



MATHEUS WILSON SILVA CORDEIRO

**EFEITO DE UM ADITIVO MICROBIANO DIETÉTICO À
BASE DE *BACILLUS* NO DESEMPENHO, PARÂMETROS
SANGUÍNEOS, CARACTERÍSTICAS FECAIS,
MORFOMETRIA RUMINAL E EXPRESSÃO GÊNICA
INTESTINAL DE TOUROS DE CORTE EM TERMINAÇÃO**

**LAVRAS - MG
2025**

MATHEUS WILSON SILVA CORDEIRO

**EFEITO DE UM ADITIVO MICROBIANO DIETÉTICO À BASE DE *BACILLUS* NO
DESEMPENHO, PARÂMETROS SANGUÍNEOS, CARACTERÍSTICAS FECAIS,
MORFOMETRIA RUMINAL E EXPRESSÃO GÊNICA INTESTINAL DE TOUROS
DE CORTE EM TERMINAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador
Prof. Dr. Thiago Fernandes Bernardes

**LAVRAS - MG
2025**

MATHEUS WILSON SILVA CORDEIRO

EFEITO DE UM ADITIVO MICROBIANO DIETÉTICO À BASE DE *BACILLUS* NO DESEMPENHO, PARÂMETROS SANGUÍNEOS, CARACTERÍSTICAS FECAIS, MORFOMETRIA RUMINAL E EXPRESSÃO GÊNICA INTESTINAL DE TOUROS DE CORTE EM TERMINAÇÃO

EFFECT OF A DIETARY MICROBIAL ADDITIVE *BACILLUS*-BASED ON PERFORMANCE, BLOOD PARAMETERS, FECAL CHARACTERISTICS, RUMINAL MORPHOMETRY AND INTESTINAL GENE EXPRESSION IN FINISHING BEEF BULLS

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 19 de agosto de 2025

Dr. Flávio Augusto Portela Santos - Universidade de São Paulo (ESALQ/USP)

Dr. Pedro Henrique Vilela Carvalho - AgNext at Colorado State University

Dr. Vicente Ribeiro Rocha Júnior - Universidade Estadual de Montes Claros

Dr. Vinícius Nunes de Gouvêa - Texas A&M AgriLife Research

Orientador
Prof. Dr. Thiago Fernandes Bernardes

**LAVRAS - MG
2025**

*A Deus, por ser meu rochedo, minha fortaleza,
meu libertador. À minha mãe, por ser minha
grande incentivadora. À minha avó Maria das
Graças (in memoriam).*
Dedico!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por sempre guiar meus passos, me proteger e me fornecer a coragem para encarar com fé todas as adversidades.

À minha mãe Fabienne, se hoje tenho a possibilidade de estar realizando o doutorado, foi porque lá atrás ela cuidou, educou e incentivou alguém que só tinha um sonho. Ao meu irmão André, que sempre foi meu companheiro e amigo. Ao meu pai Geilson, por ter me possibilitado esse privilégio de conhecer e respeitar os animais. À minha avó Maria das Graças (*in memoriam*), sei o quanto a senhora torceu por isso.

Ao meu orientador, o professor Dr. Thiago Bernardes, por ter apostado no meu trabalho. Espero ter retribuído a confiança. Serei sempre grato por toda a ajuda e oportunidades que o senhor me possibilitou. Em especial, obrigado por ter confiado o presente trabalho e ter me possibilitado passar o período nos Estados Unidos.

Ao professor Dr. Vinícius Gouvêa, por ter me recebido na Texas A&M AgriLife Research at Amarillo. O senhor possibilitou a realização deste sonho pessoal e profissional. Serei sempre grato por tudo que fez por mim.

À Novonesis, na pessoa do Dr. Bruno Cappellozza, obrigado pelo apoio durante todas as etapas deste trabalho.

Ao grupo de pesquisa do professor Thiago, por toda a colaboração durante a execução de todas as atividades. Aos técnicos do Laboratório de Pesquisa Animal, Stefânia, Antônio, Flávio e Márcio, pelo auxílio e amizade.

À Natália Melo, esse doutorado foi mais leve com você. Obrigado pelo apoio em todas as etapas desse período.

Aos comitês de avaliação, tanto da qualificação quanto da defesa, muito obrigado pelo tempo cedido e pelas contribuições.

Agradeço à Universidade Federal de Lavras – UFLA, ao Departamento de Zootecnia – DZO e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFLA – PPGZ/UFLA, pela estrutura oferecida e pela oportunidade de realização do doutorado.

Agradeço à Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES) pela formação acadêmica que me proporcionou antes do meu ingresso na UFLA, contribuindo significativamente para minha trajetória profissional

Agradeço à Capes pela concessão da bolsa de estudos, que tornou possível a realização do doutorado. Espero que o investimento concedido dê frutos positivos à sociedade.

A todos que, de alguma forma, me ajudaram, muito obrigado!

*"Então, Davi pegou uma pedra do alforje e,
com a funda, atirou..."
(1 Samuel 17:49)*

RESUMO

Os aditivos alimentares são uma estratégia eficiente para melhorar o desempenho e a utilização de nutrientes em bovinos de corte. Entre essas alternativas, os *Direct-Fed Microbials* (DFMs) têm demonstrado potencial para modular a microbiota ruminal e intestinal, promovendo benefícios tanto para a saúde animal quanto para a produtividade. Foram avaliados os efeitos de um DFM contendo *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* no desempenho, morfometria ruminal, expressão gênica intestinal, parâmetros sanguíneos e fecais de touros em confinamento. Touros Nelore x Angus (n = 144; peso corporal inicial = 401 kg ± 45.5 kg) foram distribuídos aleatoriamente em 36 baias (4 touros/baia e 18 baias/tratamento) seguindo um delineamento inteiramente casualizado. Uma dieta de terminação à base de milho moído foi oferecida para ingestão *ad libitum* duas vezes ao dia durante 84 dias contendo os seguintes tratamentos: 1) controle (sem DFM); 2) DFM (*B. licheniformis* e *B. subtilis*) a $6,4 \times 10^9$ UFC (2 g) por animal. Os dados foram analisados utilizando o procedimento MIXED do SAS, tendo baia como unidade experimental, o efeito fixo do tratamento e o efeito aleatório de baia aninhado dentro de tratamento. Para os parâmetros fecais (duas coletas realizadas) o efeito de coleta e sua interação com os efeitos do tratamento foram incluídos no modelo. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas em $p \leq 0,05$. Tendências foram mencionadas se o valor de p fosse maior que 0,05, mas menor ou igual a 0,10. Os touros que receberam o tratamento DFM reduziram o consumo de matéria seca ($P \leq 0.01$), não diferiram o ganho médio diário (2.05; $P = 0.39$) e aumentaram a eficiência alimentar ($P = 0.05$) em 6% com relação ao controle. As demais variáveis de desempenho, peso final, peso de carcaça quente e rendimento de carcaça quente não diferiram ($P > 0.10$). Em relação aos parâmetros sanguíneos animais que receberam DFM tiveram a ureia plasmática reduzida em 6.2% ($P = 0.02$). Glicose, haptoglobina e lipopolissacarídeos não diferiram ($P > 0.10$). A morfometria ruminal não foi influenciada pelo tratamento ($P > 0.10$). O uso do DFM tendeu a reduzir o amido fecal ($P = 0.10$). O período influenciou o pH e amido fecal ($P < 0.01$), que foi maior para amido e menor para pH na segunda coleta. O uso do DFM aumentou a expressão gênica de tiptofano hidroxilase 1 ($P = 0.02$) e de superóxido dismutase 1 ($P = 0.03$) no duodeno dos animais. A suplementação com DFM à base de *B. licheniformis* e *B. subtilis* para touros Nelore × Angus na fase de terminação diminui a ingestão de matéria seca, não influencia o GMD, melhora a eficiência alimentar, reduz a ureia plasmática e aumenta a expressão de genes importantes para a função duodenal.

Palavras-chave: *B. licheniformis*; *B. subtilis*; Eficiência alimentar; Saúde intestinal.

ABSTRACT

Feed additives are an efficient strategy to improve performance and nutrient utilization in beef cattle. Among these alternatives, Direct-Fed Microbials (DFMs) have demonstrated potential to modulate ruminal and intestinal microbiota, promoting benefits for both animal health and productivity. The effects of a DFM containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* on performance, ruminal morphometrics, intestinal gene expression, and blood and fecal parameters of feedlot bulls were evaluated. Nelore × Angus bulls (n = 144; initial body weight = 401 kg ± 45.5 kg) were randomly distributed into 36 pens (4 bulls/pen and 18 pens/treatment) following a completely randomized design. A finishing diet based on ground corn was offered for *ad libitum* intake twice daily for 84 days, containing the following treatments: 1) control (no DFM); 2) DFM (*B. licheniformis* and *B. subtilis*) at 6.4×10^9 CFU (2 g) per animal. Data were analyzed using the MIXED procedure of SAS, with pen as the experimental unit, treatment as a fixed effect, and pen nested within treatment as a random effect. For fecal parameters (two collections), the effect of collection and its interaction with treatment were included in the model. Statistical differences were considered significant at $p \leq 0.05$. Trends were mentioned if p-value was greater than 0.05 but less than or equal to 0.10. Bulls receiving DFM treatment reduced dry matter intake ($P \leq 0.01$), did not differ in average daily gain (ADG; $P = 0.39$), and improved feed efficiency ($P = 0.05$) by 6% compared to the control. Other performance variables, final weight, hot carcass weight, and hot carcass yield, did not differ ($P > 0.10$). Regarding blood parameters, animals receiving DFM had a 6.2% reduction in plasma urea ($P = 0.02$). Glucose, haptoglobin, and lipopolysaccharides did not differ ($P > 0.10$). Ruminal morphometrics were not influenced by treatment ($P > 0.10$). DFM use tended to reduce fecal starch ($P = 0.06$). The collection period influenced fecal pH and starch ($P < 0.01$), with higher starch and lower pH in the second collection. DFM increased gene expression of tryptophan hydroxylase 1 ($P = 0.02$) and superoxide dismutase 1 ($P = 0.03$) in the duodenum of the animals. Supplementation with DFM based on *B. licheniformis* and *B. subtilis* for Nelore × Angus bulls in the finishing phase reduces dry matter intake, does not influence ADG, improves feed efficiency, and increases the expression of genes important for duodenal function.

Keywords: *B. licheniformis*; *B. subtilis*; Feed efficiency; Intestinal health.

INDICADORES DE IMPACTO

A suplementação com microbianos diretos (DFM) à base de *Bacillus licheniformis* e *B. subtilis* em bovinos de corte demonstra potencial para gerar impactos múltiplas áreas. Tecnicamente, o estudo avança na compreensão de estratégias nutricionais que modulam a microbiota intestinal, promovendo maior eficiência alimentar e reduzindo a excreção de amido fecal, o que pode inspirar o desenvolvimento de novos aditivos/combinações para bovinos de corte consumindo dietas de alto grão. Economicamente, a redução no consumo de matéria seca (3,1%) sem comprometer o ganho de peso diário (2,05 kg) sugere diminuição de custos com alimentação, um dos principais gastos na pecuária. No âmbito social, a adoção de DFM pode beneficiar produtores de todos os portes, pois a tecnologia é de fácil aplicação e promove ganhos produtivos ao otimizar recursos. A melhoria na eficiência alimentar também contribui para a segurança alimentar, ao reduzir a pressão sobre insumos. Culturalmente, os resultados incentivam uma mudança na percepção dos produtores sobre o uso de alternativas sustentáveis aos antibióticos, alinhando-se às demandas globais por práticas agropecuárias responsáveis. A expressão gênica aumentada de enzimas no duodeno abre caminho para pesquisas futuras sobre saúde intestinal e bem-estar animal. Por fim, o estudo consolida-se como uma ferramenta para a formulação de dietas mais eficientes e sustentáveis, com aplicação direta na cadeia produtiva de carne bovina.

IMPACT INDICATORS

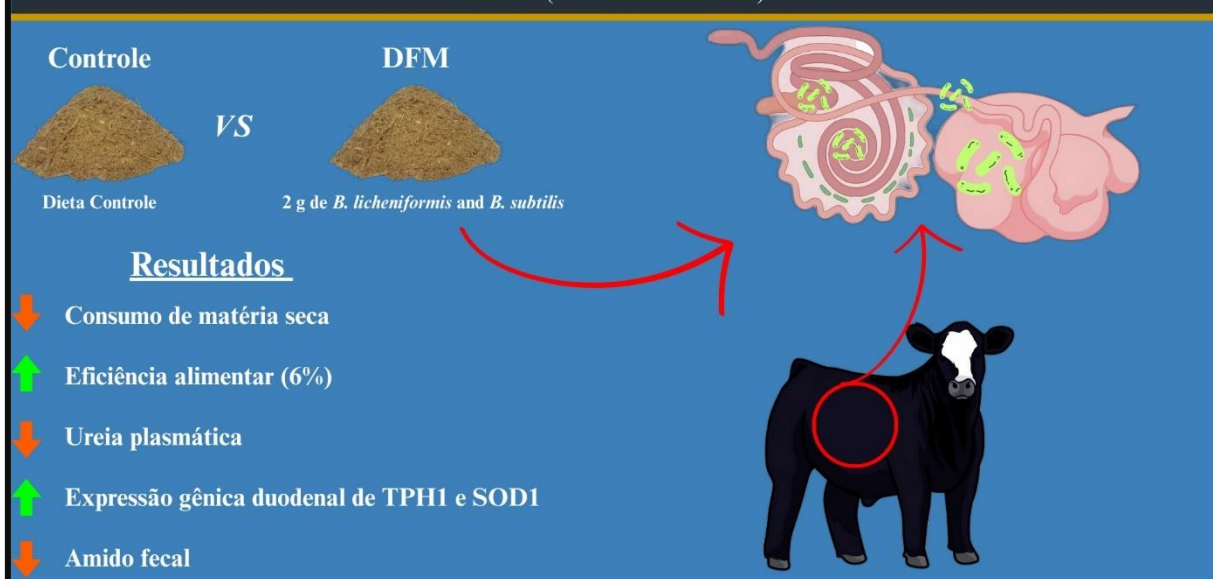
The supplementation of direct-fed microbials (DFM) based on *Bacillus licheniformis* and *B. subtilis* in beef cattle shows potential to generate impacts across multiple areas. Technologically, the study advances the understanding of nutritional strategies that modulate the gut microbiota, promoting greater feed efficiency and reducing fecal starch excretion, which may inspire the development of new additives/combinations for beef cattle fed high-grain diets. Economically, the reduction in dry matter intake (3.1%) without compromising average daily gain (2.05 kg) suggests a decrease in feed costs, one of the main expenses in livestock production. Socially, the adoption of DFM may benefit producers of all scales, as the technology is easy to apply and promotes productive gains by optimizing resources. The improvement in feed efficiency also contributes to food security by reducing pressure on inputs. Culturally, the results encourage a shift in producers' perception regarding the use of sustainable alternatives to antibiotics, aligning with global demands for responsible farming practices. The increased gene expression of enzymes in the duodenum paves the way for future research on gut health and animal welfare. Finally, the study establishes itself as a tool for formulating more efficient and sustainable diets, with direct application in the beef production chain.

RESUMO INTERPRETATIVO E RESUMO GRÁFICO

Elaborado por **Matheus Cordeiro** e orientado por **Thiago Bernardes**

O resumo gráfico tem como objetivo ilustrar os principais efeitos de um DFM contendo *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* no desempenho, expressão gênica intestinal, parâmetros sanguíneos e fecais de novilhos em confinamento. *Direct-Fed Microbials* (DFM) podem ser utilizados com o intuito de se promover melhora da saúde e desempenho. *Bacillus* spp. se destacam como DFM, pois apresentam a capacidade de influenciar positivamente no funcionamento de todo trato gastrointestinal. Os touros que receberam o tratamento DFM reduziram o consumo de matéria seca, não diferiram o ganho médio diário e aumentaram a eficiência alimentar em 6% com relação ao controle. As demais variáveis de desempenho, peso final, peso de carcaça quente e rendimento de carcaça quente não diferiram. Em relação aos parâmetros sanguíneos animais que receberam DFM tiveram a ureia plasmática reduzida em 6.2%. Glicose, haptoglobina e lipopolissacarídeos não diferiram. A morfometria ruminal não foi influenciada pelo tratamento. O uso do DFM tendeu a reduzir o amido fecal. O uso do DFM aumentou a expressão gênica de tiptofano hidroxilase 1 e de superóxido dismutase 1 ($P = 0.03$) no duodeno dos animais. Em conclusão, A suplementação com DFM à base de *B. licheniformis* e *B. subtilis* para touros Nelore \times Angus na fase de terminação diminui a ingestão de matéria seca, não influencia o GMD, melhora a eficiência alimentar, reduz a ureia plasmática e aumenta a expressão de genes importantes para a função duodenal.

Neste estudo, touros Nelore \times Angus confinados receberam 2 g de um DFM composto de *B. licheniformis* e *B. subtilis* ($6,4 \times 10^9$ UFC/animal) durante 84 dias de terminação com uma dieta contendo 50% de amido (% da matéria seca)



SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1. Surgimento dos aditivos alimentares.....	13
2.2. <i>Direct-fed microbials</i> (DFM) como aditivo para bovinos.....	15
2.3. Gênero <i>Bacillus</i>	17
2.4. Melhorias na eficiência da cadeia da carne através da utilização de <i>B. subtilis</i> e <i>B. licheniformis</i> como DFM.....	23
3. REFERÊNCIAS.....	27
CAPÍTULO II. Effects of a Bacillus-based direct-fed microbial on performance, blood parameters, fecal characteristics, rumen morphometrics, and intestinal gene expression in finishing beef bulls.....	37
INTRODUCTION.....	41
MATERIALS AND METHODS.....	42
RESULTS.....	50
DISCUSSION.....	46
CONCLUSIONS.....	49
LITERATURE CITED.....	49

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O consumo de ração é um dos principais fatores econômicos que impactam a lucratividade de confinamentos de gado de corte (Nkrumah et al., 2006). Portanto, a melhoria da eficiência alimentar (EA; ganho/consumo) representa uma importante estratégia para aumentar a sustentabilidade econômica destes sistemas (Kenny et al., 2018). Diante disso, otimizar a utilização dos nutrientes dietéticos é essencial para atingir as metas produtivas (Owens et al., 2010; Silva et al., 2021).

Aditivos alimentares são uma estratégia eficaz para melhorar o desempenho e o aproveitamento dos nutrientes por bovinos de corte (DiLorenzo e Galyean, 2010; Marques, 2022). Dentre estes, *Direct-Fed Microbials* (DFM) podem ser utilizados com o intuito de se promover melhora da saúde e desempenho (Krehbiel et al., 2003; El Jeni et al., 2024). Bactérias do gênero *Bacillus* se destacam como DFM, pois apresentam a capacidade de influenciar positivamente no funcionamento de todo trato gastrointestinal (TGI; Fuerniss et al., 2022; Limede et al., 2025). Isso decorre de sua capacidade de produzir ampla gama de enzimas, inibir o crescimento de bactérias potencialmente prejudiciais e melhorar a integridade da barreira intestinal (Cappellozza et al., 2025). Além disso, devido ao seu fornecimento ser em forma de esporos, *Bacillus* spp. permanecem viáveis durante processos de armazenamento, mistura na ração e alimentação (Bernardeau et al., 2017; Cappellozza et al., 2023a).

Estudos que utilizaram *Bacillus* spp. como DFM em gado de corte demonstraram melhora na condição corporal de novilhas prenhes e o ganho médio diário de sua prole após o desmame (Izquierdo et al., 2024), aumento do consumo de matéria seca (CMS) e digestibilidade dos nutrientes por vacas consumindo uma dieta à base de forragem (Limede et al., 2025), melhora da saúde e imunidade de bezerros de corte (Mackey et al., 2024) e na eficiência alimentar (Calaca et al., 2022; Dias et al., 2022; Lopez et al., 2024).

Em não ruminantes, *Bacillus* spp. são amplamente utilizados para melhorar a saúde e funcionamento intestinal (Luise et al., 2022). Esse efeito pode ser possível em ruminantes, uma vez que os esporos podem ser resistentes à passagem pelo abomaso e capazes de desempenhar sua função no intestino (Leser et al., 2008; Luise et al., 2022). Essa pode ser uma alternativa vantajosa para bovinos de corte alimentados com dietas ricas em grãos de cereais. Grandes quantidades de amido podem atingir o intestino grosso destes animais, o que ocasiona consequências negativas, como acidose e lesões na mucosa (Penner et al., 2014; Steele et al., 2016; Aschenbach et al., 2019; Trotta et al., 2021). No entanto, os impactos intestinais (*in vivo*)

34 da alimentação com DFM à base de *Bacillus*, e como isso interfere no desempenho, ainda
35 requerem estudos em bovinos alimentados com dietas de terminação.

36 Diante dessas considerações, a hipótese deste estudo foi que bovinos de corte
37 alimentados com um aditivo contendo *B. licheniformis* e *B. subtilis* influenciariam a expressão
38 de genes no ceco (família das proteínas de choque térmico) e no duodeno (OCLN, CAT, SOD1,
39 TPH1, TJP1 e CLDN4), e melhorariam o desempenho. O objetivo foi descrever as bases
40 teóricas da utilização de *B. licheniformis* e *B. subtilis* como um DFM (Capítulo I) e avaliar o
41 efeito de um produto DFM comercial contendo *B. licheniformis* e *B. subtilis* sobre o
42 desempenho, EA, a morfometria ruminal, a expressão gênica intestinal e os parâmetros
43 sanguíneos e fecais de touros em terminação (Capítulo II).

44

45 **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

46 **2.1. Surgimento dos aditivos alimentares**

47 Aditivo para alimentação animal é qualquer substância adicionada intencionalmente à
48 dieta, para aprimorar a qualidade dos alimentos, o desempenho ou os produtos finais dos
49 animais (Hutjens, 1991; Brasil, 2015; FAO, 2020). Essas substâncias são utilizadas desde a
50 década de 1950, acompanhando o desenvolvimento dos confinamentos americanos, que
51 adotaram dietas formuladas como parte de um sistema de produção mais intensivo (Mintert,
52 2003). O crescimento populacional nos Estados Unidos, que aumentou em mais de 19 milhões
53 de pessoas entre 1940 e 1950 (Census Bureau, 2021), elevou a demanda por proteína animal,
54 pressionando a indústria a buscar métodos mais eficientes de produção. Até então, a criação de
55 um grande número de animais em áreas confinadas havia obtido sucesso limitado, tanto por ser
56 uma prática nova, quanto pela constante ameaça de doenças infecciosas (Kiser et al., 1971).
57 Nessa perspectiva, antibióticos adicionados à dieta como aditivos alimentares surgiram como
58 uma solução eficaz para reduzir o risco de doenças em animais de corte (Wallace, 1970; Kiser
59 et al., 1971), desempenhando papel importante no desenvolvimento da indústria de carne atual.

60 O uso de antibióticos como aditivos alimentares ganhou maior evidência na observação
61 de Stokstad et al. (1949), em que resíduos de fermentação da produção comercial de
62 clortetraciclina melhoravam o ganho de peso e aumentavam a eficiência alimentar em frangos.
63 Esse efeito foi atribuído na época a simplesmente um "fator de crescimento não identificado"
64 (Nagaraja, 1995). Posteriormente, verificou-se que o crescimento observado era causado pelo
65 antibiótico residual presente no resíduo da fermentação, resultante de um processo de extração
66 ineficiente (Jukes e Williams, 1953). A inclusão dessas substâncias nas dietas dos animais de

67 produção se tornou economicamente viável, visto que, uma pequena quantidade era suficiente
68 para promover melhora no desempenho (Wallace, 1970).

69 Inicialmente se especulava que os antibióticos poderiam não apresentar benefícios em
70 ruminantes, visto que, poderia suprimir a fermentação no rúmen (Nagaraja, 1995). Essa
71 preocupação foi evidenciada para o uso em vacas leiteiras pela possibilidade de contaminação
72 no leite (Wallace, 1970). Pesquisas posteriores demonstraram que os ruminantes adultos
73 podiam tolerar os antibióticos sem apresentar efeitos negativos, o que resultou na ampla
74 utilização desses compostos como promotor de crescimento (Lassiter, 1955).

75 Um marco na história dos aditivos alimentares para bovinos ocorreu nas décadas de
76 1960 a 1970 nos Estados Unidos (Nagaraja, 1995; McGuffey et al., 2001). No início da década
77 de 1960, um nutricionista de ruminantes Dr. Arthur P. Raun da *Iowa State University* juntou-se
78 ao *Lilly Research Laboratories* para descobrir e desenvolver um produto de modificação da
79 fermentação ruminal para a indústria pecuária, com base na estequiometria e fluxo energético
80 (Richardson et al., 1976; McGuffey, 2017). Amostras de extratos de solo e produtos químicos
81 descartados na seleção para medicina humana foram analisadas, e em 1970, um composto que
82 gerou um pico de propionato foi identificado e avaliado tanto *in vitro* (Richardson et al., 1976)
83 quanto em estudos de larga escala em confinamentos (Raun et al., 1976). Composto este, a
84 monensina, antibiótico ionóforo já conhecido na época por suas propriedades coccidiostáticas
85 (Fitzgerald e Mansfield, 1973; Wallace, 1970). Os resultados obtidos foram enviados a *Food*
86 *and Drug Administration* (FDA) e a aprovação da monensina foi concedida como aditivo
87 alimentar em 1975 (McGuffey, 2017).

88 Apesar das vantagens, a utilização de antibióticos como aditivos sempre foi
89 acompanhada de discussões sobre questões de segurança, riscos de contaminação e o potencial
90 desenvolvimento de resistência bacteriana (Kiser et al., 1971). A teoria da formação da
91 resistência bacteriana aos antibióticos está diretamente relacionada à transferência horizontal
92 de genes de resistência, principalmente através de plasmídeos (Lees et al., 2021). Estudos
93 pioneiros, como Anderson e Datta (1965), demonstraram que a resistência poderia ser
94 transferida entre bactérias, como *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*, via conjugação.
95 Nesta condição, o uso de antibióticos em animais, especialmente em doses sub-terapêuticas
96 para promoção de crescimento, poderia criar um ambiente seletivo que favoreceria a
97 proliferação de bactérias resistentes.

98 Foi neste cenário que em 1986 a Suécia se tornou o primeiro país a banir o uso de
99 antibióticos como promotores de crescimento (Castanon, 2007). E as proibições continuaram
100 pela Dinamarca em 1998, e em 1999 quando a União Europeia (UE) primeiro restringiu o uso

101 de quatro antibióticos, seguindo em 2006 para proibição total (União Europeia, 2003;
102 Mingmongkolchai e Panbangred, 2018). Já nos Estados Unidos, em 2017 a FDA proibiu o uso
103 de antibióticos medicamente importantes para humanos como promotores de crescimento,
104 permitindo seu uso apenas para fins terapêuticos, sob supervisão veterinária (FDA, 2025). Cabe
105 ressaltar que em 2016, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu uma classificação
106 de antibióticos com base em sua importância para a saúde humana. Nessa classificação, os
107 ionóforos, como monensina, narasina e lasalocida, foram categorizados como "sem importância
108 para a saúde humana" (World Health Organization, 2018). Isso se deve ao fato de que esses
109 compostos não possuem aplicação terapêutica em humanos, indicando que seu uso em dietas
110 animais não representa um risco significativo à saúde pública (Marques, 2022).

111 O conhecimento sobre o papel de antibióticos, principalmente ionóforos, na melhoria
112 da eficiência produtiva dos ruminantes é consolidado (Nagaraja, 1995; McGuffey et al., 2001;
113 McGuffey, 2017). No entanto, o esforço global para se reduzir o uso na pecuária tem aumentado
114 o foco científico no desenvolvimento de alternativas, entre as quais o uso de *Direct-Fed*
115 *Microbials* se destaca como uma das estratégias mais estudadas (El Jeni et al., 2024).

116

117 **2.2. Direct-fed microbials (DFM) como aditivo para bovinos**

118 Inicialmente o termo “probiótico” foi o mais difundido, para humanos e animais, como
119 suplemento alimentar microbiano vivo, que afeta benéficamente o animal hospedeiro ao
120 melhorar o equilíbrio microbiano intestinal (Fuller, 1989). Além disso, esse termo era usado
121 para descrever culturas microbianas viáveis, extratos de culturas, preparações enzimáticas ou
122 várias combinações desses elementos (Yoon e Stern, 1995; Krehbiel et al., 2003). Isso fez com
123 que a FDA em 1989 exigisse que o termo DFM fosse empregado em vez de probiótico (Yoon e
124 Stern, 1995; FDA, 2015). Essa definição também foi restringida a produtos que supostamente
125 contêm microrganismos vivos e viáveis presentes (Krehbiel et al., 2003; FDA, 2015). No
126 entanto, do ponto de vista científico, as classificações e definições desse tipo de aditivo
127 alimentar se encontram em constante evolução (El Jeni et al., 2024).

128 Apesar do uso de DFM como aditivo ter começado a receber maior atenção na década
129 de 1980, os primórdios da ideia são anteriores. Em 1924, Eckles et al. publicaram um relatório
130 no *Journal of Dairy Science* a respeito da utilização de levedura na dieta de bezerros, isso
131 acontecendo antes da elucidação da estrutura do DNA (Newbold, 1995). A crescente
132 preocupação com o uso de hormônios e antibióticos como promotores de crescimento (Kiser et
133 al., 1971; McAllister et al., 2011), aliada a interesses comerciais, contribuiu para o renovado
134 interesse em aditivos microbianos para ração (Newbold, 1995).

135 Em bovinos, o uso de culturas microbianas tem sido uma alternativa eficaz para
136 substituir a aplicação de antibióticos em bezerros neonatos em condições de estresse, melhorar
137 a produção de leite em vacas leiteiras e aumentar a eficiência alimentar de bovinos de corte
138 (Krehbiel et al., 2003; McAllister et al., 2011; El Jeni et al., 2024; Lopes et al., 2024). Esses
139 benefícios são atribuídos a diversos mecanismos de ação. Entre os principais, destacam-se a
140 modulação do ambiente microbiano e a regulação do pH intestinal (Krehbiel et al., 2003). Nesse
141 contexto, a produção de ácidos como o lactato, contribui para a redução do pH, criando um
142 ambiente desfavorável para patógenos (Nalla et al., 2022). Outro aspecto importante é a
143 influência dos DFM na proporção molar de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC; El Jeni et
144 al., 2024). O butirato, por exemplo, fortalece a integridade do epitélio intestinal ao estimular
145 proteínas de junção estreita, como ocludinas e zonula occludens-1, reduzindo a permeabilidade
146 e promovendo uma barreira mais eficiente contra microrganismos indesejáveis (Usuda et al.,
147 2021). Além disso, os DFM competem por nutrientes e sítios de adesão no epitélio
148 gastrointestinal, inibindo a colonização por patógenos (McAllister et al., 2011). Outro
149 mecanismo relevante é a produção de compostos antimicrobianos, como bacteriocinas, que
150 auxiliam no controle de microrganismos indesejáveis (O'Connor et al., 2020). Adicionalmente,
151 os DFM podem reduzir a inflamação sistêmica por meio da imunoestimulação e modular vias
152 hormonais e inflamatórias do hospedeiro (McAllister et al., 2011; Nalla et al., 2022). Em
153 conjunto, esses efeitos contribuem para a melhora da saúde intestinal e do desempenho animal
154 (El Jeni et al., 2024). O modo de ação é específico para cada produto e varia com base nas
155 espécies presentes e no estágio fisiológico do animal.

156 Um grande número de microrganismos foi testado como DFM. Em revisão, McAllister
157 et al. (2011) descreveram como sendo os principais microrganismos utilizados, as bactérias
158 isoladas do rúmen e bactérias produtoras de ácido láctico. Com relação às isoladas do rúmen o
159 principal objetivo é alterar o perfil dos produtos de fermentação ruminal, principalmente pela
160 utilização do ácido láctico por *Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas ruminantium* e
161 *Propionibacterium freudenreichii*. Quanto aos microrganismos produtores de ácido láctico, o
162 enfoque estratégico reside em sua ação pós-ruminal. O uso de cepas selecionadas de
163 *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Pediococcus* spp. e *Enterococcus* spp. pode modular o
164 ecossistema intestinal através de dois mecanismos sinérgicos: (i) produção de bacteriocinas
165 com atividade antimicrobiana e (ii) aumento da concentração de lactato, criando um ambiente
166 hostil para patógenos entéricos como *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. (Krehbiel et al., 2003).
167 Outros microrganismos, como leveduras e alguns fungos também apresentam potencial de
168 utilização (Krehbiel et al., 2003; El Jeni et al., 2024).

169 Apesar de potencial, nem todos os microrganismos que podem gerar respostas benéficas
170 ao hospedeiro têm a capacidade para se tornar um DFM utilizável em nível de campo. Algumas
171 das cepas microbianas estudadas não conseguem manter sua viabilidade diante dos desafios
172 impostos por variações de temperatura e umidade (McAllister et al., 2011; Cappelozza et al.,
173 2023a). Essas condições adversas ocorrem ao longo de todo o processo, desde a produção,
174 envase, transporte, armazenamento e preparação da ração (Cappelozza et al., 2023a). É neste
175 cenário que bactérias formadoras de esporos ganham destaque como possíveis aditivos para
176 ruminantes. Bactérias como as do gênero *Bacillus*, são amplamente utilizadas como
177 suplementos para humanos e animais (Mingmongkolchai e Panbangred, 2018). Espécies desse
178 gênero destacam-se por formar esporos altamente resistentes com a capacidade de crescer no
179 rúmen e nos intestinos, o que pode impactar positivamente a saúde e função de todo trato
180 gastrointestinal dos ruminantes (Green et al., 1999; Fuerniss et al., 2022). Atualmente, as
181 espécies *B. licheniformis* e *B. subtilis* vêm ganhando destaque como aditivo alimentar para
182 ruminantes (Qiao et al., 2010; Elshagabee et al., 2017; Dias et al., 2022; Lopez et al., 2024) e
183 há mais tempo para os não ruminantes (Luise et al., 2022). Logo, torna-se imprescindível o
184 conhecimento sobre o gênero *Bacillus* e as potenciais espécies a serem utilizadas com aditivos
185 para os animais.

186

187 **2.3. Gênero *Bacillus***

188 O gênero *Bacillus* tem sido caracterizado como um conjunto de bactérias Gram positivas
189 que apresentam forma de bastonete, aeróbios ou anaeróbios facultativos e formadores de
190 endósporos (Logan e Vos, 2015). As espécies deste gênero são encontradas em uma ampla gama
191 de locais, tendo sido isoladas de água doce, água salgada, plantas, ar e principalmente do solo
192 (Maughan e Auwera, 2011).

193 A sobrevivência a diversas condições ambientais é um diferencial de espécies de
194 *Bacillus*. Algumas cepas podem sobreviver em condições extremas, incluindo amplas faixas de
195 temperatura e pH e altas concentrações de sal (Mandic-Mulec et al., 2016; Harirchi et al., 2022).
196 A capacidade de sobreviver a múltiplas combinações de extremas condições ambientais faz com
197 que esses microrganismos sejam considerados poliextremófilos (Logan e Vos, 2015). Essa
198 capacidade colocou algumas espécies no centro de interesses industriais (Harirchi et al., 2022).
199 Achados biotecnológicos apontam a possibilidade de produção de inúmeros compostos
200 (Guncheva e Zhiryakova, 2011).

201 Atualmente a vasta amplitude metabólica de espécies de *Bacillus* é aproveitada pela
202 indústria para a produção de enzimas (ex: amilases, celulasas, xilanases, esterases), compostos

203 bioativos (peptídeos antimicrobianos), ou uso como probióticos para humanos e animais
204 (Harirchi et al., 2022). Além disso, algumas espécies podem causar doenças como *B. cereus* e
205 *B. anthracis* (Maughan e Auwera, 2011; Logan e Vos, 2015). Estas propriedades ressaltam a
206 importância de se conhecer mais sobre estes microrganismos, visto que, algumas espécies
207 apresentam grande utilidade, e outras, perigo para saúde.

208

209 **2.3.1. Diversidade filogenética/taxonômica do gênero *Bacillus***

210 O gênero *Bacillus* é um grupo extremamente diverso de bactérias dentro do filo
211 *Firmicutes*, contemplando espécies com amplo impacto na vida humana (Patel e Gupta, 2020).
212 Ferdinand Cohn, biólogo alemão, estabeleceu o gênero *Bacillus* em 1872 para incluir as três
213 espécies de bactérias em forma de bastonete, *Bacillus subtilis* (espécie tipo), *Bacillus anthracis*
214 e *Bacillus ulna*, sem levar em conta a motilidade ou esporulação (Logan e Vos, 2015). Espécies
215 como *B. anthracis* e *B. subtilis* estavam entre as primeiras espécies de bactérias já descritas de
216 maneira sistemática no final do século 19 por Cohn e também por Robert Koch, outro biólogo
217 alemão (Maughan e Auwera, 2011).

218 A maior parte das espécies de *Bacillus* se enquadram na definição, já apresentada, de
219 bactérias em forma de bastonetes, formadoras de endósporos, aeróbias ou anaeróbias
220 facultativas (Fritze, 2004). Esta definição permanece com relevância prática, apesar da proposta
221 de espécie estritamente anaeróbica como *B. infernus*, *B. arsenicoselenatis* e *B. selenitireducens*
222 existirem (Logan e Vos, 2015). A extrema heterogeneidade das espécies se deve principalmente
223 a critérios abstratos empregados no passado para atribuir diversas espécies formadoras de
224 endósporos na presença de oxigênio para o gênero (Logan et al., 2009).

225 Com relação à diversidade filogenética o "*Bergeys's Manual of Systematics of Archaea*
226 *and Bacteria*", apresenta que atualmente 142 espécies estão incluídas no gênero *Bacillus*
227 (classificação baseada no 16S rDNA; Logan e Vos, 2015). O manual descreve que outros
228 parâmetros devem ser utilizados em análises filogenéticas/taxonômicas para se chegar a um
229 conceito mais refinado de "espécie bacteriana". Diante disso, atualizações são esperadas, como
230 exemplo, a formação de novos gêneros na família *Bacillaceae* a partir de espécies de *Bacillus*
231 (Fritze, 2004; Mandic-Mulec et al., 2016). Avanços consideráveis na classificação de bactérias
232 formadoras de endósporos são alcançados com análises genômicas (filogenômica)
233 comparativas (Gupta et al., 2020; Gaballa et al., 2021).

234 Diante do que foi apresentado, torna-se coerente realizar a classificação das espécies de
235 interesse, que serão abordadas ao longo deste texto. A classificação a seguir é baseada no
236 "*Bergeys's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*" (Logan e Vos, 2015).

237 **Domínio:** *Bacteria*
238 **Filo:** *Firmicutes*
239 **Classe:** *Bacilli*
240 **Ordem:** *Bacillales*
241 **Família:** *Bacillaceae*
242 **Gênero:** *Bacillus*
243 **Espécies:** *subtilis* e *licheniformis*
244

245 **2.3.2. Características fisiológicas e metabólicas**

246 Dentro do gênero *Bacillus* há ampla diversidade a respeito dos requisitos nutricionais e
247 ambientais para o crescimento destes microrganismos (Mandic-Mulec et al., 2016). A maioria
248 das espécies pode crescer heterotroficamente em meios simples ou enriquecidos (como em
249 ágar), não necessitando de fatores de crescimento (ex: vitaminas), no entanto, extrato de
250 levedura estimula o desenvolvimento das colônias (Harirchi et al., 2022). A maioria das
251 espécies usará glicose e/ou outros carboidratos fermentáveis como única fonte de carbono e
252 energia (Logan e Vos, 2015). Em relação às necessidades de nitrogênio, as espécies de *Bacillus*
253 podem utilizar fontes inorgânicas e orgânicas (Checinska et al., 2015). Sais de amônio podem
254 servir como única fonte, mas os aminoácidos são amplamente utilizados, além de que algumas
255 cepas podem usar ureia (Logan e Vos, 2015).

256 Outra característica geral de espécies de *Bacillus* é a faixa de temperatura de
257 crescimento, que vai desde psicrófilos (-2 a 20 °C) a termófilos (>70 °C), porém, grande parte
258 são mesófilos (25-40 °C; Harirchi et al., 2022; Logan e Vos, 2015). A seguir serão discutidas as
259 particularidades para as espécies *B. subtilis* e *B. licheniformis*.

260 Torna-se válido destacar que *B. subtilis* e *B. licheniformis* são espécies intimamente
261 relacionadas, com comportamento saprofítico (Voigt et al., 2008). Está atribuição se deve a
262 capacidade de degradar uma variedade de compostos complexos (muitas vezes do solo) e
263 utilizar os produtos da degradação como nutrientes para sustentar o crescimento, ou até mesmo,
264 garantir a sobrevivência em condições limitantes (Antelmann et al., 2001; Harirchi et al., 2022).
265 Acredita-se que a ausência de uma membrana externa (por ser Gram positivo) permita a
266 secreção de grandes quantidades de compostos diretamente no meio extracelular (Voigt et al.,
267 2006; Voigt et al., 2008), o que faz com que essas espécies sejam amplamente utilizadas pela
268 indústria (Su et al., 2020).

269
270

271 2.3.2.1. *Bacillus subtilis*

272 A variação nos nutrientes e nas condições ambientais do meio podem ocasionar
273 mudanças no desenvolvimento de culturas microbianas de *B. subtilis* (Monteiro et al., 2005).
274 Logan e Vos (2015) listam como características individuais da espécie:

275 **Características gerais:** Gram positivo, células em forma de bastonete, móveis,
276 aeróbicos ou anaeróbicos facultativos (crescimento anaeróbico pode ocorrer em meio com
277 glicose e nitrato). Células apresentam tamanho entre 0,7-0,8 por 2,0-3,0 µm, ocorrendo
278 isoladamente e em pares, raramente em cadeias.

279 **Temperatura de crescimento:** ótima de 28-30 °C, mínima de 5-20 °C e máxima de 45-
280 55 °C.

281 **pH de crescimento:** 5,5-8,5 (limites não foram registrados).

282 **Requisitos nutricionais:** necessita de glicose e um sal de amônio como fontes de
283 carbono e nitrogênio. Caseína, esculina, gelatina e amido são hidrolisados, no entanto,
284 fenilalanina e ureia não. Pectina e os polissacarídeos dos tecidos vegetais são decompostos.
285 Dextran e levan são formados extracelularmente a partir da sacarose. O citrato é utilizado como
286 única fonte de carbono pela maioria das cepas; propionato não é utilizado. O nitrato é reduzido
287 a nitrito. Cepas podem tolerar até 10% de cloreto de sódio (NaCl). Ácido sem gás é produzido
288 a partir da glicose e de uma ampla gama de outros carboidratos.

289 **Endósporos:** apresentam formato elipsoidais a cilíndricos que se situam centralmente,
290 paracentalmente e subterminalmente em esporângios não dilatados. Estes endósporos
291 apresentam alta capacidade de adesão e estão vastamente disseminados no solo, poeira e
292 vegetação.

293 As características fisiológicas apresentadas por *B. subtilis* respondem como estas
294 bactérias conseguem sobreviver em um ambiente de constante mudanças. A indústria tem
295 aproveitado da capacidade destes microrganismos, através da produção de enzimas para
296 degradar diversa variedade de substratos, proteínas para fins medicinais e emprego como
297 probiótico/DFM (Souza et al., 2017; Su et al., 2020).

298 A capacidade de biossíntese de compostos é de tamanho potencial que tem se atribuído
299 a cepas de *B. subtilis* a capacidade de serem uma “fábrica de células microbianas” (Dijl e
300 Hecker, 2013). A utilização de compostos produzidos vai desde indústria farmacêutica,
301 alimentícia, agrícola e de combustíveis (Harirchi et al., 2022). Dentre os principais produtos
302 provenientes de *B. subtilis* podemos destacar enzimas (Dijl e Hecker, 2013), proteínas
303 heterólogas (Cui et al., 2018), aminoácidos (Su et al., 2020), antibióticos (Cherukuri et al.,
304 2020) e vitaminas (Acevedo-Rocha et al., 2019).

305 Evidente que a produção em larga escala de compostos específicos requer alguma
306 técnica de manipulação gênica (Liu et al., 2017), que direciona a maquinaria de síntese
307 bacteriana para determinada rota metabólica (Su et al., 2020). No entanto, essa capacidade de
308 produção em larga escala só é possível graças ao maquinário de síntese que essas bactérias
309 possuem. Isso nos indica que em meios com nutrientes o suficientes vários compostos podem
310 vir a ser produzidos, não apenas um composto alvo, como no processo industrial (Voigt et al.,
311 2006).

312 Além de enzimas, *B. subtilis* também apresenta grande capacidade de produzir
313 vitaminas como B1, B2, B5 e B7 (Acevedo-Rocha et al., 2019). Em condições controladas, o
314 rendimento de riboflavina (vitamina B2) pode atingir até 826,52 mg/L (Su et al., 2020). No
315 entanto, cabe ressaltar que para resultados como estes são empregadas estratégias de engenharia
316 metabólica (Liu et al., 2020). Essas estratégias geralmente são baseadas na otimização do
317 metabolismo central do carbono, super expressão da síntese da vitamina e bloqueio da síntese
318 de subprodutos (Liu et al., 2020; Su et al., 2020).

319 *B. subtilis* tem a capacidade de secretar uma variedade de peptídeos antimicrobianos de
320 baixo peso molecular e bacteriocinas, como surfactina (Su et al., 2020), bacilisina
321 (Afsharmanesh et al., 2018) e subtilina (Corvey et al., 2003), que apresentam grande valor para
322 utilização tanto nas indústrias farmacêuticas, biomédicas, de alimentos e agropecuária (Smock
323 et al., 2020; Su et al., 2020; Smith et al., 2021).

324 Su et al. (2020) descrevem a capacidade de *B. subtilis* produzir um estereoisômero de
325 inositol (potencial agente terapêutico para a doença de Alzheimer), ácido hialurônico
326 (glicosaminoglicano), N-acetilglucosamina (amina acetilada derivada da glicose), ácido poli- γ -
327 glutâmico e heparosan através de técnicas de manipulação metabólica.

328 **2.3.2.2. *Bacillus licheniformis***

329 Assim como descrito para *B. subtilis*, Logan e Vos (2015) listam como características
330 individuais da espécie *B. licheniformis*:

331 **Características gerais:** Gram positivo, células em forma de bastonetes, móveis,
332 anaeróbios facultativos. Células apresenta tamanho entre 0,6-0,8 por 1,5-3,0 μm , ocorrendo
333 isoladamente, em pares e até em cadeias.

334 **Temperatura de crescimento:** mínima de 15 °C e máxima de 50-68 °C.

335 **pH de crescimento:** 5,7-6,8 (limites não foram registrados).

336 **Requisitos nutricionais:** Caseína, esculina, gelatina e amido são hidrolisados (algumas
337 cepas hidrolisam ureia), fenilalanina não é desaminada. Pectina e os polissacarídeos dos tecidos
338 vegetais são decompostos. Dextran e levan são formados extracelularmente a partir da sacarose.

339 Citrato e propionato são utilizados como únicas fontes de carbono pela maioria das cepas. O
340 nitrato é reduzido a nitrito. Ácido sem gás é produzido a partir da glicose e de uma ampla gama
341 de outros carboidratos. Cresce na presença de até 7% de NaCl.

342 **Endósporos:** apresentam formato elipsoidais a cilíndricos que se situam centralmente,
343 paracentralmente e subterminalmente em esporângios não dilatados. Estes endósporos
344 apresentam alta capacidade de adesão e estão vastamente disseminados no solo, poeira e
345 vegetação.

346 É importante destacarmos que as condições de meio podem vir a impactar na resposta
347 de *B. licheniformis*. (Voigt et al., 2006) ao avaliarem o proteoma de *B. licheniformis* observaram
348 mudanças na secreção de proteínas em função da privação de nutrientes em meios de cultura.
349 O maior nível de secreção de proteína foi alcançado na fase estacionária de crescimento em
350 meio complexo, quando as células secretaram um alto número de enzimas degradativas para
351 tornar acessíveis fontes de nutrientes. O crescimento em meio definido sob diferentes condições
352 de privação de nutrientes levou à secreção de proteínas específicas, presumivelmente
353 envolvidas na neutralização da privação. Um exemplo claro, foi que quando fosfato foi limitado
354 no meio houve indução para a formação de fitase. Fato interessante, visto que o fitato é a
355 principal forma de armazenamento de fósforo nas plantas (Logan e Vos, 2015).

356 Como já dito *B. licheniformis* e *B. subtilis* são espécies próximas (Veith et al., 2004),
357 este fato reflete nas semelhanças das enzimas produzidas (Quadro 1). Entretanto, as diferenças
358 em seus genomas promovem alterações em alguns metabólitos (Voigt et al., 2006; Voigt et al.,
359 2008). A exemplo disso, *B. licheniformis* apresenta maior potencial produtivo de metabólitos
360 (He et al., 2023), e sua α -amilase é mais termoestáveis do que aquelas obtidas de outros
361 microrganismos, incluindo outras espécies de *Bacillus spp.* (Muras et al., 2021). Outra diferença
362 apresentada é a capacidade de *B. licheniformis* em produzir ureases (He et al., 2023), capacidade
363 esta, ausente em *B. subtilis* (Logan e Vos, 2015).

364

365 **Quadro 1.** Principais enzimas produzidas por *B. subtilis* e *B. licheniformis*

Espécie produtora	Classe enzimática	Aplicação industrial
<i>B. subtilis</i> e <i>B. licheniformis</i>	Metaloprotease extracelular	Indústria de couro
	Serina protease	Agente antifúngico Indústrias de detergentes
	α - Amilase	Processos que envolvam quebra do amido
	β - lactamase (penicilinase)	Biologia Molecular e Indústria de Antibióticos
	Celulase	Indústria de biocombustíveis
	Ciclodextrina glucanotransferase	Indústria farmacêuticas, cosméticas e alimentícias
<i>B. subtilis</i>	β - Glucanase	Processos que envolvam quebra do amido
	Levansucrase	Indústrias farmacêuticas e alimentícias
	Esterase	Biodegradação
<i>B. licheniformis</i>	Glicose isomerase	Indústrias alimentícias
	Quitinase	Agente de controle biológico

366 **Fonte:** Adaptado de Harirchi et al. (2022).

367

368 **2.4. Melhorias na eficiência da cadeia da carne através da utilização de *B. subtilis* e *B.***
369 ***licheniformis* como DFM**

370 Em recente revisão Cappellozza et al. (2025) relataram os possíveis efeitos de bactérias
371 do gênero *Bacillus* em bovinos, atribuindo seus benefícios principalmente à ação no rúmen e
372 intestino. No rúmen, há uma possível melhora da digestibilidade da FDN e do amido (Pan et
373 al., 2022; Capellozza et al., 2023b; Limede et al., 2025). Já no intestino, *Bacillus* spp. colaboram
374 principalmente com a manutenção e melhora da saúde do animal. Isso pode ser atribuído à
375 capacidade de estimular a liberação de mucinas (Santano et al., 2020), imunoglobulinas e
376 citocinas por células do sistema imunológico (Sun et al., 2010; Oyebade et al., 2023), síntese e
377 liberação de compostos antimicrobianos e antioxidantes (Luise et al., 2022), competir por
378 superfície de adesão do epitélio com microrganismos patogênicos (Mingmongkolchai e
379 Panbangred, 2018) e manter a integridade do epitélio na presença de desafios (Boll et al., 2024).

380 Essa junção de benefícios resulta geralmente em melhoria da eficiência alimentar (Dias
381 et al., 2022; Guimaraes et al., 2024; Miller et al., 2024). Porém, as respostas podem ser

382 inconsistentes (Cappelozza et al., 2025). Essa variação decorre da incomparabilidade direta
383 entre os estudos, devido às diferenças entre as espécies e cepas, tipos de dieta, concentrações
384 de nutrientes e o nível de ingestão dos animais (Lopez et al., 2024). No entanto, a suplementação
385 das atuais misturas bacterianas de DFM para bovinos não parece causar efeitos negativos, e
386 melhorias no desempenho são relatadas com frequência (Krehbiel et al., 2003; McAllister et
387 al., 2011; El Jeni et al., 2024; Lopez et al., 2024; Cappelozza et al., 2025). Isso faz com que
388 sua utilização seja encorajada em diferentes fases na cadeia do gado de corte.

389 A ocorrência de eventos prejudiciais à saúde, como diarreia e pneumonia na fase de cria,
390 pode comprometer a produtividade (Heinrichs e Heinrichs, 2011; Buczinski et al., 2021) e a
391 eficiência de deposição de carcaça em sistemas de corte (Richeson et al., 2012). Diante disso,
392 estratégias que minimizem problemas sanitários e melhorem o desempenho são indispensáveis
393 para manutenção rentável dos sistemas produtivos nessa fase. Nesse sentido, *Bacillus* spp.
394 podem auxiliar na proteção do epitélio intestinal e minimizar potenciais prejuízos decorrentes
395 de bactérias enteropatogênicas.

396 Magalhães et al. (2024) compararam grupos de bezerras (Holandês X Gir) no pré-
397 desmame recebendo dois tipos de DFM, (i) *B. licheniformis* 809 e *B. subtilis* 810 (BAC; $3,2 \times$
398 10^9 UFC/cabeça) e (ii) BAC junto com *Enterococcus faecium* 669 ($13,2 \times 10^9$ UFC/cabeça)
399 contra um grupo controle. Foi observado que, independentemente do tratamento, o
400 fornecimento do DFM tendeu a reduzir a ocorrência de diarreia de 50% para 30% e reduziu as
401 ocorrências de pneumonia de 47% para 27% dos animais. Os autores relataram que as razões
402 pela qual o DFM reduziu a ocorrência de pneumonia ainda são desconhecidas, porém,
403 especularam que a microbiota intestinal desempenha papel importante na ocorrência e
404 gravidade de infecções pulmonares. Com relação à redução da ocorrência de diarreia, além da
405 ação local contra adesão ao epitélio por microrganismos enteropatogênicos (Mingmongkolchai
406 e Panbangred, 2018), *Bacillus* spp. auxiliam na ação do sistema imune intestinal. Essa ação foi
407 corroborada por Wang et al. (2022) que observaram aumento na concentração plasmática de
408 imunoglobulinas e redução no número de intervenções medicamentosas em bezerros
409 holandeses recebendo *B. subtilis*.

410 Os efeitos positivos da utilização de DFM baseado em *Bacillus* spp. são perceptíveis até
411 mesmo após o período mais crítico da vida de bezerros. Copani et al. (2025) avaliaram os efeitos
412 do fornecimento de *B. licheniformis* 809 e *B. subtilis* 810 (DFM, $3,2 \times 10^9$ UFC/cabeça) para
413 bezerros da raça holandesa após os 14 dias de vida, período considerado pelos autores menos
414 crítico em relação à ocorrência de diarreia e pneumonia, em dois experimentos. A ocorrência
415 dessas enfermidades não diferiu entre os grupos recebendo DFM ou controle. No entanto, nos

416 dois experimentos realizados animais recebendo DFM apresentaram peso final superior (7.1%
417 no primeiro estudo e 8.6% no segundo).

418 Com a melhora do estado de saúde naturalmente os bezerros tendem a apresentar
419 melhores taxa de crescimento. Isso pode estar atrelado à de melhora dos atributos funcionais
420 do trato gastrointestinal (Steele et al., 2016). Sun et al. (2011) estudaram o efeito de *B. subtilis*
421 sobre o desenvolvimento do epitélio ruminal de bezerros holandeses. Foi observado aumento
422 de 22% e 15% no número de papilas por cm² em animais recebendo 1×10^{10} UFC de *B. subtilis*
423 no desmame e 44 dias após, respectivamente, quando comparado a animais do controle. Esses
424 achados podem ajudar a explicar resultados com os de Du et al. (2018), que observaram um
425 incremento de 46% no ganho de peso de bezerros taurinos com retardo de crescimento durante
426 um período de 30 dias com a suplementação de *B. subtilis*.

427 A suplementação com *Bacillus* spp. pode apresentar amplos efeitos em sistemas de
428 produção. Além da ação direta na saúde e no desenvolvimento de bezerros, benefícios indiretos
429 podem ser alcançados quando matrizes são suplementadas com esse tipo de DFM. Neste
430 sentido, efeitos de transferência materna podem influenciar significativamente o desempenho
431 pós-desmame da prole. No estudo de Izquierdo et al. (2024), a suplementação de novilhas
432 Brangus com DFM contendo *B. licheniformis* e *B. subtilis* ($6,6 \times 10^9$ UFC/cabeça/dia), durante
433 o período de 139 dias antes do parto até 104 dias após o parto, resultou em bezerros com peso
434 6% superior ao grupo controle após 77 dias de recria.

435 Atualmente não são encontrados trabalhos que avaliem os benefícios do fornecimento
436 de *B. subtilis* e *B. licheniformis* desde o nascimento ao abate. No entanto, animais que
437 apresentam maiores taxas de ganho quando bezerros, têm melhor desempenho ao final da
438 terminação (Abitante et al., 2024). Diante disso, no cenário atual em que bovinos são abatidos
439 cada vez mais cedo, *Bacillus* spp. podem colaborar com ganhos substanciais na fase de vida
440 inicial, além de melhorar as condições do trato gastrointestinal, de forma que os animais possam
441 chegar em melhores condições na terminação.

442 Os avanços na produção de bovinos de corte têm sido impulsionados, em parte, pela
443 adoção de dietas de alta densidade energética na fase de terminação (Silva et al., 2024). Bovinos
444 confinados geralmente consomem dietas ricas em concentrado por longos períodos de tempo,
445 assim, a manutenção da saúde gastrointestinal torna-se crítica para maximizar a eficiência de
446 utilização de nutrientes (Dias et al., 2022; Cappellozza et al., 2025). Nessa perspectiva, *Bacillus*
447 spp. parecem colaborar com estes aspectos auxiliando na eficiência alimentar de animais
448 confinados recebendo dietas com alta energia.

449 Os problemas de saúde em bovinos durante a fase de terminação representam desafios
450 produtivos significativos, porém intervenções nutricionais podem mitigar esses efeitos,
451 reduzindo as taxas de descarte (Galyean et al., 2022). Neste sentido, Guimaraes et al. (2024)
452 forneceram para novilhos em terminação um DFM composto de *Lactobacillus animalis*,
453 *Propionibacterium freudenreichii*, *B. licheniformis* e *B. subtilis* (50 mg/animal dia). Como
454 resultados, a suplementação com DFM aumentou em 5% a eficiência alimentar, reduziu a taxa
455 de remoção advinda de doenças e óbito (de 1,61 % para 0,11%) e diminuiu a prevalência de
456 abscessos hepáticos pós-abate em 30%. Esses autores especularam que a redução no percentual
457 de abscessos hepáticos pudesse estar relacionada a um pH ruminal mais estável dos animais
458 que consumiram o DFM. Este mecanismo encontra suporte nos achados de Silva et al. (2024),
459 que, utilizando uma formulação microbiana similar, registraram redução de 300 min/dia no
460 tempo de permanência do pH ruminal abaixo de 5,6 que é o limiar crítico para desenvolvimento
461 de acidose subaguda.

462 Lopez et al. (2024) também avaliaram os efeitos da suplementação com uma
463 combinação de bactérias composta por *L. animalis*, *P. freudenreichii*, *B. licheniformis* e *B.*
464 *subtilis* (50 mg/animal dia do DFM) sobre o desempenho, digestibilidade e características de
465 carcaça de novilhos mestiços Angus. Os animais receberam dietas à base de milho floculado a
466 vapor durante 153 dias, sendo alocados em três tratamentos: (1) controle (sem DFM); (2)
467 tratamento-A, contendo os quatro microrganismos em proporção 1:1:1:3, totalizando 6×10^9
468 UFC/cabeça/dia; e (3) tratamento-B, com a mesma combinação, mas na proporção 1:1:3:1. Os
469 autores observaram que bovinos suplementados com o tratamento-A apresentaram melhora
470 significativa no GMD (+6,7%) e na eficiência alimentar (+6%), além de tendência de aumento
471 no peso final (+15 kg) e no peso de carcaça quente (+10 kg) em comparação ao grupo controle.
472 A digestibilidade aparente da matéria seca, da fibra em detergente neutro e da hemicelulose
473 também apresentou tendência de aumento nos animais do grupo tratamento-A. Em
474 contrapartida, o tratamento-B não promoveu diferenças significativas em relação ao controle.
475 Já no estudo de Miller et al. (2024), com os mesmos microrganismos utilizados (dose de 50
476 mg/animal dia, não informado a UFC) o DFM aumentou o ganho de peso diário apenas nos
477 primeiros 55 dias (+6%), aumentou o consumo de matéria seca geral (+3%) e o rendimento de
478 carcaça (+1,3%), sem influência na eficiência alimentar.

479 Ainda com relação a melhora de desempenho com o emprego de DFM contendo
480 *Bacillus* spp. Dias et al. (2022) investigaram diferentes combinações de DFM na fermentação
481 ruminal, desempenho e características de carcaça de bovinos Nelore alimentados com dieta de
482 alto concentrado em dois experimentos, um de metabolismo e outro de desempenho. Os

483 tratamentos consistiram em uma dieta controle sem probióticos, uma dieta suplementada com
 484 1 g/animal contendo *Enterococcus faecium* e *Saccharomyces cerevisiae* ($3,5 \times 10^9$ UFC/g) e
 485 outra com 2 g/animal contendo *B. licheniformis* e *B. subtilis* ($3,2 \times 10^9$ UFC/g). Os resultados
 486 indicaram que a suplementação com DFM, independentemente do tipo, reduziu a relação
 487 acetato:propionato (-17%) e a concentração de amônia ruminal (-6%), além de tender a
 488 melhorar o ganho de peso diário e a eficiência alimentar.

489 Em resumo, os estudos demonstram que os DFMs contendo *Bacillus* spp. melhoram o
 490 desempenho de bovinos em terminação. Essa melhora pode ser atribuída à estabilização do pH
 491 ruminal (Silva et al., 2024), aumento da digestibilidade (Lopez et al., 2024) e modulação da
 492 fermentação ruminal (Dias et al., 2022). Adicionalmente, reduzem problemas sanitários, como
 493 abscessos hepáticos e taxas de descarte (Guimaraes et al., 2024), reforçando seu papel na saúde
 494 gastrointestinal e eficiência produtiva de bovinos sob dietas de alto concentrado.

495

496

REFERÊNCIAS

497 ABITANTE, G.; LEME, P. R.; DE PAULA CARLIS, M. S.; RAMÍREZ-ZAMUDIO, G. D.;
 498 GOMES, B. I. P.; DE ANDRADE, L. B.; GOULART, R. S.; PUGLIESI, G.; SARAN
 499 NETTO, A.; DAHLEN, C. R.; SILVA, S. L. Effects of Early Weaning on Performance and
 500 Carcass Quality of Nellore Young Bulls. **Animals**, v. 14, n. 5, 2024. DOI:
 501 10.3390/ani14050779.

502 ACEVEDO-ROCHA, C. G.; GRONENBERG, L. S.; MACK, M.; COMMICHAU, F. M.;
 503 GENEÉ, H. J. Microbial cell factories for the sustainable manufacturing of B vitamins.
 504 **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 18–29, 2019. DOI:
 505 10.1016/j.copbio.2018.07.006.

506 AFSHARMANESH, H.; PEREZ-GARCIA, A.; ZERIOUH, H.; AHMADZADEH, M.;
 507 ROMERO, D. Aflatoxin degradation by *Bacillus subtilis* UTB1 is based on production of an
 508 oxidoreductase involved in bacilysin biosynthesis. **Food Control**, v. 94, p. 48–55, 2018. DOI:
 509 10.1016/j.foodcont.2018.03.002.

510 ANDERSON, E. S.; DATTA, N. Resistance to Penicillins and Its Transfer in
 511 *Enterobacteriaceae*. **Lancet**, v. 1, n. 7382, p. 407-409, 1965. DOI: 10.1016/s0140-
 512 6736(65)90004-8

513 ANTELMANN, H.; TJALSMA, H.; VOIGT, B.; OHLMEIER, S.; BRON, S.; VAN DIJL, J.
 514 M.; HECKER, M. A proteomic view on genome-based signal peptide predictions. **Genome**
 515 **Research**, v. 11, n. 9, p. 1484–1502, 2001. DOI: 10.1101/gr.182801.

516 ASCHENBACH, J. R.; ZEBELI, Q.; PATRA, A. K.; GRECO, G.; AMASHEH, S.; PENNER,
 517 G. B. Symposium review: The importance of the ruminal epithelial barrier for a healthy and
 518 productive cow. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 2, p. 1866–1882, 2019. DOI:
 519 10.3168/jds.2018-15243.

520 BERNARDEAU, M.; LEHTINEN, M. J.; FORSSTEN, S. D.; NURMINEN, P. Importance of
 521 the gastrointestinal life cycle of *Bacillus* for probiotic functionality. **Journal of Food Science**
 522 **and Technology**, v. 54, n. 8, p. 2570–2584, 2017. DOI: 10.1007/s13197-017-2688-3.

- 523 BOLL, E. J.; COPANI, G.; CAPPELLOZZA, B. I. *Bacillus paralicheniformis* 809 and
524 *Bacillus subtilis* 810 support *in vitro* intestinal integrity under hydrogen peroxide and
525 deoxynivalenol challenges. **Translational Animal Science**, v. 8, 2024. DOI:
526 10.1093/tas/txae061.
- 527 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa
528 Agropecuária. **Instrução Normativa nº 44, de 15 de dezembro de 2015**. Dispõe sobre
529 aditivos para alimentação animal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 dez. 2015.
- 530 BUCZINSKI, S.; ACHARD, D.; TIMSIT, E. Effects of calfhooD respiratory disease on health
531 and performance of dairy cattle: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Dairy**
532 **Science**, v. 104, n. 7, p. 8214–8227, 2021. DOI: 10.3168/jds.2020-19941.
- 533 CALACA, A. M. M.; FIGUEIREDO, C. B.; SILVA, M. B.; FERNANDES, J. J. R.;
534 FERNANDES, M. H. M. R.; SILVA, L. F.; COUTO, V. R. M. Effect of a *Bacillus* probiotic
535 strain on Nellore cattle finished on pasture during the dry season. **Livestock Science**, v. 264,
536 2022. DOI: 10.1016/j.livsci.2022.105068.
- 537 CAPPELLOZZA, B. I.; COOKE, R. F.; AMARAL, R. C.; BACH, A.; ENGLE, T. E.;
538 FERRARETTO, L. F.; MARQUES, R. S.; MILLER, A. C.; MORIEL, P.; VENDRAMINI, J.
539 M. B. Ruminant Nutrition Symposium: Novel microbial solutions to optimize production
540 efficiency in beef and dairy systems. **Journal of Animal Science**, 2025. DOI:
541 10.1093/jas/skaf165.
- 542 CAPPELLOZZA, B. I.; JOERGENSEN, J. N.; COPANI, G.; BRYAN, K. A.; FANATINATI,
543 P.; BODIN, J. C.; KHAHI, M. M.; NINODEGUZMAN, C.; ARRIOLA, K. G.; LIMA, L. O.;
544 FAROOQ, S.; VYAS, D. Evaluation of a *Bacillus*-based direct-fed microbial probiotic on *in*
545 *vitro* rumen gas production and nutrient digestibility of different feedstuffs and total mixed
546 rations. **Translational Animal Science**, v. 7, n. 1, 2023b. DOI: 10.1093/tas/txad044.
- 547 CAPPELLOZZA, B. I.; SEGURA, A.; MILORA, N.; GALSCHIOET, C.; SCHJELDE, M.;
548 COPANI, G. Stability of *Bacillus* and *Enterococcus faecium* 669 Probiotic Strains When
549 Added to Different Feed Matrices Used in Dairy Production. **Animals**, v. 13, n. 14, 2023a.
550 DOI: 10.3390/ani13142350.
- 551 CASTANON, J. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry
552 feeds. **Poultry Science**, v. 86, n. 11, p. 2466-2471, 2007.
- 553 CENSUS BUREAU. **Historical Population Change Data (1910-2020)**. 2021. Disponível
554 em: <<https://www.census.gov/data/tables/time-series/dec/popchange-data-text.html>>. Acesso
555 em: 1 jan. 2025.
- 556 CHECINSKA, A.; PASZCZYNSKI, A.; BURBANK, M. *Bacillus* and other spore-forming
557 genera: Variations in responses and mechanisms for survival. **Annual Review of Food**
558 **Science and Technology**, v. 6, p. 351–369, 2015. DOI: 10.1146/annurev-food-030713-
559 092332.
- 560 CHERUKURI, P. K.; SONGKIATISAK, P.; DING, F.; JAULT, J. M.; XU, X. H. N. Antibiotic
561 Drug Nanocarriers for Probing of Multidrug ABC Membrane Transporter of *Bacillus subtilis*.
562 **ACS Omega**, v. 5, n. 3, p. 1625–1633, 2020. DOI: 10.1021/acsomega.9b03698.
- 563 COPANI, G.; MORRILL, K.; QUEIROZ, O. C. M.; CAPPELLOZZA, B. I. *Bacillus* spp.
564 supplementation stimulates the growth of preweaning bull calves offered milk replacer and
565 pelleted starter supplement. **Applied Animal Science**, v. 41, n. 2, p. 76–84, 2025. DOI:
566 10.15232/aas.2024-02626.

- 567 CORVEY, C.; STEIN, T.; DÜSTERHUS, S.; KARAS, M.; ENTIAN, K. D. Activation of
568 subtilin precursors by *Bacillus subtilis* extracellular serine proteases subtilisin (AprE), WprA,
569 and Vpr. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 304, n. 1, p. 48–54,
570 2003. DOI: 10.1016/S0006-291X(03)00529-1.
- 571 CUI, W.; HAN, L.; SUO, F.; LIU, Z.; ZHOU, L.; ZHOU, Z. Exploitation of *Bacillus subtilis*
572 as a robust workhorse for production of heterologous proteins and beyond. **World Journal of**
573 **Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 10, p. 1–19, 2018. DOI: 10.1007/s11274-018-
574 2531-7.
- 575 DIAS, B. G. C.; SANTOS, F. A. P.; MESCHIATTI, M.; BRIKNER, B. M.; ALMEIDA, A. A.;
576 QUEIROZ, O.; CAPPELLOZZA, B. I. Effects of feeding different probiotic types on
577 metabolic, performance, and carcass responses of *Bos indicus* feedlot cattle offered a high-
578 concentrate diet. **Journal of Animal Science**, v. 100, n. 10, 2022. DOI: 10.1093/jas/skac289.
- 579 DIJL, J. M.; HECKER, M. *Bacillus subtilis*: From soil bacterium to super-secreting cell
580 factory. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 1, p. 1–6, 2013. DOI: 10.1186/1475-2859-12-3.
- 581 DILORENZO, N.; GALYEAN, M. L. Applying technology with newer feed ingredients in
582 feedlot diets: do the old paradigms apply? **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 13 Supl.,
583 2010. DOI: 10.2527/jas.2009-2362.
- 584 DU, R.; JIAO, S.; DAI, Y.; AN, J.; LV, J.; YAN, X.; WANG, J.; HAN, B. Probiotic *Bacillus*
585 *amyloliquefaciens* C-1 improves growth performance, stimulates GH/IGF-1, and regulates the
586 gut microbiota of growth-retarded beef calves. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018. DOI:
587 10.3389/fmicb.2018.02006
- 588 ECKLES, C. H.; WILLIAMS, V. M.; WILBUR, J. W.; PALMER, L. S.; HARSHAW, H. M.
589 Yeast as a Supplementary Feed for Calves. **Journal of Dairy Science**, v. 7, n. 5, p. 421-424,
590 1924. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(24)94040-9
- 591 EL JENI, R.; VILLOT, C.; KOYUN, O. Y.; OSORIO-DOBLADO, A.; BALOYI, J. J.;
592 LOURENCO, J. M.; STEELE, M.; CALLAWAY, T. R. Invited review: “Probiotic”
593 approaches to improving dairy production: Reassessing “magic foo-foo dust.” **Journal of**
594 **Dairy Science**, v. 107, n. 4, p. 1832–1856, 2024. DOI: 10.3168/jds.2023-23831.
- 595 ELSHAGHABEE, F. M. F.; ROKANA, N.; GULHANE, R. D.; SHARMA, C.; PANWAR, H.
596 *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. **Frontiers in**
597 **Microbiology**, v. 8, p. 1490, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01490
- 598 FITZGERALD, P. R.; MANSFIELD, M. E. Efficacy of monensin against bovine coccidiosis
599 in young holstein-friesian calves. **The Journal of Protozoology**, v. 20, n. 1, p. 121-126, 1973.
- 600 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Environmental performance of**
601 **feed additives in livestock supply chains: Guidelines for assessment - Version 1**. 2020.
602 Disponível em: <<https://doi.org/10.4060/ca9744en>>. Acesso em: 26 mar. 2025.
- 603 FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Antimicrobial Resistance**. 2025.
604 Disponível em: <[https://www.fda.gov/animal-veterinary/safety-health/antimicrobial-](https://www.fda.gov/animal-veterinary/safety-health/antimicrobial-resistance)
605 [resistance](https://www.fda.gov/animal-veterinary/safety-health/antimicrobial-resistance)>. Acesso em: 1 jan. 2025.
- 606 FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **CPG Sec. 689.100 Direct-Fed Microbial**
607 **Products**. 2015. Disponível em: <[https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-](https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/cpg-sec-689100-direct-fed-microbial-products)
608 [guidance-documents/cpg-sec-689100-direct-fed-microbial-products](https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/cpg-sec-689100-direct-fed-microbial-products)>. Acesso em: 5 mar.
609 2025.

- 610 FRITZE, D. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: The aerobic endospore-
611 forming bacteria. **Phytopathology**, v. 94, n. 11, p. 1245–1248, 2004. DOI:
612 10.1094/PHYTO.2004.94.11.1245.
- 613 FUERNISS, L. K.; KREIKEMEIER, K. K.; REED, L. D.; CRAVEY, M. D.; JOHNSON, B. J.
614 Cecal microbiota of feedlot cattle fed a four-species *Bacillus* supplement. **Journal of Animal**
615 **Science**, v. 100, n. 10, 2022. DOI: 10.1093/jas/skac258.
- 616 FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, n. 5, p.
617 365-378, 1989.
- 618 GABALLA, A.; CHENG, R. A.; TRMCIC, A.; KOVAC, J.; KENT, D. J.; MARTIN, N. H.;
619 WIEDMANN, M. Development of a database and standardized approach for rpoB sequence-
620 based subtyping and identification of aerobic spore-forming *Bacillales*. **Journal of**
621 **Microbiological Methods**, v. 191, p. 106350, 2021. DOI: 10.1016/j.mimet.2021.106350.
- 622 GALYEAN, M. L.; DUFF, G. C.; RIVERA, J. D. Galyean Appreciation Club Review:
623 revisiting nutrition and health of newly received cattle - what have we learned in the last 15
624 years? **Journal of Animal Science**, v. 100, n. 4, 2022. DOI: 10.1093/jas/skac067.
- 625 GREEN, D. H.; WAKELEY, P. R.; PAGE, A.; BARNES, A.; BACCIGALUPI, L.; RICCA, E.;
626 CUTTING, S. M. Characterization of Two *Bacillus* Probiotics. **Applied and Environmental**
627 **Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 4288-4291, 1999.
- 628 GUIMARAES, O.; PREEDY, G.; FOX, J. T.; CAPPELLOZZA, B. I.; DAVIS, T. C.;
629 SCHUTZ, J. S.; THEURER, M. E. A Novel Direct-Fed Microbial Impacts Growth
630 Performance and Supports Overall Health of Feedlot Cattle. **Ruminants**, v. 4, n. 2, p. 267–
631 279, 2024. DOI: 10.3390/ruminants4020019.
- 632 GUNCHEVA, M.; ZHIRYAKOVA, D. Catalytic properties and potential applications of
633 *Bacillus* lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 1, p. 1–21, 2011.
634 DOI: 10.1016/j.molcatb.2010.09.002.
- 635 GUPTA, R. S.; PATEL, S.; SAINI, N.; CHEN, S. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus*
636 species clades, proposed as novel bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative
637 genomic analyses: Description of *robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an
638 emended genus *Bacillus* limiting it o. **International Journal of Systematic and**
639 **Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 5753–5798, 2020. DOI: 10.1099/ijsem.0.004475.
- 640 HARIRCHI, S.; SAR, T.; RAMEZANI, M.; ALIYU, H.; ETEMADIFAR, Z.; NOJOU MI, S.
641 A.; YAZDIAN, F.; AWASTHI, M. K.; TAHERZADEH, M. J. *Bacillales*: From Taxonomy to
642 Biotechnological and Industrial Perspectives. **Microorganisms**, v. 10, n. 12, p. 1–47, 2022.
643 DOI: 10.3390/microorganisms10122355.
- 644 HE, H.; YU, Q.; DING, Z.; ZHANG, L.; SHI, G.; LI, Y. Biotechnological and food synthetic
645 biology potential of platform strain: *Bacillus licheniformis*. **Synthetic and Systems**
646 **Biotechnology**, v. 8, n. 4, p. 281–291, 2023. DOI: 10.1016/j.synbio.2023.03.008.
- 647 HEINRICHS, A. J.; HEINRICHS, B. S. A prospective study of calf factors affecting first-
648 lactation and lifetime milk production and age of cows when removed from the herd. **Journal**
649 **of Dairy Science**, v. 94, n. 1, p. 336–341, 2011. DOI: 10.3168/jds.2010-3170.
- 650 HUTJENS, M. F. Feed Additives. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal**
651 **Practice**, v. 7, n. 1, p. 167-184, 1991. DOI: 10.1016/s0749-0720(15)30789-1

- 652 IZQUIERDO, V. S.; CAPPELLOZZA, B. I.; SILVA, J. V. L.; SANTOS, G. C. M.;
653 MIRANDA, A.; BITTAR, J. H. J.; PICKETT, A.; MACKEY, S.; COOKE, R. F.;
654 VENDRAMINI, J. M. B.; MORIEL, P. Maternal pre- and postpartum supplementation of a
655 *Bacillus*-based DFM enhanced cow and calf performance. **Journal of Animal Science**, v.
656 102, 2024. DOI: 10.1093/jas/skaf110.
- 657 JUKES, T. H.; WILLIAMS, W. L. Nutritional effects of antibiotics. **Pharmacological**
658 **Reviews**, v. 5, n. 4, p. 381-420, 1953.
- 659 KENNY, D. A.; FITZSIMONS, C.; WATERS, S. M.; MCGEE, M. Invited review: Improving
660 feed efficiency of beef cattle - The current state of the art and future challenges. **Animal**, v.
661 12, n. 9, p. 1815–1826, 2018. DOI: 10.1017/S1751731118000976.
- 662 KISER, J. S.; GALE, G. O.; KEMP, G. A.; MERCER, H. D. Antibiotics As Feedstuff
663 Additives: The Risk-Benefit Equation For Man. **CRC Critical Reviews in Toxicology**, v. 1,
664 n. 1, p. 55-92, 1971. DOI: 10.3109/10408447109104301
- 665 KREHBIEL, C. R.; RUST, S. R.; ZHANG, G.; GILLILAND, S. E. Bacterial direct-fed
666 microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. **Journal of Animal**
667 **Science**. v. 81, n. 14, p. 120-132, 2003. DOI: 10.2527/2003.8114_suppl_2E120x
- 668 LASSITER, C. A. Antibiotics as Growth Stimulants for Dairy Cattle: A Review. **Journal of**
669 **Dairy Science**, v. 38, n. 10, p. 1102-1118, 1955. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(55)95086-4
- 670 LEES, P.; PELLIGAND, L.; GIRAUD, E.; TOUTAIN, P. L. A history of antimicrobial drugs
671 in animals: Evolution and revolution. **Journal of Veterinary Pharmacology and**
672 **Therapeutics**, v. 44, p. 137-171, 2021. DOI: 10.1111/jvp.12895
- 673 LESER, T. D.; KNARREBORG, A.; WORM, J. Germination and outgrowth of *Bacillus*
674 *subtilis* and *Bacillus licheniformis* spores in the gastrointestinal tract of pigs. **Journal of**
675 **Applied Microbiology**, v. 104, n. 4, p. 1025–1033, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-
676 2672.2007.03633.x.
- 677 LIMEDE, A. C.; MARQUES, R. S.; CIDRINI, F. A. A.; CRUZ, V. A.; QUEIROZ, A. C. M.;
678 CIDRINI, I. A.; FARIAS, I. M. S. A.; RODRIGUES, A. N.; SCHOLLJEGERDES, E. J.;
679 SOUZA, I. S.; COOKE, R. F.; GRESSE, R.; VESTERGAARD, G.; CAPPELLOZZA, B. I.
680 Effects of a *Bacillus*-based direct-fed microbial on digestibility, ruminal in situ nutrient
681 disappearance, microbiome, and fermentation parameters in forage-fed beef cattle. **Journal of**
682 **Animal Science**, v. 103, 2025. DOI: 10.1093/jas/skaf093.
- 683 LIU, S.; HU, W.; WANG, Z.; CHEN, T. Production of riboflavin and related cofactors by
684 biotechnological processes. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 1–16, 2020. DOI:
685 10.1186/s12934-020-01302-7.
- 686 LIU, Y.; LI, J.; DU, G.; CHEN, J.; LIU, L. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* fueled
687 by systems biology: Recent advances and future directions. **Biotechnology Advances**, v. 35,
688 n. 1, p. 20–30, 2017. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.11.003.
- 689 LOGAN, N. A.; BERGE, O.; BISHOP, A. H.; BUSSE, H. J.; DE VOS, P.; FRITZE, D.;
690 HEYNDRICKX, M.; KÄMPFER, P.; RABINOVITCH, L.; SALKINOJA-SALONEN, M. S.;
691 SELDIN, L.; VENTOSA, A. Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic,
692 endospore-forming bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary**
693 **Microbiology**, v. 59, n. 8, p. 2114–2121, 2009. DOI: 10.1099/ij.s.0.013649-0.

- 694 LOGAN, N. A.; VOS, P. *Bacillus*. In: WHITMAN, W. B.; RAINEY, F.; KÄMPFER, P.;
695 TRUJILLO, M.; CHUN, J.; DEVOS, P.; HEDLUND, B.; DEDYSH, S. (ed.). *Bergey's*
696 *manual of systematics of archaea and bacteria*. 1. ed. Wiley, p. 1–164, 2015.
- 697 LOPEZ, A. M.; SARTURI, J. O.; JOHNSON, B. J.; WOERNER, D. R.; HENRY, D. D.;
698 CIRIACO, F. M.; SILVA, K. G. S.; RUSH, C. J. Effects of bacterial direct-fed microbial
699 combinations on beef cattle growth performance, feeding behavior, nutrient digestibility,
700 ruminal morphology, and carcass characteristics. **Journal of Animal Science**, v. 102, 2024.
701 DOI: 10.1093/jas/skae004.
- 702 LUISE, D.; BOSI, P.; RAFF, L.; AMATUCCI, L.; VIRDIS, S.; TREVISI, P. *Bacillus* spp.
703 Probiotic Strains as a Potential Tool for Limiting the Use of Antibiotics, and Improving the
704 Growth and Health of Pigs and Chickens. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022. DOI:
705 10.3389/fmicb.2022.801827.
- 706 MACKEY, S. J.; COOKE, R. F.; PICKETT, A. T.; CAPPELLOZZA, B. I.; HARVEY, K. M.;
707 KARISCH, B. B. Supplementing a *Bacillus*-based probiotic to high-risk stocker cattle.
708 **Journal of Animal Science**, v. 102, 2024. DOI: 10.1093/jas/skae209.
- 709 MAGALHÃES, J.; CAPPELLOZZA, B. I.; DOS SANTOS, T. C.; INOE, F.; PESSOA
710 ARAÚJO JÚNIOR, J.; KURISSIO, J. K.; QUEIROZ, O.; JOERGENSEN, J. N.; COOKE, R.
711 F.; VASCONCELOS, C. G. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Effects of supplementing direct-
712 fed microbials on health and growth of preweaning Gyr × Holstein dairy calves. **Journal of**
713 **Dairy Science**, v. 107, n. 8, p. 6117–6130, 2024. DOI: 10.3168/jds.2023-24434.
- 714 MANDIC-MULEC, I.; STEFANIC, P.; VAN ELSAS, J. D. Ecology of *bacillaceae*. In: *The*
715 *Bacterial Spore: From Molecules to Systems*. Washington, DC: American Society for
716 Microbiology, p. 59–85, 2016. DOI: 10.1128/9781555819323.ch3.
- 717 MARQUES, R. Otimização do uso de diferentes aditivos em dietas de bovinos de corte. In:
718 SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 12., 2022, Viçosa, MG. **Anais do XII**
719 **Simpósio de Produção de Gado de Corte**. Viçosa, MG: UFV, DZO, 2022. p. 123.
- 720 MAUGHAN, H.; AUWERA, V. G. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to
721 be essential though often misleading. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 4, p. 789–
722 797, 2011. DOI: 10.1016/j.meegid.2011.02.001.
- 723 MCALLISTER, T. A.; BEAUCHEMIN, K. A.; ALAZZEH, A. Y.; BAAH, J.; TEATHER, R.
724 M.; STANFORD, K. Review: The use of direct fed microbials to mitigate pathogens and
725 enhance production in cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 91, n. 2, p. 193-211,
726 2011. DOI: 10.4141/CJAS10109
- 727 MCGUFFEY, R. K. A 100-year review: metabolic modifiers in dairy cattle nutrition. **Journal**
728 **of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10113-10142, 2017. DOI: 10.3168/jds.2017-12987
- 729 MCGUFFEY, R. K.; RICHARDSON, L. F.; WILKINSON, J. I. D. Ionophores for dairy
730 cattle: current status and future outlook. **Journal of Dairy Science**, v. 84, Suppl., p. 194-203,
731 2001. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(01)70200-5
- 732 MILLER, A. C.; MEZZOMO, R.; GOMES, D. I.; LOH, H. Y.; LEVENSON, J. R.;
733 GUIMARAES, O.; TANGREDI, B. V.; ZUCHEGNO, S. M.; CHEK, E.; CAPPELLOZZA, B.
734 I.; SCHUTZ, J. S.; ENGLE, T. E. Influence of BOVAMINE DEFEND Plus on growth
735 performance, carcass characteristics, estimated dry matter digestibility, rumen fermentation
736 characteristics, and immune function in finishing beef steers. **Translational Animal Science**,
737 v. 8, 2024. DOI: 10.1093/tas/txae045.

- 738 MINGMONGKOLCHAI, S.; PANBANGRED, W. *Bacillus* probiotics: an alternative to
739 antibiotics for livestock production. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 3, p. 638-
740 654, 2018. DOI: 10.1111/jam.13690
- 741 MINTERT, J. Beef feedlot industry. **Veterinary Clinics of Food Animal Practice**, v. 19, n. 2,
742 p. 387-395, 2003. DOI: 10.1016/S0749-0720(03)00030-9
- 743 MONTEIRO, S. M.; CLEMENTE, J. J.; HENRIQUES, A. O.; GOMES, R. J.; CARRONDO,
744 M. J.; CUNHA, A. E. A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*.
745 **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 4, p. 1026–1031, 2005. DOI: 10.1021/bp050062z.
- 746 MURAS, A.; ROMERO, M.; MAYER, C.; OTERO, A. Biotechnological applications of
747 *Bacillus licheniformis*. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 4, p. 609–627, 2021.
748 DOI: 10.1080/07388551.2021.1873239.
- 749 NAGARAJA, T. G. Ionophores and antibiotics in ruminants. In: WALLACE, R. J.;
750 CHESSON, A. (Ed.). **Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding**. New York:
751 VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1995. cap. 9, p. 1-20. DOI: 10.1002/9780470377033.ch9
- 752 NALLA, K.; MANDA, N. K.; DHILLON, H. S.; KANADE, S. R.; ROKANA, N.; HESS, M.;
753 PUNIYA, A. K. Impact of Probiotics on Dairy Production Efficiency. **Frontiers in**
754 **Microbiology**, v. 13, p. 805963, jun. 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2022.805963
- 755 NEWBOLD, C. J. Microbial feed additives for ruminants. In: WALLACE, R. J.; CHESSON,
756 A. (Ed.). **Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding**. New York: VCH
757 Verlagsgesellschaft mbH, 1995. cap. 13.
- 758 NKRUMAH, J. D.; OKINE, E. K.; MATHISON, G. W.; SCHMID, K.; LI, C.; BASARAB, J.
759 A.; PRICE, M. A.; WANG, Z.; MOORE, S. S. Relationships of feedlot feed efficiency,
760 performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy
761 partitioning in beef cattle 1. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 1, p. 145, 2006. DOI:
762 10.2527/2006.841145x
- 763 O'CONNOR, P. M.; KUNIYOSHI, T. M.; OLIVEIRA, R. P. S.; HILL, C.; ROSS, R. P.;
764 COTTER, P. D. Antimicrobials for food and feed; a bacteriocin perspective. **Current**
765 **Opinion in Biotechnology**, v. 61, p. 209-215, fev. 2020. DOI: 10.1016/j.copbio.2019.10.007
- 766 OWENS, F. N.; SAPIENZA, D. A.; HASSEN, A. T. Effect of nutrient composition of feeds
767 on digestibility of organic matter by cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 13
768 Supl., 2010. DOI: 10.2527/jas.2009-2559. DOI: 10.2527/jas.2009-2559
- 769 OYEBADE, A. O.; LEE, S.; SULTANA, H.; ARRIOLA, K.; DUVALSAINT, E.; NINO DE
770 GUZMAN, C.; FERNANDEZ MARENCHINO, I.; MARROQUIN PACHECO, L.; AMARO,
771 F.; GHEDIN GHIZZI, L.; MU, L.; GUAN, H.; ALMEIDA, K. V.; RAJO ANDRADE, B.;
772 ZHAO, J.; TIAN, P.; CHENG, C.; JIANG, Y.; DRIVER, J.; VYAS, D. Effects of direct-fed
773 microbial supplementation on performance and immune parameters of lactating dairy cows.
774 **Journal of Dairy Science**, v. 106, n. 12, p. 8611–8626, 2023. DOI: 10.3168/jds.2022-22898.
- 775 PAN, L.; HARPER, K.; QUEIROZ, O.; COPANI, G.; CAPPELLOZZA, B. I. Effects of a
776 *Bacillus*-based direct-fed microbial on in vitro nutrient digestibility of forage and high-starch
777 concentrate substrates. **Translational Animal Science**, v. 6, n. 2, 2022. DOI:
778 10.1093/tas/txac067.
- 779 PATEL, S.; GUPTA, R. S. A phylogenomic and comparative genomic framework for
780 resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species,

- 781 *peribacillus* gen. nov., *cytobacillus* gen. nov., *mesobacillus* gen. nov., *neobacillus* gen. nov.,
782 *metabacillu*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n.
783 1, p. 406–438, 2020. DOI: 10.1099/ijsem.0.003775.
- 784 PENNER, G. B.; ASCHENBACH, J. R.; WOOD, K.; WALPOLE, M. E.; KANAFANY-
785 GUZMAN, R.; HENDRICK, S.; CAMPBELL, J. Characterising barrier function among
786 regions of the gastrointestinal tract in Holstein steers. **Animal Production Science**, v. 54, n.
787 9, p. 1282–1287, 2014. DOI: 10.1071/AN14285.
- 788 QIAO, G. H.; SHAN, A. S.; MA, N.; MA, Q. Q.; SUN, Z. W. Effect of supplemental *Bacillus*
789 cultures on rumen fermentation and milk yield in Chinese Holstein cows. **Journal of Animal**
790 **Physiology and Animal Nutrition**, v. 94, n. 4, p. 432–436, ago. 2010. DOI: 10.1111/j.1439-
791 0396.2009.00926.x
- 792 RAUN, A. P.; COOLEY, C. O.; POTTER, E. L.; RATHMACHER, R. P.; RICHARDSON, L.
793 F. Effect of monensin on feed efficiency of feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v. 43,
794 n. 3, p. 670–677, 1976. DOI: 10.2527/jas1976.433670x
- 795 RICHARDSON, L. F.; RAUN, A. P.; POTTER, E. L.; COOLEY, C. O.; RATHMACHER, R.
796 P. Effect of monensin on rumen fermentation *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Animal Science**,
797 v. 43, n. 3, p. 678–685, 1976. DOI: 10.2527/jas1976.433678x
- 798 RICHESON, J. T.; KEGLEY, E. B.; POWELL, J. G.; BECK, P. A.; LEY, B. L. VANDER;
799 RIDPATH, J. F. Weaning management of newly received beef calves with or without
800 continuous ex-posure to a persistently infected bovine viral diarrhea virus pen mate: Effects
801 on health, performance, bovine viral diarrhea virus titers, and peripheral blood leukocytes 1.
802 **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 6, p. 1972–1985, 2012. DOI: 10.2527/jas2011-4077.
- 803 SANTANO, N. B.; BOLL, E. J.; CAPERN, L. C.; CIEPLAK, T. M.; KELESZADE, E.;
804 LETEK, M.; COSTABILE, A. Comparative evaluation of the antimicrobial and mucus
805 induction properties of selected bacillus strains against enterotoxigenic escherichia coli.
806 **Antibiotics**, v. 9, n. 12, p. 1–10, 2020. DOI: 10.3390/antibiotics9120849.
- 807 SILVA, B. C.; PACHECO, M. V. C.; GODOI, L. A.; SOUZA, G. A. P.; TRÓPIA, N. V.;
808 PUCETTI, P.; SILVA, F. A. S.; MENEZES, A. C. B.; RENNÓ, L. N.; PAULINO, M. F.;
809 SCHOONMAKER, J. P.; VALADARES FILHO, S. C. Feed intake, nutrient digestibility, and
810 selected rumen parameters in feedlot bulls fed diets with different feed additives. **PLoS ONE**,
811 v. 16, n. 11, p. e0259414, 2021. DOI: 10.1371/journal.pone.0259414
- 812 SILVA, S. K. G.; SARTURI, J. O.; JOHNSON, B. J.; WOERNER, D. R.; LOPEZ, A. M.;
813 RODRIGUES, B. M.; NARDI, K. T.; RUSH, C. J. Effects of bacterial direct-fed microbial
814 mixtures offered to beef cattle consuming finishing diets on intake, nutrient digestibility,
815 feeding behavior, and ruminal kinetics/ fermentation profile. **Journal of Animal Science**, v.
816 102, 2024. DOI: 10.1093/jas/skae003.
- 817 SMITH, Z. K.; BROADWAY, P. R.; UNDERWOOD, K. R.; RUSCHE, W. C.; WALKER, J.
818 A.; BURDICK SANCHEZ, N. C.; CARROLL, J. A.; LAFLEUR, D.; HERGENREDER, J. E.
819 Evaluation of *Bacillus subtilis* PB6 on feedlot phase growth performance, efficiency of
820 dietary net energy utilization, and fecal and subiliac lymph node Salmonella prevalence in
821 spring placement yearling beef steers fed in southeastern South Dakota. **Translational**
822 **Animal Science**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 2021. DOI: 10.1093/tas/txab002.
- 823 SMOCK, T. M.; SAMUELSON, K. L.; HERGENREDER, J. E.; ROUNDS, P. W.;
824 RICHESON, J. T. Effects of *Bacillus subtilis* PB6 and/or chromium propionate

- 825 supplementation on clinical health, growth performance, and carcass traits of high-risk cattle
826 during the feedlot receiving and finishing periods. **Translational Animal Science**, v. 4, n. 4,
827 p. 1–12, 2020. DOI: 10.1093/tas/txaa163.
- 828 SOUZA, V. L.; LOPES, N. M.; ZACARONI, O. F.; SILVEIRA, V. A.; PEREIRA, R. A. N.;
829 FREITAS, J. A.; ALMEIDA, R.; SALVATI, G. G. S.; PEREIRA, M. N. Lactation
830 performance and diet digestibility of dairy cows in response to the supplementation of
831 *Bacillus subtilis* spores. **Livestock Science**, v. 200, p. 35–39, 2017. DOI:
832 10.1016/j.livsci.2017.03.023.
- 833 STEELE, M. A.; PENNER, G. B.; CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; GUAN, L. L.
834 Development and physiology of the rumen and the lower gut: Targets for improving gut
835 health. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 6, p. 4955–4966, 2016. DOI: 10.3168/jds.2015-
836 10351.
- 837 STOKSTAD, E. L. R.; JUKES, T. H.; PIERCE, J.; PAGE, A. C., Jr.; FRANKLIN, A. L. The
838 multiple nature of the animal protein factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 180, n. 2, p.
839 647-654, 1949.
- 840 SU, Y.; LIU, C.; FANG, H.; ZHANG, D. *Bacillus subtilis*: A universal cell factory for
841 industry, agriculture, biomaterials and medicine. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 1–
842 12, 2020. DOI: 10.1186/s12934-020-01436-8.
- 843 SUN, P.; WANG, J. Q.; ZHANG, H. T. Effects of *Bacillus subtilis* natto on performance and
844 immune function of preweaning calves. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5851–
845 5855, 2010. DOI: 10.3168/jds.2010-3263.
- 846 SUN, P.; WANG, J. Q.; ZHANG, H. T. Effects of supplementation of *Bacillus subtilis* natto
847 Na and N1 strains on rumen development in dairy calves. **Animal Feed Science and**
848 **Technology**, v. 164, n. 3-4, p. 154–160, 2011. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2011.01.003.
- 849 TROTTA, R. J.; HARMON, D. L.; MATTHEWS, J. C.; SWANSON, K. C. Nutritional and
850 Physiological Constraints Contributing to Limitations in Small Intestinal Starch Digestion and
851 Glucose Absorption in Ruminants. **Ruminants**, v. 2, n. 1, p. 1–26, 2022. DOI:
852 10.3390/ruminants2010001.
- 853 UNIÃO EUROPEIA. Parlamento Europeu e Conselho. **Regulamento (CE) n.º 1831/2003, de**
854 **22 de Setembro de 2003**. Relativo aos aditivos destinados à alimentação animal. Jornal
855 Oficial da União Europeia, Bruxelas, 18 out. 2003. L 268/29.
- 856 USUDA, H.; OKAMOTO, T.; WADA, K. Leaky Gut: Effect of Dietary Fiber and Fats on
857 Microbiome and Intestinal Barrier. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n.
858 14, p. 7613. 2021. DOI: 10.3390/ijms22147613
- 859 VEITH, B.; HERZBERG, C.; STECKEL, S.; FEESCHE, J.; MAURER, K. H.;
860 EHRENREICH, P.; BÄUMER, S.; HENNE, A.; LIESEGANG, H.; MERKL, R.;
861 EHRENREICH, A.; GOTTSCHALK, G. The complete genome sequence of *Bacillus*
862 *licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. **Journal of Molecular**
863 **Microbiology and Biotechnology**, v. 7, n. 3-4, p. 204–211, 2004. DOI: 10.1159/000079829.
- 864 VOIGT, B.; ANTELMANN, H.; ALBRECHT, D.; EHRENREICH, A.; MAURER, K. H.;
865 EVERS, S.; GOTTSCHALK, G.; VAN DIJL, J. M.; SCHWEDER, T.; HECKER, M. Cell
866 physiology and protein secretion of *Bacillus licheniformis* compared to *Bacillus subtilis*.
867 **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 1-2, p. 53–68, 2008. DOI:
868 10.1159/000142894.

- 869 VOIGT, B.; SCHWEDER, T.; SIBBALD, M. J. J. B.; ALBRECHT, D.; EHRENREICH, A.;
870 BERNHARDT, J.; FEESCHE, J.; MAURER, K. H.; GOTTSCHALK, G.; VAN DIJL, J. M.;
871 HECKER, M. The extracellular proteome of *Bacillus licheniformis* grown in different media
872 and under different nutrient starvation conditions. **Proteomics**, v. 6, n. 1, p. 268–281, 2006.
873 DOI: 10.1002/pmic.200500091.
- 874 WALLACE, H. D. Biological responses to antibacterial feed additives in diets of meat
875 producing animals. **Journal of Animal Science**, v. 31, n. 6, p. 1118-1126, 1970. DOI:
876 10.2527/jas1970.3161118x
- 877 WANG, H.; YU, Z.; GAO, Z.; LI, Q.; QIU, X.; WU, F.; GUAN, T.; CAO, B.; SU, H. Effects
878 of compound probiotics on growth performance, rumen fermentation, blood parameters, and
879 health status of neonatal Holstein calves. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 3, p. 2190–
880 2200, 2022. DOI: 10.3168/jds.2021-20721
- 881 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Critically important antimicrobials for human**
882 **medicine: 6th revision 2018: ranking of medically important antimicrobials for risk**
883 **management of antimicrobial resistance due to non-human use.** Geneva: World Health
884 Organization, 2019. Disponível em: <<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo>>.
885 Acesso em: 5 mar. 2025.
- 886 YOON, I. K.; STERN, M. D. Influence of direct-fed microbials on ruminal microbial
887 fermentation and performance of ruminants: a review. **Asian-Australasian Journal of**
888 **Animal Science**, v. 8, n. 6, p. 533-555, dez. 1995.

889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912

CAPÍTULO II

O capítulo a seguir segue as normas de submissão do periódico científico *Journal of Animal Science*, com exceção da localização das tabelas e figuras, que foram inseridas junto ao texto para facilitar a visualização.

Effects of a *Bacillus*-based direct-fed microbial on performance, blood parameters, fecal characteristics, rumen morphometrics, and intestinal gene expression in finishing beef bulls†

Matheus Wilson Silva Cordeiro*, Thiago Fernandes Bernardes*¹

* Federal University of Lavras, Lavras, MG 37, Brazil.

¹Corresponding author: Thiago Fernandes Bernardes (thiagobernades@ufla.br).

†Este trabalho já se encontra disponível para toda a comunidade científica no periódico *Journal of Animal Science*. O endereço do artigo no periódico é: <https://doi.org/10.1093/jas/skae259>.

913 **Lay Summary.**

914 One of the main alternatives of additives to modulate the microbial population in the
915 gastrointestinal tract (GIT), especially in the intestine, is the use of direct-fed microbials (DFM).
916 This class of additives comprises all the feed products that contain a live or naturally occurring
917 source of microorganism. The inclusion of DFM in diets of ruminants in the finishing phase
918 may improve gain:feed by modifying the composition of the microbial community in the GIT
919 to bring about a better symbiotic relationship with the host. These effects may be achieved with
920 the use of *Bacillus* spp. bacteria, such as *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. Mixtures
921 of these bacteria are able to foster positive effects in the finishing phase of beef cattle fed high-
922 energy diets, which reinforces the need for studies that examine the effects and mechanisms of
923 these species. In this study, feedlot Nelore × Angus bulls that received a DFM composed of *B.*
924 *licheniformis* and *B. subtilis* had decreased dry matter intake, no influence on average daily gain,
925 improved gain:feed, and an increase in expression of genes important for duodenal function.

926

927

928

929 **Teaser Text**

930 Direct-fed microbials based on *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* fed to Nelore ×
931 Angus bulls during the finishing phase reduced dry matter intake, maintained average daily
932 gain, and improved feed efficiency through their action in reducing fecal starch and increasing
933 beneficial gene expression in the duodenum.

934

935 **ABSTRACT.** We evaluated the effects of supplementing direct-fed microbials (DFM),
936 containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*, on performance, rumen morphometrics,
937 intestinal gene expression, and blood and fecal parameters in finishing bulls. Nellore × Angus
938 bulls (n = 144; initial BW = 401 ± 45.5 kg) were distributed at random in 36 pens (4 bulls/pen
939 and 18 pens/treatment), following a completely randomized design. A ground corn-based
940 finishing diet was offered for ad libitum intake twice a day for 84 d, containing the following
941 treatments: 1) control (without DFM); 2) DFM (*B. licheniformis* and *B. subtilis*) at 6.4×10^9
942 CFU (2 g) per animal. The data were analyzed using the MIXED procedure of SAS, with a pen
943 representing an experimental unit, the fixed effect of the treatment, and the random effect of
944 pen nested within the treatment. For fecal parameters (two collections made), the collection
945 effect and its interaction with the treatment were included in the model. Bulls that received the
946 DFM had a decreased dry matter intake ($P \leq 0.01$), did not differ in average daily gain (2.05 kg;
947 $P = 0.39$), and had a 6% improvement in gain:feed ($P = 0.05$). The other performance variables,
948 final BW, hot carcass weight, and hot carcass yield, did not differ ($P > 0.10$). Plasma urea-N
949 concentration decreased by 6.2% ($P = 0.02$) in the bulls that received DFM. Glucose,
950 haptoglobin, and lipopolysaccharides were not different between treatments ($P > 0.10$).
951 Ruminal morphometrics were not affected by the treatment ($P > 0.10$). The use of DFM tended
952 to reduce fecal starch ($P = 0.10$). At slaughter, bulls fed DFM had an increased duodenal gene
953 expression of tryptophan hydroxylase-1 ($P = 0.02$) and of superoxide dismutase-1 ($P = 0.03$).
954 Overall, supplementation with DFM based on *B. licheniformis* and *B. subtilis* to Nellore ×
955 Angus bulls in the finishing phase decreased dry matter intake, did not influence ADG,
956 improved gain:feed, and increased the expression of genes important for duodenal function.

957 **Keywords:** *B. licheniformis*, *B. subtilis*, gain:feed, gene expression, intestinal health

958

LIST OF ABBREVIATIONS

959

960 **ADG** = average daily gain;961 **AS** = ash;962 **CON** = control;963 **CP** = crude protein;964 **DFM** = direct-fed microbials;965 **DM** = dry matter;966 **DMI** = dry matter intake;967 **EE** = ether extract;968 **FE** = feed efficiency;969 **HCW** = hot carcass weight;970 **HCY** = hot carcass yield;971 **LPS** = lipopolysaccharide;972 **NDF** = neutral detergent fiber;973 **NFC** = non-fiber carbohydrates;974 **peNDF** = physically effective neutral detergent fiber;975 **ST** = starch.

976

INTRODUCTION

977

978 Finishing cattle on high-energy diets allows for earlier slaughter and improved carcass
979 quality (McGregor et al., 2012; Drouillard, 2018). However, finishing cattle can develop
980 metabolic disorders when fed high-energy diets (Nagaraja and Titgemeyer, 2007; Cooke, 2017),
981 such as ruminal acidosis. To mitigate these problems, feed additives can be used to improve the
982 performance and health of feedlot cattle (Nagaraja and Taylor, 1987; Marques and Cooke,
983 2021).

984

985 Direct-fed microbials (DFM) have been adopted as alternatives to traditional antibiotic
986 additives (El Jeni et al., 2024). Among eubiotic approaches, bacteria of the *Bacillus* genus show
987 promise for application in livestock systems, as they are supplied in the form of spores, ensuring
988 their survival and stability during storage and feeding processes (Bernardeau et al., 2017;
989 Cappellozza et al., 2023a). In addition, *Bacillus* spp. demonstrate an ability to grow both in the
990 rumen and in the intestine, which may positively impact the health and function of the entire
991 gastrointestinal tract (Green et al., 1999; Fuerniss et al., 2022). *Bacillus* spp. are characterized
992 as producers of a wide range of enzymes (Qiao et al., 2010; van Dijl and Hecker, 2013), and
993 can increase fiber and starch degradation *in vitro* (Pan et al., 2022; Cappellozza et al., 2023b).
994 Supplementation with bacterial endospores of the *Bacillus* genus resulted in increased
995 production of milk, protein, and solids, and improved milk/dry matter intake (DMI) in dairy
996 cows (Sun et al., 2013; Souza et al., 2017). Moreover, for beef cattle, previous studies indicate
997 improved G:F (Calaca et al., 2022; Dias et al., 2022; Lopez et al., 2024).

998

999 In non-ruminants, bacteria of the *Bacillus* genus are widely used to improve intestinal
1000 health (Luise et al., 2022). This may be possible in ruminants since the spores may be resistant
1001 in passing through the abomasum and able to function in the intestine (Leser et al., 2008; Luise
1002 et al., 2022). For beef cattle consuming high-energy diets, this may be a beneficial situation
since a large amount of starch can reach the large intestine of cattle which can have negative
consequences, such as acidosis and mucosal lesions (Penner et al., 2014; Steele et al., 2016;

1029 Agener União Saúde Animal, Embu-Guaçu, Brazil; 1 mL/44 kg weight; TRUCID; Elanco
1030 Animal Health, Greenfield, United States; 1 mL/50 kg weight). To acclimate bulls to the
1031 facilities, all bulls were fed a common diet based on corn silage, dry-ground corn, soybean
1032 meal, and mineral mix (without any additive) for 5 d prior to experiment initiation (from day
1033 -5 to day -1). The pens (4 × 14 m; n = 36) were divided by wooden posts and wire, equipped
1034 with individual waterers and feed troughs (4 m). Pen was assigned to one of two treatments:
1035 finishing a diet without any additive (CON), or the same diet containing 2 g of DFM/animal
1036 per day (DFM). The DFM was composed of *B. licheniformis* 809 and *B. subtilis* 810 (3.2×10^9
1037 CFU/g; BOVACILLUS; Novonesis, Hørsholm, Denmark). A batch of a vitamin and mineral
1038 supplement with and without the DFM was received every 30 d. The CON supplement
1039 contained clay which is an inert substance to replace the direct-fed microbial in the DFM
1040 supplement. To administer the product, the supplement with DFM was first mixed with the
1041 concentrate and, before feeding, with the other ingredients of the diet. The complete
1042 composition and the nutritional profile of the diets are shown in Table 1. Treatment diets were
1043 fed for 84 d. The adaptation period was 15 d and consisted of three diets with progressive
1044 increases in concentrate (5 d each), varying from a roughage:concentrate proportion (dry basis)
1045 of 50:50 to 41:59 and finally 32:68. The final diet had a proportion of 23:77 and was formulated
1046 using the NASEM (2016) recommendations to provide an average daily gain (ADG) of 1.9
1047 kg/d. Throughout the experimental period, the diets were provided twice a day (at 0800 and
1048 1500 hours) in equal proportions, as a total feed mixture. The diet was weighed daily with an
1049 electronic balance and offered to ensure ad libitum intake, allowing 3% to 5% of orts. To
1050 minimize the risk of cross-contamination, each treatment was managed by a different group of
1051 people that did not participate in the management of the other. In addition, all equipment used,
1052 such as pails, bags, and shovels, were marked with specific colors and designated exclusively
1053 for only one of the treatments.

1054 **Table 1.** Ingredients, chemical composition, and particle size distribution of the diets used

Item	Diet			
	Step 1 (0 to 5 d)	Step 2 (6 to 10 d)	Step 3 (11 to 15 d)	Final diet (16 to 84 d)
Ingredients, % DM				
Corn silage	50.0	41.0	32.0	23.0
Ground corn	38.0	47.0	56.0	65.0
Soybean meal	8.00	8.00	8.00	8.00
Urea	1.00	1.00	1.00	1.00
Mineral/vitamin supplement ¹	3.00	3.00	3.00	3.00
Chemical composition				
Dry matter	48.3	55.0	60.1	62.9
Ash	4.74	4.80	4.71	5.31
Crude protein	13.1	13.1	13.1	13.4
Neutral detergent insoluble fiber	34.5	27.1	25.4	22.9
apNDF ²	32.3	26.4	24.7	22.2
peNDF ³	17.2	13.6	12.2	10.8
Ether extract	3.04	3.60	3.40	3.67
Starch	37.6	43.5	49.7	50.4
Non-fiber carbohydrates	44.6	51.4	53.4	54.7
Non-starch non-fiber carbohydrates	6.96	7.92	3.69	4.33
Particle size distribution of diet	% of the total			
>8 mm	31.5	26.0	21.9	18.1
< 8 > 4 mm	28.0	25.6	20.2	17.9
< 4 mm	40.5	48.4	57.9	63.9
Particle size distribution of ground corn	% of the total			
>3.35 mm	0.00			
<3.35 e >2.36 mm	4.00			
<2.36 e >1.7 mm	16.0			
<1.7 e >1.18 mm	20.0			
<1.18 e > 0.6 mm	30.0			
<0.6 mm	30.0			
Mean particle size of corn ⁴ , mm	1.03			

1055 ¹Composition: calcium 190 g/kg, phosphorus 30 g/kg, sulfur 30 g/kg, magnesium 30 g/kg,
1056 sodium 75 g/kg, butylated hydroxytoluene (BHT) 1,000 mg/kg, cobalt 30 mg/kg, copper 750
1057 mg/kg, fluorine 300 mg/kg, iodine 40 mg/kg, manganese 1,500 mg/kg, selenium 12 mg/kg, zinc
1058 3,000 mg/kg, vitamin A 1,50,000 IU/kg, vitamin D3 15,000 IU/kg, vitamin E 500 IU/kg.

1059 ²Fiber insoluble in neutral detergent corrected for ash and protein.

1060 ³Percent peNDF was estimated by multiplying the percentage of sample larger than 8 mm in
1061 particle size (top 2 sieves) by the percent NDF of those particle sizes.

1062 ⁴Based on Yu et al. (1998).

1063 *Chemical analyses*

1064 Diet formulation and composition were based on weekly dry matter (DM) analyses,
1065 actual nutrient values, and corresponding feed batching records. Weekly ingredient samples
1066 were stored in a freezer at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until nutrient analyses were completed. After weekly DM
1067 determination, weekly samples from each ingredient were composited by month and analyzed.
1068 All samples were dried in a forced-air circulation oven at $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 72 h and then ground in a
1069 Wiley mill (Wiley TE-680, Philadelphia, United States). After milling, the absolute DM
1070 concentration was obtained by drying in a laboratory oven at $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ (method 934.01; AOAC,
1071 1990), crude protein (CP) was obtained by the Kjeldahl method calculated as total N \times 6.25
1072 (method 984.13), and mineral matter (MM) concentration was determined by complete
1073 combustion in a muffle furnace at $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 h (method 942.05). The ether extract (EE) was
1074 quantified using the Soxhlet method (method 963.15) according to the AOAC (1990). Neutral
1075 detergent fiber (NDF) was analyzed with thermostable amylase, free of sodium sulfite, and
1076 corrected for ash and protein (Mertens, 2002; method F-012/1, Detmann et al., 2021). The starch
1077 (ST) plus free glucose was determined using the enzymes α -amylase and amyloglucosidase and
1078 obtained by colorimetry for glucose, as described in Fernandes et al. (2022), adapted from Hall
1079 et al. (2015). The data from dietary nutrient analyses were used to calculate the concentrations
1080 of NFC ($100 - \text{CP} - \text{NDF} - \text{EE} - \text{MM}$) and NFC without starch (NFCWS; $100 - \text{CP} - \text{NDF} - \text{EE} - \text{MM} -$
1081 ST). Particle size distribution of the corn silage was evaluated with a Penn State particle
1082 separator, containing screens of 19, 8, and 4 mm and the bottom pan (Heinrichs and Jones,
1083 2013). Percent physically effective fiber (peNDF) was estimated by multiplying the percentage
1084 of sample larger than 8 mm (top 2 sieves) by the percent NDF (as a decimal) of those particle
1085 sizes. Weekly samples of the ground corn used in preparing the diets were characterized for
1086 particle size distribution by using an orbital sieve shaker with intermittent tapping motion—
1087 rotap (MA 750, Marconi, Piracicaba, Brazil), and the sieves had mesh openings of 6.70, 4.75,

1088 3.35, 2.36, 1.70, 1.18, 0.60 mm, and the bottom pan. Approximately 100 g of dry sample was
1089 shaken for 10 min. Three rubber sieve balls were used to assist in detaching the finer particles
1090 in the sieves of 1.70, 1.18, and 0.60 mm, as described in Kalivoda et al. (2017), whereas the
1091 mean particle size was obtained according to Yu et al. (1998).

1092 *Performance, intake, and efficiency measurements*

1093 The individual live weight of the bulls was collected on days 0 and 84 of the study and
1094 was used to calculate adjusted weight gain ($BW \times 0.96$; final weight minus initial weight) and
1095 ADG (adjusted weight gain/84 d) during the experiment. Samples of the diet offered, and orts
1096 were collected daily, weighed, and dried. Thus, DMI was calculated as the total kilogram of
1097 DM delivered to each pen after subtracting the weight of dry orts. At the end of the experiment,
1098 the ADG and the DMI were used to calculate G:F.

1099 *Fecal parameters*

1100 Feces were collected twice in periods of three consecutive days (from the 33rd to the
1101 35th day and from the 63rd to the 65th day of the experimental period). Fecal samples from
1102 each animal (50 g/animal) were collected from the floor of each pen immediately after
1103 defecation. To ensure representativeness, the collections were carried out at different times
1104 throughout the day: from 1700 to 1800 hours on the first day, 1200 to 1300 hours. On the second
1105 day, and 0600 to 0700 hours on the third day. At the end of each daily collection and at the end
1106 of the 3 d of each collection, a composite sample was formed per pen (200 g/animal) and stored
1107 in plastic bags at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

1108 To determine fecal pH, 15 g of feces were added to test tubes containing 10 mL of
1109 distilled water and homogenized using a vortex mixer (VORTEX MIXER, Kasvi, São José dos
1110 Pinhais, Brazil). The pH was determined using a multiparameter pH meter (Medidor edge
1111 HI2020-02, Hanna Instruments, Tamboré Barueri, Brazil). Fecal samples were dried, ground,
1112 and analyzed regarding nitrogen and starch concentration, as already described.

1113 *Blood parameters*

1114 Blood samples (10 mL) from two bulls per pen (n = 72) were collected on the last day
1115 of the experimental period after the morning feeding (approximately at 0900 hours). Samples
1116 were taken from the jugular vein using vacutainer tubes with sodium fluoride (for glucose) or
1117 heparin (for urea, haptoglobin, and lipopolysaccharides) to prevent blood clotting. After
1118 collection, the samples were placed on ice and centrifuged at $2,700 \times g$ for 20 min, and the
1119 plasma was harvested and frozen until analysis.

1120 Glucose concentrations were quantified using a colorimetric kit (K082; GLICOSE
1121 MONOREAGENTE, Bioclin, Belo Horizonte, Brazil). Urea was determined with a commercial
1122 colorimetric kit (UREA UV; Bioclin, Belo Horizonte, Brazil), whereas haptoglobin was
1123 determined with the Cat:ELK7354 kit (KIT ELISA HAPTOGLOBIN CATTLE, ELK
1124 Biotechnology, Denver, USA). Lastly, lipopolysaccharides were quantified using the EU3126
1125 kit (LPS ELISA KIT, Fine Test, Wuhan, China), according to manufacturer's recommendations.
1126 Results were obtained using a Multiskan GO spectrophotometer (Thermo Scientific; Waltham,
1127 USA).

1128 *Slaughter and sample collection*

1129 At the end of the experimental period, bulls were slaughtered in a commercial
1130 slaughterhouse (Frigorífico Angelelli Ltda., Piracicaba, SP, Brazil). The carcasses were
1131 weighed to determine hot carcass weight (HCW). Carcass yield was determined considering
1132 the ratio of HCW to adjusted final weight. Samples of the ventral sac of the rumen (*atrium*
1133 *ruminis*), duodenum, and cecum (same bulls selected for blood collection; n = 72) were
1134 collected. Rumen tissue samples were fixed on polyethylene slides and stored in universal
1135 sample containers containing buffered formalin. The duodenum and cecum samples were
1136 placed in 5-mL cryogenic tubes (E-lab, Monte Alto, Brazil) and then in liquid nitrogen for
1137 transport, and subsequently stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until the beginning of gene expression analyses.

1138 Liver abscess score was evaluated according to its occurrence and seriousness, as described by
1139 Brink et al. (1990): 0 (without abscess), 1 (1 or 2 abscesses < 2.5 cm or abscess scars), 2 (3 to
1140 4 abscesses < 2.5 cm), and 3 (1 abscess > 2.5 cm or several small abscesses).

1141 *Rumen morphometrics*

1142 Samples collected during slaughter were fixed in buffered formalin for at least 48 h
1143 before further processing. Tissues were gradually dehydrated with ethanol and clarified with
1144 xylene. Samples were placed in paraffin and then cut into 5- μ m-thick sections and mounted on
1145 a glass microscope slide. At least five histological sections were obtained from each sample.
1146 Hematoxylin and eosin were used to stain the slides. Histological images of each section were
1147 obtained using an optical microscope (BX43, Olympus LS, Tokyo, Japan) in a 20X lens linked
1148 to a camera to capture images with 300 DPI resolution. Height, width, and thickness of the
1149 keratinized layer and the papillary area were determined using the ImageJ software (version
1150 1.52A; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

1151 *Gene expression*

1152 According to the manufacturer's recommendations, the total ribonucleic acid (RNA) of
1153 the duodenum and cecum samples was extracted by the SV Total RNA Isolation System
1154 (Promega, Madison, WI, USA). Subsequently, 1.0% (w/v) agarose gel electrophoresis was
1155 performed on the RNA of all the tissues, and they were stained with GelRed Nucleic Acid Gel
1156 Stain (Biotium, Hayward, CA, USA). Gel was visualized in an E-Gel Imager Camera Hood
1157 (Life Technologies, Neve Yamin, Israel). Samples were quantified (260/280 nm and 260/230
1158 nm) using a nano-spectrophotometer (DeNovix DS-11, Wilmington, DE, USA).
1159 Complementary DNA (cDNA) was synthesized using the GoScript Reverse Transcription
1160 System (Promega, Madison, WI, USA).

1161 All the primers used for the target genes and reference genes are described in Table 2.
1162 Actin beta (ACTB) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) reference genes

1163 were used. Primers were designed using the Primer3Plus web interface program and were based
 1164 on the sequences indexed and published in the GenBank public database, NCBI (National
 1165 Center for Biotechnology Information) platform. Primers were synthesized by Invitrogen
 1166 (Carlsbad, CA, USA).

1167 **Table 2.** Sequences of primers used in the RT-qPCR trial and tissue in which gene expression
 1168 was determined

Gene	Sequence (5' to 3')	Accession number	Tissue analyzed
HSPB1	F: CTGAAACACCGCCTGCTAAA R: CGAGTGAAGCAACGGGAAAT	NM_001025569.1	Cecum
HSPA4	F: AGAGTAGAGCCACCACTTCG R: GGCCAGCTGAACTCTTGAAG	NM_001114192.2	Cecum
CLDN4	F: TACTCCGCTAAGTACTCCGC R: ACCAGTTTGTAGCACCTCCA	NM_001014391.2	Duodenum
TJP1	F: CCTGCCCAACTCAACTCATG R: TGCTTTATTGTGTGGAGGCG	XM_024982012.1	Duodenum
TPH1	F: AACTCTCTCCACTGCTAGCC R: GCCTCCAGAGTTACCCGTTA	XM_002693039.5	Duodenum
SOD1	F: CGGCGTCGTTTTCTCTACTT R: ATTACACCACAGGCCAAACG	NM_174615.2	Duodenum
CAT	F: CATTGCAGTTCGCTTCTCCA R: CAAGCCATGATGGTGCTGAA	NM_001035386.2	Duodenum
OCLN	F: CCCTTTCTGCTTCTTCAGGC R: CTCCAAGTTACCACTGCTGC	NM_001082433.2	Duodenum
ACTB	F: GTCCACCTTCCAGCAGATGT R: CAGTCCGCCTAGAAGCATTT	NM_173979.3	Reference gene
GAPDH	F: CATTGCCCTCAACGACCACTT R: TCCACCACCCTGTTGCTGTA	NM_001034034.1	Reference gene

1169 HSPB1 = heat shock protein family B, member 1; HSPA4 = heat shock protein family A,
 1170 member 4; CLDN4 = claudin 4; TJP1 = tight junction protein 1; TPH1 = tryptophan
 1171 hydroxylase 1; SOD1 = superoxide dismutase 1; CAT = catalase; OCLN = occludin; ACTB =
 1172 actin beta; GAPDH = glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

1173 Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis was carried out
 1174 using the SYBR Green detection system (Applied Biosystems, USA) in the Eppendorf Realplex
 1175 thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). The entire RT-qPCR assay for each gene was
 1176 conducted based on cDNA obtained from 36 biological replicates per treatment and 2 technical

1177 replicates for each treatment. Relative expression levels were calculated using the Delta Delta
1178 Ct method, according to Livak and Schmittgen (2001).

1179 *Statistical analysis*

1180 Results were analyzed in a completely randomized design using the MIXED procedure
1181 of SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA). Pen was considered the experimental unit. The
1182 statistical model considered the fixed effects of the treatment (CON vs. DFM) and pen nested
1183 within the treatment as a random effect. When significant ($P < 0.05$), the adjusted initial weight
1184 was incorporated as a covariate in statistical analysis of the corresponding parameters. If the
1185 adjusted initial weight was not significant ($P > 0.05$), it was removed from the model. For the
1186 fecal parameters, the collection effect (1st and 2nd) and its interaction with the treatment effects
1187 were added to the model. For all the variables and their interactions, the data are shown as
1188 treatment means \pm standard error of the mean. The covariance structure adopted was defined
1189 by the lowest value for the Akaike information criterion. Statistical differences were considered
1190 significant at $P < 0.05$. Trends were noted if the P-value was greater than 0.05 but less than or
1191 equal to 0.10.

1192

1193

RESULTS

1194 At the beginning of the experiment, the adjusted initial BW did not differ among the
1195 treatments ($P = 0.85$; Table 3). In line with this response, no differences were observed for
1196 adjusted final weight ($P = 0.39$), HCW ($P = 0.30$), and dressing ($P = 0.70$). Although ADG ($P =$
1197 0.39) did not differ between treatments, bulls consuming the DFM had 3.1% lower DMI (0.4
1198 kg) and, consequently, had 6% greater G:F. At slaughter, there was no incidence of liver
1199 abscesses (data not shown).

1200 **Table 3.** Performance and carcass characteristics of Angus × Nellore bulls with and without
 1201 intake of DFM composed of *Bacillus* over 84 days of confinement

Item ¹	Treatment		SEM ³	P value
	Control	DFM ²		
Adjusted initial weight, kg	402.6	399.8	10.651	0.85
Adjusted final weight, kg	570.0	575.4	4.363	0.39
ADG, kg/day	2.01	2.08	0.052	0.39
DMI, kg/day	12.9	12.5	0.085	0.01
G:F	0.157	0.167	0.004	0.05
HCW, kg	307.1	311.2	2.763	0.30
Dressing, %	54.9	55.1	0.258	0.70

1202 ¹Adjusted weight (final and initial) = BW × 0.96, assuming 4% fill; ADG = average daily weight
 1203 gain; DMI = dry matter intake; G:F = gain:feed; HCW = hot carcass weight.

1204 ²Direct-fed microbials, composed of *B. licheniformis* and *B. subtilis* supplied at a dose of 2 g
 1205 per animal/d.

1206 ³Standard error of the mean.

1207 Regarding blood metabolites, treatment did not influence plasma concentration of
 1208 glucose, haptoglobin, and LPS ($P \geq 0.05$; Table 4). Bulls that consumed DFM had lower plasma
 1209 urea concentrations than CON bulls ($P = 0.017$). No difference was found for height, width, and
 1210 thickness of the keratinized layer and rumen papillary area ($P \geq 0.05$; Table 5).

1211

1212 **Table 4.** Blood parameters of Angus × Nellore bulls with and without intake of DFM composed
1213 of *Bacillus* over 84 days of confinement.

Item	Treatment		SEM ²	P value
	Control	DFM ¹		
Glucose (mg/dL)	79.0	76.7	2.122	0.36
Urea (mg/dL)	29.2	27.4	0.968	0.02
Haptoglobin (ng/mL)	7.73	9.19	0.719	0.26
LPS (µg/mL) ³	2.31	2.86	0.556	0.15

1214 ¹Direct-fed microbials, composed of *B. licheniformis* and *B. subtilis* supplied at a dose of 2 g
1215 per animal/d.

1216 ²Standard error of the mean.

1217 ³Lipopolysaccharides.

1218

1219 **Table 5.** Ruminal morphometrics of Angus × Nellore bulls with or without intake of DFM
1220 composed of *Bacillus* over 84 days of confinement

Item	Treatment		SEM ²	P value
	Control	DFM ¹		
Height of the papillae, mm	4.36	4.73	0.208	0.22
Width of the papillae, mm	0.37	0.38	0.010	0.34
Keratin layer, µm	11.9	11.2	0.475	0.47
Area, mm ²	1.79	1.74	0.031	0.25

1221 ¹Direct-fed microbials, composed of *B. licheniformis* and *B. subtilis* supplied at a dose of 2 g
1222 per animal/d.

1223 ²Standard error of the mean.

1224 Bulls consuming DFM tended to have lower fecal starch (P = 0.096; Table 6). The fecal
1225 starch concentration was greater (P < 0.0001) during the 2nd feces collection (9.88%; from the
1226 63rd to the 65th day of the experimental period) compared to the 1st feces collection (6.05%;
1227 from the 33rd to the 35th day of the experimental period). The opposite was found for fecal pH
1228 (5.86 vs. 5.60; P < 0.0001), which did not differ between treatments (P = 0.33).

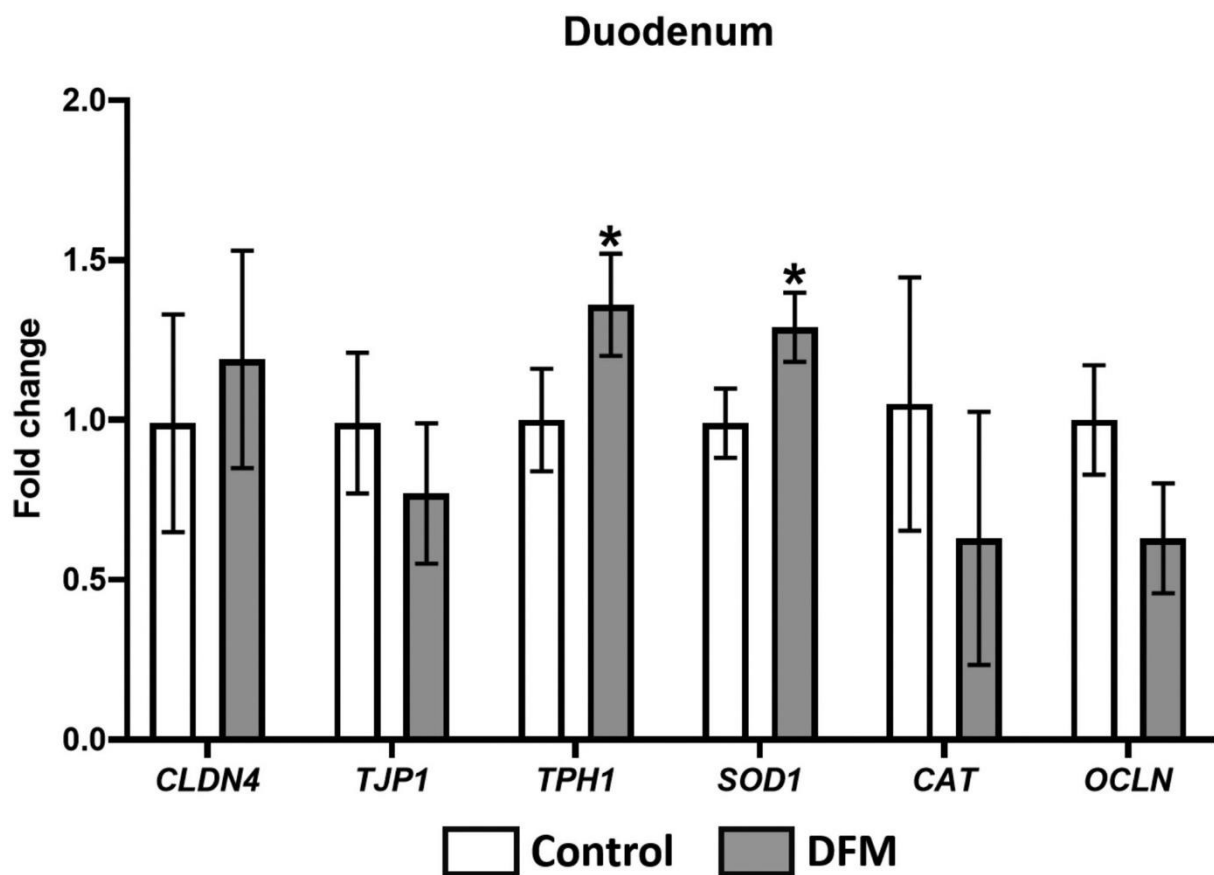
1229 **Table 6.** Fecal starch, pH, and nitrogen of Angus × Nellore bulls with or without intake of DFM composed of *Bacillus* over 84 days of confinement
 1230 in two collection periods

Item	Treatment	Collection		Mean	SEM ²	P value		
		1 st	2 nd			Treatment	Collection	Treatment*Collection
Starch	Control	6.56	10.3	8.45	0.542	0.10	<0.0001	0.86
	DFM ¹	5.54	9.42	7.48				
Mean		6.05	9.88					
pH	Control	5.82	5.61	5.71	0.034	0.33	<0.0001	0.14
	DFM	5.90	5.59	5.75				
Mean		5.86	5.60					
Nitrogen	Control	2.29	2.22	2.25	0.044	0.12	0.31	0.32
	DFM	2.18	2.20	2.19				
Mean		2.23	2.21					

1231 ¹Direct fed microbials, composed of *B. licheniformis* and *B. subtilis* supplied at a dose of 2 g per animal/d.

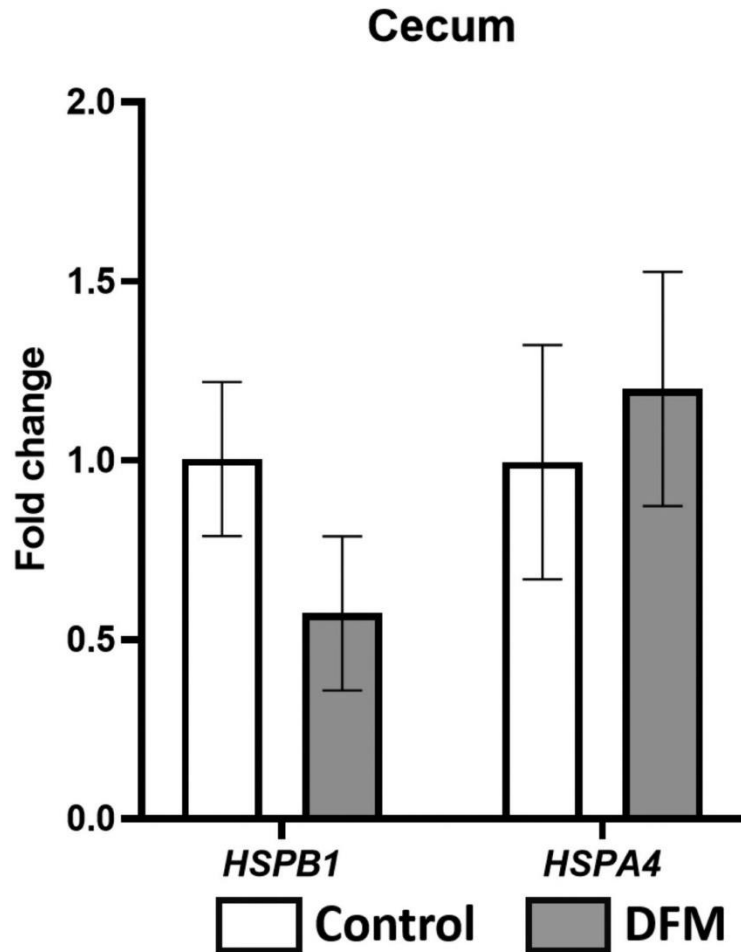
1232 ²Standard error of the mean.

1233 In the duodenum (Figure 1), the expression of tryptophan hydroxylase-1 (TPH1; P =
 1234 0.01) and superoxide dismutase-1 (SOD1; P = 0.02) was greater in bulls that consumed DFM.
 1235 Nevertheless, no differences were observed in expression of claudin-4 (CLDN4; P = 0.22), tight
 1236 junction protein-1 (TJP1; P = 0.60), catalase (CAT; P = 0.55), and occludin (OCLN; P = 0.57).
 1237 In the cecum (Figure 2), in turn, no differences were observed among the treatments for either
 1238 heat shock protein family B member 1 (HSPB1; P = 0.66) or heat shock protein family A
 1239 member 4 (HSPA4; P = 0.53).



1240

1241 **Figure 1.** Relative expression of genes in the duodenum of Angus × Nellore bulls with or
 1242 without intake of DFM composed of *Bacillus* species. *P < 0.05. Standard error of the mean =
 1243 0.340 (CLDN4 = claudin-4); 0.220 (TJP1 = tight junction protein-1); 0.160 (TPH1 = tryptophan
 1244 hydroxylase-1); 0.108 (SOD1 = superoxide dismutase-1); 0.396 (CAT = catalase); 0.171
 1245 (OCLN = occludin).



1246

1247 **Figure 2.** Relative expression of genes in the cecum of Angus × Nellore bulls with or without
 1248 intake of DFM composed of *Bacillus* species. Standard error of the mean = 0.215 (HSPB1 =
 1249 heat shock protein family B, member 1); 0.327 (HSPA4 = heat shock protein family A, member
 1250 4).

1251

1252

DISCUSSION

1253

1254

1255

1256

1257

1258

Provision of DFM composed of bacteria of the *Bacillus* genus has the potential to improve beef cattle performance; however, the responses in the literature are inconsistent and scarce. In this study, we have examined the performance and the physiological characteristics of Nellore × Angus bulls consuming a DFM composed of *B. licheniformis* and *B. subtilis* bacteria. Bacteria with sporulation capacity, such as *Bacillus* spp., have greater thermal stability, viability during storage, and, above all, tolerance to the adverse conditions of the

1259 gastrointestinal tract than other feed additives (Leser et al., 2008; Luise et al., 2022; Cappellozza
1260 et al., 2023a). Beef cattle receiving high-energy diets can benefit from supplementation with
1261 *Bacillus* spp. through its effects in regulating the microbiome, preventing and combating
1262 colonization of potentially harmful bacteria, and improving the barrier function and integrity of
1263 the gastrointestinal tract (McAllister et al., 2011; Lambo et al., 2021; Boll et al., 2024; El Jeni
1264 et al., 2024).

1265 In the present study, bulls consuming the DFM had 3.1% lower DMI than the animals
1266 in the control group. Several factors affect DMI in beef cattle, such as body fat content, sex,
1267 physiological status, heat stress, and the addition of feed additives (NASEM, 2016). The effect
1268 of *Bacillus* spp. on DMI of cattle has varied among studies (Smock et al., 2020; Dias et al.,
1269 2022; Goetz et al., 2023; Lopez et al., 2024; Silva et al., 2024). Under suitable conditions, DMI
1270 decreases as a result of increased digestibility of nutrients in the gastrointestinal tract (Tyrrell
1271 and Moe, 1975), which allows the animal to meet its energy demands with a smaller amount of
1272 feed (Cantalapiedra-Hijar et al., 2018; Jacovaci et al., 2021). In this respect, the ability that *B.*
1273 *licheniformis* and *B. subtilis* have in producing a wide range and number of enzymes
1274 (Elshaghabee et al., 2017; Luise et al., 2022; Cappellozza et al., 2023b) may have helped
1275 increase the digestibility of the nutrients, especially of starch. Using the same bacterial species
1276 as the present study, Pan et al. (2022) observed 5.75% improvement in in vitro starch
1277 digestibility for grain corn. Related to that, evidence indicates that one of the species used, *B.*
1278 *licheniformis*, specifically hydrolyzes starch in environments with greater availability of this
1279 nutrient (de Boer et al., 1994; Deng et al., 2018; Lopez et al., 2024; Silva et al., 2024).
1280 Furthermore, bulls fed DFM tended ($P = 0.10$) to have lower starch concentration in feces. A
1281 potential explanation for this finding is that the DFM may have increased starch degradation,
1282 as discussed above, and led to lower fecal excretion, once *B. licheniformis* and *B. subtilis* are
1283 capable of degrading starch (Pan et al., 2022). However, our study did not perform variables

1284 that could confirm this theory. Thus, future studies are warranted in evaluating the effects of
1285 DFM on carbohydrates degradation. The lower fecal concentration in DFM bulls may also be
1286 related to the lower DMI in those animals, once several studies (Moharrery et al., 2014; Owens
1287 et al., 2016) suggested that total tract starch digestibility and fecal starch concentration in cattle
1288 closely depend on dietary starch intake.

1289 As the ADG was not affected by the treatment (mean of 2.05 kg), along with the lowered
1290 aforementioned DMI, bulls that received the DFM exhibited 6% greater G:F. In agreement with
1291 our findings, Lopez et al. (2024) reported that upon feeding crossbred Angus cattle with DFM
1292 composed of *Lactobacillus animalis*, *Propionibacterium freudenreichii*, *B. subtilis*, and *B.*
1293 *licheniformis* in the respective ratio of 1:1:1:3, G:F was improved by 5.7%. Dias et al. (2022)
1294 also found a trend of improvement of 4.5% in ADG and 3.4% in G:F in Nellore (*Bos indicus*)
1295 cattle in contrast between different DFM and a control group. Divergences in the effects found
1296 in the literature may be attributed to the differences of breeds, microbial species, strains,
1297 concentrations, and types of diets. Supplementation of the current DFM seems not to have
1298 negative for cattle. Conversely, the potential for improving performance is frequently reported
1299 (Sun et al., 2013; Calaca et al., 2022; Dias et al., 2022; Lopez et al., 2024). Furthermore, the
1300 fact that the gene expression of a key antioxidant enzyme (SOD1) was greater in the duodenum
1301 of DFM-fed bulls may be associated with a greater intestinal nutrient efficiency, but this needs
1302 to be addressed and confirmed in future research efforts. Lastly and supporting our results,
1303 others have reported that *Bacillus* spp. stimulates the expression, synthesis, and release of
1304 antioxidant enzymes in the lower GIT of livestock animals (Wang et al., 2017).

1305 Plasma urea-N was 6.2% lower for bulls consuming DFM. This response may be
1306 attributed to the lower DMI in those bulls, once intake and plasma urea-N concentrations are
1307 highly correlated. Another potential explanation for that is the presence of *B. licheniformis* as a
1308 feed additive (Qiao et al., 2010). Those authors reported that the addition of *B. licheniformis* in

1309 the diet decreased ammonia concentration; and consequently, stimulated microbial growth in
1310 the rumen of Holstein cows. They suggested that the reduction in ruminal ammonia resulted
1311 from greater assimilation by the bacteria. However, it should be highlighted that this
1312 explanation should be considered cautiously since we did not evaluate rumen parameters,
1313 nitrogen balance, production of microbial protein, and other aspects.

1314

1315 **CONCLUSIONS**

1316 Supplementation with DFM based on *B. licheniformis* and *B. subtilis* to Nellore × Angus
1317 bulls in the finishing phase decreased DMI, did not influence ADG, improved G:F, and
1318 increased the expression of genes important for duodenal function.

1319

1320 **ACKNOWLEDGMENTS**

1321 This research was sponsored by Novonosis, Hørsholm, Denmark.

1322

1323 **CONFLICT OF INTEREST STATEMENT**

1324 The authors declare no conflicts of interest.

1325

1326 **LITERATURE CITED**

1327 AOAC. 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Arlington (VA): Association of Official
1328 Analytical Chemists.

1329 Aschenbach, J. R., Q. Zebeli, A. K. Patra, G. Greco, S. Amasheh, and G. B. Penner. 2019.

1330 Symposium review: The importance of the ruminal epithelial barrier for a healthy and
1331 productive cow. *J. Dairy Sci.* 102:1866–1882. doi:10.3168/jds.2018-15243.

- 1332 Bernardeau, M., M. J. Lehtinen, S. D. Forssten, and P. Nurminen. 2017. Importance of the
1333 gastrointestinal life cycle of *Bacillus* for probiotic functionality. *J. Food Sci. Technol.*
1334 54:2570–2584. doi:10.1007/s13197-017-2688-3.
- 1335 Boll, E. J., G. Copani, and B. I. Cappelozza. 2024. *Bacillus paralicheniformis* 809 and
1336 *Bacillus subtilis* 810 support in vitro intestinal integrity under hydrogen peroxide and
1337 deoxynivalenol challenges. *Transl. Anim. Sci.* 8. doi:10.1093/tas/txae061.
- 1338 Bottje, W. G., and G. E. Carstens. 2009. Association of mitochondrial function and feed
1339 efficiency in poultry and livestock species. *J. Anim. Sci.* 87. doi:10.2527/jas.2008-1379.
- 1340 Brink, D. R., S. R. Lowry, R. A. Stock, and J. C. Parrot. 1990. Severity of liver abscesses
1341 and efficiency of feed utilization of feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 68:1201–1207.
1342 doi:10.2527/1990.6851201x
- 1343 Calaca, A. M. M., C. B. Figueiredo, M. B. Silva, J. J. R. Fernandes, M. H. M. R. Fernandes,
1344 L. F. Silva, and V. R. M. Couto. 2022. Effect of a *Bacillus* probiotic strain on Nellore cattle
1345 finished on pasture during the dry season. *Livest. Sci.* 264.
1346 doi:10.1016/j.livsci.2022.105068.
- 1347 Cappelozza, B. I., A. Segura, N. Milora, C. Galschiet, M. Schjelde, and G. Copani. 2023a.
1348 Stability of *Bacillus* and *Enterococcus faecium* 669 Probiotic Strains When Added to
1349 Different Feed Matrices Used in Dairy Production. *Animals.* 13. doi:10.3390/ani13142350.
- 1350 Cappelozza, B. I., J. N. Joergensen, G. Copani, K. A. Bryan, P. Fantinati, J. C. Bodin, M.
1351 M. Khahi, C. Ninodeguzman, K. G. Arriola, L. O. Lima, S. Farooq, and D. Vyas. 2023b.
1352 Evaluation of a *Bacillus*-based direct-fed microbial probiotic on *in vitro* rumen gas
1353 production and nutrient digestibility of different feedstuffs and total mixed rations. *Transl*
1354 *Anim Sci.* 7. doi:10.1093/tas/txad044.

- 1355 Cooke, R. F. 2017. Invited paper: Nutritional and management considerations for beef cattle
1356 experiencing stress-induced inflammation. *Prof. Anim. Sci.* 33:1–11.
1357 doi:10.15232/pas.2016-01573.
- 1358 de Boer, A. S., F. Priest, and B. Diderichsen. 1994. On the industrial use of *Bacillus*
1359 *licheniformis*: a review. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 40:595–598. doi:10.1007/bf00173313
- 1360 Deng, K. D., Y. Xiao, T. Ma, Y. Tu, Q. Y. Diao, Y. H. Chen, and J. J. Jiang. 2018. Ruminant
1361 fermentation, nutrient metabolism, and methane emissions of sheep in response to dietary
1362 supplementation with *Bacillus licheniformis*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 241:38–44.
1363 doi:10.1016/j.anifeedsci.2018.04.014.
- 1364 Detmann, E., L. F. C. Silva, G. C. Rocha, M. N. N. Palma, and J. P. P. Rodrigues. 2021.
1365 Methods for feed analysis. 2^a. Suprema, Viçosa.
- 1366 Dias, B. G. C., F. A. P. Santos, M. Meschiatti, B. M. Brixner, A. A. Almeida, O. Queiroz,
1367 and B. I. Cappellozza. 2022. Effects of feeding different probiotic types on metabolic,
1368 performance, and carcass responses of *Bos indicus* feedlot cattle offered a high-concentrate
1369 diet. *J. Anim. Sci.* 100. doi:10.1093/jas/skac289.
- 1370 Drouillard, J. S. 2018. Current situation and future trends for beef production in the United
1371 States of America - A review. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 31:1007–1016.
1372 doi:10.5713/ajas.18.0428.
- 1373 El Jeni, R., C. Villot, O. Y. Koyun, A. Osorio-Doblado, J. J. Baloyi, J. M. Lourenco, M.
1374 Steele, and T. R. Callaway. 2024. Invited review: “Probiotic” approaches to improving dairy
1375 production: Reassessing “magic foo-foo dust.” *J. Dairy Sci.* 107:1832–1856.
1376 doi:10.3168/jds.2023-23831.

- 1377 Elshagabee, F. M. F., N. Rokana, R. D. Gulhane, C. Sharma, and H. Panwar. 2017. *Bacillus*
1378 as potential probiotics: Status, concerns, and future perspectives. *Front. Microbiol.* 8.
1379 doi:10.3389/fmicb.2017.01490.
- 1380 Fernandes, T., K. T. da Silva, B. F. Carvalho, R. F. Schwan, R. A. N. Pereira, M. N. Pereira,
1381 and C. L. da Silva Ávila. 2022. Effect of amylases and storage length on losses, nutritional
1382 value, fermentation, and microbiology of silages of corn and sorghum kernels. *Anim. Feed*
1383 *Sci. Technol.* 285. doi:10.1016/j.anifeedsci.2022.115227.
- 1384 Fuerniss, L. K., K. K. Kreikemeier, L. D. Reed, M. D. Cravey, and B. J. Johnson. 2022.
1385 Cecal microbiota of feedlot cattle fed a four-species *Bacillus* supplement. *J. Anim. Sci.* 100.
1386 doi:10.1093/jas/skac258.
- 1387 Goetz, B. M., M. A. Abeyta, S. Rodriguez-Jimenez, E. J. Mayorga, J. Opgenorth, G. M.
1388 Jakes, A. D. Freestone, C. E. Moore, D. J. Dickson, J. E. Hergenreder, and L. H. Baumgard.
1389 2023. Effects of *Bacillus subtilis* PB6 supplementation on production, metabolism,
1390 inflammatory biomarkers, and gastrointestinal tract permeability in transition dairy cows.
1391 *J. Dairy Sci.* 106:9793–9806. doi:10.3168/jds.2023-23562.
- 1392 Green, D. H., P. R. Wakeley, A. Page, A. Barnes, L. Baccigalupi, E. Ricca, and S. M.
1393 Cutting. 1999. Characterization of Two *Bacillus* Probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.*
1394 65:4288-4291. doi:10.1128/aem.65.9.4288-4291.1999.
- 1395 Hall, M. B., J. Arbaugh, K. Binkerd, A. Carlson, T. Thi Doan, T. Grant, C. Heuer, H. D.
1396 Inerowicz, B. Jean-Louis, R. Johnson, J. Jordan, D. Kondratko, E. Maciel, K. McCallum,
1397 D. Meyer, C. A. Odijk, A. Parganlija-Ramic, T. Potts, L. Ruiz, S. Snodgrass, D. Taysom, S.
1398 Trupia, B. Steinlicht, and D. Welch. 2015. Determination of dietary starch in animal feeds
1399 and pet food by an enzymatic-colorimetric method: Collaborative study. *J. AOAC Int.*
1400 98:397–409. doi:10.5740/jaoacint.15-012.

- 1401 Heinrichs, J., and C. M. Jones. 2013. The penn state particle separator.
1402 <https://extension.psu.edu/penn-state-particle-separator>. Accessed Nov. 2023.
- 1403 Jacovaci, F. A., P. A. R. Salvo, C. C. Jobim, and J. L. P. Daniel. 2021. Effect of ensiling on
1404 the feeding value of flint corn grain for feedlot beef cattle: A meta-analysis. *Rev. Bras.*
1405 *Zootec.* 50. doi:10.37496/rbz5020200111.
- 1406 Kalivoda, J. R., C. K. Jones, and C. R. Stark. 2017. Impact of varying analytical
1407 methodologies on grain particle size determination. *J. Anim. Sci.* 95:113–119.
1408 doi:10.2527/jas2016.0966.
- 1409 Lambo, M. T., X. Chang, and D. Liu. 2021. The recent trend in the use of multistrain
1410 probiotics in livestock production: An overview. *Animals.* 11. doi:10.3390/ani11102805.
- 1411 Leser, T. D., A. Knarreborg, and J. Worm. 2008. Germination and outgrowth of *Bacillus*
1412 *subtilis* and *Bacillus licheniformis* spores in the gastrointestinal tract of pigs. *J. Appl.*
1413 *Microbiol.* 104:1025–1033. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03633.x.
- 1414 Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using
1415 Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods.* 25:402–408.
1416 doi:10.1006/meth.2001.1262.
- 1417 Lopez, A. M., J. O. Sarturi, B. J. Johnson, D. R. Woerner, D. D. Henry, F. M. Ciriaco, K. G.
1418 S. Silva, and C. J. Rush. 2024. Effects of bacterial direct-fed microbial combinations on
1419 beef cattle growth performance, feeding behavior, nutrient digestibility, ruminal
1420 morphology, and carcass characteristics. *J. Anim. Sci.* 102. doi:10.1093/jas/skae004.
- 1421 Luise, D., P. Bosi, L. Raff, L. Amatucci, S. Viridis, and P. Trevisi. 2022. *Bacillus* spp.
1422 Probiotic Strains as a Potential Tool for Limiting the Use of Antibiotics, and Improving the

- 1423 Growth and Health of Pigs and Chickens. *Front. Microbiol.* 13.
1424 doi:10.3389/fmicb.2022.801827.
- 1425 Marques, R. da S., and R. F. Cooke. 2021. Effects of ionophores on ruminal function of beef
1426 cattle. *Animals*. 11. doi:10.3390/ani11102871.
- 1427 Marques, R. S., L. J. Chagas, F. N. Owens, and F. A. P. Santos. 2016. Effects of various
1428 roughage levels with whole flint corn grain on performance of finishing cattle. *J. Anim. Sci.*
1429 94:339–348. doi:10.2527/jas.2015-9758.
- 1430 McAllister, T. A., K. A. Beauchemin, A. Y. Alazzeah, J. Baah, R. M. Teather, and K. Stanford.
1431 2011. Review: The use of direct fed microbials to mitigate pathogens and enhance
1432 production in cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 91:193–211. doi:10.4141/cjas10047.
- 1433 McGregor, E. M., C. P. Campbell, S. P. Miller, P. P. Purslow, and I. B. Mandell. 2012. Effect
1434 of nutritional regimen including limit feeding and breed on growth performance, carcass
1435 characteristics and meat quality in beef cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 92:327–341.
1436 doi:10.4141/cjas2011-126.
- 1437 Mertens, D. R. 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber
1438 in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *J. AOAC Int.* 85:1217–
1439 1240. doi:10.1093/jaoac/85.6.1217
- 1440 Moharrery, A., M. Larsen, and M. R. Weisbjerg. 2014. Starch digestion in the rumen, small
1441 intestine, and hind gut of dairy cows - a meta-analysis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 192:1–14.
1442 doi:10.1016/j.anifeedsci.2014.03.001.
- 1443 Nagaraja, T. G., and E. C. Titgemeyer. 2007. Ruminal acidosis in beef cattle: The current
1444 microbiological and nutritional outlook. *J. Dairy Sci.* 90:17–38. doi:10.3168/jds.2006-478.

- 1445 Nagaraja, T. G., and M. B. Taylor. 1987. Susceptibility and resistance of ruminal bacteria to
1446 antimicrobial feed additives. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1620–1625.
1447 doi:10.1128/aem.53.7.1620-1625.1987
- 1448 National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine (NASEM). 2016. Nutrient
1449 requirements of beef cattle. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press.
- 1450 Owens, C. E., R. A. Zinn, A. Hassen, and F. N. Owens. 2016. Mathematical linkage of total-
1451 tract digestion of starch and neutral detergent fiber to their fecal concentrations and the
1452 effect of site of starch digestion on extent of digestion and energetic efficiency of cattle.
1453 *Prof. Anim. Sci.* 32:531–549. doi:10.15232/pas.2016-01510.
- 1454 Pan, L., K. Harper, O. Queiroz, G. Copani, and B. I. Cappellozza. 2022. Effects of a
1455 *Bacillus*-based direct-fed microbial on in vitro nutrient digestibility of forage and high-
1456 starch concentrate substrates. *Transl. Anim. Sci.* 6. doi:10.1093/tas/txac067.
- 1457 Penner, G. B., J. R. Aschenbach, K. Wood, M. E. Walpole, R. Kanafany-Guzman, S.
1458 Hendrick, and J. Campbell. 2014. Characterising barrier function among regions of the
1459 gastrointestinal tract in Holstein steers. *Anim. Prod. Sci.* 54:1282–1287.
1460 doi:10.1071/an14285.
- 1461 Qiao, G. H., A. S. Shan, N. Ma, Q. Q. Ma, and Z. W. Sun. 2010. Effect of supplemental
1462 *Bacillus* cultures on rumen fermentation and milk yield in Chinese Holstein cows. *J. Anim.*
1463 *Physiol. Anim. Nutr.* 94:429–436. doi:10.1111/j.1439-0396.2009.00926.x.
- 1464 Silva, K. G. S., J. O. Sarturi, B. J. Johnson, D. R. Woerner, A. M. Lopez, B. M. Rodrigues,
1465 K. T. Nardi, and C. J. Rush. 2024. Effects of bacterial direct-fed microbial mixtures offered
1466 to beef cattle consuming finishing diets on intake, nutrient digestibility, feeding behavior,
1467 and ruminal kinetics/ fermentation profile. *J. Anim. Sci.* 102. doi:10.1093/jas/skae003.

- 1468 Smock, T. M., K. L. Samuelson, J. E. Hergenreder, P. Whitney Rounds, and J. T. Richeson.
1469 2020. Effects of *Bacillus subtilis* PB6 and/or chromium propionate supplementation on
1470 clinical health, growth performance, and carcass traits of high-risk cattle during the feedlot
1471 receiving and finishing periods. *Transl. Anim. Sci.* 4:1–12. doi:10.1093/tas/txaa163.
- 1472 Souza, V. L., N. M. Lopes, O. F. Zacaroni, V. A. Silveira, R. A. N. Pereira, J. A. Freitas, R.
1473 Almeida, G. G. S. Salvati, and M. N. Pereira. 2017. Lactation performance and diet
1474 digestibility of dairy cows in response to the supplementation of *Bacillus subtilis* spores.
1475 *Livest. Sci.* 200:35–39. doi:10.1016/j.livsci.2017.03.023.
- 1476 Steele, M. A., G. B. Penner, F. Chaucheyras-Durand, and L. L. Guan. 2016. Development
1477 and physiology of the rumen and the lower gut: Targets for improving gut health. *J. Dairy*
1478 *Sci.* 99:4955–4966. doi:10.3168/jds.2015-10351.
- 1479 Sun, P., J. Q. Wang, and L. F. Deng. 2013. Effects of *Bacillus subtilis natto* on milk
1480 production, rumen fermentation and ruminal microbiome of dairy cows. *Animal.* 7:216–
1481 222. doi:10.1017/s1751731112001188.
- 1482 Trotta, R. J., D. L. Harmon, J. C. Matthews, and K. C. Swanson. 2021. Nutritional and
1483 Physiological Constraints Contributing to Limitations in Small Intestinal Starch Digestion
1484 and Glucose Absorption in Ruminants. *Ruminants.* 2:1–26.
1485 doi:10.3390/ruminants2010001.
- 1486 Tyrrell, H. F., and P. W. Moe. 1975. Effect of Intake on Digestive Efficiency. *J. Dairy Sci.*
1487 58:1151–1163. doi:10.3168/jds.S0022-0302(75)84694-7.
- 1488 Valente, E. E. L., J. L. Klotz, and D. L. Harmon. 2021. 5-Hydroxytryptophan strongly
1489 stimulates serotonin synthesis in Holstein steers. *Domest. Anim. Endocrinol.* 74.
1490 doi:10.1016/j.domaniend.2020.106560.

- 1491 Yu, P., J. T. Huber, F. A. P. Santos, J. M. Simas, and C. B. Theurer. 1998. Effects of Ground,
1492 Steam-Flaked, and Steam-Rolled Corn Grains on Performance of Lactating Cows. *J. Dairy*
1493 *Sci.* 81:777–783. doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75634-6.