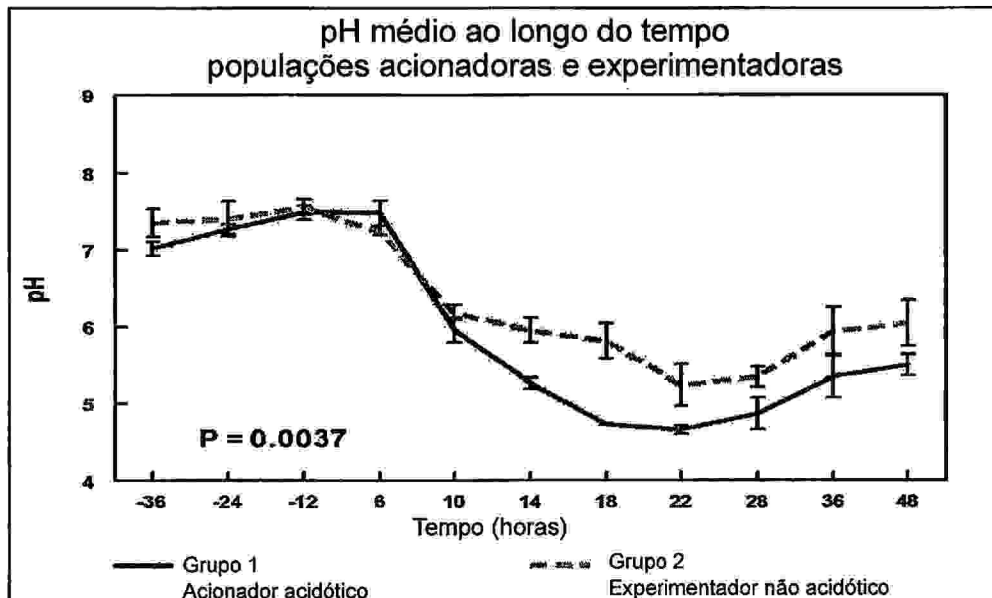


Fig. 1

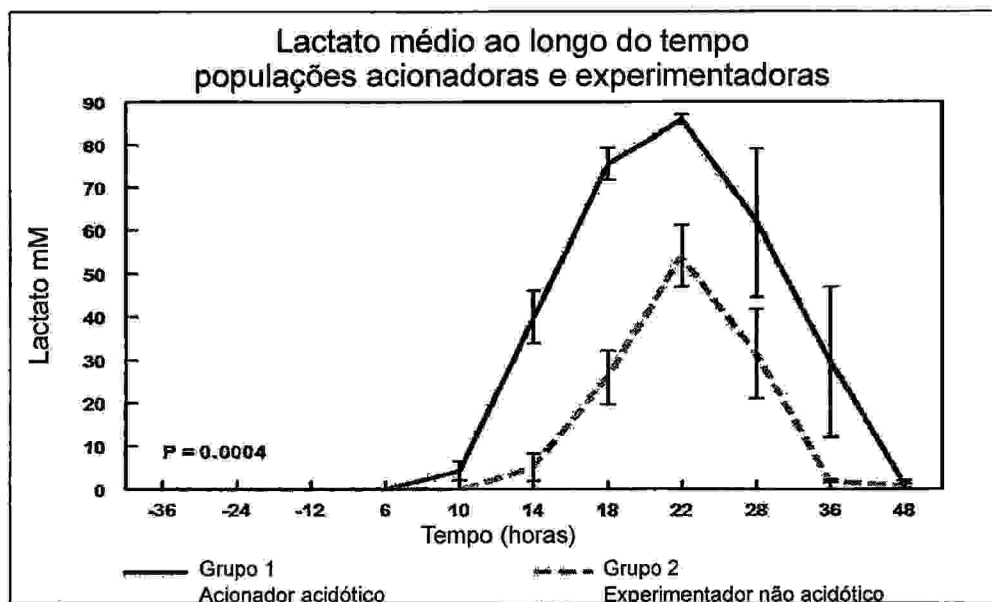


Fig. 2

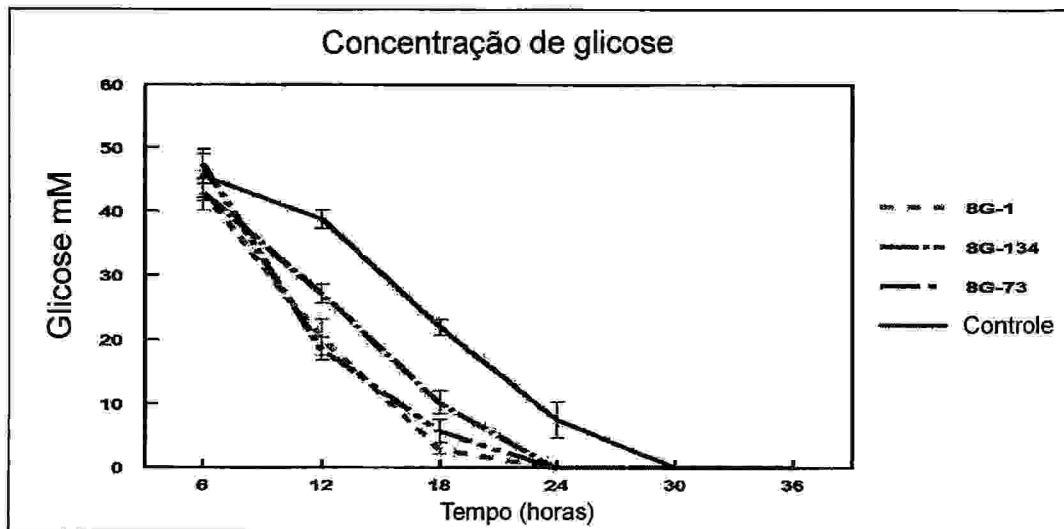


Fig. 3

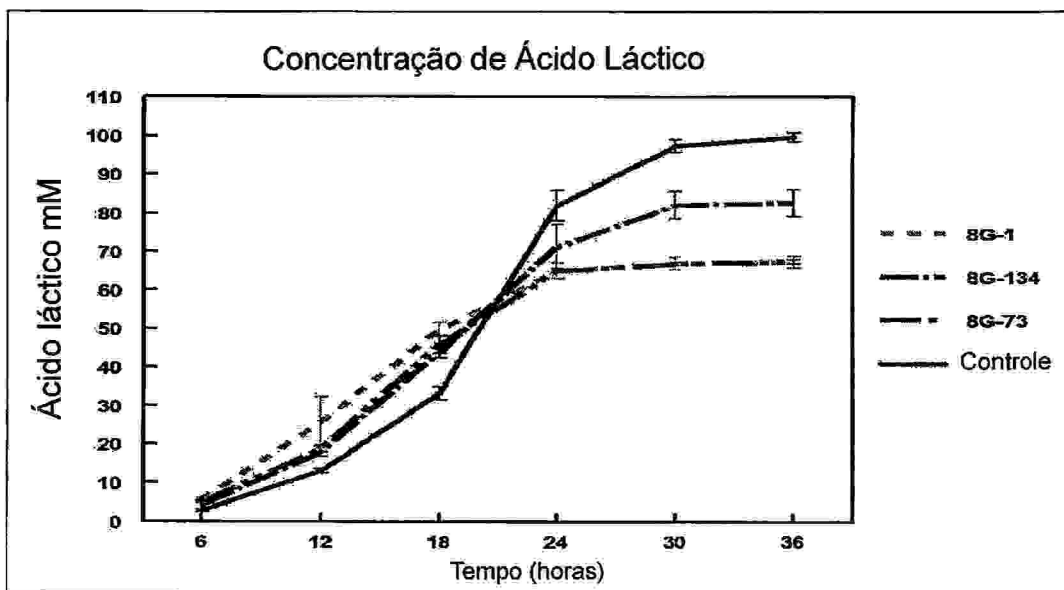


Fig. 4

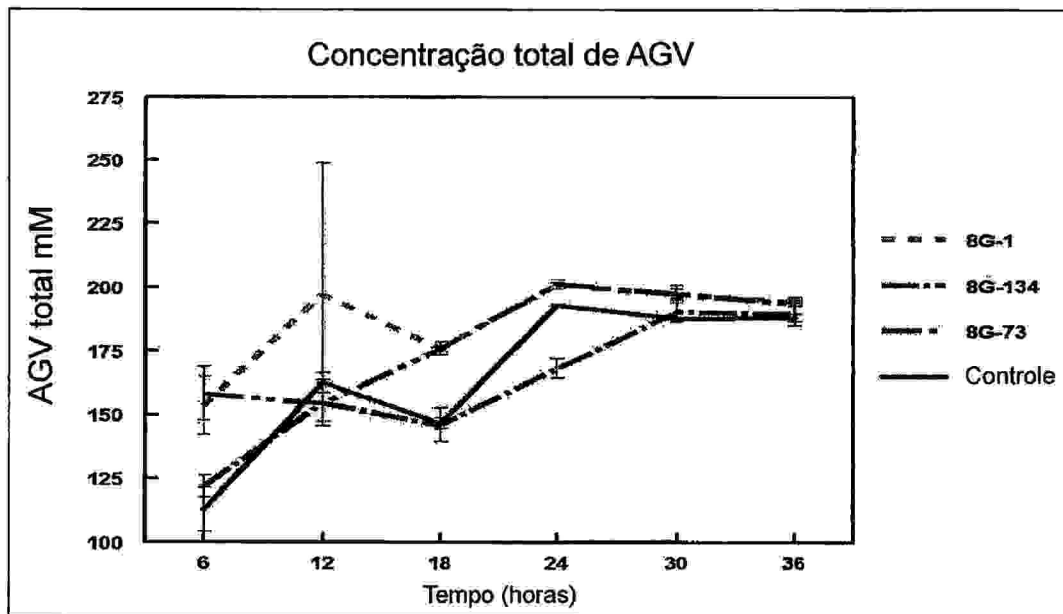


Fig. 5

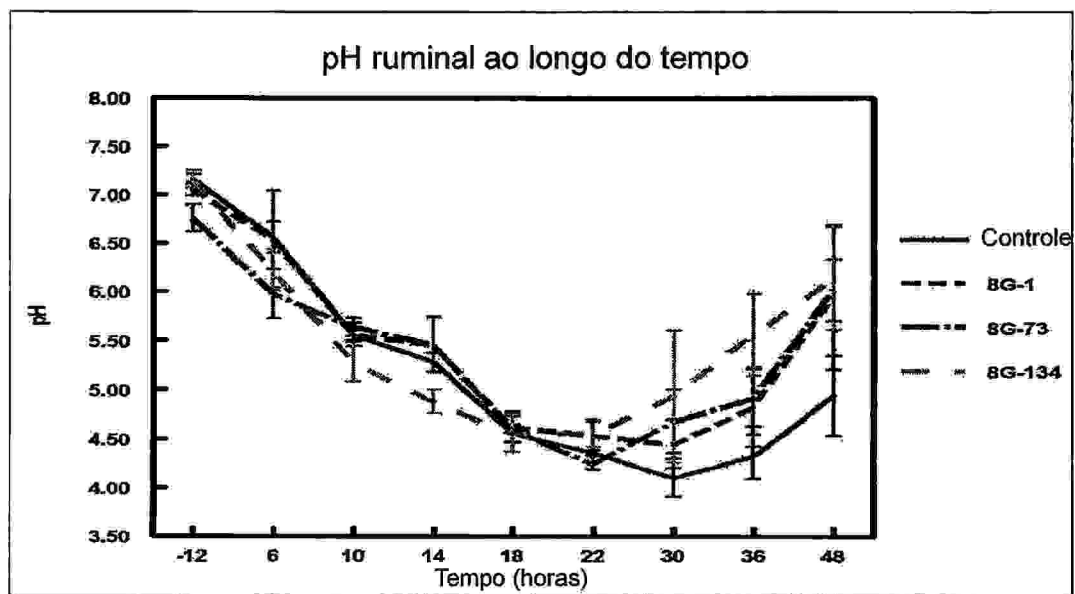


Fig. 6

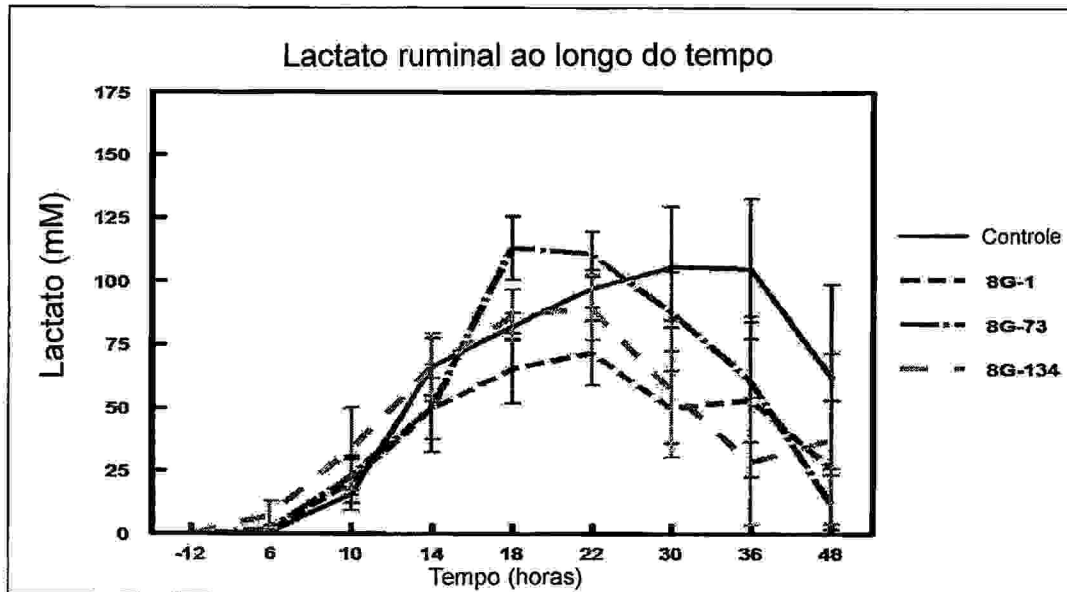


Fig. 7

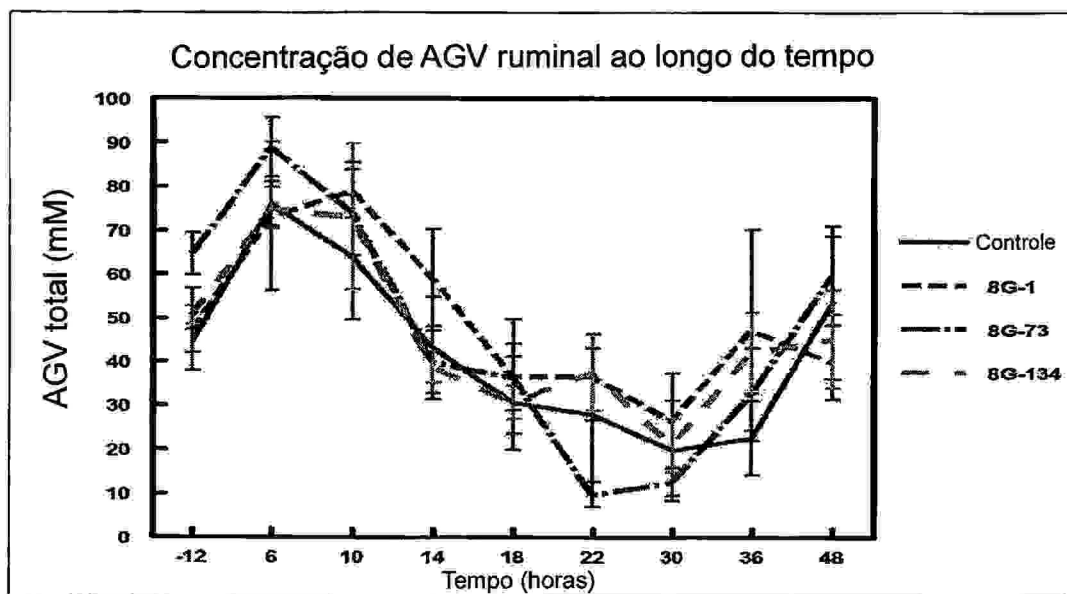


Fig. 8