

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Efeito da administração oral de *Megasphaera elsdenii* no desempenho e
saúde de bezerros leiteiros**

Rayane Dias Faveri Barboza

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens

**Piracicaba
2024**

Rayane Dias Faveri Barboza
Zootecnista

**Efeito da administração oral de *Megasphaera elsdenii* no desempenho e saúde de
bezerros leiteiros**

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:

Profa. Dra. **CARLA MARIS MACHADO BITTAR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens

Piracicaba
2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Barboza, Rayane Dias Faveri

Efeito da administração oral de *Megasphaera elsdenii* no desempenho e saúde de bezerros leiteiros / Rayane Dias Faveri Barboza. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2024.

63 p.

Dissertação (Mestrado) – USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Acidose 2. Butirato 3. Microbioma 4. Probiótico I. Título

DEDICATÓRIA

A meu avô, Rubens, que acreditou nos meus sonhos e trabalhou durante toda sua vida para permitir que eu pudesse ir em busca deles.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A Deus, pois tudo é por Ele e para Ele.

A Nossa Senhora Aparecida, por ser meu refúgio e caminhar junto a mim.

A minha família, em especial minha avó e minha mãe, minhas fiéis companheiras. Que não mediram esforços para que eu chegasse até aqui.

Ao meu avô, pelo exemplo de garra e humildade. Por me mostrar que é através do trabalho e com sabedoria que se conquista grandes coisas.

Ao meu pai, pelo apoio incondicional.

Ao meu namorado, por ser meu melhor amigo e se fazer presente em todos os momentos.

A Professora Carla, por me acolher e me ensinar tanto. Esse período, que hoje parece ter sido tão curto, foi sem dúvida um grande marco em minha vida.

Ao Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ao programa de Ciência Animal e Pastagens e aos docentes com quem tive a oportunidade de aprender, obrigada pela dedicação ao ensino e a pesquisa.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa em Metabolismo Animal e aos estagiários do Clube de Criação de Bezerros (CCB), por contribuírem com meu crescimento profissional e pessoal, sou grata a todos por dividirem suas experiências e trajetórias.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A empresas Nutricorp, em especial a Nathaly e Osvaldo, por proporcionarem o desenvolvimento deste projeto.

A Fazenda Agrindus e a equipe do bezerreiro que é tão bem gerenciada pela Suzi e que desempenha um trabalho excepcional. Sou grata, pela paciência e pela oportunidade de aprendizado.

A todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. Efeito dos programas de alimentação sobre o consumo de dieta sólida.....	13
2.2. Importância da dieta sólida para o desenvolvimento ruminal	15
2.2.1. Estabelecimento da microbiota ruminal	15
2.2.2. Desenvolvimento anatômico e fisiológico	17
2.3. Definição e alterações microbiológicas causadas pela acidose ruminal.....	21
2.4. Implicações a saúde dos ruminantes e estratégias de prevenção a acidose	23
2.5. Papel da <i>Megasphaera elsdenii</i> na redução da acidose ruminal	25
2.6. Efeitos sobre a função ruminal, consumo e desempenho animal.	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1. Local do experimento e animais	31
3.2. Grupos experimentais	32
3.3. Desempenho e saúde	33
3.4. Parâmetros sanguíneos	35
3.5. Análise estatística	36
4. RESULTADOS	37
4.1. Consumo de dieta líquida e dieta sólida	37
4.2. Ganho de peso e características de crescimento.....	38
4.3. Parâmetros de saúde dos animais	40
4.4. Parâmetros sanguíneos dos animais	41
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS	53
ANEXOS	63

RESUMO

Efeito da administração oral de *Megasphaera elsdenii* no desempenho e saúde de bezerros leiteiros

A *Megasphaera elsdenii* (ME) tem potencial de metabolizar o lactato e a glicose à butirato, promovendo a manutenção do pH e o aumento da concentração de ácido butírico, que é o principal ácido graxo de cadeia curta envolvido no processo de desenvolvimento ruminal de bezerros, o que possibilita melhora na degradação e na absorção de nutrientes, e consequentemente aumento do desempenho e da saúde dos animais. O objetivo deste estudo foi determinar o efeito do probiótico contendo a cultura deste microrganismo, no desempenho e saúde dos animais durante e após o aleitamento. Cinquenta bezerras da raça Holandesa, oriundas de um rebanho comercial, foram distribuídas em delineamento de blocos ao acaso considerando o peso ao nascimento. Foram testados dois tratamentos: 1) Placebo: solução composta por água, maltodextrina, açúcar, bicarbonato de sódio, fosfato de potássio, sulfato de amônio, sulfato de magnésio, cloreto de cálcio e cloreto de sódio; e 2) Lactipro NXT: cultura de ME (NCIMB 41125, 10 ml, 5×10^9 UFC/ animal, MS Biotec, Wamego, KS) diluída na solução utilizada como placebo. O período experimental foi de 84 dias e a administração dos tratamentos foi realizada aos 14 ± 1 dia de idade. O programa de aleitamento era do tipo *step-up step-down*, e o desaleitamento foi iniciado aos 60 dias com duração de sete dias. O concentrado inicial e a água estavam disponíveis desde o primeiro dia de idade dos animais e o feno foi fornecido ao início do desaleitamento, e assim como a água e o concentrado também foi fornecido *ad libitum*. O consumo de concentrado foi medido diariamente, assim como as variáveis de saúde. As medidas de crescimento e os metabólitos sanguíneos foram avaliados a cada duas semanas. As medidas de crescimento e desempenho não foram afetadas pelo tratamento, nem durante o aleitamento nem após o desaleitamento, assim como também não foi encontrado efeito no consumo de concentrado inicial e consumo de matéria seca total. No entanto, o consumo de dieta sólida inicial era baixo e o escore fecal dos animais durante o fornecimento do probiótico era alto, o que pode ter impactado de forma negativa no estabelecimento do microrganismo. Os efeitos observados na saúde foram apenas numéricos, sem significância e não demonstram benefícios acerca da administração da cultura de ME ao aleitamento e desaleitamento. Para a concentração de glicose e de beta-hidroxibutirato (BHBA), observamos valores que são compatíveis com a idade dos animais. A concentração de BHBA foi numericamente maior nos animais que receberam o produto probiótico nas semanas após a dosagem, porém a vantagem numérica reduziu ao desaleitamento e não teve efeito na interação tratamento idade ($p > 0,05$). A dosagem oral da cultura de ME em bezerros aos 14 dias de idade, não foi eficaz em promover aumento na concentração de metabólitos envolvidos no desenvolvimento do rúmen e consequentemente não possibilitaram aumentos significativos no desempenho e saúde dos bezerros durante a transição do aleitamento para o desaleitamento.

Palavras-chave: Acidose, Butirato, Microbioma, Probiótico

ABSTRACT

Effect of oral administration of *Megasphaera elsdenii* on performance and health of dairy calves

Megasphaera elsdenii (ME) has the potential to metabolize lactate and glucose to butyrate, promoting the maintenance of pH and increasing the concentration of butyric acid, which is the main short-chain fatty acid involved in the process of rumen development in calves, which makes it possible to improve the degradation and absorption of nutrients, and consequently increase the performance and health of animals. This study aimed to determine the effect of probiotics containing the culture of this microorganism on the performance and health of animals during and after breastfeeding. Fifty Holstein calves from a commercial herd were distributed in a randomized block design considering birth weight. Two treatments were tested: 1) Placebo: solution composed of water, maltodextrin, sugar, sodium bicarbonate, potassium phosphate, ammonium sulfate, magnesium sulfate, calcium chloride and sodium chloride; and 2) Lactipro NXT: ME culture (NCIMB 41125, 10 ml, 5×10^9 CFU/animal, MS Biotec, Wamego, KS) diluted in the solution used as placebo. The experimental period was 84 days, and treatments were administered at 14 ± 1 day of age. The breastfeeding program was a step-up, step-down type; weaning began at 60 days and lasted seven days. The initial concentrate and water were available from the animals' first day of age, and hay was provided at the beginning of weaning. Water, concentrate, and hay were also provided ad libitum. Concentrate consumption was measured daily, as were health variables. Growth measurements and blood metabolites were assessed every two weeks. Growth and performance measures were not affected by the treatment, neither during breastfeeding nor after weaning, nor was there any effect on initial concentrate intake and total dry matter intake. However, the initial solid diet consumption was low, and the fecal score of the animals during the probiotic supply was high, which may have harmed the establishment of the microorganism. The effects observed on health were only numerical, without significance, and did not demonstrate benefits regarding the administration of the ME culture during breastfeeding and weaning. For the concentration of glucose and beta-hydroxybutyrate (BHBA), we observed values that were compatible with the age of the animals. The concentration of BHBA was numerically higher in animals that received the probiotic product in the weeks after dosing, but the numerical advantage was reduced with weaning and had no effect on the age-treatment interaction ($p > 0.05$). Oral dosing of ME culture in calves at 14 days of age was ineffective in promoting an increase in the concentration of metabolites involved in rumen development and consequently did not allow significant increases in the performance and health of calves during the transition from breastfeeding to weaning.

Keywords: Acidosis, Butyrate, Microbiome, Probiotic

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dosagem oral da cultura de <i>Megasphaera elsdenii</i>	33
Figura 2. Volume de dieta líquida fornecida de acordo com a idade em semanas. O volume fornecido variou até o início do desaleitamento.	34
Figura 3. Consumo de dieta líquida (g de MS/d) durante o período de aleitamento.	38
Figura 4. Consumo de dieta sólida (g/d) durante o período de aleitamento e desaleitamento.	38
Figura 5. Ganho de peso (kg/d) durante o período de aleitamento e desaleitamento.	39
Figura 6. Escore fecal dos animais durante o período experimental.	41
Figura 7. Concentração de glicose sérica em bezerros suplementados com cultura de <i>Megasphaera elsdenii</i>	42
Figura 8. Concentrações de BHBA sérico em bezerros suplementados com cultura da <i>Megasphaera elsdenii</i>	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Volume e qualidade do colostro fornecido e avaliação da transferência de imunidade passiva de bezerros.	32
Tabela 2. Ingredientes e composição química dos alimentos.....	34
Tabela 3. Consumo de alimento de bezerros suplementados ou não com <i>Megasphaera elsdenii</i>	37
Tabela 4. Desempenho e medidas corporais de bezerros suplementados ou não com probiótico.....	39
Tabela 5. Avaliações de saúde e escore fecal dos bezerros suplementados com cultura de <i>Megasphaera elsdenii</i> e acompanhados durante 12 semanas.....	40
Tabela 6. Avaliações dos metabólitos sanguíneos de bezerros suplementados com cultura de <i>Megasphaera elsdenii</i> , durante 12 semanas.	41

1. INTRODUÇÃO

O sistema de criação de bezerras leiteiras está em constante atualização. No Brasil, a fase de criação tem recebido incentivo de empresas privadas e públicas para que mudanças nas práticas de manejo sejam realizadas. Essas mudanças possuem como foco a manutenção da saúde, bem-estar e desempenho durante a fase mais crítica da criação de fêmeas de reposição. A importância da fase de aleitamento para a vida futura dessa fêmea de reposição já foi amplamente discutida, entretanto, existem diversas lacunas no que diz respeito aos desafios nutricionais, sanitários e sociais desses animais.

Entre os desafios nutricionais a serem solucionados, a transição da condição de pré-ruminante para a de ruminante funcional é uma das mais importantes, pois esse período traz implicações à saúde, desempenho e rentabilidade do sistema de criação. Para que as taxas de crescimento desses animais sejam mantidas durante o desaleitamento, o sistema digestório deve estar completo ou parcialmente desenvolvido, de modo que os bezerros sejam capazes de suprir suas exigências nutricionais a partir da degradação dos componentes da dieta sólida e da absorção dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos na fermentação.

O desenvolvimento ruminal durante a fase de aleitamento é influenciado pela colonização microbiana, ingestão de alimentos sólidos e desenvolvimento físico do epitélio ruminal (Jami et al., 2013; Nussio et al., 2003). Portanto, antecipar a ingestão de alimentos sólidos durante a fase de aleitamento, além de melhorar o aporte nutricional, pode acelerar o desenvolvimento do retículo-rúmen (Heinrichs, 2004). O fornecimento de dietas com alta inclusão de alimentos palatáveis, como grãos de cereais, que possui grandes quantidades de carboidratos prontamente fermentáveis, contribui para a produção de ácido butírico e propiônico no ambiente ruminal. O ácido butírico e o ácido propiônico, são os principais ácidos para o processo de desenvolvimento. O butirato é metabolizado pelo epitélio ruminal contribuindo para o crescimento e densidade de papilas, aumentando a área absorptivas e, conseqüentemente, o aproveitamento de nutrientes pelos animais (Aikman et al., 2011).

Contudo, taxas altas de fermentação ocasionadas por dietas sólidas com alto teor de carboidratos não-fibrosos (CNF) e inadequadas em fibra, podem resultar em acúmulos de AGCC e concentrações elevadas de ácido láctico no ambiente ruminal, o que provoca queda acentuada do pH e risco de evolução para acidose. A acidose ruminal reduz o fluxo sanguíneo para o epitélio, assim como a motilidade ruminal, que quando associadas, resultam em um processo conhecido como queratinização das papilas, que diminui a capacidade de absorção da parede ruminal. Em situações de acúmulo de AGCC no rúmen em desenvolvimento, é

comum observar variações na ingestão de alimento sólido, o que prejudica o processo completo de desenvolvimento ruminal, reduz a saúde e o desempenho futuro (Khan et al., 2016; Mojahedi et al., 2018; Porter et al., 2007; Toledo et al., 2020).

As estratégias de suplementação com aditivos microbianos ou probióticos estão se consolidando como fortes aliados na manutenção da saúde ruminal, pois alteram a composição do microbioma e melhoram a atividade dos microrganismos. A *Megasphaera elsdenii* (ME) é uma bactéria gram-negativa que possui potencial de fermentar o lactato e prevenir a acidose láctica, bem como altera os padrões de fermentação através da metabolização de lactato a propionato e butirato, e produção de butirato a partir da fermentação de glicose (Henning et al., 2010b; Susanto et al., 2023).

Os testes *in vitro*, utilizando diferentes cepas de ME demonstram resultados consistentes acerca da manutenção do pH ruminal e redução do acúmulo de ácido láctico, assim como os trabalhos utilizando as cepas de ME em animais contribuem com essa expectativa. Uma meta-análise com dados *in vivo* de animais com alto consumo de grãos demonstram que a ME tem capacidade de diminuir a concentração de ácido láctico, reduzir a proporção de acetato e aumentar as concentrações de propionato, butirato e outros AGCC, além de ser eficiente na manutenção do pH (Susanto et al., 2023).

No entanto, ainda não está definido quais os efeitos sobre o consumo de matéria seca e sobre o desempenho produtivo em bovinos leiteiros. Em animais jovens a expectativa é de aumento na ingestão de concentrado, melhora no desempenho e na eficiência alimentar. Muya e colaboradores (2015) exploraram a utilização deste microrganismo e encontraram resultados que contribuem com essa expectativa, do mesmo modo que observaram melhora nas características de desenvolvimento ruminal em animais que receberam uma dose de ME, como aumento na largura, densidade de papila, maior peso do retículo-rúmen e aumento nas concentrações de beta-hidroxibutirato. Contudo, os estudos que abordam a dosagem de ME em animais jovens são escassos e há pouca clareza sobre a eficácia da administração de ME e sua relação com o manejo alimentar durante o período de aleitamento.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da administração oral de uma dose de ME, no período de aleitamento de bezerras leiteiras, como alternativa para intensificar o desenvolvimento ruminal nesta fase, promovendo maior consumo de concentrado e desempenho durante a transição entre o aleitamento e desaleitamento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Efeito dos programas de alimentação sobre o consumo de dieta sólida

Nos últimos anos, diversas pesquisas tiveram como objetivo esclarecer qual seria o sistema de aleitamento com maiores benefícios para o desenvolvimento de bezerras leiteiras que conseqüentemente refletisse na vida produtiva futura desses animais. Os principais temas abordados pelos grupos de pesquisa buscam identificar o programa de alimentação, ou seja, a quantidade de matéria seca fornecida via dieta líquida, manejo e período de fornecimento da dieta líquida e como estes fatores impactam no desenvolvimento do trato gastrointestinal e na capacidade de digestão e absorção de nutrientes durante e após o período de aleitamento.

Existem diversas possibilidades que podem ser utilizadas nos programas de alimentação, a maior parte delas variando a quantidade de dieta líquida fornecida, o que irá caracterizar o sistema de aleitamento como: severamente restrito (<400g de MS), baixa taxa de alimentação (400-600 g de MS), moderada taxa de alimentação (600- 900g de MS) e alta taxa de alimentação (>900g de MS) (NASEM, 2021).

O sistema de aleitamento severamente restrito baseia-se na oferta de dieta líquida no volume de 10% do peso ao nascer do animal, fixado normalmente em quatro litros (Davis and Drackley, 1998). Os sistemas de criação de bezerros leiteiros por muito tempo consideraram que adotar volumes restritos de fornecimento de dieta líquida (4 litros) seriam suficientes para atingir um bom desempenho animal e desenvolvimento do trato gastrointestinal, além de economicamente ser menos dispendioso para o produtor de leite.

Este sistema tem como principal objetivo estimular o consumo antecipado de alimento sólido, o que promove um melhor desenvolvimento anatômico e funcional do retículo-rúmen ao desaleitamento, estando mais preparado para a fase de transição e a dieta exclusivamente sólida (De Paula et al., 2017). Entretanto, este volume de fornecimento restrito de dieta líquida, não fornece teores de proteína e energia metabolizável que possam manter as taxas de crescimento durante as primeiras semanas de vida, em que os bezerros ainda não ingerem quantidade de dieta sólida capaz de suprir esse déficit de nutrientes (NASEM, 2021). Atualmente no Brasil, segundo o levantamento do Alta Cria 2023, apenas 4% dos produtores assistidos fornecem este volume de dieta líquida (Azeveto et al., 2023).

Em contrapartida, o sistema de aleitamento com altas taxas de alimentação tem como premissa o fornecimento de dieta líquida em volumes acima de 20% do peso ao nascer, podendo ser dividido em duas ou mais refeições. O consumo elevado de dieta líquida fornece

alta ingestão de nutrientes de alto valor biológico, que resultam em maiores taxas de ganho de peso e maior eficiência alimentar (Blome et al., 2003). Neste sentido, através do fornecimento intensivo de dieta líquida é possível manter altas taxas de crescimento na fase de aleitamento e este fator está associado ao aumento na produção de leite desta futura vaca em sua primeira lactação (Heinrichs et al., 2003).

Os resultados dessas pesquisas, estimularam os produtores de leite a mudarem seus programas de alimentação para sistemas que fornecem maiores taxas de ingestão de nutrientes. Segundo o levantamento do Alta Cria, 59% dos produtores nacionais fornecem entre cinco e seis litros de dieta líquida, 35% fornece entre sete e oito litros e entre as propriedades participantes, 2% ofertam mais de nove litros por dia (Azevedo et al., 2023).

No entanto, o consumo de matéria seca (MS) superior a 750-800g vindos exclusivamente da dieta líquida, reduzem a ingestão de dieta sólida o que ocasiona um desenvolvimento do trato gastrointestinal tardio (Gelsinger et al., 2016). Com isto, há redução na digestibilidade da matéria seca do alimento sólido, devido à imaturidade do retículo-rúmen que mesmo após o desaleitamento não terá capacidade de ingerir, digerir e metabolizar todos os nutrientes (Quigley, 2019).

A estratégia de aleitamento ou programa de alimentação que alinha as recomendações de fornecimento de dieta líquida e a tentativa de atingir o melhor desenvolvimento ruminal durante o aleitamento, é denominada como *step-up/step-down*. Esse programa de alimentação consiste em promover uma alta taxa de ingestão de dieta líquida nos primeiros dias de aleitamento, quando a exigência nutricional é alta e o consumo de concentrado é pouco expressivo. No entanto, após esse primeiro período que compreende as primeiras duas semanas de idade, a taxa de alimentação com dieta líquida é reduzida, e busca-se aumentar a ingestão de dieta sólida e consequentemente atingir um bom desenvolvimento ruminal na transição entre o aleitamento e desaleitamento (Omid-Mirzaei et al., 2015; Khan et al., 2007).

Com isso, estabelecer práticas de manejo que preparem o animal na fase inicial para a ingestão, digestão e fermentação de substratos da dieta sólida de forma antecipada, proporciona melhor adaptação durante o desaleitamento, melhorando o bem-estar nessa fase tão desafiadora.

2.2. Importância da dieta sólida para o desenvolvimento ruminal

2.2.1. Estabelecimento da microbiota ruminal

Entre os ruminantes e os diferentes microrganismos anaeróbicos é mantida uma relação de simbiose, isso porque os microrganismos encontram no ambiente ruminal condições adequadas e substrato para o estabelecimento de diferentes espécies e gêneros. Em troca, os microrganismos fornecem por meio da fermentação dos substratos da dieta sólida, os aminoácidos, amônia, vitaminas e AGCC, pois são capazes de se ligarem às partículas dos alimentos, degradarem e metabolizarem nutrientes que os ruminantes não teriam capacidade de digerir, como os carboidratos fibrosos, não fibrosos e proteínas (Hungate, 1966).

Com isto, os microrganismos têm o potencial de fornecer ao hospedeiro cerca de 70% da sua exigência em energia e proteína diária. Ao gerar metabólitos através da digestão de componentes da dieta, são produzidos precursores de vias bioquímicas, que participam ou regulam o metabolismo de glicose, lipídeos e aminoácidos dos bovinos (Hungate, 1975; Yeoman and White, 2014). A importância desse foco de pesquisa e sua aplicabilidade se torna evidente, considerando que a diversidade e funcionalidade do microbioma ruminal possui íntima relação com a eficiência dos processos de fermentação e digestão nos ruminantes (Abecia et al., 2014).

Ao nascer, os ruminantes possuem o retículo-rúmen subdesenvolvido e sem funcionalidade, o que faz com que esses animais, durante a primeira fase da vida, sejam dependentes dos nutrientes fornecidos pela dieta líquida, que é digerida através de processos enzimáticos que ocorrem no abomaso. A aquisição de funcionalidade por esses compartimentos é dependente do estabelecimento de microrganismos no rúmen que até então é considerado um ambiente estéril (Baldwin et al., 2004).

No entanto, mesmo que este processo inicie no momento do nascimento, por meio do contato do neonato com o canal uterino, ele não é imediato e até as 12 primeiras semanas de vida envolve mudanças constantes até que esteja estável (Minato et al., 1992; Rey et al., 2014). Diversos fatores podem influenciar na variedade de colônias presentes no retículo-rúmen de um animal adulto, contudo, nas primeiras semanas de vida dos bovinos os fatores externos como a microbiota materna, o tipo de parto, o ambiente, o colostro, a fonte de dieta líquida e o contato com outros animais, são as primeiras vias para inoculação de microrganismo no ambiente ruminal (Dias et al., 2018; Penders et al., 2006). Entretanto, o consumo e as características da dieta sólida são os fatores mais importantes para a estabilidade das populações, pois atuam como fonte de inoculação de microrganismos e

também de substratos para fermentação gerando energia para sua multiplicação (Khan et al., 2016; Li et al., 2012).

Diferente do sistema de criação extensivo, em que os bezerros possuem maior contato com o ambiente, com os outros animais e com a própria mãe, no sistema intensivo, que é baseado na criação individual dos bezerros e em ambientes que reduzem as alternativas para aquisição de uma população microbiana variada, a formação da microbiota se torna dependente da dieta ofertada, do manejo e das instalações utilizadas (Fonty et al., 1988). O levantamento anual do programa Alta Cria, diz que 89% das propriedades assistidas utilizam sistema de criação individual até os 30 dias de vida e que 62% mantém este sistema até o desaleitamento ser concluído e em cerca de 39% das propriedades os animais permanecem nessas instalações por mais de sete dias após o desaleitamento. As instalações que predominam nesse sistema, de acordo com o mesmo levantamento, são os sistemas de bezerreiro argentino (36%), de gaiola suspensa (28%) e baias no chão (14%) (Azevedo et al., 2023).

O sistema de alojamento individual aumenta a idade para estabelecimento de comunidades de microrganismos que poderiam ser encontradas no ambiente ruminal de bezerros com idade antecipada, e que são encontradas comumente em ruminantes adultos (Franzolin and Dehority, 1996). Entretanto, promover a colonização de microrganismos no rúmen de bezerros com poucas semanas é fundamental, pois a transição entre a condição de ruminante não funcional para ruminante funcional, é crucial para a adaptação digestiva dos ruminantes (Li et al., 2012). Nesta circunstância, antecipar o consumo de alimentos sólidos, através de dietas que possuam qualidade e alta palatabilidade, empregando programas de alimentação e estratégias de desaleitamento que atendam a este objetivo são essenciais (Heinrichs, 2004; Khan et al., 2016).

O tipo de alimento sólido, ou seja, sua forma física e composição química influencia de diferentes maneiras no microbioma ruminal (Nussio et al., 2003). As dietas que possuem em sua composição ingredientes com alto teor de carboidratos facilmente fermentáveis beneficiam bactérias que degradam amido, aumentando as concentrações molares de butirato e propionato, que são necessários para o adequado desenvolvimento anatômico e físico do rúmen (Baldwin et al., 2004). Em contrapartida, dietas com maior participação de componentes fibrosos, que possui carboidratos de fermentação lenta, beneficiam bactérias que degradam celulose e hemicelulose o que altera os padrões de fermentação e resulta em concentrações molares de acetato maiores (Bull et al., 1965).

A composição química da dieta determina as mudanças que ocorrem nos padrões de fermentação. A alta inclusão de grãos e cereais processados, que possui açúcar e amido de rápida degradação no rúmen, reduz o pH pela alta concentração de ácidos orgânicos que são produzidos em decorrência da fermentação desses substratos. A queda no pH ruminal, ocasiona falha no estabelecimento de populações de protozoários ciliados e fungos, que são microrganismos que como as bactérias também possuem funções importantes para os processos fermentativos. O impacto do pH mais ácido no ambiente ruminal, prejudica também as bactérias fibrolíticas, reduzindo a capacidade de digestão da fibra (Penner and Oba, 2009).

Por meio da dieta fornecida no início da vida é possível interferir na composição da comunidade microbiana. Durante a fase de aleitamento a manipulação da microbiota por meio dos ingredientes que compõem a dieta pode resultar no estabelecimento de uma diversidade de espécies e gêneros que são de interesse para a qualidade da fermentação durante a vida adulta (Dill-Mcfarland et al., 2017). O microbioma dos animais adultos é resistente a mudanças brandas na dieta, as alterações na população podem ocorrer, mas de maneira provisória, o que sugere que modular o microbioma de animais adultos não resulta em uma nova comunidade estável (Abecia et al., 2018; Weimer, 2015). Por outro lado, em neonatos a utilização de estratégias de intervenção dietética são eficientes e úteis para a promover diversidade de microrganismos no ambiente ruminal que seja capaz de dar suporte ao desenvolvimento do bezerro, aumentando sua taxa de crescimento e reduzindo populações de microrganismos patogênicos (Dias et al., 2017). Portanto, promover o estabelecimento de uma comunidade bacteriana robusta, com capacidade de atuar efetivamente diante de situações em que há alta disponibilidade de substratos prontamente fermentáveis ou na transição entre dietas compostas por diferentes proporções, é fundamental para alcançar saúde ruminal e geral ao longo da vida produtiva.

2.2.2. Desenvolvimento anatômico e fisiológico

Ao nascer, o trato digestório anterior dos ruminantes contribui pouco para a atividade digestiva e fornece poucos substratos para o metabolismo energético, pois não está completamente desenvolvido e não possui funcionalidade. Essa baixa importância pode ser compreendida pela mudança na proporção anatômica que ocorre entre os compartimentos do sistema digestivo ao decorrer da vida dos ruminantes. Nas primeiras semanas de idade, o retículo-rúmen corresponde a 38% do peso total dos pré-estômagos (rúmen, retículo, omaso e

abomaso) porém, com o aumento no consumo de dieta sólida e a idade, o retículo-rúmen passa a representar 61,23% do peso total dos quatro compartimentos, em contrapartida o abomaso reduz sua proporção, correspondendo a apenas 25,37%. Ao desaleitamento, com aproximadamente 12 semanas de idade, quando o animal possui capacidade de consumo exclusivo de dieta sólida, o retículo-rúmen tem 67% e o abomaso 18% de proporção ao peso total dos quatro compartimentos (Davis and Drackley, 1998).

Por esse motivo, o local de digestão e absorção no início da vida dos bovinos com maior representatividade é o intestino, em que há alta atividade da lactase e de outras enzimas intestinais sobre a degradação dos substratos para obtenção de glicose. Após o nascimento, os bezerros precisam aprender a viver no ambiente extrauterino e a manter as funções fisiológicas vitais, como o funcionamento adequado do sistema nervoso, da termorregulação e da respiração, com isso a glicose passa a ser amplamente utilizada pelos neonatos (Baldwin et al., 2004; Khan et al., 2016).

A aquisição de funcionalidade pelo rúmen depende, em termos de mudanças físicas e anatômicas, do desenvolvimento adequado da musculatura e do epitélio ruminal, que por meio da atividade do microbioma presente neste ambiente, se torna capaz de absorver e utilizar no metabolismo energético os AGCC produzidos pela fermentação microbiana. Assim, o local de digestão e absorção que antes era principalmente o intestino, é alterado para o rúmen. Outras mudanças fisiológicas ocorrem em função do aumento na atividade ruminal, bem como do desenvolvimento do aparelho salivar e da atividade de ruminação (Baldwin et al., 2004; Khan et al., 2016).

O desenvolvimento anatômico da parede interna do rúmen deve ser ao menos parcial durante o desaleitamento. O epitélio ruminal possui funções fisiológicas variadas e muito importantes, agindo na proteção, na absorção, no transporte e metabolismo de AGCC. Desta forma, para manter as taxas de crescimento após o desaleitamento, é necessário ter êxito no desenvolvimento do epitélio ruminal, afim de garantir melhor digestibilidade dos alimentos sólidos fornecidos (Baldwin et al., 2004; Khan et al., 2016).

A diferenciação do epitélio ruminal tem início na fase fetal, no entanto, após o nascimento ainda ocorrem mudanças importantes em termos de desenvolvimento, metabolismo e capacidade de absorção pelo tecido. A intensificação do processo de desenvolvimento ruminal tem influência principalmente do consumo de alimentos sólidos pelos ruminantes (Jami et al., 2013; Khan et al., 2007b). A ingestão de alimentos sólidos por bezerros, logo nas primeiras semanas de idade beneficia o estabelecimento precoce de populações microbianas, sendo uma fonte importante de inoculação. Além disso, a presença

de concentrado no rúmen afeta de forma positiva a atividade de fermentação por microrganismos, o que aumenta o aproveitamento do concentrado e fornece AGCC como produto final (Jami et al., 2013; R. L. Baldwin et al., 2004). Com isso, há desenvolvimento do epitélio ruminal, com formação de papilas numerosas e saudáveis, com maior capacidade de absorção (Khan et al., 2008; Quigley, 1996).

O alimento sólido, principalmente o concentrado composto por grãos, proporciona alterações morfofisiológicas importantes para o bom funcionamento do rúmen. A natureza e qualidade da dieta tem potencial de alterar as mudanças que vão ocorrer nos tecidos, podendo ser de forma positiva ou não (Li et al., 2011). A fermentação dos ingredientes da dieta sólida, que possuem alto teor de carboidratos não fibrosos (CNF) e proteína, resulta na produção de AGCC, especialmente os ácidos butírico e propiônico (Baldwin et al., 2004).

Esses dois ácidos atuam de forma significativa para a diferenciação celular da parede ruminal, pois estimulam a mitose das células epiteliais do tecido (Sakata et al., 1980). Através de estímulos químicos gerados pela presença e absorção do butirato e propionato, o epitélio ruminal, utiliza esses produtos como fonte de energia para diferenciação das células epiteliais em papilas, que aumentam em número, altura e largura (Baldwin et al., 2004; Suarez-Mena et al., 2016). A importância das papilas para a funcionalidade do rúmen está no fato de que essas estruturas aumentam a área de superfície de contato entre a corrente sanguínea e o conteúdo ruminal, melhorando a capacidade absorptiva do rúmen. O aumento no desenvolvimento de papilas também é associado à intensidade do fluxo sanguíneo no epitélio ruminal (Glauber et al., 1991).

O ácido butírico é absorvido amplamente pelas células do epitélio ruminal, entretanto, parte é utilizada para obtenção de energia e parte é convertida a corpos cetônicos, como beta-hidroxibutirato (BHBA). O ácido propiônico que não foi utilizado pelas células epiteliais será direcionado para o processo de neoglicogênese hepática, para obtenção de glicose, que abastece os demais tecidos.

Os alimentos volumosos, também possibilitam o desenvolvimento do rúmen e retículo, entretanto, sua contribuição se dá em crescimento da musculatura e capacidade de enchimento (Toledo et al., 2023, 2020). A ingestão de alimentos mais grosseiros, com maior tamanho de partícula, como o feno e a silagem, favorece a produção de acetato em relação a proporção molar de butirato e propionato, sendo, portanto, menos importante para a proliferação papilar. A presença da forragem no ambiente ruminal, produz estímulos físicos para a muscularização do tecido e para a intensificação da motilidade ruminal (Khan et al., 2011; Kosiorowska et al., 2011). Além disso, o consumo precoce de forragem, garante

benefícios que vão além das mudanças físicas e anatômicas, pois melhoram o desenvolvimento cognitivo nos bezerros e amplia a capacidade de adaptação ao novo (Horvath et al., 2020; Morrow et al., 2023).

Buscando atingir o melhor desenvolvimento ruminal possível na fase de aleitamento, a composição dos concentrados deve possuir ingredientes de alta digestibilidade e boa palatabilidade, considerando que o trato gastrointestinal nesta fase ainda está pouco desenvolvido. Entretanto, teores mínimos de fibra insolúvel em detergente ácido (FDA) e fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) são recomendadas, pois asseguram a integridade do epitélio ruminal, através do estímulo da ruminação, salivação e manutenção do pH ruminal. Os autores sugerem faixas amplas para FDN (15 e 25%) e FDA (6 a 20%), de forma que os teores mínimos ceda espaço para inclusão de ingredientes de alta digestibilidade (Davis and Drackley, 1998).

Os concentrados iniciais que possuem inclusão de fibra abaixo do mínimo recomendado, resultam em mudanças constantes no pH. A alta participação de carboidratos não estruturais na composição dos concentrados, ou mesmo mudanças físicas nos ingredientes que aumente a disponibilidade do amido, produzem AGCC que em condições de inclusão inadequadas de fibra, podem exceder a capacidade de absorção do rúmen, que ainda está subdesenvolvido, provocando a queda do pH ruminal. A queda do pH ruminal, principalmente quando associada a produção de ácido lático, compromete o estabelecimento de microrganismos ruminais, sobretudo aqueles que degradam a fibra, diminuindo a eficiência de digestão do alimento (Khan et al., 2016).

As quedas acentuadas no pH do rúmen não afetam apenas a população de microrganismos ruminais, bem como alteram os padrões de motilidade ruminal, diminuindo o ritmo dos movimentos (Krause and Oetzel, 2006). Da mesma forma, há impactos nas papilas ruminais, que desenvolvem uma camada de queratina (hiperqueratose) para proteção, em razão do processo inflamatório, consequência do acúmulo de ácidos no rúmen e da queda no pH. A queratinização das papilas, reduzem a capacidade absorptiva do epitélio ruminal e diminuem o fluxo sanguíneo que chega ao tecido (Greenwood et al., 1997; Laarman et al., 2012).

Os impactos de uma má gestão de energia na dieta, sem a presença adequada de componentes que forneçam níveis mínimos de fibra ainda na fase de cria, pode gerar alterações morfológicas permanentes no epitélio ruminal, com consequências para a saúde geral dos bovinos e para o desempenho, podendo até mesmo reduzir a permanência do animal no rebanho. Portanto, manter a integridade da parede ruminal é imprescindível.

2.3. Definição e alterações microbiológicas causadas pela acidose ruminal

O aumento no potencial de produção de leite resultou em animais com maior demanda energética, atendida com dietas com alta inclusão de carboidratos rapidamente fermentáveis (Eastridge, 2006). No entanto, o consumo excessivo desses compostos, principalmente quando a dieta não fornece fibra adequadamente ou mesmo em condições de baixa capacidade de absorção do retículo rúmen, os riscos de acidose ruminal são aumentados (Slyter et al., 1976).

O aparelho retículo-rúmen, corresponde ao local onde ocorre fermentação microbiana. A microbiota ruminal é composta principalmente por organismos anaeróbicos, que convertem os substratos fermentáveis em AGCC, que posteriormente serão utilizados no metabolismo energético. A oferta dos substratos e conseqüentemente a produção dos AGCC deve acompanhar a taxa de absorção da parede ruminal, de forma que não exista excesso de ácidos no rúmen (Nagaraja and Titgemeyer, 2007).

Em condições de equilíbrio entre a degradação de substratos e a absorção ruminal, o pH médio do rúmen é superior a 5,5 e varia frequentemente entre 5,8 e 6,5. As flutuações constantes nos valores de pH são influenciadas pelo horário e volume de ingestão de carboidratos rapidamente fermentáveis. A capacidade do animal de produzir tampão também está associada às mudanças constantes de pH ruminal. Dietas com baixo estímulo à mastigação e ruminação limitam a produção de saliva e conseqüentemente reduz a capacidade tampão. O acúmulo de ácidos no rúmen sugere que existe um desequilíbrio entre a população de microrganismos, a utilização dos substratos e a absorção de ácidos pela parede ruminal (Krause and Oetzel, 2006; Owens et al., 1998).

A acidose ruminal representa vários graus de acidez no rúmen, portanto, corresponde ao acúmulo total de ácidos orgânicos, podendo ser AGCC e ácido láctico. Britton e colaboradores (1989) categorizaram a acidose em subaguda e aguda de acordo com a faixa de pH que atinge, o tipo de ácido responsável pela queda no pH ruminal e se há sinais clínicos presentes. O pH ruminal igual ou inferior a 5,6 é utilizado como valor para definir ocorrência de acidose. A acidose ruminal subaguda (SARA) pode ser compreendida pela redução do pH na faixa de 5,0 a 5,6. Enquanto valores iguais ou inferiores a 5,0 definem ocorrência de acidose aguda (Krause and Oetzel, 2006; Owens et al., 1998).

No entanto, esses valores estão bem definidos apenas para ruminantes adultos, mas não para animais jovens. Definir uma faixa de pH crítica que garante a correta maturação ruminal e não traz risco de anormalidades anatômicas para o epitélio é um desafio, pois para

muitos autores os baixos níveis de pH observados em ruminantes jovens são fisiológicos. Contudo, nas primeiras semanas de idade e antes de iniciar o consumo de alimentos sólidos os bezerros possuem pH variando entre 6,3 e 6,0, e faixas de pH <5,5 são consideradas prejudiciais para a saúde ruminal e geral dos bezerros (NASEM, 2021).

O início da acidose se dá pelo acúmulo não fisiológico de AGCC, no entanto a progressão do quadro de acidose é ocasionada pelo aumento na produção e acúmulo de ácido láctico no ambiente ruminal. Durante a SARA também há produção de ácido láctico, mas sem seu acúmulo uma vez que as bactérias fermentadoras de lactato estão ativas e rapidamente o metabolizam em AGCC (Goad et al., 1998). Quando o pH alcança valores aproximados ou inferiores a 5,0, por um período prolongado, há alterações na microbiota ruminal, e o crescimento de bactérias fermentadoras de ácido láctico é inibido, provocando o acúmulo de lactato (Huber et al., 1976). Desta forma, aumenta-se a chance de a SARA evoluir para a acidose aguda ou láctica.

As dietas que disponibilizam grandes quantidades de substratos fermentáveis, promovem uma resposta adaptativa pelas bactérias ruminais que respondem aumentando a taxa de crescimento e a atividade fermentativa. Com taxa de produção e absorção adequada as funções e atividades ruminais são mantidas estáveis (pH ruminal 5,6 a 6,5). Em contrapartida se há desequilíbrio entre a disponibilidade de substrato e a função ruminal, alterações nas populações bacterianas serão observadas e as bactérias fermentadoras de amido, maltose, glicose e ácido láctico serão as principais prejudicadas (Goad et al., 1998; Nocek, 1997; Plaizier et al., 2008).

Durante a adaptação da microbiota ruminal à ingestão de dietas com alta inclusão de carboidratos rapidamente fermentáveis, as bactérias capazes de utilizar o lactato possuem crescimento acentuado. Existem diversos organismos ruminais com capacidade para fermentar ácido láctico, entretanto a *Megasphaera elsdenii* (ME) e *Selenomonas ruminantium* ssp. *Lactilytica* são encontrados em maior contagem no rúmen (Huber et al., 1976).

A bactéria que tem um importante papel na redução do acúmulo ruminal de ácido láctico é a *Megasphaera elsdenii* (Counotte et al., 1981). Este microrganismo não é capaz de fermentar o amido, mas tem potencial de utilizar maltose e glicose, o que a torna dependente de outras bactérias ruminais para atender sua demanda por substratos energéticos (Hino et al., 1994). As cepas de ME possuem como característica o uso preferencial de lactato, que pode ser metabolizado a acetato, propionato e butirato. No entanto, o padrão de fermentação da ME pode ser alterado em algumas cepas, quando há presença de glicose, favorecendo o aumento das proporções molares de butirato, caproato e valerato (Marounek et al., 1989).

As diversas mudanças que ocorrem no microbioma ruminal em função das flutuações de pH ruminal, comprometem a atividade fermentativa, alteram os padrões de fermentação e reduzem o aproveitamento dos nutrientes fornecidos pela dieta. Desta maneira, estratégias que promovam menores reduções de pH contribuem para a estabilidade e ampla variedade de espécies e gêneros que são importantes para a saúde ruminal e geração de energia para os bovinos.

2.4. Implicações a saúde dos ruminantes e estratégias de prevenção a acidose

Estratégias alimentares que utilizam grandes quantidades de carboidratos rapidamente fermentáveis, mudanças abruptas de dietas e períodos críticos para adaptação fisiológica, podem aumentar os riscos de acidose nos animais. As implicações da SARA e da acidose láctica em bovinos ocasionam sintomas ruminais, comportamentais e sistêmicos. As flutuações e quedas acentuadas no pH ruminal possuem implicações que vão além das alterações causadas a microbiota, por exemplo o aumento nas concentrações de aminas, como histamina, tiramina e triptamina no ambiente ruminal acidótico. A presença desses compostos tóxicos, principalmente a histamina, está associada a ocorrência de laminite (Nocek, 1997; Owens et al., 1998).

Outro agente tóxico relacionado à patogenicidade da acidose são componentes da parede celular dos organismos ruminais gram-negativos conhecidos como endotoxinas ou lipopolissacarídeo (LPS) (Nagaraja et al., 1978). A liberação fisiológica das endotoxinas ocorre durante a morte e desintegração das bactérias gram-negativas no ambiente ruminal, portanto, encontrar concentrações de endotoxinas no líquido ruminal é comum. Em animais submetidos a dietas intensivas a concentração de endotoxinas é elevada quando comparada a animais em dietas com maior inclusão de forragem. Isto se deve possivelmente pela maior concentração de bactérias gram-negativa ou devido a condições favoráveis para liberação de endotoxinas de bactérias sensíveis as quedas abruptas ou a frequentes flutuações no pH ruminal (Andersen et al., 1994; Nagaraja et al., 1979). Alguns mediadores inflamatórios (citocinas e metabólitos dos ácidos araquidônicos) foram identificados em bovinos com acidose induzida experimentalmente, além de outros efeitos biológicos provocados pela presença de endotoxinas, como inibição da motilidade do retículo-rúmen (Aiumlamai et al., 1992; Eades, 1997).

Assim como em ruminantes adultos, Gelsinger (2020) relatou redução no consumo de matéria seca e queda na taxa de crescimento e ganho de peso em bezerros, após ingestão de

dieta elaborada para causar reduções no pH. O mesmo sinal foi descrito anteriormente como sendo possivelmente causado pela fraca motilidade ruminal, que é inibida na presença de agentes tóxicos liberados nas fases de baixo pH. Outra justificativa para o comportamento de ingestão reduzido pode ser o aumento na osmolaridade do conteúdo ruminal, em função da baixa absorção e do aumento nas concentrações de substâncias como glicose e lactato. O aumento no influxo de butirato para a corrente sanguínea também contribui para a diminuição na ingestão de alimento (J L Kleen et al., 2003).

A diarreia é mais um sinal clínico observado durante a ocorrência de acidose. As alterações que podem ocorrer nas fezes compreendem, aumento na fluidez, mudança de cor e presença de partículas de alimentos. O pH fecal se torna mais ácido que o mensurado em fezes de animais saudáveis. O fato da função ruminal estar afetada, ou seja, com ruminação, degradação e fermentação prejudicada, ocorre aumento nos substratos que chegam ao intestino para serem digeridos (Oetzel, 2000).

Durante a alta ingestão de grãos e a ocorrência de SARA, ocorrem alterações histológicas indesejáveis no epitélio ruminal. Steele e colaboradores (2011) sugeriram que dietas com alta inclusão de carboidratos fermentáveis provocam aumento da permeabilidade, pois reduzem a organização e a espessura do epitélio escamoso estratificado e a adesão entre as células. Ademais, dietas de alto grão aceleram a migração celular e o envelhecimento pós-mitótico. Em conjunto e com ocorrência frequente essas mudanças levam a paraqueratose (Oetzel, 2000).

Com a demanda por soluções que reduzam a ocorrência, bem como a gravidade da acidose aguda e SARA, diversos estudos foram desenvolvidos e demonstram avanços ao que diz respeito à manutenção do pH do líquido ruminal. Dentre as possibilidades, desempenhar estratégias de manejo nutricional que permitam adaptação do microbioma à nova dieta é primordial. As dietas para ruminantes jovens devem fornecer fibra em detergente neutro fisicamente eficaz (FDN_{fe}; >8 mm) que possua boa proporção em relação a inclusão de amido. A inclusão de amido degradável no rúmen deve variar entre 20 e 40% no concentrado inicial para assegurar condições adequadas de atividade microbiana e saúde ruminal. Os teores recomendados comumente para FDN estão acima de 13% na matéria seca e variam de acordo com as características do concentrado, podendo chegar a 18% quando o concentrado ofertado é peletizado (NASEM, 2021).

A utilização de ionóforos e probióticos nas dietas animais já possuem grande aceitação na indústria de produção animal, esta prática visa inibir o crescimento de bactérias gram-positivas, que produzem ácido lático, como *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus spp.*

Essas moléculas são importantes moduladores do microbioma ruminal e concomitantemente alteram o padrão de ingestão de alimentos, reduzindo o risco de acúmulo de AGCC e lactato.

O uso de cepas capazes de reduzir o acúmulo de ácido láctico através da metabolização deste ácido em glicose e outros AGCC, também se destaca como importante ferramenta na manutenção da saúde ruminal e melhoria do desempenho produtivo.

2.5. Papel da *Megasphaera elsdenii* na redução da acidose ruminal

A *Megasphaera elsdenii* se mostrou um importante microrganismo para o controle da acidose ruminal. Devido ao seu potencial de utilizar amplamente o lactato disponível no fluido ruminal e a sua capacidade de crescimento em condições de pH inferior a 5,6 fazem com que este organismo se diferencie em relação a outras bactérias consumidoras de lactato que suportam apenas faixas de pH entre 6,0 e 6,5 (Weimer, 2015). Este é um organismo gram-negativo e estritamente anaeróbico, que anteriormente era conhecido como *Peptostreptococcus elsdenii* (Counotte et al., 1981).

Esta bactéria está presente no ambiente ruminal de bovinos e ovinos e à medida que o consumo de carboidratos altamente fermentáveis é intensificado e há disponibilidade de substratos a ME tem a taxa de multiplicação e crescimento aumentada. Algumas cepas de ME se mostram promissoras, pois priorizam a utilização do lactato, mesmo na presença de outros substratos, além de competir com outros organismos por substratos para produção de lactato, como glicose e maltose (Marounek et al., 1989; Weimer, 2015). A ME se destaca por ser o único microrganismo ruminal conhecido por fermentar 60 e 80% de ácido láctico (DL-lactato) em propionato através da via do acrilato (Counotte et al., 1981).

A ampla faixa de utilização de lactato pela ME, é justificada por características do animal e da dieta. Dietas compostas por carboidratos prontamente fermentáveis podem aumentar a capacidade de utilização de lactato pela ME, pois as funções ruminais do hospedeiro estão comprometidas e as populações microbianas capazes competir pelo lactato estão suprimidas.

Os progressos obtidos nos últimos anos proporcionaram produtos patenteados que possuem diversas características de interesse. Entretanto alguns desses produtos e cepas ainda não possuem aplicabilidade na indústria de nutrição animal. O motivo seria o fato de não terem sido isoladas do rúmen de animais resistentes, por não serem resistentes aos ionóforos, não utilizam o DL-lactato com substrato preferencial ou mesmo por terem crescimento e multiplicação insatisfatórios. Outra dificuldade comercial para os produtos probióticos com

cepas de ME é a estabilidade do organismo, pois a ME é viável apenas em ambiente anaeróbico (Klieve et al., 2003; Long et al., 2014; Robinson et al., 1992).

As cepas de ME são filogeneticamente semelhantes de acordo com o sequenciamento de 16S rRNA, ou seja, elas representam um grupo homogêneo, possuindo 97 a 99% de semelhança. Dentre as cepas que obtiveram resultados desejáveis, a cepa B159 foi capaz de prevenir o acúmulo de lactato em condições de alta disponibilidade de substrato prontamente fermentável (Kung and Hession, 1995). Da mesma forma, a cepa 407A demonstrou ser eficiente em prevenir acidose láctica em novilhos e a cepa NIAH 1102 teve preferência pelo lactato mesmo quando a glicose estava disponível (Hino et al., 1994; Robinson et al., 1992). A cepa YE34 estabeleceu populações no ambiente ruminal rapidamente. Contudo, ainda que tenham sido identificadas cepas com características desejáveis, todas possuem uma ou mais limitações descritas anteriormente.

Neste contexto, novas pesquisas foram realizadas para identificar cepas mais completas, que abrangem melhor os requisitos. A cepa de ME NCIMB 41125, começou a ser investigada em 1944 e de maneira distinta das anteriores, esse organismo foi obtido através do conteúdo ruminal de vacas leiteiras e bovinos confinados adaptadas a dietas com alta inclusão de carboidratos altamente fermentáveis (Horn et al., 2009a). Essa cepa foi selecionada através de uma estratégia com alta pressão de seleção, sustentada por um ambiente que proporcionou uma combinação de fatores que geram mudanças contínuas e simultâneas no ambiente. Ademais essa cepa apresenta taxa de crescimento acentuada, maior que o crescimento de todas as outras cepas de ME que foram registradas, sendo de até 0,938/h o que gera uma produção de biomassa de 0,39g (L/h) (Horn et al., 2009b). Com essa característica, a cepa 41125 se torna mais tolerante ao estresse provocado por um ambiente aeróbico, desta maneira a cepa é mais interessante para uso comercial.

No controle do acúmulo de lactato essa cepa demonstrou ser capaz de metabolizar o lactato em produtos finais de fermentação quando o pH ruminal era inferior a 5,5, além disso continuou se multiplicando em um pH máximo de 4,5 (Horn et al., 2009b; Meissner et al., 2010). O principal produto obtido através da fermentação do lactato por esse organismo é o acetato, que continua a ser produzido mesmo diante do pH baixo. Outra importante característica para comercialização de probióticos com cultura de ME NCIMB 41125 é que esta cepa resiste a ionóforos, a anti-helmínticos e antibióticos (Marounek et al., 1989; Meissner et al., 2010; Nagaraja and Taylor, 1987). Essa propriedade é indispensável, pois assim como na dieta de bovinos de corte, na indústria de produção de leite essas moléculas são amplamente utilizadas.

Foram realizados testes *in vitro* com o isolado 41125, simulando ambientes de média energia, comumente observado em dietas de vacas leiteiras e ambientes de alta energia, próximo ao que ocorre em dietas de confinamento. As concentrações do inóculo diferiram de acordo com a taxa de energia utilizada na dieta, sendo $3,1 \times 10^6$ UFC/mL e 5×10^5 UFC/mL para média energia e alta energia, respectivamente. Durante o teste *in vitro* o pH chegou a 5,5, configurando acidose subaguda e até menos de 5 evoluindo para o que seria acidose aguda, e neste ambiente a cepa 41125 foi eficaz em reduzir o acúmulo de ácido láctico e manter o pH ruminal do meio.

Apesar dos resultados promissores obtidos através dos testes *in vitro*, a expectativa para os testes *in vivo* é que os resultados sejam diferentes devido às condições adversas e que não podem ser controladas, como em um ambiente *in vitro*. Os principais efeitos sobre a funcionalidade do inóculo podem ser a fermentação de AGCC e o acúmulo no meio ruminal, taxa de passagem da ingesta, taxa de desaparecimento e diluição.

2.6. Efeitos sobre a função ruminal, consumo e desempenho animal

Os trabalhos que testaram o uso da cepa 41125 *in vivo* demonstraram resultados consistentes para algumas características como manutenção do pH ruminal e redução do tempo em que o pH ficou abaixo de 5,6. Aikman e colaboradores (2009), mediram o pH ruminal de vacas submetidas ao tratamento com inoculação da cultura de ME (NCIMB 41125) e controle e concluíram que os animais controle permaneciam mais tempo com pH abaixo de 5,6 (4,03 h vs. 3,35 h para ME 41125), possivelmente devido a maior concentração molar de AGCC. Em outro estudo com vacas leiteiras, aplicaram diferenças na concentração de carboidratos fermentáveis da dieta, sendo as proporções de 60:40 e outra 70:30. Neste estudo de Hagg e colaboradores (2010), encontraram uma leve vantagem na administração da cepa 41125, pois entre os tratamentos (controle e cepa 41125), as concentrações médias de ácido láctico (mM) foram respectivamente de 2,75 vs. 2,5 para proporção 60:40 e 5,80 e 4,32 para proporção 70:30.

Demais trabalhos corroboram com esses achados, demonstrando consistência na administração da cepa 41125. Em ovinos canulados, os resultados após o fornecimento de volumoso, posteriormente 1000g de milho (sem adaptação) seguido de 300g de maltose, encontraram faixas de pH abaixo de 5 por mais de 8h nos animais que receberam o placebo, enquanto os animais que receberam a cepa 41125 com 10^{11} UFC permaneceram com pH

acima de 5,5 ($p < 0,001$). Da mesma forma, o ácido láctico permaneceu inferior a 10 mM nos animais que receberam a cepa de ME (41125).

As concentrações de ácido láctico também foram inferiores para animais que receberam o inóculo da cepa 41125, quando se ofertou dietas típicas de confinamento, com alta inclusão de grãos de cereais. Em bovinos de corte o pH foi próximo de 5 entre os dias 9 e 17 após administração do placebo e as concentrações de lactato foram em média 10,1 e 20,8 nos dias 2 e 3, em contrapartida nos animais que receberam o tratamento com a cepa 41125, a média de pH em todo o período para as três concentrações da cepa (10^9 , 10^{10} e 10^{11} UFC/dose) foi superior a 5,5 e a concentração de lactato foi de apenas 0,28 e 0,47 mM.

Algumas evidências demonstram que a eficiência em manter o pH e controlar o acúmulo de ácido láctico no rúmen pela cultura de ME 41125 depende da dose administrada. Contudo, doses entre 10^{10} e 10^{11} fornecem maior estabilidade nos resultados, ademais utilizar dose de 10^{10} UFC representa 105 UFC/mL de concentração do organismo no rúmen. Ainda neste contexto, pouco se sabe sobre a sobrevivência da cepa no ambiente ruminal ao longo do tempo.

A administração comumente ocorre após o desafio com alto concentrado e a atividade do organismo é representativa nos primeiros e mais críticos períodos da adaptação (dois a quatro dias), isso se deve a dose da cepa suplementada e a presença de cepas endógenas de ME que possuem resposta mais lenta e que povoam o rúmen progressivamente. Entretanto, desafios e mudanças na ingestão de concentrados prontamente fermentáveis, seja através de alterações na proporção ofertada, mudanças de processamento dos ingredientes ou mesmo volume de ingestão, podem ocorrer ao decorrer do tempo e esperasse que a cepa mantenha a funcionalidade. Os dados de McDaniel e colaboradores (2008), sugerem que a cepa 41125 continua a desempenhar sua vantagem no controle do lactato e manutenção do pH, mesmo após um longo período da inoculação.

A influência da administração da cepa sobre a concentração de AGCC no rúmen é variável, doses altas (10^{10} vs 10^9 UFC/mL) reduzem a concentração ruminal total. Desta forma, a dose pode ser a explicação para as mudanças no rendimento de AGCC. Entretanto, na presença de promotores de crescimento (monensina, flavomicina, bacitracina de zinco) a cepa 41125 proporcionou menor concentração de AGCC durante testes *in vitro*, pois os ionóforos reduziram a fermentação microbiana. A presença da virginiamicina afetou de forma menos acentuada o crescimento da cepa 41125 resultando em produção de AGCC, o que demonstra boa relação entre a ação moduladora da virginiamicina e a atividade da cepa 41125.

Assim como existe o efeito da dose de ME administrado, a faixa de pH do líquido ruminal, o substrato e a taxa de diluição são causas de confundimento a respeito do rendimento dos AGCC. Quando o pH diminui, a atividade fermentativa da ME muda para direção que favorece o ácido butírico e valérico em relação ao ácido propiônico (Counotte et al., 1981; Marounek et al., 1989). Em vacas leiteiras, com faixa de pH próximas de 6 a inoculação com a cepa 41125, aumentou a proporção molar de ácido propiônico. Da mesma forma, Henning e colaboradores (2010b), com dietas de confinamento que levaram o pH do rúmen a $<5,5$, relataram uma vantagem para a proporção molar de ácido butírico e valérico com a dose de ME. Através dessas evidências, fica claro que a faixa de pH pode desfavorecer a composição de AGCC. Entretanto, os estudos envolvendo animais em crescimento possuem interesse por essa mudança no padrão de fermentação, que beneficia as concentrações de ácido butírico. Em bezerros leiteiros a administração de uma dose da cultura de ME, aumentou as concentrações de beta-hidroxibutirato no plasma sanguíneo, além de aumentar características de desenvolvimento ruminal, como largura e densidade de papilas (Muya et al., 2017, 2015).

Os trabalhos com animais jovens, demonstram antecipado consumo de alimento sólido e em maior quantidade, quando comparado a animais que não receberam a dose do probiótico. E em consequência do aumento na energia ingerida, vinda não apenas através da dieta líquida, mas com incremento do consumo mais expressivo de concentrado, os animais tiveram maior ganho de peso e melhor eficiência alimentar (Muya et al., 2017, 2015). Em um estudo semelhante ao de Muya e colaboradores (2017), o autor também relatou o aumento no ganho de peso médio diário de bezerras que receberam a dose de ME antes ($p=0,04$) e após o desaleitamento ($p=0,03$), neste estudo as novilhas também chegaram aos 70 dias com mais peso que os animais do grupo controle ($p < 0,05$) (Dikotope, 2018).

Durante a SARA a redução ou flutuação no consumo de MS é comumente relatado e espera-se que a administração de ME diminua esse impacto sobre o consumo e há alguns trabalhos que sustentam essa expectativa. Drouillard (2004), observou a maior ingestão de ração durante a fase de desafio, ou seja, adaptação ao confinamento e essa vantagem foi mantida durante o período de confinamento, nos animais que receberam a dose de ME. Em trabalhos com cordeiros, o consumo de ração dos animais que receberam a cepa 41125, foi 29% maior em relação aos animais do controle (Henning et al., 2010a). Durante outro estudo, desta vez com bovinos, Henning e colaboradores (2010), relataram menor variação diária no consumo de MS. Muya e colaboradores (2015), determinaram maior consumo inicial de concentrado em bezerros dosados com ME, além de maior ganho diário (17% mais kg/dia).

Apesar da maioria dos trabalhos apoiarem que há diminuição na variação do consumo de ração, alguns resultados não sustentam essa expectativa (McDaniel et al., 2008; Stevens et al., 2017). As razões que podem justificar o fato de nem sempre ter aumento no consumo em função da dosagem de ME, pode ser o tipo e processamento dos grãos, protocolo de adaptação, proporções de energia da dieta.

Aikman e colaboradores (2011), demonstraram que a administração da cepa de ME 41125, em vacas de alta produção de leite, ou seja, mais susceptíveis a SARA, recebendo dietas convencionais e dietas para induzir a SARA, tiveram maior produção de leite em comparação aos animais do tratamento controle durante os primeiros 21 dias pós-parto, que corresponde ao período mais crítico e com aumento acentuado no consumo ($P=0,001$). Com este resultado também houve aumento na eficiência de produção, porque o consumo de MS foi menor. A maior eficiência produtiva provavelmente se deve a maior produção de ácido propiônico (Aikman et al., 2011). Esses resultados são consistentes com os relatados por Hagg e colaboradores (2010), que demonstram que vacas de alta produção que consomem dietas altamente energética possuem os maiores ganhos com a administração da cepa de ME.

No trabalho de Yohe e colaboradores (2018), uma única administração da cultura de ME aos 14 dias de idade de bezerros leiteiros, não foi suficiente para que o microrganismo se estabelecesse no rúmen, o que conseqüentemente não influenciou o desempenho e concentrações de metabólitos no rúmen e no sangue. Esses resultados corroboram com os relatados por Aikman e colaboradores (2011), onde o pH ruminal tendeu a ser baixo por menos tempo logo após a administração da cepa de ME; no entanto, o tempo com pH baixo se prolongou após um período sem a dosagem. Esses resultados sugerem que dosagens mais frequentes podem ser necessárias para ter efeitos consistentes e que a eficiência no estabelecimento depende da interação de fatores como, o hospedeiro, momento da inoculação, a cepa e a dieta fornecida (Weimer, 2015).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local do experimento e animais

O experimento foi conduzido nas instalações da Fazenda Santa Rita (Agrindus-SA), localizada no município de Descalvado-SP. (21° 54' 14" Sul, 47° 37' 12" Oeste, altitude de 685m) que possui clima subtropical úmido (classificação climática Köppen Geiger, Cfa). A Fazenda Santa Rita é uma propriedade comercial fundada em 1945, reconhecida pela produção pioneira de leite A2. O experimento foi realizado no período de janeiro a abril de 2022, neste período a fazenda possuía um total de 6.103 animais (todas as categorias animais estão incluídas neste somatório) e média de produção de leite de 34 kg.

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizadas 50 bezerras da raça holandesa provenientes deste rebanho que nasceram entre os dias 14 e 24 de janeiro de 2022. As bezerras foram acompanhadas a partir do terceiro dia de idade, quando eram transferidas das instalações do berçário para as instalações do bezerreiro, onde permaneceram até o desaleitamento e término do experimento. As instalações do bezerreiro eram compostas por baias suspensas que possuíam cama de palhada de trigo. Os animais foram alocados individualmente nas baias, as quais eram limpas e tinham a cama repostada diariamente, para manter os animais em local limpo e seco.

Logo após o nascimento, os animais foram separados de suas mães e pesados através de balança digital, para conhecer o peso ao nascimento e determinar o volume de fornecimento de colostro, depois deste procedimento foi realizado a cura e desinfecção do umbigo com antisséptico comercial. A colostragem foi realizada com fornecimento de colostro de alta qualidade (26,9 a 33,3% brix) nas primeiras 3h de vida no volume correspondente a 10% do peso ao nascer. O colostro foi fornecido através de mamadeira e utilizou-se colostro materno, proveniente do banco de colostro e quando necessário colostro enriquecido. Somente animais com adequada transferência de imunidade passiva foram incluídos no estudo. A qualidade do colostro e o volume de fornecimento não diferiram entre os tratamentos, portanto, o brix sérico às 24hrs, também foi igual para ambos os tratamentos. Ademais, os valores de transferência de imunidade passiva, com brix sérico maior que 9,4%, demonstram ótima eficiência de colostragem ($P > 0,05$; Tabela 1).

Tabela 1. Volume e qualidade do colostro fornecido e avaliação da transferência de imunidade passiva de bezerros.

Item	Tratamento		EPM ¹	P valor ²
	Placebo	Lactipro		
Brix, %				
Colostro	30,44	30,20	0,3454	0,6141
Sangue às 24h	11,14	11,33	0,1929	0,4850
Volume, L	3,5	3,5	0,2080	0,9731

¹EPM= erro padrão da média

3.2. Grupos experimentais

Após o alojamento nas instalações do bezerreiro, os animais foram identificados e blocados de acordo com o peso ao nascer (sete blocos foram formados) e distribuídos ao acaso entre dois tratamentos:

- 1) Controle ou placebo – Administração oral da solução contendo: água, maltodextrina, açúcar, bicarbonato de sódio, fosfato de potássio, sulfato de amônio, sulfato de magnésio, cloreto de cálcio e cloreto de sódio.
- 2) Tratamento - Administração oral de Lactipro NXT (cultura de *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125, 10 ml, 5×10^9 UFC/ animal, MS Biotec, Wamego, KS). O probiótico é acondicionado em uma embalagem estéril, possuindo um lacre entre a solução diluente (água, maltodextrina, açúcar, bicarbonato de sódio, fosfato de potássio, sulfato de amônio, sulfato de magnésio, cloreto de cálcio e cloreto de sódio) e o conteúdo em pó onde se concentra a cultura bacteriana desidratada.

A administração oral de ambos os tratamentos foi realizada com apenas uma dose contendo 10 ml das soluções, quando os animais completaram 14 ± 1 dia de idade. Para a aplicação utilizou-se um dosador manual, como demonstrado na Figura 1.



Figura 1. Dosagem oral da cultura de *Megasphaera elsdenii*.

3.3. Desempenho e saúde

Após a colostragem, os bezerros receberam através de balde aberto 6L/dia de leite não comercializável pasteurizado dividido em duas refeições (7h00 e 14h00), sendo registrada qualquer recusa de consumo. Este volume de fornecimento foi mantido até os 20 dias de idade, quando o volume de fornecimento foi aumentado para 8L/dia e foi mantido até o início do desaleitamento gradual, o que caracteriza um programa de alimentação do tipo *step-up/step-down* (Figura 2).

O leite não comercializável foi ofertado nos primeiros dias de idade dos animais e gradualmente foi substituído por sucedâneo lácteo (Nattmilk, Auster Nutrição Animal LTDA, Hortolândia, SP) diluído para obter 14% de sólidos (1:7; Tabela 2). Os horários de fornecimento e número de refeições foram mantidos durante todo período experimental.

Os animais tiveram acesso *ad libitum* à água e concentrado inicial (Tabela 2). O concentrado inicial foi fabricado na própria fazenda e era fornecido diariamente no período da manhã, e as sobras do dia anterior foram pesadas em balança digital (Toledo, 9094, São Bernardo do Campo, SP) para cálculo do consumo diário de dieta sólida.

O período de aleitamento compreendeu oito semanas, com desaleitamento gradual iniciando entre os 56 e 63 dias de idade com duração de sete dias (Figura 2). Após o desaleitamento, os bezerros tiveram acesso a feno de Tifton 85 (*Cynodon* spp.) como fonte de volumoso (Tabela 2). Os animais permaneceram no experimento por mais duas semanas, de forma que o período experimental compreendeu 10 semanas (84 dias).

Tabela 2. Ingredientes e composição química dos alimentos.

Item	Concentrado ¹	Sucedâneo lácteo	Feno ²
Ingredientes, %MS			
Milho moído	46,25	-	-
Farelo de soja	27,5	-	-
Farelo de trigo	20	-	-
Sucedâneo lácteo	3	-	-
Núcleo mineral/vitamínico	2,5	-	-
Levedura	0,5	-	-
Adsorvente de micotoxinas	0,25	-	-
Composição química, %			
MS	90,12	95,65	92,23
Matéria mineral	8,05	6,5	7,27
PB	21,30	19,05	11,23
FDN	12,15	1,7	73,43
Extrato etéreo	4,60	15,85	1,57

¹ Concentrado = concentrado farelado

² Feno = feno de Tifton

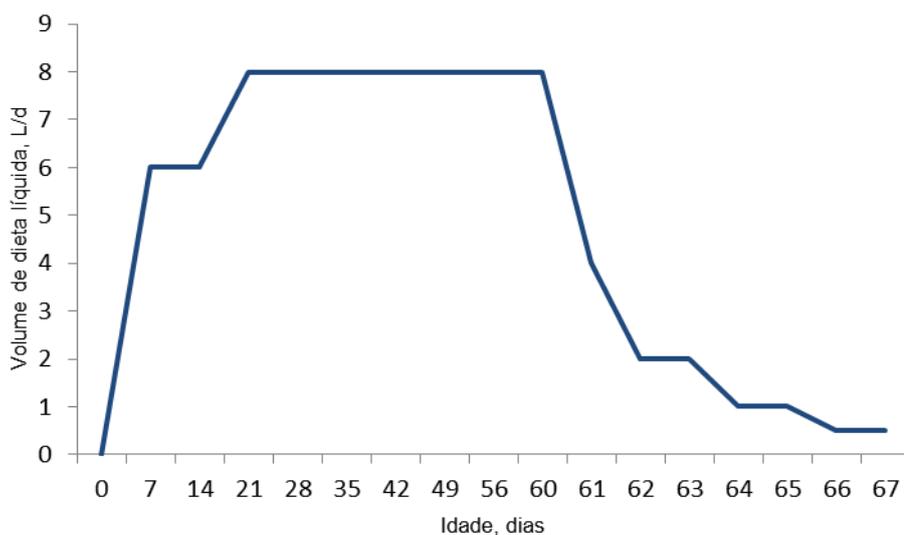


Figura 2. Volume de dieta líquida fornecida de acordo com a idade em semanas. O volume fornecido variou até o início do desaleitamento.

Os bezerros foram pesados e tiveram suas medidas corporais (perímetro torácico, largura de garupa e altura de cernelha) registradas ao nascimento, e a cada 14 dias até a décima semana de idade. Esse procedimento foi realizado antes do fornecimento da dieta líquida da manhã. As pesagens foram realizadas com uma balança digital (Tendal, Constant, Duque de Caxias, RJ) e as medidas corporais foram obtidas com o auxílio de uma régua com escala em centímetros e fita métrica também com escala em centímetros.

Diariamente, antes do fornecimento da primeira refeição era monitorada a saúde dos animais, a fim de identificar alterações clínicas e registrar a ocorrência de doenças. Para esta avaliação utilizou-se o escore de saúde desenvolvido pela Universidade de Wisconsin-Madison (Calf Health Scoring Criteria), para o diagnóstico de doença respiratória bovina (DRB): temperatura retal, tosse, secreção nasal, secreção ocular e posição de cabeça e orelhas, cada variável recebe pontuação de 0 a 3 de acordo com a intensidade das alterações clínicas, como apresentado no Anexo A (McGuirk, 2008). Foi considerado com febre os animais que registraram temperatura retal $\geq 39,5$ e com tosse os animais que registraram escore de tosse ≥ 2 . A fluidez das fezes também foi registrada diariamente, antes da limpeza das baias, para monitorar a ocorrência de diarreia. Para avaliação foi utilizado o escore fecal, considerando: (0) Normal; (1) Pastosa ou semi-formada; (2) Fluída; (3) Líquido-aquosa. O escore fecal ≥ 2 por mais de um dia consecutivo foi registrado como sendo uma ocorrência de diarreia.

As decisões de diagnóstico e tratamento eram realizadas pelo veterinário responsável pelo setor na fazenda.

3.4. Parâmetros sanguíneos

Antes da administração do probiótico e depois a cada 14 dias, amostras de sangue foram coletadas através da punção da veia jugular, utilizando-se tubos providos de vácuo contendo fluoreto de sódio como antiglicolítico e oxalato de potássio como anticoagulante (Vacuette do Brasil, Campinas, SP, Brasil). As coletas de sangue foram realizadas respeitando o intervalo de duas horas após a refeição da manhã e durante o período experimental, seis coletas por animal (14, 28, 42, 56, 70, 84 dias de idade) foram feitas para avaliação da concentração de b-hidroxibutirato e glicose. O tubo foi centrifugado logo após a coleta, em centrífuga não refrigerada (4000 Rpm) por 25 minutos, para a obtenção do soro sanguíneo. O soro sanguíneo foi acondicionado e congelado, para posterior análise dos metabólitos sanguíneos.

Os parâmetros sanguíneos foram realizados em Sistema Automático para Bioquímica – Modelo SBA – 200 (CELM, Barueri, SP, Brasil), com a utilização de kits comerciais específicos para os metabólitos avaliados. Para a determinação da concentração de glicose plasmática, utilizou-se o kit Labtest Diagnóstica S.A. (Lagoa Santa, MG, Brasil), para a determinação de beta-hidroxibutirato foi utilizado o kit enzimático RANBUT (Randox Laboratories – Life Sciences Ltd. Crumlin, UK; importado por Randox Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil).

3.5. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado para esse trabalho foi de blocos casualizados, os blocos eram definidos considerando o peso ao nascer de cada animal. As medidas de desempenho (consumo de concentrado, consumo de feno, ganho médio diário (GMD), perímetro torácico, altura de cernelha e largura de garupa) e os parâmetros sanguíneos (concentração de glicose sérica e de beta-hidroxibutirato sérico) foram analisadas como medidas repetidas no tempo, através do pacote estatístico SAS (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC), utilizando-se o procedimento MIXED, conforme o modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + E_{ij} + W_k + TW_{ik} + E_{ijk}$$

Onde, Y_{ijk} = variável resposta; μ = média geral; T_i = efeito do tratamento; B_j = efeito aleatório de bloco; E_{ij} = erro residual A; W_k = efeito da idade; TW_{ik} = efeito da interação entre tratamento e idade; e E_{ijk} = erro residual B.

As matrizes de covariância “compound symmetry, heterogeneous compound symmetry, autoregressive, heterogeneous autoregressive, unstructured, banded, variance components, toeplitz, antidependence e heterogeneous Toeplitz” foram testadas e definidas de acordo com o menor valor obtido para Akaike’s Information Criterion corrected (AICC).

As variáveis fixas como: peso ao nascimento, peso ao desaleitamento, peso médio, brix sérico e do colostro, volume de colostro, e as variáveis de saúde (score de saúde, score fecal, dias com febre e dias com tosse) foram analisadas utilizando o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ji} = \mu + T_i + B_j + E_{ij}$$

Onde, Y_{ji} = variável resposta; μ = média geral; T_i = efeito do tratamento; B_j = efeito aleatório de bloco; E_{ij} = erro residual.

Para todas as variáveis respostas as médias foram obtidas através do comando LSMEANS, com nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Consumo de dieta líquida e dieta sólida

A ingestão de dieta líquida e sólida não diferiu entre o tratamento controle (placebo) e o tratamento com inoculação da cultura de ME durante todo o período experimental (Tabela 3). No entanto, o consumo de matéria seca de dieta líquida, concentrado, feno e dieta total apresentou efeito da idade. O feno estava disponível para os animais ao início do desaleitamento e assim como as demais variáveis de consumo, não houve efeito significativo entre os tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3. Consumo de alimento de bezerros suplementados ou não com *Megasphaera elsdenii*.

Item	Tratamentos		EPM ¹	P valor ²		
	Placebo	Lactipro		T	I	T×I
Consumo de alimento, g MS/d						
Dieta líquida	658.5	655.4	5.20	0.6396	<0.0001	0.9363
Concentrado	697.5	711.7	46.40	0.8067	<0.0001	0.9611
Feno	81.9	80.1	3.87	0.7347	0.0283	0.3520
Total	1387.6	1404.9	45.27	0.7546	<0.0001	0.9538

¹EPM= erro padrão da média

²T = Efeito de tratamento; I= efeito de idade; T×I= interação entre tratamento e idade.

O consumo de dieta líquida reduziu na segunda semana de idade em ambos os grupos, entretanto, a redução observada neste trabalho não foi significativa entre os tratamentos Placebo e Lactipro (713,73 g MS/d vs. 718,50 g MS/d; Figura 3).

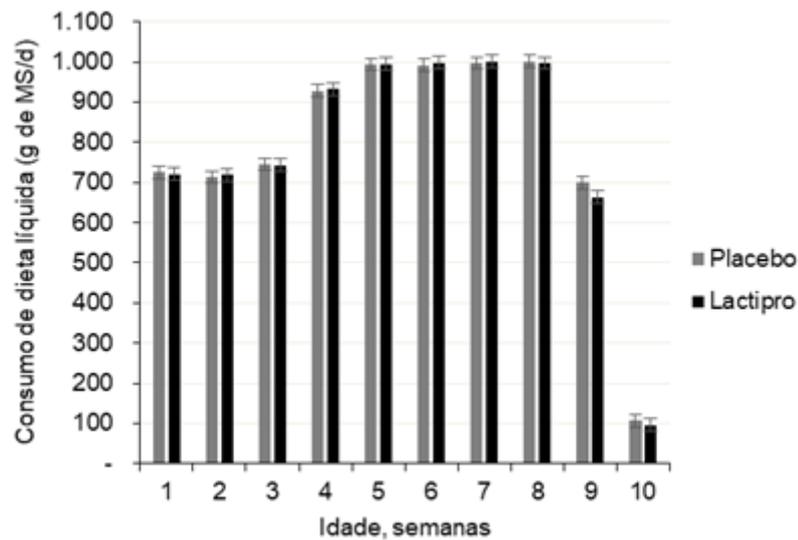


Figura 3. Consumo de dieta líquida (g de MS/d) durante o período de aleitamento.

O período de aleitamento compreendeu até a décima semana, neste período o consumo de dieta líquida era bastante reduzido (107,06 g MS/d vs 96,31 g/MS/d) e mais de 90% da MS da dieta total era fornecida através da dieta sólida.

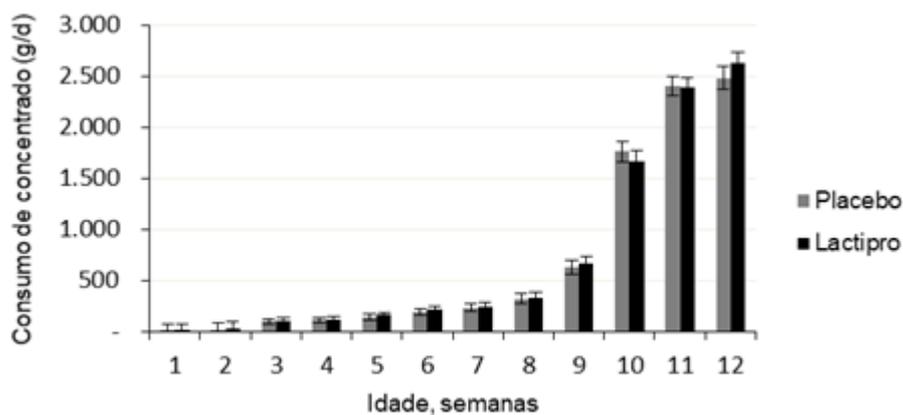


Figura 4. Consumo de dieta sólida (g/d) durante o período de aleitamento e desaleitamento.

4.2. Ganho de peso e características de crescimento

As medidas de desempenho não foram afetadas pelos tratamentos, os animais tiveram desempenho semelhante durante todo o período, com peso corporal médio de 62,72 kg e eficiência alimentar (EA) foi de 0,500 kg/g MS (Tabela 4). A

Tabela 4. Desempenho e medidas corporais de bezerros suplementados ou não com probiótico.

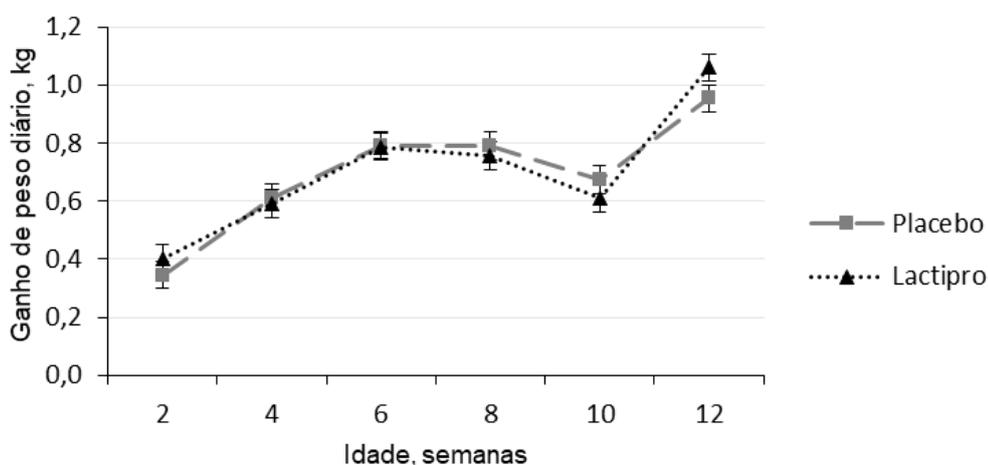
Item	Tratamentos		EPM ¹	P valor ²		
	Placebo	Lactipro		T	I	T×I
Peso corporal, kg						
Médio, kg	62,72	62,72	2,23	0,9953	<0,0001	0,7156
Inicial, kg	36,95	36,66	2,126			
Oitava semana, kg	72,27	72,05	2,334			
Final, kg	94,94	94,47	2,724			
Ganho de peso, kg/d	0,662	0,701	0,027	0,3177	<0,0001	0,7963
Perímetro Torácico, cm	91,1	91,2	1,0710	0,9101	<0,0001	0,7007
Largura de Garupa, cm	26,3	24,9	1,0250	0,3328	<0,0001	0,4968
Altura de Cernelha, cm	80,1	80,1	1,0080	0,9371	<0,0001	0,8886
EA ³ , kg/kg de MS	0,5001	0,5033	0,0163	0,8387	<0,0001	0,7004

¹EPM= erro padrão da média

²T = Efeito de tratamento; I= efeito de idade; T×I= interação entre tratamento e idade.

³EF = Eficiência alimentar.

Houve redução no ganho de peso diário dos animais durante o processo de desaleitamento (Figura 5). O início da redução ocorreu da oitava à décima semana, quando o desaleitamento foi finalizado e os animais tinham acesso apenas a dieta sólida e feno. Contudo, não houve efeito da administração de ME (P=0,3372).

**Figura 5.** Ganho de peso (kg/d) durante o período de aleitamento e desaleitamento.

4.3. Parâmetros de saúde dos animais

Para as variáveis de saúde e escore fecal também não foi observado efeito da administração de ME. O escore fecal apresentou efeito de idade ($P < 0,0001$), com maiores valores durante a segunda semana de idade dos animais (Tabela 5; Figura 6). Durante a oitava semana, ou seja, no início do desaleitamento, a fluidez das fezes foi mais elevada em relação ao período anterior, sendo menor apenas que as medidas de escore fecal obtidos na primeira e segunda semana de idade dos animais (Figura 6). O escore fecal nas semanas subsequentes ao início do desaleitamento demonstram leve aumento na fluidez das fezes dos animais, em relação ao período de aleitamento, porém sem efeito significativo ($P > 0,05$).

Tabela 5. Avaliações de saúde e escore fecal dos bezerros suplementados com cultura de *Megasphaera elsdenii* e acompanhados durante 12 semanas.

Item	Tratamentos		EPM ¹	P valor ²		
	Placebo	Lactipro		T	I	T×I
Saúde						
Escore de saúde	2,7	2,5	1,09	0,8619		
Escore fecal	0,86	0,87	0,030	0,7573	<0,0001	0,6822
Escore fecal >2, dias	11,0	9,1	0,96	0,1746		
Febre, dias	9,0	8,9	0,91	0,9009		
Tosse, dias	8,6	6,2	1,42	0,2406		

¹EPM= erro padrão da média

²T = Efeito de tratamento; I= efeito de idade; T×I= interação entre tratamento e idade.

As medidas de escore fecal ≥ 2 são apresentadas em dias, assim como o escore de tosse. Os animais do tratamento com o Lactipro registraram uma média 9,1 dias com escore fecal ≥ 2 , e o grupo que não recebeu a cultura de ME registrou uma média de 11 dias. Os registros de tosse, demonstram que a frequência média de dias com tosse nos animais que receberam a dose de ME foi de 6,2, enquanto os animais que não receberam o produto probiótico registraram 8,6 dias. Contudo, esses resultados não possuem diferença significativa e não influenciaram os resultados de consumo de dieta líquida, bem como as características de desempenho (Tabela 3, 4 e 5).

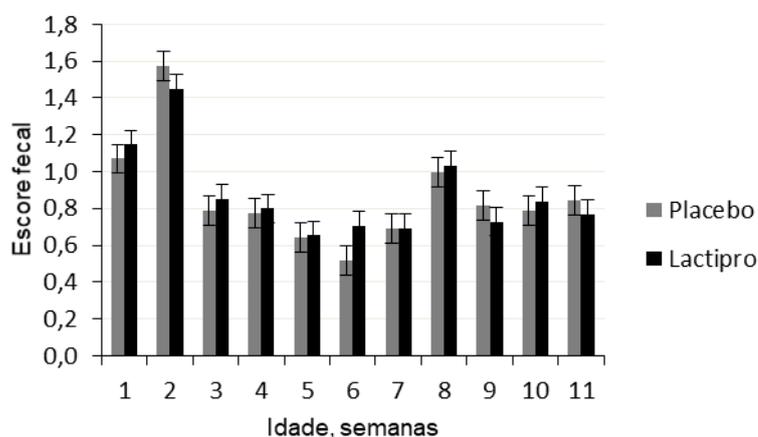


Figura 6. Escore fecal dos animais durante o período experimental.

4.4. Parâmetros sanguíneos dos animais

A concentração de glicose sérica e de beta-hidroxibutirato não tiveram influência da dosagem de ME (Tabela 6).

Tabela 6. Avaliações dos metabólitos sanguíneos de bezerras suplementados com cultura de *Megasphaera elsdenii*, durante 12 semanas.

Item	Tratamentos		EPM ¹	P valor ²		
	Placebo	Lactipro		T	I	T×I
Glicose, mg/dL	101,00	101,95	1,450	0,6231	<0,0001	0,9531
BHBA, mmol/L	0,116	0,118	3,845	0,7722	<0,0001	0,7245

¹EPM= erro padrão da média

²T = Efeito de tratamento; I= efeito de idade; T×I= interação entre tratamento e idade.

Houve efeito de idade sobre a variável de concentração de glicose e BHB (Tabela 6). As bezerras apresentaram aumento na concentração de glicose entre a segunda e quarta semana, reduzindo gradualmente e estabilizando após o completo desaleitamento (Figura 7). Por outro lado, a concentração de BHBA teve um aumento acentuado durante o desaleitamento e após o desaleitamento (Figura 8).

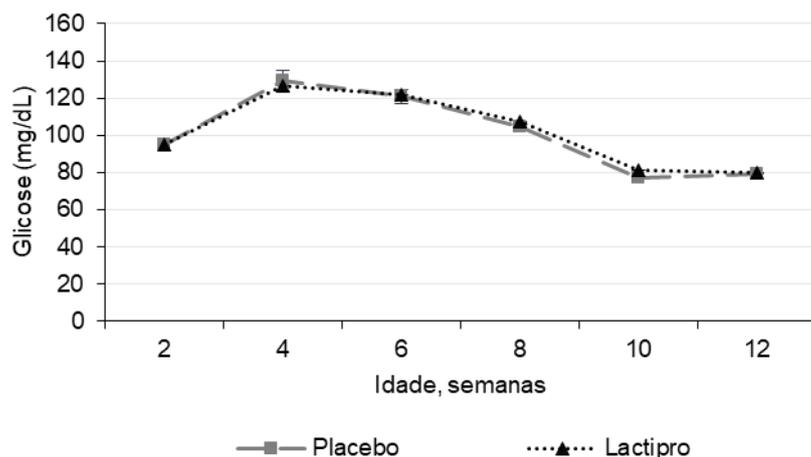


Figura 7. Concentração de glicose sérica em bezerros suplementados com cultura de *Megasphaera elsdenii*.

A concentração molar de BHBA do grupo tratado com a administração de ME foi de 0,064, 0,066 e 0,083 mmol/L, nas semanas quatro, seis e oito respectivamente e para grupo que não recebeu a dose de ME a concentração de BHBA observada nas mesmas semanas foram 0,062, 0,061 e 0,077 mmol/L. Para ambos os grupos a concentração de BHBA aumentou de forma acentuada após a oitava semana, no entanto sem efeito de tratamento durante todo período experimental ($P > 0,05$).

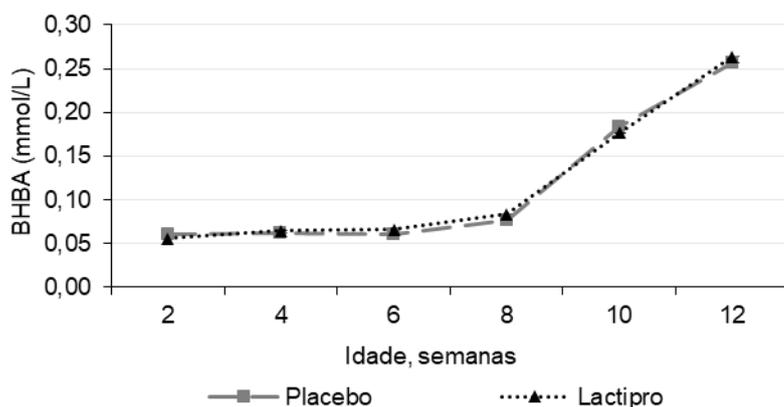


Figura 8. Concentrações de BHBA sérico em bezerros suplementados com cultura da *Megasphaera elsdenii*.

5. DISCUSSÃO

A administração do probiótico foi avaliada quanto a capacidade de promover o aumento no desempenho produtivo de bezerras leiteiras, especialmente através do desenvolvimento ruminal mais precoce. A importância do ácido butírico no desenvolvimento do epitélio ruminal é bem definida e, portanto, aumentar a proporção deste ácido no ambiente ruminal, implica em melhor desenvolvimento de papilas ruminais (Yohe et al., 2018). O microrganismo utilizado neste estudo, promove mudanças no perfil fermentativo quando há substratos como lactato e glicose disponível no rúmen, o que favorece a produção de butirato e propionato, como produtos da fermentação. O lactato está presente frequentemente no rúmen de neonatos bovinos, o que pode ocorrer devido ao escape de dieta líquida pela goteira esofágica e ao aumento no consumo de dieta sólida (Counotte et al., 1981; Susanto et al., 2023), sempre muito rica em amido.

O uso de cepas probióticas que aumentem a produção de AGCC importantes para o processo de desenvolvimento ruminal é uma estratégia consolidada. Entretanto, características individuais desses microrganismos podem implicar em falta de concordância entre as investigações acerca de sua funcionalidade e efetividade. A cepa utilizada neste estudo (NCIMB 41125) é estritamente anaeróbia e possui rigorosas recomendações de uso, para que a cultura do microrganismo não seja comprometida durante a administração. Neste trabalho, o produto foi acondicionado em temperatura adequada e a dose do produto foi fornecida através de um aplicador acoplado diretamente a embalagem, de forma que o produto não fosse exposto ao oxigênio, ademais foi verificada a ausência da coloração azul no líquido ofertado, o que demonstra integridade do produto. Os animais foram divididos em três grupos contendo 14 ± 1 dia de idade, para que o produto não excedesse o período de validade após a primeira aplicação (14 dias). Essa idade de inoculação foi determinada considerando resultados de outros trabalhos científicos (Muya et al., 2015; Muya et al., 2017; Yohe et al., 2018) e de testes realizados em fazendas comerciais.

A efetividade da administração oral da cultura de ME 41125 foi anteriormente abordada. Contudo, há pouca clareza com relação ao estabelecimento e desempenho do microrganismo. A prevalência do microrganismo no rúmen após a dosagem não foi amplamente investigada. O aumento transitório nas populações de ME foi relatado em alguns trabalhos, bem como houve pouca influência da presença da cultura de ME na composição do microbioma. No estudo de Yohe e colaboradores (2018), a prevalência do organismo por 70 dias após uma única administração aos 14 dias de idade, não foi suficiente para manter uma

concentração de ME estável no rúmen. Da mesma maneira também realizamos uma única dosagem em bezerros com aproximadamente 14 dias, entretanto não avaliamos o estabelecimento e a prevalência do microrganismo no ambiente ruminal após a inoculação.

O adequado estabelecimento do microrganismo no rúmen é descrito como dependente de alguns aspectos como a escolha da cepa, ou seja, as condições de sobrevivência, o momento da inoculação e o hospedeiro. A cepa de ME pode encontrar dificuldade para estabelecer uma população estável no ambiente ruminal em função da especificidade do hospedeiro, que pode permitir apenas mudanças provisórias na composição da microbiota. Ademais, alcançar um estabelecimento bem-sucedido da bactéria no rúmen pode ser dependente da dinâmica do metabolismo, de forma que haja sincronismo entre a disponibilidade de lactato e outros substratos importantes para o microrganismo no momento de inoculação, permitindo que este encontre um ambiente favorável ao estabelecimento de populações robustas (Monteiro et al., 2022; Weimer et al., 2015).

Weimer e colaboradores (2015) atribuíram o sucesso parcial do estabelecimento da ME em função do horário de oferta do probiótico, que ocorreu quatro horas após a alimentação, momento em que haveria maior produção de lactato no rúmen. No presente estudo, a dosagem foi realizada respeitando apenas duas horas após a alimentação com dieta líquida, e apesar de não ter sido realizado avaliações na concentração de lactato no líquido ruminal, esta pode ter sido a razão para não termos encontrado resultados que demonstram vantagem para a administração da cepa.

O estabelecimento de bactérias no ambiente ruminal, também sofre influência da taxa de passagem da digesta. Os microrganismos probióticos possuem maiores chances de instalar populações estáveis se sua taxa de crescimento for superior a taxa de passagem do rúmen (Van Soest, 2018). Em bezerros, nota-se mudanças constantes na taxa de passagem, devido as condições de saúde observadas nas primeiras semanas de vida, decorrentes de processo infecciosos que comumente afetam esses animais. No presente estudo, observou-se aumento no escore fecal (Figura 6) e reduções no consumo de dieta líquida (Figura 3), durante a segunda semana de vida, o que corresponde ao período de administração do produto probiótico. Desta maneira, pode-se considerar que o status de saúde dos animais nos dias posteriores a aplicação da dose, pode ter influenciado negativamente o processo de estabelecimento do microrganismo.

O desenvolvimento do epitélio ruminal é sobretudo influenciado pela ingestão e composição da dieta sólida fornecida, que atua como substrato primário para a fermentação de ácidos graxos de cadeia curta, que possuem função importante no desenvolvimento do rúmen.

Com isto, potencializar o consumo de alimento sólidos durante a fase de aleitamento traz benefícios para o pós-aleitamento, quando os bezerros devem ser capazes de suprir sua exigência de manutenção e crescimento apenas com os nutrientes fornecidos via dieta sólida. Assim como o desempenho, a saúde e o bem-estar dos bezerros é impactado pela ingestão antecipada de alimento sólido (Bittar et al., 2020).

Entretanto, alimentar os bezerros com taxa moderada a alta de alimentação com dieta líquida (750 –800 g MS/dia) resulta em maiores taxas de crescimento (NASEM, 2021), mas reduz o interesse dos bezerros e consequentemente atrasa o início no consumo de alimentos sólidos (Gelsinger et al., 2016). Muya e colaboradores (2017) testaram a administração da cultura de ME aos 14 dias de idade com oferta de dieta líquida *ad libitum*, e o consumo observado foi de 8,2 kg/d e 7,4 kg/d, e apesar do consumo concentrado inicial ser baixo, o consumo de concentrado relatado para os animais que receberam a dose de ME, foi 40% maior que o relatado para os animais do tratamento controle (0,14 kg/dia vs. 0,10 kg/dia). No presente estudo, mesmo administrando a cepa com a mesma idade e fornecendo volume de dieta líquida semelhante ao utilizado por Muya e colaboradores (2017), não observamos incremento no consumo de concentrado nos animais dosados com cultura de ME.

No presente estudo, os animais foram aleitados sob um regime de *step-up step-down*, e durante a fase de maior potencial de consumo de dieta líquida a oferta foi de oito litros por dia. A média de consumo de dieta líquida durante o período de aleitamento foi de 658.5 g de MS/dia para o tratamento placebo e de 655.4 g de MS/dia para o tratamento que recebeu a dose da cultura de ME ($P > 0,05$). Contudo, em um trabalho anterior os animais consumiram uma quantidade inferior de dieta líquida (460 g de MS/dia), o que pode ter favorecido o estabelecimento do microrganismo e o aumento no consumo de MS vinda da dieta sólida ($P < 0,001$) (Muya et al., 2015). O consumo de MS proveniente exclusivamente da dieta líquida observado durante o período de inoculação da cepa e semanas após, eram superiores a 700 g de MS/dia, o que pode ter contribuído para a redução do interesse dos animais pelo alimento sólido (Gelsinger et al., 2016).

O consumo inicial de concentrado foi baixo para ambos os grupos e a idade para início do consumo de concentrado em volume expressivo (> 100 g/dia por 3 dias consecutivos) foi aos 26 dias. A ingestão de alimentos sólidos tardia está relacionada a alta disponibilidade de dieta líquida, que permitiu que a exigência energética fosse suprida em sua totalidade pelo consumo de substituto de leite (SL) (Dikotope, 2018; Muya et al., 2015; Terré et al., 2006). Desta forma, o consumo de alimento sólido aos 14 dias de idade era pouco expressivo e não fornecia substratos suficientes para completo estabelecimento do

microrganismo no ambiente ruminal. No trabalho de Muya e colaboradores (2015), durante a segunda semana de vida (14 dias), os animais já possuíam consumo aproximado de 200 g de MS/ dia, o que não foi observado no presente estudo.

O período de desaleitamento é o mais crítico para o ruminante jovem, pois muitos iniciam esse processo com o sistema digestivo pouco preparado para as mudanças que seguirão após o desaleitamento. O consumo exclusivo de dieta sólida e o acesso ao alimento volumoso durante e após o desaleitamento é desafiador para os bezerros e pode levar a variações no consumo de dieta sólida, em função da adaptação do rúmen as mudanças no padrão de consumo, aumento na disponibilidade de substratos prontamente fermentáveis e flutuações no pH ruminal.

Assim como os resultados acerca do estabelecimento da ME, os dados referentes ao efeito da dosagem de ME no consumo de matéria seca não são claros. Os trabalhos utilizando a cultura em animais jovens relatam aumento no consumo de concentrado durante e após o desaleitamento, o que sugere que bezerros que recebem a dose de ME desenvolvem maior capacidade de absorção e conseqüentemente maior estímulo ao consumo (Dikotope, 2018; Miller et al., 2013; Muya et al., 2017, 2015). Entretanto, a redução na ingestão de matéria seca foi descrita como efeito da administração de ME, o que pode ocorrer em função do aumento da saciedade, que é resultado da maior concentração de propionato disponível para geração de energia (Aikman et al., 2009; Allen et al., 2005).

O consumo de dieta sólida observado não foi afetado pela administração de ME durante as semanas que compreenderam o desaleitamento (semanas 8 a 10; Figura 4). Contudo, o impacto da dosagem de ME sobre o consumo de dieta sólida pode sofrer influência do tipo de processamento dos ingredientes, bem como da proporção de energia da dieta. De acordo com o NASEM (2021), o fornecimento de dietas iniciais com alto amido (> 32 %) e baixo FDN (< 13 %), reduz a faixa de pH para valores abaixo de 5,5, o que é considerado prejudicial à saúde e maturação ruminal. O concentrado utilizado neste trabalho tinha potencial de desafiar os animais, pois era composto por baixa inclusão de FDN (12,15 % na MS) e alta inclusão de milho moído (41,681 % na MS) o que poderia provocar SARA nos animais, entretanto não avaliamos os parâmetros de saúde ruminal.

Da mesma maneira que os resultados de consumo de matéria seca, os parâmetros de desempenho não diferiram entre os grupos, mas foram semelhantes aos valores relatados por Quigley e colaboradores (1994) para animais em aleitamento. O GMD observado nos bezerros que receberam a dosagem da cepa probiótica foi em média 0,701 g/d, enquanto que o observado para os animais do grupo placebo foi de 0,662 g/d, portanto sem significância ($P =$

0,3177). Os resultados são consistentes com pesquisas anteriores que encontraram apenas diferença numérica no GMD de animais que receberam a cultura. Nestes estudos, os autores argumentam que a ausência de resultados significativos possa ser devido à grande variação entre os animais, ao protocolo de adaptação utilizado e ao fato de a dieta não ter sido agressiva o suficiente para que a ME expressasse seu benefício (Declerck et al., 2020b, 2020a). No presente estudo, os animais eram bastante homogêneos, com peso ao nascimento e Brix sérico sem diferença significativa ($P= 0,9953$ e $P= 0,4850$, respectivamente), o que sugere o impacto da dieta, do protocolo de aleitamento e fornecimento do probiótico como motivos para não ter sido observado efeito da administração de ME no desempenho dos animais.

Observou-se redução no GMD de todos os animais na semana 10 (Figura 5), ou seja, semana após o desaleitamento. Esse resultado demonstra que a dosagem de ME não atenuou os desafios impostos pelo processo de desaleitamento nos animais que receberam a dose, pois tiveram redução no ganho da mesma maneira que os animais que não receberam o probiótico. A queda no ganho de peso durante e após o desaleitamento, é consequência da incapacidade dos animais de atender sua demanda nutricional apenas consumindo alimento sólido, pois o aparelho retículo-rúmen não está completamente funcional para degradar e metabolizar os substratos que são ingeridos (Bittar et al., 2020; Sweeney et al., 2010).

A dosagem da cultura de ME também não demonstrou vantagem significativa na saúde de bezerros em aleitamento. O escore fecal foi maior durante a segunda semana de idade (Figura 6), como citado anteriormente. Neste período os animais possuem alta susceptibilidade a infecções, pois há queda na imunidade passiva e os animais iniciam o processo de aquisição de imunidade ativa (Chase et al., 2008). Depois de lidar com os processos de adaptação que as primeiras semanas de idade exigem, os bezerros ainda precisam enfrentar o desafiador processo de desaleitamento. Ao desaleitamento, a alta ingestão de energia proveniente de alimentos altamente fermentáveis, reduz de forma acentuada o pH ruminal que pode progredir para SARA. O aumento na fluidez das fezes é observado frequentemente em animais com SARA, em função do aumento na taxa de passagem intestinal, pois ocorre aumento no volume de substrato que sai do rúmen resultado da sua atividade de degradação e fermentação alterada (Kleen et al., 2003; Oetzel, 2003). Ao início do desaleitamento, ou seja, durante a semana oito, a fluidez das fezes em ambos os grupos foi elevada em relação à semana anterior (Figura 6). O aumento da fluidez continuou sendo observado nas semanas seguintes ao desaleitamento, porém não foi significativo entre os animais que receberam a cultura do probiótico e os que não receberam ($P > 0,05$).

Os animais que apresentam aumento na fluidez das fezes como sinal clínico, comumente reduzem a ingestão de alimento e tem queda no ganho de peso, portanto, reduzir a gravidade ou a persistência da diarreia é importante para diminuir seu impacto no desempenho (Pardon et al., 2013; Schinwald et al., 2022). Observou-se redução de dois dias na persistência da diarreia (escore fecal ≥ 2) em bezerros que receberam a dose de ME em comparação com os animais que receberam o placebo (9,1 vs 11,0).

Assim como a diarreia, as doenças respiratórias também são causas da redução no desempenho durante o aleitamento (Pardon et al., 2013). Os bezerros possuem maior risco de adquirir infecções respiratórias entre a segunda e quarta semana de idade, e podem ser acometidos durante todo o período de aleitamento e desaleitamento (Chase et al., 2008; Hulbert and Moisés, 2016). Os resultados obtidos demonstram diminuição na frequência de dias com tosse (escore de tosse ≥ 2), sendo que os animais que receberam a dosagem contendo a cultura de ME registraram 6,2 dias e os animais que receberam o placebo tiveram 8,6 dias com escore de tosse ≥ 2 . No entanto, assim como a redução de dias com diarreia, a redução nos dias com tosse também não possui diferença significativa e não influenciou os resultados de consumo de dieta líquida, bem como as características de desempenho (Tabela 3,4 e 5).

Os parâmetros sanguíneos tiveram apenas efeito de idade ($P < 0,0001$; Tabela 6). As concentrações de glicose são mais elevadas nas primeiras semanas de idade dos bezerros, pois nessa idade o metabolismo depende da glicose para manter seus processos vitais. Com o início da atividade de fermentação ruminal as concentrações de glicose tendem a reduzir e os AGCC passam a ser importantes intermediários nas vias para obtenção de energia (Baldwin et al., 2004; Khan et al., 2016). Em todos os animais, a glicose tendeu a aumentar entre a segunda e quarta semana, reduzindo gradualmente e estabilizando após o completo desaleitamento (Figura 7). Esse resultado é consistente com o observado em estudos anteriores com animais em aleitamento, em que a concentração de glicose plasmática variou entre 90 e 100 mg/dL, até a sexta semana de idade (Huber, 1969).

A concentração molar de BHBA sofre influência principalmente do consumo de dieta sólida (Suarez-Mena et al., 2017). Desta forma, a concentração molar de BHBA tem comportamento inverso ao da glicose, sendo mais baixa nas primeiras semanas e aumentando de forma acentuada ao desaleitamento (Figura 8). Não foi observado efeito significativo da cultura de ME na concentração plasmática de BHBA ($P > 0,005$). No entanto, os resultados demonstram uma vantagem numérica para os animais que receberam a dose, portanto, esses animais tiveram uma concentração plasmática de 4,2, 8,0 e 8,2% maior de BHBA, nas

semanas quatro, seis e oito respectivamente, em comparação com os animais do grupo placebo. Entretanto, foi observada redução na vantagem numérica nas semanas seguintes e esses resultados não foram afetados pelo tratamento ou pela interação tratamento e idade ($P > 0,05$). Yohe e colaboradores (2018), em um trabalho semelhante ao presente, também não observaram efeito do probiótico na concentração molar de BHBA.

Apesar disso, outros trabalhos que testaram a dosagem de ME em bezerros durante o aleitamento, demonstram resultados significativos na concentração de BHBA após a dosagem (0,281 vs 0,106; $P = 0,03$) (Muya et al., 2017). Esse resultado sugere que em no presente trabalho os animais que receberam a cultura do probióticos não tiveram benefício com a dosagem de ME, pois a média de concentração plasmática de BHBA para o grupo que recebeu o probióticos foi de 0,118 mmol/L, semelhante à observada por Muya et al. (2017) para animais que não foram dosados com ME.

Segundo Weimer e colaboradores (2015), o padrão de fermentação observado com a ME é dependente da combinação de uma elevada concentração de substratos e incubação por tempo prolongado. Os resultados desse trabalho confirmam essa afirmação, pois o consumo de MS no momento da administração do probióticos era baixa, assim como o período de retenção do substrato no ambiente ruminal, devido à dificuldade sanitária enfrentada pelos animais durante a segunda semana de idade, o que não deve ter alterado o padrão de fermentação. Desta forma, a ausência de resultados significativos para a concentração de BHBA, demonstra que a administração do probióticos aos 14 dias de idade não foi eficiente para aumentar o consumo de concentrado inicial e conseqüentemente melhorar o desempenho dos animais.

6. CONCLUSÃO

Para bezerros alimentados com alta taxa de ingestão de dieta líquida, e consequentemente com baixo consumo de concentrado inicial, o fornecimento de uma única dose da cultura de *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 aos 14 dias de idade não foi suficiente para promover benefícios nas características de desempenho, saúde e nos parâmetros sanguíneos, que são utilizados como indicadores de desenvolvimento ruminal. Administrar o probiótico em idade mais avançada, bem como, testar dosagens mais frequentes, pode ser necessário para esclarecer melhor a sua aplicabilidade em sistemas de criação bezerros leiteiros.

REFERÊNCIAS

- Abecia, L., Martínez-Fernandez, G., Waddams, K., Martín-García, A. I., Pinloche, E., Creevey, C. J. 2018. Analysis of the Rumen microbiome and metabolome to study the effect of an antimethanogenic treatment applied in early life of kid goats. *Front Microbiol.* 9:396403.
- Abecia, L., Ramos-Morales, E., Martínez-Fernandez, G., Arco, A., Martín-García, A. I., Newbold, C.J. 2014. Feeding management in early life influences microbial colonisation and fermentation in the rumen of newborn goat kids. *Animal Production Science.* 54, 1449-1454.
- Aikman, P. C., Henning, P. H., Horn, C. H., Humphries, D. J. 2009. Effects of *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 supplementation on rumen fermentation and pH in early lactation dairy cows. *Proc. XIth Int. Symp. Rumin. Physiol. Clermont-Ferrand. Fr.* p. 110–1.
- Aikman, P. C., Henning, P. H., Humphries, D. J., Horn, C. H. 2011. Rumen pH and fermentation characteristics in dairy cows supplemented with *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 in early lactation. *J Dairy Sci.* 94:2840–9.
- Aiumlamai S., Kindahl, H., Fredriksson, G., Edqvist, L. E., Kulander, L., Eriksson, O. 1992. The role of endotoxins in induced ruminal acidosis in calves. *Acta Vet Scand.* 33:117–27
- Allen, M. S., Bradford, B. J., Harvatine, K. J. 2005. The cow as a model to study food intake regulation. *Annu Ver Nut.* 25:523–47.
- Andersen, P. H., Hesselholt, M., Jarloev, N. 1994. Endotoxin and arachidonic acid metabolites in portal, hepatic and arterial blood of cattle with acute ruminai acidosis. *Acta Vet Scand.* 35:223–34.
- Azevedo, R. A., Teixeira, A. M., Silva, A. L., Bittar, C. M. M., Ferreira, G. C., Zambrano, J. A., et al., 2023. *Alta CRIA* 2023.
- Baldwin, R. L., McLeod, K. R., Klotz, J. L., Heitmann, R. N. 2004. Rumen development, intestinal growth and hepatic metabolism in the pre- and postweaning ruminant. *J Dairy Sci.*
- Bittar, C. M. M., Gallo, M. P., Silva, J. T., De Paula, M. R., Poczynek, M., Mourão, G. B. 2020. Gradual weaning does not improve performance for calves with low starter intake at the beginning of the weaning process. *J Dairy Sci.* 103:4672–80.
- Blome, R. M., Drackley, J. K., McKeith, F. K., Hutjens, M. F., McCoy, G. C. 2003. Growth, nutrient utilization, and body composition of dairy calves fed milk replacers containing different amounts of protein. *J Anim Sci.* 81:1641–55.

- Britton, R., Stock, R., Cornell, U. 1989. Acidosis: A continual problem in cattle fed high grain diets. Proc. Cornell Nutr. Conf. Feed Manuf. Ithaca Cornell Univ., p. 8.
- Bull, L., Bush, L., Friend, J. D., Harris, B. J., Jones, E. W. 1965. Incidence of ruminal parakeratosis in calves fed different rations and its relation to volatile fatty acid absorption. J Dairy Sci. 48:1459-1466.
- Chase, C. C. L., Hurley, D. J., Reber, A. J. 2008. Neonatal Immune Development in the Calf and Its Impact on Vaccine Response. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 24:87–104.
- Counotte, G. H. M., Prins, R. A., Janssen, R. H. A. M., De Bie, M. J. A. 1981. Role of *Megasphaera elsdenii* in the Fermentation of dl-[2-C]lactate in the Rumen of Dairy Cattle. Appl Environ Microbiol. 42:649–55.
- Davis, C. L., Drackley, J. K. 1998. The Development, Nutrition, and Management of the Young Calf. Iowa State University Press.
- Declerck, J. C., Reeves, N. R., Miller, M. F., Johnson, B. J., Ducharme, G. A., Rathmann, R. J. 2020a. The influence of *Megasphaera elsdenii* on rumen morphometrics of cull cows immediately stepped up to a high-energy finishing diet. 194–205. Transl. Anim. Sci. 4:194–205.
- Declerck, J. C., Wade, Z. E., Reeves, N. R., Miller, M. F., Johnson, B. J., Ducharme, G. A. 2020b. Influence of *Megasphaera elsdenii* and feeding strategies on feedlot performance, compositional growth, and carcass parameters of early weaned beef calves. Transl. Anim. Sci. 4:1-13.
- Dennis, S. M., Arambel, M. J., Bartley, E. E., Dayton, A. D. 1983. Effect of Energy Concentration and Source of Nitrogen on Numbers and Types of Rumen Protozoa. J Dairy Sci. 66:1248–54.
- De Paula, M. R., Oltramari, C. E., Silva, J. T., Gallo, M. P. C., Mourão, G. B., Bittar, C. M. M. 2017. Intensive liquid feeding of dairy calves with a medium crude protein milk replacer: Effects on performance, rumen, and blood parameters. J Dairy Sci. 100:4448–56.
- Dias, J., Marcondes, M. I., Noronha, M. F., Resende, R. T., Machado, F. S., Mantovani, H. C. 2017. Effect of pre-weaning diet on the ruminal archaeal, bacterial, and fungal communities of dairy calves. Front Microbiol. 8:1553.
- Dias, J., Marcondes, M. I., Souza, S. M., Da Mata e Silva, B. C., Noronha, M. F., Resende, R. T. 2018. Bacterial community dynamics across the gastrointestinal tracts of dairy calves during preweaning development. Appl Environ Microbiol. 84.
- Dikotope, L. M. 2018. The effects of *Megasphaera elsdenii* on dairy heifer performance.

- Dill-Mcfarland, K. A., Breaker, J. D., Suen, G. 2017. Microbial succession in the gastrointestinal tract of dairy cows from 2 weeks to first lactation. *Sci Rep.* 7:40864–40864.
- Drouillard, J. S. 2004. Oral dosing of feedlot cattle with *Megasphaera elsdenii*: impact on adaptation to high-concentrate diets. Research Report: Project no. 2003 – 12, Kansas State University, Manhattan.
- Eades, S. C. 1997. Endotoxaemia in dairy cattle: Mechanism of reticulorumen stasis. *Vet J.* 153:321–7.
- Eastridge, M. L. 2006. Major Advances in Applied Dairy Cattle Nutrition. *J Dairy Sci.* 89:1311–23.
- Fonty, G., Senaud, J., Jouany, J. P., Gouet, P. 1988. Establishment of ciliate protozoa in the rumen of conventional and conventionalized lambs: influence of diet and management conditions. *Can J Microbiol.* 34:235–41.
- Franzolin, R., Dehority, B. A. 1996. Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. *J Anim Sci.* 74:2803–9.
- Gelsing, S. L. 2020. Physiological effects of starter-induced ruminal acidosis in calves before, during, and after weaning. *J Dairy Sci.* 103:2762–72.
- Gelsing, S. L., Heinrichs, A. J., Jones, C. M. 2016. A meta-analysis of the effects of preweaned calf nutrition and growth on first-lactation performance. *J Dairy Sci.* 99:6206–14.
- Glauber, J. G., Wandersee, N. J., Little, J. A., Ginderl, G. D. 1991. 5'-Flanking Sequences Mediate Butyrate Stimulation of Embryonic Globin Gene Expression in Adult Erythroid Cells. *Mol Cell Biol.* 11:4690–7.
- Goad, D., Goad, C., Nagaraja, T. G. 1998. Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. *Journal Anim Sci.* 76: 234-241.
- Greenwood, R. H., Morrill, J. L., Titgemeyer, E. C., Kennedy, G. A. 1997. A New Method of Measuring Diet Abrasion and Its Effect on the Development of the Forestomach. *J Dairy Sci.* 80:2534–41.
- Hagg, F. M., Erasmus, L. J., Henning, P. H., Coertze, R. J. 2010. The effect of a direct fed microbial (*Megasphaera elsdenii*) on the productivity and health of Holstein cows. *S Afr J Anim Sci.* 40:101–12.

- Heinrichs, A. J., Jones, C. M., Heinrichs, B. S. 2003 Effects of Mannan Oligosaccharide or Antibiotics in Neonatal Diets on Health and Growth of Dairy Calves 1. *J Dairy Sci.* 86:4064–9.
- Heinrichs, A. L. K. 2004. Desenvolvimento ruminal em bezerros leiteiros. Na Criação de Bezerros e Novilhas. Nottingham, Reino Unido.
- Henning, P. H., Horn, C. H., Leeuw, K. J., Meissner, H. H., Hagg, F. M. 2010a. Effect of ruminal administration of the lactate-utilizing strain *Megasphaera elsdenii* (Me) NCIMB 41125 on abrupt or gradual transition from forage to concentrate diets. *Anim Feed Sci Technol.*
- Henning, P. H., Horn, C. H., Steyn, D. G., Meissner, H. H., Hagg, F. M. 2010b. The potential of *Megasphaera elsdenii* isolates to control ruminal acidosis. *Anim Feed Sci Technol.* 157:13–9.
- Hino, T., Shimada, K., Maruyama, T. 1994. Substrate preference in a strain of *Megasphaera elsdenii*, a ruminal bacterium, and its implications in propionate production and growth competition. *Appl Environ Microbiol.* 60:1827–31.
- Horn, C. H., Kistner, A., Fouché, G. 2009. Selective enrichment, isolation and characterisation of fast-growing acid-tolerant lactate utilisers from rumen contents of animals on high-energy diets. *Ruminant Physiol.* 216-217.
- Horn, C. H., Kistner, A., Fouché, G. 2009. The Auxostat as isolation and rapid selection tool for strict anaerobic minority organisms in complex ecosystems. 6 *Internat. Symp. Anaerob. Microbiol.*, Liblice Chateau.
- Horvath, K. C., Gingerich, K. N., Hixson, C. L., Miller-Cushon, E. K. 2020. Effects of access to hay on cognition of pre-weaned dairy calves and behavior upon social grouping after weaning. *Appl Anim Behav Sci.* 232:105109.
- Huber, J. T. 1969. Development of the Digestive and Metabolic Apparatus of the Calf. *J Dairy Sci.* 52:1303–15.
- Huber, T., Cooley, J., Goetsch, D. D., Das, N. K. 1976. Lactic acid-utilizing bacteria in ruminal fluid of a steer adapted from hay feeding to a high-grain ration. *American J Vet Res.* 37:611-613.
- Hulbert, L. E., Moisés, S. J. 2016. Stress, immunity, and the management of calves. *J Dairy Sci.* 99:3199–216.
- Hungate, R. E. 1975. The Rumen Microbial Ecosystem. *Annual Review of Ecology and Systematics.* 6:1, 39-666:39–66.
- Hungate, R.E. 1966. CHAPTER II – The Rumen Bacteria. 8-60.

- Jami, E., Israel, A., Kotser, A., Mizrahi, I. 2013. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *ISME J.* 7:1069–79.
- Khan, M. A., Bach, A., Weary, D. M., Von Keyserlingk, M. A. G. 2016. Invited review: Transitioning from milk to solid feed in dairy heifers. *J Dairy Sci.* 99:885–902.
- Khan, M. A., Lee, H. J., Lee, W. S., Kim, H. S., Ki, K. S., Hur, T. Y. 2007a. Structural growth, rumen development, and metabolic and immune responses of Holstein male calves fed milk through step-down and conventional methods. *J Dairy Sci.* 90:3376–87.
- Khan, M. A., Lee, H. J., Lee, W. S., Kim, H. S., Kim, S. B., Park, S. B. 2008. Starch Source Evaluation in Calf Starter: II. Ruminal Parameters, Rumen Development, Nutrient Digestibilities, and Nitrogen Utilization in Holstein Calves. *J Dairy Sci.* 91:1140–9.
- Khan, M. A., Weary, D. M., Von Keyserlingk, M. A. G. 2011. Invited review: Effects of milk ration on solid feed intake, weaning, and performance in dairy heifers. *J Dairy Sci.* 94.
- Kleen, J. L., Hooijer, G. A., Rehage, J., Noordhuizen, J. P. T. M. 2003. Subacute Ruminal Acidosis (SARA): a Review. *J. Vet. Med. A.* 50:406–14.
- Klieve, A. V., Hennessy, D., Ouwerkerk, D., Forster, R. J., Mackie, R. I., Attwood, G. T. 2003. Establishing populations of *Megasphaera elsdenii* YE 34 and *Butyrivibrio fibrisolvens* YE 44 in the rumen of cattle fed high grain diets. *J Appl Microbiol.* 95:621–30.
- Kosiorowska, A., Puggaard, L., Hedemann, M. S., Sehested, J., Jensen, S. K., Kristensen, N. B. 2011. Gastrointestinal development of dairy calves fed low- or high-starch concentrate at two milk allowances. *Animal.* 5:211–9.
- Krause, K. M., Oetzel, G. R. 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Anim Feed Sci Technol.* 126:215–36.
- Kung, L. J., Hession, A. O. 1995. Preventing in vitro lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation with *Megasphaera elsdenii*. *J Anim Sci.* 73:250–6.
- Laarman, A. H., Sugino, T., Oba, M. 2012. Effects of starch content of calf starter on growth and rumen pH in Holstein calves during the weaning transition. *J Dairy Sci.* 95:4478–87.
- Li, R. W., Connor, E. E., Li, C., Baldwin, R. L., Sparks, M. E. 2012. Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomic tools. *Environ Microbiol.* 14:129–39.
- Long, M., Feng, W. J., Li, P., Zhang, Y., He, R. X., Yu, L. H. 2014. Effects of the acid-tolerant engineered bacterial strain *Megasphaera elsdenii* H6F32 on ruminal pH and the lactic acid concentration of simulated rumen acidosis in vitro. *Res Vet Sci.* 96:28–9.

- Marounek, M., Fliegerova, K., Bartos, S. 1989. Metabolism and some characteristics of ruminal strains of *Megasphaera elsdenii*. *Appl Environ Microbiol.* 55:1570–3.
- McDaniel, M. R., Higgins, J. J., Heidenreich, J. M., Shelor, M. K., Parsons, G. L., Henning, P. H. 2008. Ruminal parameters of cattle drenched with a placebo, or live cultures of *Megasphaera elsdenii* strain CH4. *Abstr. ASAS-ADSA Annu. Congr. USA.*
- Meissner, H. H., Henning, P. H., Horn, C. H., Leeuw, K. J., Hagg, F. M., Fouché, G. 2010. Ruminal acidosis: A review with detailed reference to the controlling agent *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125. *S Afr J Anim Sci.* 40:79–100.
- Miller, K. A., Van Bibber-Krueger, C. L., Drouillard, J. S. 2013. Orally dosing steers with Lactipro (*Megasphaera elsdenii*) decreases the quantity of roughages fed during finishing. *Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports: Vol. 0: Iss. 1.*
- Minato, H., Otsuka, M., Shirasaka, S., Itabashi, H., Mitsumori, M. 1992. Colonization of microorganisms in the rumen of young calves. *J Gen Appl Microbiol.* 38:447–56.
- McGuirk, S.M. 2008. Disease Management of Dairy Calves and Heifers. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24, 139-153
- Mojahedi, S., Khorvash, M., Ghorbani, G. R., Ghasemi, E., Mirzaei, M., Hashemzadeh-Cigari, F. 2018. Performance, nutritional behavior, and metabolic responses of calves supplemented with forage depend on starch fermentability. *J Dairy Sci.* 101:7061–72.
- Monteiro, H. F., Agostinho, B. C., Vinyard, J. R., Harden, T., Bennett, S. L., Arce-Cordero, J. A. 2022. *Megasphaera elsdenii* and *Saccharomyces Cerevisiae* as direct fed microbials during an in vitro acute ruminal acidosis challenge. *Sci Rep.* 12:1–13.
- Morrow, C. R., Downey, B. C., Tucker, C. B. 2023. Response to novel feed in dairy calves is affected by prior hay provision and presentation method. *PLoS One.* 18:e0284889.
- Muya, M. C., Erasmus, L. J., Miller, K., Aperce, C., Nherera, F. V. 2017. Performance of Holstein calves having free access to milk and dosed with *Megasphaera elsdenii*. *Sci. Agric.* 74:189-194.
- Muya, M. C., Nherera, F. V., Miller, K. A., Aperce, C. C., Moshidi, P. M., Erasmus, L.J. 2015. Effect of *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 dosing on rumen development, volatile fatty acid production and blood β -hydroxybutyrate in neonatal dairy calves. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 99:913-8. doi: 10.1111/jpn.12306. Epub 2015 Mar 26. PMID: 25817063.
- Nagaraja, T. G., Bartley, E. E., Fina, L. R., Anthony, H. D., Bechtle, R. M. 1978. Evidence of endotoxins in the rumen bacteria of cattle fed hay or grain. *J Anim Sci.* 47:226–34.

- Nagaraja, T. G., Bartley, E. E, Fina, L. R., Anthony, H. D., Brent, B. E., Sapienza, D. A. 1979. Chemical characteristics of rumen bacterial endotoxin. *J Anim Sci.* 48:1250–6.
- Nagaraja, T. G., Taylor, M. B. 1987. Susceptibility and resistance of ruminal bacteria to antimicrobial feed additives. *Appl Environ Microbiol.* 53:1620–5.
- Nagaraja, T. G., Titgemeyer, E. C. 2007. Ruminal Acidosis in Beef Cattle : The Current Microbiological. *J Dairy Sci.* 90:E17–38..
- National Academies of Sciences and Medicine E. Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Eighth Revised Edition. Washington, DC: The National Academies Press; 2021.
- Nocek, J. E. 1997. Bovine acidosis: Implications on laminitis. *J Dairy Sci.* 80:1005–28.
- Nussio, C. M. B., Santos, F. A. P., Zopollatto, M., Pires, A. V., De Moraes, J. B., De Fernandes, J. J. R. 2003. Parâmetros de fermentação e medidas morfométricas dos compartimentos ruminais de bezerros leiteiros suplementados com milho processado (Floculado vs. Laminado a vapor) e monensina. *Rev Bras Zootec.* 32:1021–31.
- Oetzel, G. R. 2003. Sub acute ruminal acidosis in dairy cattle.
- Oetzel, G. R. 2000. Clinical Aspects of Ruminal Acidosis in Dairy Cattle. *Am Assoc Bov Pract Conf Proc.* 46–53.
- Owens, F. N., Secrist, D. S., Hill, W. J., Gill, D. R. 1998. Acidosis in cattle: a review. *J Anim Sci.* 76:275–86.
- Pardon, B., Hostens, M., Duchateau, L., Dewulf, J., De Bleecker, K., Deprez, P. 2013. Impact of respiratory disease, diarrhea, otitis and arthritis on mortality and carcass traits in white veal calves. *BMC Vet Res.* 9:1–14.
- Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I. 2006. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics.* 118:511–21.
- Penner, G. B., Oba, M. 2009. Increasing dietary sugar concentration may improve dry matter intake, ruminal fermentation, and productivity of dairy cows in the postpartum phase of the transition period. *J Dairy Sci.* 92:3341–53.
- Plaizier, J. C., Krause, D. O., Gozho, G. N., McBride, B. W. 2008. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. *Vet J.* 176:21–31.
- Porter, J. C., Warner, R. G., Kertz, A. F. 2007. Effect of Fiber Level and Physical Form of Starter on Growth and Development of Dairy Calves Fed No Forage. *Prof Anim Sci.* 23:395–400.

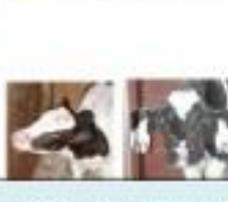
- Quigley III, J., Bernard, J., Tyberendt, T., Martin, K. 1994. Intake, Growth, and Selected Blood Parameters in Calves Fed Calf Starter via Bucket or Bottle. *J Dairy Sci.* 77:354-357.
- Quigley, J. D. 2019. Symposium review: Re-evaluation of National Research Council energy estimates in calf starters. *J Dairy Sci.* 102:3674–83.
- Quigley, J. D. 1996. Influence of weaning method on growth, intake, and selected blood metabolites in Jersey calves. *J Dairy Sci.* 79:2255–60.
- Rey, M., Enjalbert, F., Combes, S., Cauquil, L., Bouchez, O., Monteils, V. 2014. Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning is sequential. *J Appl Microbiol.* 116:245–57.
- Robinson, J. A., Smolenski, W. J., Greening, R. C., Ogilvie, M. L., Bell, R. L., Barsuhn, K. 1992. Prevention of acute acidosis and enhancement of feed intake in the bovine by *Megasphaera elsdenii* 407A. *J Anim Sci.* 70:310.
- Sakata, T., Hikosaka, K., Shiomura, A. N. Y., Tamate, D. H. 1980. Stimulatory effect of insulin on ruminal epithelium cell mitosis in adult sheep. *Br J Nutr.* 44:325–31.
- Schinwald, M., Creutzinger, K., Keunen, A., Winder, C. B., Haley, D., Renaud, D. L. 2022. Predictors of diarrhea, mortality, and weight gain in male dairy calves. *J Dairy Sci.* 105:5296–309.
- Slyter, L. L., Kern, D. L., Weaver, J. M. 1976. Effect of pH on ruminal lactic-acid utilization and accumulation invitro. *J. Anim. Sci.* 43:333–4.
- Steele, M. A., Croom, J., Kahler, M., Alzahal, O., Hook, S. E., Plaizier, K. 2011. Bovine rumen epithelium undergoes rapid structural adaptations during grain-induced subacute ruminal acidosis. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 300:1515–23.
- Stevens, K. D., Eastridge, M. L., Daniels, K. M., Finney, S. K., Leshure, S. N. 2017. Effect of oral administration of *Megasphaera elsdenii* on performance of Holstein cows during early lactation. *App Animal Sci.* 33:120-126.
- Suarez-Mena, F. X., Heinrichs, A. J., Jones, C. M., Hill, T. M., Quigley, J. D. 2016. Straw particle size in calf starters: Effects on digestive system development and rumen fermentation. *J Dairy Sci.* 99:341–53.
- Suarez-Mena, F. X., Hu, W., Dennis, T. S., Hill, T. M., Schlotterbeck, R. L. 2017. β -Hydroxybutyrate (BHB) and glucose concentrations in the blood of dairy calves as influenced by age, vaccination stress, weaning, and starter intake including evaluation of BHB and glucose markers of starter intake. *J Dairy Sci.* 100:2614–24.

- Susanto, I., Wiryawan, K. G., Suharti, S., Retnani, Y., Zahera, R., Jayanegara, A. 2023. Evaluation of *Megasphaera elsdenii* supplementation on rumen fermentation, production performance, carcass traits and health of ruminants: a meta-analysis. *Anim Biosci.* 36:879–90.
- Sweeney, B. C., Rushen, J., Weary, D. M., De Passillé, A. M. 2010. Duration of weaning, starter intake, and weight gain of dairy calves fed large amounts of milk. *J Dairy Sci.* 93:148–52.
- Terré, M., Bach, A., Devant, M. 2006. Performance and behaviour of calves reared in groups or individually following an enhanced-growth feeding programme. *J Dairy Res.* 73:480–6.
- Toledo, A. F., Dondé, S. C., Silva, A. P., Cezar, A. M., Coelho, M. G., Tomaluski, C. R. 2023. Whole-plant flint corn silage inclusion in total mixed rations for pre- and postweaning dairy calves. *J Dairy Sci.* 106:6185–97.
- Toledo, A. F., Silva, A. P., Poczynek, M., Coelho, M. G., Silva, M. D., Polizel, D. M., 2020. Whole-flint corn grain or tropical grass hay free choice in the diet of dairy calves. *J Dairy Sci.* 103:10083–98.
- Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*, Ithaca, NY: Cornell University Press.
- Weimer, P. J. 2015. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: Implications for engineering improved ruminal fermentations. *Front Microbiol.* 6:139401.
- Weimer, P. J., Da Silva, C. L., Cacite, F. 2015. Effects of ruminal dosing of Holstein cows with *Megasphaera elsdenii* on milk fat production, ruminal chemistry, and bacterial strain persistence¹. *J Dairy Sci.* 98:8078–92.
- Yeoman, C. J., White, B. A. 2014. Gastrointestinal tract microbiota and probiotics in production animals. *Annu Rev Anim Biosci.* 2:469–86.
- Yohe, T. T., Enger, B. D., Wang, L., Tucker, H. L. M., Ceh, C. A., Parsons, C. L. M. 2018. Short communication : Does early-life administration of a *Megasphaera elsdenii* probiotic affect long-term establishment of the organism in the rumen and alter rumen metabolism in the dairy calf? *J Dairy Sci.* 101:1747–51.

ANEXOS

ANEXO A. Escore de saúde de bezerros desenvolvido pela Universidade de Wisconsin-Madison (Calf Health Scoring Criteria)


**School of
Veterinary Medicine**
UNIVERSITY OF WISCONSIN-MADISON

Calf Health Scoring Criteria			
0	1	2	3
Rectal temperature			
100-100.9	101-101.9	102-102.9	≥103
Cough			
None	Induce single cough	Induced repeated coughs or occasional spontaneous cough	Repeated spontaneous coughs
Nasal discharge			
Normal serous discharge	Small amount of unilateral cloudy discharge	Bilateral, cloudy or excessive mucous discharge	Copious bilateral mucopurulent discharge
			
Eye scores			
Normal	Small amount of ocular discharge	Moderate amount of bilateral discharge	Heavy ocular discharge
			
Ear scores			
Normal	Ear flick or head shake	Slight unilateral droop	Head tilt or bilateral droop
			
Fecal scores			
Normal	Semi-formed, pasty	Loose, but stays on top of bedding	Watery, sifts through bedding
			