The University of Tehran Press

Iranian Journal of Animal Science

Online ISNN: 2008-4773

Homepage: http:// ijas.ut.ac.ir/

Evaluation of probiotic *Bacillus coagulans DSM 32016* effect on growth performance, nutrient digestibility, health indices, blood metabolites, and immune status of Holstein dairy calves

Mahbub Mohammadi[1], Saeed Zeinoaldini[2]✉, Ahmad Zare Shahneh [3], Mahdi Ganjkhanlou[4], Mahdi Zhandi[5]

1. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, School of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, karaj, Iran. Email: mahbub.mohammadi@ut.ac.ir
2. Corresponding author, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, School of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, karaj, Iran. Email: zeinoaldini@ut.ac.ir
3. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, School of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, karaj, Iran. Email: azareh@ut.ac.ir
4. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, School of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, karaj, Iran. Email: ganjkhanlou@ut.ac.ir
5. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, School of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, karaj, Iran. Email: mzhandi@ut.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 10 August 2024

Received in revised form: 20 October 2024

Accepted: 20 October 2024

Published online: Summer 2025

Keywords:

Calves,
Probiotic,
Bacillus coagulans,
Growth.

ABSTRACT

The present experiment was designed to investigate the effects of probiotic Bacillus coagulans DSM 32016 on growth performance, nutrient digestibility, health indicators and serum metabolites of Holstein calves. Sixty Holstein calves, with from day 4 to day 73 of age were divided to the following two treatments as controls: no probiotic supplementation, probiotic *Bacillus coagulans*: 600 mg per kg of feed + 600 mg per kg of milk. was evaluated in two phases, 1 to 50 days and 51 to 70 days, factors as growth performance, nutrient digestibility, health indices, blood metabolites, and immune status. Compared to the control, dry matter consumption, average daily gain (ADG), feed efficiency, and Height change did not differ significantly while the digestibility of nutrients was affected by probiotics (P< 0.05). Calves that received the probiotic, NDF digestibility had decreased compared to the control (P<0.05), while NFC increased with probiotic supplementation (P< 0.05). Health indicators and fecal score were more favorable with probiotic supplement than the control in both periods (P< 0.05). However, days with fever in both periods, and rectal temperature on days 51 to 70 were significantly reduced. Compared to the control, the level of glucose, beta-hydroxybutyrate and lymphocytes increased, and the level of neutrophils and the ratio of neutrophils to lymphocytes decreased during days 51 to 70 with the probiotic supplement. Therefore, the use of probiotic Bacillus coagulans DSM 32016 in milk and feed increases the digestibility of NFC and improves the fecal score and health indicators and increases the level of lymphocytes and immunity.

Cite this article: Mohammadi, M., Zeinoaldini, S., Zare Shahneh, A., Ganjkhanlou, M. & Zhandi, M. (2025). Evaluation of probiotic Bacillus coagulans *DSM 32016* effect on growth performance, nutrient digestibility, health indices, blood metabolites, and immune status of Holstein dairy calves. *Iranian Journal of Animal Science*, 56 **(2),** 351-368. DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2024.377864.654017

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.
DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2024.377864.654017

Extended Abstract

Introduction

In the commercial dairy farms, the health risks of young calves prior to weaning are the main concerns due to calves in this period are susceptible to diseases such as acute diarrhea and respiratory disease and environmental stress always endangers the health of animals. Antibiotics are widely used to prevent these unfavorable conditions and treat infections of the gastrointestinal tract of calves. However, over-use of antibiotics in livestock promotes antibiotic resistance, which has a long-term effect on the animal body and also disturbs the intestinal microflora balance. Probiotics are defined as live microorganisms that have health

benefits on the host animal by improving the colonization and recovery of the beneficial microbiota of the digestive tract and promoting nutrient absorption. Probiotics are capable to eliminate the toxins of pathogens using their produced end-products such as organic acids and bacteriocins. The use of probiotics in ruminants improved feed intake and growth performance and immune status. Moreover, probiotics supplemented to animals resulted in greater villi height and ratio of villi height to crypt depth.

Bacillus coagulans is a Gram-positive, anaerobic, non-pathogenic, spore-forming bacterium and produces lactic acid in metabolism and its spores are activated in the stomach, and grow and multiply in the animal's intestine that benefits animal health. Therefore, it seems necessary to investigate the effect of *Bacillus coagulans* probiotic on growth performance, immune system and health status of Holstein calves.

Objective

There is great interest in using probiotics as an alternative approach to antibiotics to control bacterial diseases in livestock production. There is not sufficient information the effect of *Bacillus coagulans* probiotic on growth performance, immune system and health status of calves. Therefore, it was hypothesized that the use of *Bacillus coagulans* probiotic in feed and milk may have beneficial effects on Holstein calves performance and commercial dairy farms.

Materials and methods

Sixty Holstein calves, with an average body weight (BW) of 40.02 ± 1.85 kg (SD), from day 4 to day 73 of age were divided to the following two treatments as controls: no probiotic supplementation, BC: 600 mg of probiotic per kg of feed + 600 mg of probiotic per kg of milk. Was evaluated in two phases, 1 to 50 days and 51 to 70 days. Calf health was checked daily by a blind veterinarian to experimental treatments and sick calves were treated by a veterinarian accordingly. Calves were healthy with no clinical signs of systemic disease or mortality throughout the experiment.

Data for dry matter intake, growth performance, health indices, and serum metabolites were analyzed for two discrete periods from d 1 to 50, and from d 51 to 70 of experiment using the MIXED MODEL procedure. Data of nutrient digestibilities and health indices (treated days, days with diarrhea, and days with fever) were considered as single measurements and were analyzed using the GLM procedure of SAS.

Results and Discussion

The results showed that compared to the control, dry matter consumption, average daily increase, feed efficiency, and height change during the experiment did not differ significantly ($P < 0.05$), while the digestibility of nutrients was affected by probiotics ($P < 0.05$). Calves that received the probiotic *Bacillus coagulans* DSM 32016 in milk and feed, NDF digestibility had decreased compared to the control ($P < 0.05$), while NFC increased with probiotic supplementation ($P < 0.05$). Health indicators such as eye, ear, nose and stool scores were more favorable with *Bacillus coagulans* probiotic supplement than the control in both periods ($P < 0.05$). The number of days treated with antibiotics and electrolytes was similar between the groups. However, days with fever in both periods, and rectal temperature on days 51 to 70 were significantly reduced with *Bacillus coagulans* probiotic supplementation. Compared to the control, the level of glucose, beta-hydroxybutyrate and lymphocytes increased in the Clavus probiotic supplement, and the level of neutrophils and the ratio of neutrophils to lymphocytes decreased during days 51 to 70 with the supplement.

Previous studies have shown that the addition of *Bacillus coagulans* had positive effects on the growth performance and intestinal bacteria of weaned piglets and had good application prospects for replacing antibiotics. Studies have also shown that the use of *Bacillus coagulans* probiotic in poultry improved egg quality and reduce mortality.

Conclusion

The results of the current study showed that feeding of *Bacillus coagulans* DSM 32016 probiotic causes improved the faecal score and health indices, none-fibre carbohydrate digestibility, and increased lymphocytes levels of Holstein calves which suggesting the improved immune response for calves supplemented with probiotic, decreased signs of diseases like diarrhea and the positive effect on the intestinal flora.

Author Contributions

For research articles with several authors, a short paragraph specifying their individual contributions must be provided. The following statements should be used "Conceptualization, X.X. and Y.Y.; methodology, X.X.; software, X.X.; validation, X.X., Y.Y. and Z.Z.; formal analysis, X.X.; investigation, X.X.; resources, X.X.; data curation, X.X.; writing—original draft

preparation, X.X.; writing—review and editing, X.X.; visualization, X.X.; supervision, X.X.; project administration, X.X.; funding acquisition, Y.Y. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript." Please turn to the CRediT taxonomy for the term explanation. Authorship must be limited to those who have contributed substantially to the work re-ported.

All authors contributed equally to the conceptualization of the article and writing of the original and subsequent drafts.

Data Availability Statement

In this section, please provide details regarding where data supporting reported results can be found, including links to publicly archived datasets analyzed or generated during the study (see **examples**). Data available on request from the authors.

If the study did not report any data, you might add "Not applicable" here.

Acknowledgements

The *Acknowledgments* section should be a few sentences at the end, but it is important to recognize those people (organizations and individuals) who made considerable impact on the research, provided *significant* help to the author to formulate and complete the experiment, and improved the research at any stage (from providing access to equipment or field sites to editing the manuscript). However, this is an optional section.

In this section, you can acknowledge any support given which is not covered by the author contribution or funding sections. This may include administrative and technical support, or donations in kind (e.g., materials used for experiments).

The authors would like to thank all participants of the present study.

Ethical considerations

The study was approved by the Ethics Committee of the University of ABCD (Ethical code: IR.UT.RES.2024.500). The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.

Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.

نشریه علوم دامی ایران، دوره ۵۶، شماره ۲

انتشارات دانشگاه تهران

شاپا الکترونیکی: ۷۹۴۹-۲۴۲۳

Homepage: http://ijas.ut.ac.ir//

اثر پروبیوتیک باسیلوس کواگولانز *DSM 32016* بر عملکرد رشد، قابلیت هضم مواد مغذی، شاخص‌های سلامت، متابولیت‌های خون و وضعیت ایمنی در گوسالههای هلشتاین شیرخوار

محبوب محمدی[۱] | سعید زین الدینی[۲]✉ | احمد زارع شحنه[۳] | مهدی گنج خانلو[۴] | مهدی ژندی[۵]

۱. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: mahbub.mohammadi@ut.ac.ir

۲. نویسنده مسئول، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: zeinoaldini@ut.ac.ir

۳. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: azareh@ut.ac.ir

۴. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: ganjkhanlou@ut.ac.ir

۵. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: mzhandi@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۲۰
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۷/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۲۹
تاریخ انتشار: تابستان ۱۴۰۴

کلیدواژه‌ها:
گوساله، پروبیوتیک، باسیلوس کواگولانز و رشد.

چکیده

این آزمایش، به منظور بررسی اثرات پروبیوتیک باسیلوس کواگولانز DSM 32016 بر عملکرد رشد، قابلیت هضم مواد مغذی، شاخص‌های سلامت و متابولیتهای سرمی گوسالههای هلشتاین انجام شد. شصت رأس گوساله هلشتاین از روز ۴ تا ۷۳ روزگی به دو گروه شاهد: بدون مصرف پروبیوتیک و پروبیوتیک *باسیلوس کواگولانز*: ۶۰۰ میلیگرم در هر کیلوگرم خوراک و ۶۰۰ میلیگرم در هر کیلوگرم شیر اختصاص داده شدند. در دو مرحله ۱ تا ۵۰ و ۵۱ تا ۷۰ روزگی عملکرد رشد، قابلیت هضم مواد مغذی، شاخص‌های سلامت، متابولیتهای خون و وضعیت ایمنی مورد ارزیابی قرار گرفت. در مقایسه با گروه شاهد، مصرف ماده خشک، میانگین افزایش وزن روزانه، میانگین بازده غذایی و تغییرات قد، تفاوت معنی‌داری نداشت، در حالی که قابلیت هضم مواد مغذی تحت تأثیر مصرف پروبیوتیک قرار گرفت ($P <$ ۰/۰۵). گوساله‌هایی که پروبیوتیک دریافت کردند، قابلیت هضم NDF پایینتری را نسبت به گوساله‌های گروه شاهد نشان دادند، در حالی که قابلیت هضم NFC افزایش یافت. امتیاز قوام مدفوع و وضعیت سلامت نسبت به گروه شاهد در هر دو دوره بهبود یافت ($P <$ ۰/۰۵). روزهای با تب در هر دو دوره و دمای رکتال در طول روز ۵۱ تا ۷۰ کاهش یافت ($P <$ ۰/۰۵). در مقایسه با گروه شاهد، در گروه تیماری پروبیوتیک سطح گلوکز، بتا هیدروکسیبوتیرات و لنفوسیت افزایش و سطح نوتروفیل و نسبت نوتروفیل به لنفوسیت در طول روز ۵۱ تا ۷۰ کاهش یافت ($P <$ ۰/۰۵). استفاده از پروبیوتیک باسیلوس کواگولانز سبب افزایش قابلیت هضم NFC و بهبود امتیاز قوام مدفوع و شاخصهای سلامت و افزایش سطح لنفوسیت و ایمنی میگردد..

استناد: محمدی، محبوب؛ زین الدینی، سعید؛ زارع شحنه، احمد؛ گنج خانلو، مهدی و ژندی، مهدی (۱۴۰۴). اثر پروبیوتیک باسیلوس کواگولانز *DSM 32016* بر عملکرد رشد، قابلیت هضم مواد مغذی، شاخص‌های سلامت، متابولیت‌های خون و وضعیت ایمنی در گوساله¬های هلشتاین شیرخوار. *نشریه علوم دامی ایران*، ۵۶ (۲)، ۳۶۸-۳۵۱. DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2024.377864.654017

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2024.377864.654017

مقدمه

سلامت گوسالهها قبل از شیرگیری از دغدغههای اصلی صنعت دامپروری است، زیرا، گوسالهها در این دوره به دلیل ضعف ایمنی بدن و رشد ناقص سامانه گوارش مستعد ابتلا به بیماریهایی مانند اسهال حاد و بیماریهای تنفسی هستند و تنش محیطی همواره سلامت دامها را به خطر انداخته و منجر به افزایش میزان مرگ و میر میشود (Diao *et al.*, 2019; Hammon *et al.*, 2020; Y. Zhang *et al.*, 2015).

آنتیبیوتیکها به طور گستردهای برای پیشگیری از این شرایط و درمان عفونتهای دستگاه گوارش گوسالهها استفاده میشود. با این حال، استفاده بیش از حد از آنتیبیوتیکها در دام باعث افزایش مقاومت آنتیبیوتیکی میشود که اثر طولانی مدتی بر بدن حیوان دارد و همچنین، تعادل میکرو فلورا روده را مختل میکند (Boonmar *et al.*, 1998). علاوه بر این، استفاده از آنتیبیوتیکها به دلیل خطراتی که برای سلامت حیوانات و انسان دارند، توسط سازمان بهداشت جهانی ممنوع شده است (World Health Organisation, 2017). بنابراین، علاقه زیادی به استفاده از پروبیوتیکها به عنوان یک رویکرد جایگزین برای آنتیبیوتیکها برای کنترل بیماریهای باکتریایی در دامداری وجود دارد. پروبیوتیک‌ها به عنوان میکروارگانیسم‌های زنده‌ای تعریف می‌شوند که با بهبود کلونیزاسیون و بازیابی میکروبیوتای مفید دستگاه گوارش (Schofield *et al.*, 2018) و ارتقای جذب مواد مغذی (Sánchez *et al.*, 2017)، برای سلامتی حیوان میزبان مفید است. پروبیوتیکها میتوانند با استفاده از محصولات نهایی تولید شده خود مانند اسیدهای آلی و باکتریوسینها، سموم عوامل بیماریزا را از بین ببرند (Pinto *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2017).

مطالعات قبلی نشان داده است که استفاده از پروبیوتیکها در نشخوارکنندگان باعث بهبود مصرف ماده خشک و عملکرد رشد (Abe *et al.*, 1995; Timmerman *et al.*, 2005) و همچنین باعث بهبود وضعیت ایمنی و کاهش بروز اسهال میشود (Xu *et al.*, 2017). Apas *et al.*, (2015) نشان داده شده است که استفاده از پروبیوتیکهای *لاکتوباسیلوس آلیمنتریوس*، *لاکتوباسیلوس رویتری*، *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* و *انتروکوکوس فاسیوم* در بز سبب افزایش سطوح اسیدهای چرب ضروری در شیر میشود. با این حال، پروبیوتیکهایی که توانایی تشکیل هاگ را دارند، توجه محققان را به خود جلب کرده است. به طوری که بقا و پایداری این باکتریها در مقایسه با سایر پروبیوتیکها به دلیل توانایی تشکیل هاگ به طور قابل توجهی بهتر است (Cao *et al.*, 2020). پروبیوتیک *باسیلوس آمیلولیکوفاسینس*[1] عملکرد رشد را با تحریک نسبت GH/IGF-1 بهبود میبخشید، میکروبیوتای مفید روده گوسالههای گوشتی را بهبود و تعداد باکتریهای تجزیهکننده فیبر روده را افزایش میدهد (Du et al., 2018). باسیلوس کواکولانز یک باکتری گرم مثبت، بی هوازی اختیاری، غیر بیماریزا، هاگساز و تولید کننده اسید لاکتیک است (Cao *et al.*, 2020; Y. Zhou *et al.*, 2020). در معده هاگ‌های آن فعال شده و در روده حیوان رشد و تکثیر می‌شوند (Xie *et al.*, 2022) که برای سلامتی حیوان مفید است (Abdallah *et al.*, 2020). با توجه به اینکه پروبیوتیک میتواند یک جایگزین ایمن برای آنتیبیوتیکها بوده و سبب بهبود عملکرد رشد گوسالهها شود. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثر پروبیوتیک باسیلوس کواگولانز DSM 32016 (تکنوسپور پروبیوتیک، بیوشیم) در شیر و خوراک بر عملکرد رشد، قابلیت هضم مواد مغذی، وضعیت ایمنی و وضعیت سلامت و امتیاز قوام مدفوع و فراسنجههای خونی گوسالههای هلشتاین شیرخوار بود.

پیشینه پژوهش

در دهه گذشته، اطلاعات در زمینه ایمنی بدن با پیامدهای قابل توجهی برای سلامت روده افزایش یافته است. این افزایش دانش نشان میدهد که دستگاه گوارش بزرگترین اندام ایمنی بدن است. لذا میتوان گفت که ایمنی مخاطی توسعه خود را در جنین آغاز میکند اما تا زمانی که سلولهای اپیتلیال مخاط در گوساله با میکروارگانیسمها (میکروبیوم) و/ یا محصولات آنها در لومن روده تعامل نداشته باشند، کارایی خاصی ندارند. تعامل بین سلولهای اپیتلیال و میکروبیوم برای توسعه ایمنی بموقع از جمله بلوغ، تنظیم و حفظ هموستاز سامانه ایمنی بدن لازم است (Chase, 2018). لذا درک توسعه شکمبه در گوسالههای تازه

[1] Bacillus amyloliquefaciens

متولد شده یکی از مهمترین مبحث قابل تمرکز در تغذیه گوساله است. راهکارهای توسعه شکمبه شامل تغییر در ترکیب جیره غذایی و اشکال فیزیکی آن و استفاده از انواع مواد افزودنی جدید خوراکی است (Diao *et al.*, 2019). پروبیوتیکها میکروارگانیسمهای زنده و مفیدی هستند که وقتی به مقدار کافی تجویز شوند، برای سلامت میزبان مفید بوده و به حفظ تعادل میکروبی دستگاه گوارش کمک کرده و رشد شکمبه را تقویت میکنند (Bermudez-Brito *et al.*, 2012; Diao *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2020). در سالهای اخیر نقش پروبیوتیکها در سلامت و بیماریها مورد توجه محققان قرار گرفته است و این ممکن است تا حدودی به دلیل عملکرد خوب پروبیوتیکها در پیشگیری و کاهش بیماریها و همچنین تمایل به درمانهای طبیعی باشد (Cao *et al.*, 2020). مطالعات نشان میدهند که پروبیوتیک ها باعث کاهش بروز اسهال و کاهش عدم تحمل لاکتوز میشوند، فعالیتهای ضد میکروبی و ضد سرطان روده داشته و از بیماری التهابی روده جلوگیری میکنند (Bermudez-Brito *et al.*, 2012). پروبیوتیک ها به دلیل فوایدی که برای دستگاه گوارش دارند و نقش آنها به عنوان یکی از بهترین جایگزینها برای آنتی بیوتیک ها در حیوانات از جمله طیور و ماهی، توجه بیشتری را از سوی متخصصان تغذیه دام و تولیدکنندگان دام به خود جلب کرده است.. انواع مختلفی از پروبیوتیک ها در بخش مواد غذایی، مراقبتهای پزشکی و دامپروری مانند *لاکتوباسیلوس*، *بیفیدوباکتریوم* و *باسیلوس سوبتیلیس* مورد استفاده قرار میگیرند به طور خاص، سویههای متعلق به *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* پرمصرف ترین فرآورده های پروبیوتیکی هستند. با این حال، اکثر این سویهها در برابر درجه حرارت شدید و همچنین اسید معده، آنزیمهای گوارشی و نمکهای صفراوی مقاوم نیستند (Zhou *et al.*, 2020). پروبیوتیک *باسیلوس آمیلولیکوفاسینس* در دستگاه گوارش میزبان بسیار پایدار بوده و چندین آنزیم خارج سلولی تولید میکند تا علاوه بر بهبود عملکرد سامانه ایمنی روده، قابلیت هضم و جذب مواد مغذی را نیز افزایش داده و از طریق حذف رقابتی از عفونت جلوگیری کند (Du *et al.*, 2018). به خوبی شناخته شده است که تجویز پروبیوتیکها تنوع، ترکیب و فراوانی نسبی فلور روده را تنظیم و تحت تأثیر قرار میدهد، در نتیجه باعث افزایش توانایی ایمنی بدن، کاهش بروز بیماریهای گوارشی و بهبود هضم و جذب مواد مغذی میشود. پروبیوتیک *باسیلوس کواکولانز* اولین بار توسط هامر در سال ۱۹۱۵ از کنسرو شیر فاسد جدا شد. در ابتدای کشف، *باسیلوس کواکولانز* به عنوان *لاکتوباسیلوس اسپوروژنز*[1] شناخته میشد که دارای ویژگیهای مشترک باسیلاسه و لاکتوباسیلاسه است (Zhou *et al.*, 2020). امروزه سویههای متعددی از *باسیلوس کواکولانز* وجود دارد که در خوراک دام مورد استفاده قرار میگیرند. *باسیلوس کواکولانز* میتواند میزان اسهال را کاهش دهد و عملکرد رشد خوک ها را بهبود بخشد. امروزه *باسیلوس کواکولانز* به طور گسترده در صنعت طیور مورد استفاده قرار گرفته است. *باسیلوس کواکولانز* دارای اثر محرک رشد روی جوجههای گوشتی است که این کار را از طریق بهبود تعادل میکروبیوتای روده برای بهبود ضریب تبدیل غذایی و همچنین از طریق افزایش فعالیت پروتئاز و آمیلاز انجام میدهد (Zhou *et al.*, 2020). Parhizkar *et al.*, (2022) نشان دادند که استفاده از پروبیوتیک *باسیلوس کواکولانز* DSM 32016 در مرغ مادر و جوجه گوشتی سبب افزایش تعداد تخم های تولیدی، وزن زرده و ضخامت پوسته تخم‌مرغ و جوجه درآوری، کاهش مرگ و میر میشود.

روش شناسی پژوهش

این آزمایش در یک مزرعه گاو شیری (شرکت شریفآباد، قزوین، ایران) انجام شد. تمام مراحل آزمایشی بر اساس دستورالعمل‌های استفاده از حیوانات آزمایشی و مطابق با الزامات کمیته اخلاق و محیط زیست حیوانات دانشگاه تهران بود.

گوساله، رژیم غذایی و تغذیه

این آزمایش با استفاده از ۶۰ رأس گوساله هلشتاین (۲۴ نر و ۳۶ ماده) با متوسط وزن ۴۰ کیلوگرم و از سن ۴ تا ۷۳ روزگی انجام شد. برای انجام این آزمایش فقط گوسالههای سالم که طی ۶ ساعت اول بعد از تولد ۴ لیتر آغوز (۱۰ درصد وزن بدن) مصرف کردند، انتخاب شد (Harris *et al.*, 2017). تغذیه گوسالهها در ۳ روز اول زندگی با آغوز با کیفیت خوب انجام شده و

1Lactobacillus sporogenes

وزن و ابعاد بدن در روز نخست اندازهگیری شد. گوسالهها به صورت تصادفی به دو گروه آزمایشی ۳۰ تایی اختصاص یافته و در جایگاه انفرادی نگهداری شده و طبق جدول ۱ تغذیه شدند. در طول آزمایش، گوسالهها با شیر کامل بدون افزودنی خوراکی دو بار در روز در ساعات ۶ و ۱۷ تغذیه شدند. شیر در دمای ۳۸ تا ۴۱ درجه سلسیوس و با استفاده از سطلهای فلزی عرضه و ۱۵ دقیقه پس از عرضه شیر، مقدار پسماند آن اندازهگیری شد (Harris *et al.*, 2017). خوراک گوساله و آب نیز در ظروف و سطلهای فلزی جداگانه از روز یک آزمایش ارائه شد. تغذیه شیر کامل از سن ۴ تا ۱۵ روزگی ۵ لیتر، از سن ۱۶ تا ۲۰ روزگی ۶ لیتر، از سن ۲۱ تا ۵۰ روز ۷ لیتر، از سن ۵۱ تا ۶۰ روز ۶ لیتر و از سن ۶۱ تا ۷۳ روزگی ۲ لیتر در روز بود. گوسالهها با شیر تا سن ۶۰ روزگی دو بار در روز و در ساعات ۰۶:۰۰ و ۱۶:۰۰ و از سن ۶۱ تا ۷۳ روزگی فقط یک بار در ساعت ۰۶:۰۰ تغذیه و در سن ۷۳ روزگی از شیر گرفته شدند. خوراک گوسالهها به صورت جداگانه از روز اول آزمایش به صورت آزاد ارائه شد. پسماند خوراک روزانه در ساعت ۰۷:۳۰ جمع آوری و ثبت شده و خوراک تازه در ساعت ۰۸:۰۰ ارائه شد. این آزمایش در دو مرحله ۱ تا ۵۰ روزگی و ۵۱ تا ۷۰ روزگی مورد ارزیابی قرار گرفت. مواد خوراکی مورد استفاده در خوراک پایه برای هر دو مرحله آزمایش به همراه ترکیبات شیمیایی در جدول ۱ نشان داده شده است. خوراک به طور آزاد تغذیه شد. به طوری که حداقل ۱۰ درصد خوراک به عنوان پسماند در یک دوره ۲۴ ساعته در ظرف باقی بماند. در این پژوهش از پروبیوتیک باکتریایی به نام تکنوسپور (شرکت بیوشیم، آلمان) استفاده شد. گوسالهها به صورت تصادفی در دو گروه شاهد: بدون مصرف پروبیوتیک و BC (Bacillus coagulans): ۶۰۰ میلی گرم پروبیوتیک *باسیلوس کواگولانز* DSM 32016 در هر کیلوگرم خوراک + ۶۰۰ میلی گرم *باسیلوس کواگولانز* DSM 32016 در هر کیلوگرم شیر قرار گرفتند. سلامت گوساله روزانه توسط دامپزشک بررسی و گوسالههای بیمار نیز توسط دامپزشک تحت درمان قرار گرفتند. گوسالهها سالم بودند و هیچ نشانه بالینی بیماری سیستمیک یا مرگ و میر در طول آزمایش مشاهده نشد.

جدول ۱. مواد خوراکی و ترکیب شیمیایی خوراک

مواد خوراکی	خوراک پایه دوره اول (۱-۵۰ روز)	خوراک پایه دوره دوم (۵۱-۷۰ روز)	مواد مغذی (%)	ترکیب شیمیایی خوراک دوره اول	ترکیب شیمیایی خوراک دوره دوم
یونجه	۰	۱۷/۳۰	ماده خشک	۹۱/۱۰	۷۰
کاه	۵	۰	NEm (Mcal/kg)	۱/۸۵	۱/۷۹
آب	۰	۱۷/۳۰	NEg (Mcal/kg)	۱/۲۴	۱/۱۸
ذرت	۵۶/۷۲	۳۹	پروتئین خام	۱۸/۲۳	۱۸/۲۲
سویا	۲۴/۸۸	۱۹/۱۶	NDF	۲۱/۹۴	۲۳/۷۲
سبوس گندم	۴/۸۳	۳/۴۰	ADF	۱۱/۸۰	۱۵/۱۲
* مکمل ویتامینه	۰/۸۳	۰/۵۶	NFC	۵۰/۰۳	۴۸
¶ مکمل معدنی	۰/۸۳	۰/۵۶	چربی خام	۲/۹۷	۲/۶۶
دی کلسیم فسفات	۰/۲۹	۰/۲۰			
جوش شیرین	۱/۱۶	۰/۸۰			
کربنات کلسیم	۰/۸۷	۰/۶۰			
توکسین بایندر	۰/۳۵	۰/۲۴			
بنتونیت	۰/۷۱	۰/۴۸			
اکسید منیزیم	۰/۱۱	۰/۰۸			
نمک	۰/۴۶	۰/۳۲			
جمع کل	**۱۰۰**	**۱۰۰**			

* هر کیلوگرم مکمل ویتامینه حاوی ۱۱۰۰۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین A، ۲۷۰۰۰۰ هزار ویتامین D3 و ۴۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین E است.
¶ هر کیلوگرم مکمل معدنی حاوی ۱۸۰ گرم کلسیم، ۲۰۵۰۰ میلیگرم روی، ۱۲۰۰۰ میلیگرم آهن، ۹۶۰۰ میلیگرم منگنز، ۴۸۰۰ میلیگرم مس، ۲۴۰ میلیگرم ید، ۱۲۵ میلیگرم کبالت و ۱۲۰ میلیگرم سلنیوم است.

صفات مورد ارزیابی

گوسالهها با استفاده از ترازوی الکترونیکی هر دو هفته یکبار وزن شدند. مصرف خوراک به صورت روزانه از اختلاف خوراک عرضه شده و پسماند آن در طی یک دوره زمانی ۲۴ ساعته محاسبه شد. راندمان خوراک[۱](FE) از تقسیم افزایش وزن روزانه[۲] (ADG) بر ماده خشک مصرفی[۳](DMI) کل (DMI شیر + DMI خوراک) محاسبه شد (Harris *et al.*, 2017). هر دو روز یک بار تا پایان دوره، نمره قوام مدفوع (۱؛ فوم خوب، ۲؛ مدفوع نرم، ۳؛ مدفوع شل و ۴؛ مدفوع آبکی)، بینی، چشم و گوش به صورت چشمی ارزیابی شد. قوام مدفوع با استفاده از مقیاس ۴ نقطهای تعریف شده است: ۱- فوم خوب (به خوبی شکل گرفته)، ۲- مدفوع نرم، ۳- مدفوع شل، ۴- مایع (مدفوع آبکی)؛ و اسهال زمانی تعریف شد که نمره مدفوع ۳ و ۴ بود. نمره چشم، گوش و بینی نیز هر دو روز یک بار و با استفاده از نمودار نمره سلامت گوساله دانشگاه ویسکانسین ارزیابی شد (McGuirk, 2013). دمای رکتال به صورت هفتگی با استفاده از یک دماسنج اندازهگیری شد و دقت دماسنج قبل از هر دوره با قرار دادن دماسنج در حمام آب در دمای مشخص ۳۸ تا ۴۱ درجه سلسیوس مورد بررسی و تایید شد (Harris *et al.*, 2017). دمای رکتال ۳۹/۴ درجه سلسیوس به عنوان آستانه تب تعیین شد و گوسالهها بلافاصله پس از تشخیص دماهای بالاتر از حد آستانه تب، به درمان آنتیبیوتیکی و الکترولیت اختصاص داده شدند. در نهایت، تعداد روزهای مبتلا به اسهال، روزهای با تب و روزهای تحت درمان با آنتیبیوتیک و الکترولیت برای هر گوساله به صورت جداگانه ثبت شد (Alimirzaei *et al.*, 2020). نمونههای مدفوع در روزهای ۶۴، ۶۵ و ۶۶ جمع آوری و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نمونههای مدفوع در آون در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت خشک شدند و سپس در آسیاب چکشی از طریق توری ۱ میلیمتری آسیاب شد. مقدار کمی از تمام نمونههای مدفوع خشک شده برای به دست آوردن یک نمونه مرکب برای هر حیوان مخلوط شدند. نمونههای خوراک و مدفوع برای تعیین ماده خشک، خاکستر، پروتئین خام ، چربی خام ، دیواره سلولی نامحلول در شوینده خنثی[۴](NDF) و کربوهیدرات غیر الیافی[۵](NFC) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (Van Soest *et al.*, 1991). خاکستر نامحلول در اسید به عنوان یک نشانگر داخلی در نمونههای خوراک و مدفوع برای اندازهگیری قابلیت هضم ظاهری کل مواد مغذی استفاده شد (Van Keulen & Young, 1977). برای تعیین فراسنجههای خونی از هر گروه آزمایشی تعداد ۴ گوساله به طور تصادفی انتخاب و نمونههای خون در روزهای ۱ و ۱۵ و ۴۵ و ۷۰ در ساعات اولیه صبح از سیاهرگ وداج و توسط لولههای خلأ جمعآوری شده و سرم پس از سانتریفوژ در ۱۵۰۰ xg به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای ۴ درجه سلسیوس جداسازی و در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس ذخیرهسازی شد. گلوکز، کلسترول، تری گلیسیرید، نیتروژن اوره خون، پروتئین کل و آلبومین با استفاده از کیتهای آزمایشی پارس آزمون و دستگاه اسپکتروفتومتر و بتا هیدروکسی بوتیرات با استفاده از کیت آزمایشی RANBUT ساخت شرکت Randox کشور انگلستان اندازهگیری شد. غلظت گلوبولین خون با کم کردن آلبومین از پروتئین کل محاسبه شد. جهت ارزیابی وضعیت ایمنی بدن، شاخصهای هماتولوژی از قبیل تعداد گلبولهای سفید خون (WBC[۶])، درصد نوتروفیل، درصد لنفوسیت، نسبت نوتروفیل به لنفوسیت، درصد مونوسیت و درصد ائوزینوفیل، از هر گروه آزمایشی در هر دوره خونگیری تعداد ۴ رأس گوساله به طور تصادفی انتخاب و نمونههای خون در روزهای ۱ و ۱۵ و ۴۵ و ۷۰ در ساعات اولیه صبح از سیاهرگ وداج و توسط لولههای خلأ حاوی EDTA جمعآوری شده و بالافاصله نمونه خون کامل در دمای ۴ درجه سلسیوس به آزمایشگاه دامپزشکی مبنا- کرج منتقل و با استفاده از آنالایزر هماتولوژیک اتوماتیک[۷](Technicon H1; Bayer, Toronto, Ontario) اندازهگیری شد.

روش آنالیز آماری

1Feed efficiency
2Average daily gain
3Dry matter intake
4Neutral detergent fibre
5Non-fibre carbohydrates
3. White blood cell
7Automated hematology analyzer

داده‌های ماده خشک مصرفی ، میانگین افزایش روزانه، بازده خوراک، وزن بدن و شاخص‌های سلامتی برای دو دوره آزمایش به صورت مجزا از روز ۱ تا ۵۰ و از روز ۵۱ تا ۷۰ آزمایش با استفاده از روش MIXED MODEL (SAS Institute, 2013) مطابق با مدل زیر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگینها با روش *LS means* و در سطح آماری P <۰/۰۵ گزارش شد.

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + A_{ij} + D_k + (TD)_{ik} + \varepsilon_{ijk},$$

Yijkl= مشاهده در روز k در حیوان j در تیمار i

μ= اثر میانگین جامعه

T_i= اثر تیمار i ام

A_{ij}= اثر تصادفی زمان j در تیمار i

D_k= اثر ثابت روز k

$(TD)_{ik}$= اثر متقابل ثابت تیمار i با روز k

ε_{ijk}= خطای تصادفی در روز k در حیوان j در درمان i

برای آنالیز دادههای غیرتکرار شونده نظیر قابلیت هضم ظاهری مواد از مدل زیر استفاده شده و آنالیز آن با استفاده از رویه GLM (SAS Institute, 2013) انجام شد.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Y_{ij}= مشاهدات متغیرهای وابسته

μ= میانگین کلی

T_i= اثر ثابت درمان i

ε_{ij}= خطای باقیمانده تصادفی

نتایج

ماده خشک مصرفی و عملکرد رشد

مصرف ماده خشک با مصرف پروبیوتیک *باسیلوس کواکولانز* در هر دو مرحله آزمایش تحت تأثیر قرار نگرفت (جدول ۲). علاوه بر این، میانگین افزایش روزانه، بازده خوراک و تغییرات قد گوسالهها در بین گروهها در طول آزمایش تفاوتی نداشت (P <۰/۰۵). میانگین افزایش وزن روزانه، میانگین بازده غذایی و DMI در گوساله‌های گروه BC از نظر عددی افزایش یافت. این افزایش در روزهای ۵۱ تا ۷۰ آزمایش بیشتر بود. اگرچه DMI با مصرف پروبیوتیک تغییر معنیداری نداشت، قابلیت هضم مواد مغذی در مقایسه با گروه شاهد تحت تأثیر قرار گرفت (P <۰/۰۵) (جدول ۳). قابلیت هضم NDF با مصرف پروبیوتیک کاهش یافت، در حالی که قابلیت هضم NFC به صورت معنیدار افزایش یافت (P <۰/۰۵).

جدول ۲. اثر پروبیوتیک باسیلوس کواگولانز بر عملکرد رشد گوسالههای هلشتاین شیرخوار هر دو مرحله آزمایش

صفات	گروههای آزمایشی[1]		SEM	P value		
	شاهد	BC		تیمار	دوره	تیمار*دوره
روز ۱ تا ۵۰ آزمایش						
ماده خشک مصرفی[2] (g/d)	۱۰۰۶/۶۲	۹۹۹/۶۷	۲۵/۲۴	۰/۸۵	۰/۰۱<	۰/۹۶
افزایش وزن روزانه (g)	۵۷۹/۳۶	۵۹۳/۰۳	۲۶/۴۱	۰/۷۲	۰/۰۱<	۰/۶۸
میانگین بازده غذایی[3]	۰/۵۸	۰/۶۱	۰/۰۲	۰/۳۱	۰/۰۱<	۰/۳۶
تغییرات قد گوساله (cm)	۱۰/۶۴	۱۰/۷۳	۰/۳۹	۰/۸۷	–	–
وزن اولیه (روز۱؛ kg)	۴۰/۱۷	۳۹/۹۲	۱/۵۷	۰/۹۱	–	–
وزن روز ۴۲	۶۴/۵۰	۶۴/۸۳	۲/۰۳	۰/۹۱	–	–
روز ۵۱ تا ۷۰ آزمایش						
ماده خشک مصرفی[2] (g/d)	۱۸۳۷/۵۲	۱۹۲۵/۳۱	۷۰/۴۵	۰/۳۹	۰/۰۱<	۰/۳۰
افزایش وزن روزانه (g)	۸۴۱/۵۶	۹۷۵/۰۰	۶۱/۷۲	۰/۱۵	۰/۰۱<	۰/۳۲
میانگین بازده غذایی[3]	۰/۵۱	۰/۵۵	۰/۰۳	۰/۳۵	–	–
تغییرات قد گوساله (cm)	۵/۹۳	۵/۹۳	۰/۳۱	۰/۹۹	–	–
وزن نهایی (روز۷۰؛ kg)	۸۸/۳۷	۹۲/۱۲	۳/۰۹	۰/۴۰	–	–

۱) گروههای آزمایشی شامل گروه شاهد و گروه ۶۰۰ گرم پروبیوتیک باسیلوس کواگولانز DSM 32016 در تن شیر و ۶۰۰ گرم پروبیوتیک باسیلوس کواگولانز DSM 32016 در تن خوراک (BC)

۲) کل ماده خشک مصرفی شامل شیر و خوراک

۳) بازده خوراک به عنوان نسبت افزایش وزن روزانه به ماده خشک مصرفی محاسبه شد.

جدول ۳. اثر پروبیوتیک باسیلوس کواگولانز بر قابلیت هضم ظاهری مواد مغذی (برحسب درصد)

صفات	گروههای آزمایشی[1]		SEM	P value
	شاهد	BC		
ماده خشک	۶۹ /۱۱[a]	۶۴/۶۷[b]	۰/۷۲	<۰/۰۱
ماده آلی	۷۰/۸۰[a]	۶۶/۷۴[b]	۰/۶۹	<۰/۰۱
پروتیین خام	۶۳/۰۵	۵۹/۳۷	۲/۰۳	۰/۲۳
[2]NDF	۵۸/۶۹[a]	۴۴/۹۲[b]	۰/۷۲	۰/۰۱<
[3]NFC	۷۰/۰۵[b]	۷۴/۷۳[a]	۱/۲۳	۰/۰۳
چربی خام	۶۵/۳۳	۶۲/۷۷	۲/۳۳	۰/۴۶

۱) گروههای آزمایشی شامل گروه شاهد و گروه ۶۰۰ گرم پروبیوتیک باسیلوس کواگولانز DSM 32016 در تن شیر و ۶۰۰ گرم پروبیوتیک باسیلوس کواگولانز DSM 32016 در تن خوراک (BC)

a، b: میانگینهای هر ردیف با حروف غیرهمسان اختلاف معنیدار دارند (P <۰/۰۵).

2. Neutral detergent fibre
3. Non-fibre carbohydrates

قوام مدفوع و وضعیت سلامت

همه گوسالهها بدون هیچ نشانهای از بیماری در طول مطالعه سالم بودند. وضعیت سلامت، از جمله امتیاز قوام مدفوع و نمره ظاهر گوساله در طول آزمایش در جدول ۴ ارائه شده است. نتایج نشان میدهد که گوسالههای تحت تیمار با پروبیوتیک *باسیلوس کواگولانز* قوام مدفوع پایینتری داشتند (P <۰/۰۵). وضعیت سلامت مانند نمرات چشم، گوش و بینی با مصرف پروبیوتیک *باسیلوس کواگولانز* در مقایسه با گروه شاهد در هر دو دوره آزمایشی به صورت معنیدار بهبود یافت (P <۰/۰۵).

نتایج شاخصهای سلامت در جدول ۵ ارائه شده است. تعداد روزهای تحت درمان با آنتیبیوتیکها و الکترولیتها بین گروهها مشابه بود. با این حال، روزهای با تب در هر دو دوره و دمای رکتال در طول روز ۵۱ تا ۷۰ در گروه تیماری به طور قابل توجهی کاهش یافت (P <۰/۰۵).

جدول ٤. اثر پروبیوتیک باسیلوس کواگولانز بر امتیاز قوام مدفوع و وضعیت سلامت گوسالههای هلشتاین شیرخوار

صفات	گروههای آزمایشی[1]		SEM	P value		
	شاهد	BC		تیمار	دوره	تیمار*دوره
روز ۱ تا ۵۰ آزمایش						
امتیاز قوام مدفوع	۲/۱۵	۲/۰۲	۰/۰۵	۰/۰۷	۰/۰۱<	۰/۰۵
اسکور چشم	۱/۷۰[a]	۱/۳۶[b]	۰/۰۶	۰/۰۱<	۰/۰۱<	۰/۰۱<
اسکور گوش	۱/۴۵[a]	۱/۱۴[b]	۰/۰۴	۰/۰۱<	۰/۰۱<	۰/۰۲
اسکور بینی	۱/۶۶[a]	۱/۴۵[b]	۰/۰۵	۰/۰۱<	۰/۰۱<	۰/۰۱<
روز ۵۱ تا ۷۰ آزمایش						
امتیاز قوام مدفوع	۱/۵۶[a]	۱/۳۶[b]	۰/۰۵	۰/۰۱<	۰/۶۵	۰/۲۲
اسکور چشم	۱/۵۱[a]	۱/۲۵[b]	۰/۰۵	۰/۰۱<	۰/۲۸	۰/۱۰
اسکور گوش	۱/۵۰[a]	۱/۱۵[b]	۰/۰۵	۰/۰۱<	۰/۲۷	۰/۲۴
اسکور بینی	۱/۴۱[a]	۱/۱۲[b]	۰/۰۵	۰/۰۱<	۰/۶۵	۰/۶۱

۱) گروههای آزمایشی شامل گروه شاهد و گروه ۶۰۰ گرم پروبیوتیک با سیلوس کواگولانز DSM 32016 در تن شیر و ۶۰۰ گرم پروبیوتیک با سیلوس کواگولانز DSM 32016 در تن خوراک (BC)

a، b: میانگینهای هر ردیف با حروف غیرهمسان اختلاف معنیدار دارند (P <۰/۰۵).

جدول ۵. اثر پروبیوتیک باسیلوس کواگولانز بر شاخصهای سلامت گوسالههای هلشتاین شیرخوار

صفات	گروههای آزمایشی[1]		SEM	P value		
	شاهد	BC		تیمار	دوره	تیمار*دوره
روز ۱ تا ۵۰ آزمایش						
روزهای با اسهال	۱/۳۷	۱/۰۳	۰/۳۵	۰/۵۱	–	–
روزهای تحت درمان	۲/۷۳	۲/۵۳	۰/۵۱	۰/۹۷	–	–
دمای رکتال[2] (°C)	۰/۰۹	۰/۰۷	۰/۰۲	۰/۲۸	۰/۰۱<	۰/۴۲
روزهای با تب	۰/۳۶[a]	۰/۱۵[b]	۰/۰۵	۰/۰۱<	–	–
روز ۵۱ تا ۷۰ آزمایش						
روزهای تحت درمان	۰/۵۴	۰/۴۷	۰/۳۳	۰/۹۵	–	–
دمای رکتال[2] (°C)	۰/۲۳[a]	۰/۰۹[b]	۰/۰۴	۰/۰۱<	۰/۴۰	۰/۶۳
روزهای با تب	۰/۶۷[a]	۰/۲۸[b]	۰/۰۴	۰/۰۱<	–	–

۱) گروههای آزمایشی شامل گروه شاهد و گروه ۶۰۰ گرم پروبیوتیک با سیلوس کواگولانز DSM 32016 در تن شیر و ۶۰۰ گرم پروبیوتیک با سیلوس کواگولانز DSM 32016 در تن خوراک (BCf600+m600)

۲) دمای رکتال≤ ۳۸/۴°C

a، b: میانگینهای هر ردیف با حروف غیرهمسان اختلاف معنیدار دارند (P <۰/۰۵).

متابولیتهای سرم خون و شاخصهای هماتولوژی

اثر پروبیوتیک *باسیلوس کواگولانز* بر متابولیتهای سرم خون و شاخصهای هماتولوژی گوسالههای هلشتاین شیرخوار در جدول ۶ و ۷ نشان داده شده است. تریگلیسیرید، آلبومین و پروتئین کل، گلوبولین، نسبت گلوبولین به آلبومین و غلظت نیتروژن اوره خون تحت تاثیر مصرف پروبیوتیک قرار نگرفت. در مقایسه با گروه شاهد با مصرف پروبیوتیک تمایل به کاهش سطح کلسترول در هر دو دوره آزمایش و افزایش سطح گلوکز و بتا هیدروکسی بوتیرات در طول دوره ۵۱ تا ۷۰ روزگی وجود داشت (P<۰/۰۵). در مقایسه با گروه شاهد، گروه تیماری پروبیوتیک *باسیلوس کواگولانز* سطح افزیشیافته لنفوسیت و سطح کاهش یافته نوتروفیل و نسبت نوتروفیل به لنفوسیت را در طول روز ۵۱ تا ۷۰ نشان داد (P <۰/۰۵).

جدول ٦. اثر پروبیوتیک باسیلوس کوآگولانز بر فراسنجههای خونی گوسالههای هلشتاین شیرخوار

صفات	گروههای آزمایشی[1]		SEM	P value		
	شاهد	BC		تیمار	دوره	تیمار*دوره
روز ۱ تا ۵۰ آزمایش						
گلوگز (mg/dl)	۱۰۴/۲۵	۱۱۱/۵۰	۷/۶۵	۰/۵۳	۰/۳۱	۰/۱۶
کلسترول (mg/dl)	۱۰۲/۱۲[a]	۷۷/۲۵[b]	۶/۹۱	۰/۰۴	۰/۰۱<	۰/۲۸
تری گلسیرید (mg/dl)	۲۳/۱۲	۱۶/۰۰	۲/۶۶	۰/۱۱	۰/۶۴	۰/۴۹
نیتروژن اورهای (mg/dl)	۱۷/۱۹	۱۹/۲۵	۱/۱۱	۰/۲۴	۰/۸۰	۰/۰۸
بتا هیدروکسی بوتیرات (mmol/l)	۰/۰۴۷	۰/۰۶۵	۰/۰۰۷	۰/۱۴	۰/۱۳	۰/۹۹
آلبومین (g/dl)	۳/۲۶	۳/۱۵	۰/۰۹	۰/۴۳	۰/۶۴	۰/۲۹
کل پروتئین پلاسما (g/dl)	۶/۲۱	۵/۷۹	۰/۱۸	۰/۱۵	۰/۰۱<	۰/۲۸
گلوبولین (g/dl)	۲/۹۵	۲/۶۴	۰/۱۵	۰/۱۹	۰/۰۱<	۰/۳۶
نسبت آلبومین به گلوبولین	۱/۱۶	۱/۲۳	۰/۰۷	۰/۵۳	۰/۰۱<	۰/۳۴
روز ۵۱ تا ۷۰ آزمایش						
گلوگز (mg/dl)	۹۷/۰۰[b]	۱۰۵/۷۵[a]	۲/۶۲	۰/۰۵	۰/۴۳	۰/۰۵
کلسترول (mg/dl)	۱۶۱/۰۰	۱۰۷/۸۸	۱۶/۸۸	۰/۰۶	۰/۰۷	< ۰ /۰۱
تری گلسیرید (mg/dl)	۳۰/۱۲	۳۹/۱۲	۷/۲۷	۰/۴۱	۰/۸۹	۰/۷۱
نیتروژن اورهای (mg/dl)	۱۸/۱۷	۱۷/۲۵	۱/۲۲	۰/۶۴	۰/۹۱	۰/۷۳
بتا هیدروکسی بوتیرات (mmol/l)	۰/۲۲۰[b]	۰/۳۰۹[a]	۰/۰۲۴	۰/۰۴	۰/۰۱<	۰/۵۰
آلبومین (g/dl)	۳/۴۴	۳/۴۱	۰/۰۵	۰/۷۵	۰/۰۷	۰/۹۹
کل پروتئین پلاسما (g/dl)	۶/۰۲	۶/۱۵	۰/۱۸	۰/۶۳	۰/۰۱	۰/۱۷
گلوبولین (g/dl)	۲/۵۹	۲/۷۴	۰/۲۱	۰/۶۳	۰/۲۶	۰/۱۷
نسبت آلبومین به گلوبولین	۱/۳۴	۱/۳۰	۰/۱۲	۰/۸۳	۰/۵۵	۰/۶۷

۱) گروههای آزمایشی شامل گروه شاهد و گروه ۶۰۰ گرم پروبیوتیک باسیلوس کوآگولانز DSM 32016 در تن شیر و ۶۰۰ گرم پروبیوتیک باسیلوس کوآگولانز DSM 32016 در تن خوراک (BC)

a، b: میانگینهای هر ردیف با حروف غیرهمسان اختلاف معنیدار دارند (P <۰/۰۵).

جدول ۷. اثر پروبیوتیک باسیلوس کوآگولانز بر شاخصهای هماتولوژی در گوساله‌های هلشتاین شیرخوار

صفات	گروههای آزمایشی[1]		SEM	P value		
	شاهد	BC		تیمار	دوره	تیمار*دوره
روز ۱ تا ۵۰ آزمایش						
گلبولهای سفید خون (µl/)	۷۶۵۰/۰۰	۶۶۶۲/۵۰	۷۲۱/۴۵	۰/۳۷	۰/۰۴	۰/۹۲
لنفوسیت (٪)	۷۴/۱۲	۷۳/۰۰	۱/۴۷	۰/۶۱	۰/۳۵	۰/۲۵
نوتروفیل (٪)	۲۳/۷۵	۲۶/۱۲	۱/۷۲	۰/۳۷	۰/۳۸	۰/۲۱
نسبت نوتروفیل به لنفوسیت	۰/۳۳	۰/۳۷	۰/۰۳	۰/۴۰	۰/۳۸	۰/۲۱
مونوسیت (٪)	۱/۷۵	۱/۳۷	۰/۴۷	۰/۵۹	۰/۶۵	۰/۲۰
ائوزینوفیل (٪)	۰/۳۷	۰/۵۰	۰/۱۷	۰/۶۲	۰/۵۴	۰/۰۲
روز ۵۱ تا ۷۰ آزمایش						
گلبولهای سفید خون (µl/)	۹۸۵۰/۰۰	۱۱۴۷۵/۰۰	۹۱۲/۴۷	۰/۲۵	۰/۰۵	۰/۵۲
لنفوسیت (٪)	۶۹/۲۵[b]	۷۵/۶۲[a]	۱/۲۷	۰/۰۱	۰/۶۶	۰/۷۴
نوتروفیل (٪)	۲۸/۲۵[a]	۲۲/۱۳[b]	۱/۳۳	۰/۰۲	۰/۶۷	۰/۶۰
نسبت نوتروفیل به لنفوسیت	۰/۴۱[a]	۰/۲۹[b]	۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۷۳	۰/۶۹
مونوسیت (٪)	۱/۷۵	۱/۶۲	۰/۳۲	۰/۷۹	۰/۷۰	۰/۷۰
ائوزینوفیل (٪)	۰/۷۵	۰/۸۷	۰/۳۲	۰/۷۹	۰/۷۳	۰/۳۲

۱) گروههای آزمایشی شامل گروه شاهد و گروه ۶۰۰ گرم پروبیوتیک باسیلوس کوآگولانز DSM 32016 در تن شیر و ۶۰۰ گرم پروبیوتیک باسیلوس کوآگولانز DSM 32016 در تن خوراک (BC)

a، b: میانگینهای هر ردیف با حروف غیرهمسان اختلاف معنیدار دارند (P <۰/۰۵).

بحث

ماده خشک مصرفی و عملکرد رشد

Agazzi *et al.*, (2014) با استفاده از ترکیبی از پروبیوتیکهای *لاکتوباسیلوس انیمالیس*[1] SB310، *لاکتوباسیلوس پروکازئی* زیر شاخه پروکازئی[2] SB137 و *باسیلوس کواگولانز* SB117 به ترتیب با نسبت ۳۰: ۳۵: ۳۵ درصد، بهبود مصرف خوراک گوساله، افزایش وزن بدن و کاهش بروز بیماری را در مقایسه با گروه شاهد گزارش دادند. مشابه نتایج ما، Pinos-Rodríguez *et al.*, (2002) گزارش دادند که مصرف پروبیوتیک برای میانگین وزن، میانگین افزایش روزانه یا بازده خوراک تاثیری ندارد، اگرچه ماده خشک مصرفی برای گوساله‌های گروه تیماری در مقایسه با گوساله‌های گروه شاهد بیشتر بود. باکتریهای *باسیلوس کواگولانز* میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که برای بهبود سلامت و بهره‌وری حیوانات از طریق تحریک پاسخ ایمنی میزبان و نیز از طریق ارتباط آن با بافت لنفوئیدی مرتبط با روده، ترشحات مواد، حذف رقابتی باکتری‌های بیماری‌زا و افزایش تعداد میکروارگانیسم‌های مفید در روده تجویز می‌شوند (Morrison *et al.*, 2010). *باسیلوس کواگولانز* با تولید اسید لاکتیک و سایر اسیدهای آلی و باکتریوسینها مانند لاکتوسپورین، کلونیزاسیون باکتریهای مضر را کاهش میدهد (Riazi *et al.*, 2009). به نظر میرسد پاسخ گوساله به مصرف پروبیوتیک با نحوه مصرف، نوع پروبیوتیک شامل باکتری و مخمر و ترکیب جیره غذایی میتواند متفاوت باشد (Lesmeister & Heinrichs, 2004; Wagner *et al.*, 1990).

قوام مدفوع و وضعیت سلامت

کاهش امتیاز قوام مدفوع و اسهال نشان میدهد که مصرف *باسیلوس کواگولانز* سلامت روده را بهبود بخشید و رشد عوامل بیماریزا را در روده مهار کرد. *باسیلوس کواگولانز*، یک باکتری گرم مثبت و غیر بیماریزا است که معمولاً از دستگاه گوارش حیوانات جدا میشود. این پروبیوتیک میتواند با سایر باکتریهای مضر در دستگاه گوارش رقابت کند و از تکثیر باکتریهای بیماریزا جلوگیری کند. مکانیسمهایی که *باسیلوس کواگولانز* قادر به مبارزه با باکتریهای مضر است عبارتند از: مهار رشد سایر باکتریهای بیماریزا رودهای حساس به pH مانند *اشریشیا کلی* از طریق تولید اسید لاکتیک (Cavazzoni *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 2006) که منجر به افزایش نسبت لاکتوباسیلها به باکتری *اشریشیا کلی* میشود (Hung *et al.*, 2012)، بهبود مقاومت در برابر بیماری روده با تحریک لکوسیتها و مخاط دستگاه گوارش (Mingmongkolchai & Panbangred, 2018) و افزایش ارتفاع پرزها در ژژنوم (Hung *et al.*, 2012). Nagashima *et al.*, (2010) افزایش بروز اسهال را در روزهای اولیه زندگی گوسالهها گزارش دادند، زیرا میکرو فلورای روده گوسالهها در این دوره حساستر است. L. Zhang *et al.*, (2019) به این نتیجه رسیدند که تغذیه گوساله‌های شیرخوار هلشتاین با *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*[3] نمره قوام مدفوع را کاهش می‌دهد. همچنین در مطالعه Geiger *et al.*, (2014) نیز بهبود نمره قوام مدفوع با مصرف پریبیوتیک DFM[4] مشاهده شد. Galvão *et al.*, (2005) گزارش دادند که گوسالههایی که با مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در جایگزین شیر تغذیه شده بودند، روزهای کمتری را درگیر اسهال در طول دوره شیرخوارگی داشتند که با نتایج ما مطابقت داشت. در مطالعه حاضر، امتیاز قوام مدفوع در دوره دوم آزمایش نیز در گوساله‌هایی گروه تیماری بهبود یافت و نشان داد که گوساله‌ها در دوره ۵۱ تا ۷۰ روز آزمایش هنوز تحت تنش نبودند. وضعیت سلامت گوساله‌های تغذیه شده با پروبیوتیک *باسیلوس کواگولانز* با امتیاز پایین نمره چشم، گوش و بینی در این مطالعه نشان داده شد.

مطالعه حاضر نشان میدهد که روزهای با تب در هر دو دوره و دمای رکتال در طول روز ۵۱ تا ۷۰ و همچنین اسهال با مصرف پروبیوتیک *باسیلوس کواگولانز* کاهش مییابد. پروبیوتیک‌ها می‌توانند حیوانات میزبان را در برابر عوامل بیماریزایی

1Lactobacillus animalis
2Lactobacillus paracasei subspecies paracasei SB137
3Lactobacillus rhamnosus
4direct-fed microbial

روده‌ای با «حذف رقابتی» محافظت کنند (Fuller, 1989). پروبیوتیک *باسیلوس کواگولانز* به عنوان یک پروبیوتیک در صنعت دامپروری مورد استفاده قرار گرفته است (Ripamonti *et al.*, 2009; X. Zhou *et al.*, 2010) و قادر به مهار رشد *اشریشیا کلی* میشود (Lonkar *et al.*, 2005)، ولی سازوکار آن در دستگاه گوارش کاملاً مشخص نیست. برخی از مطالعات گزارش دادند که پروبیوتیک *باسیلوس کواگولانز* میتواند باکتریوسینهای مقاوم در برابر حرارت تولید کند که بدون هر گونه اثر مهاری بر روی لاکتوباسیلها، سبب کاهش رشد باکتریهای بیماریزا شود (Hyronimus *et al.*, 1998; Le Marrec *et al.*, 2000). این با مطالعه ما مطابقت دارد که پروبیوتیک *باسیلوس کواگولانز* به طور عددی جمعیت لاکتوباسیلوس را افزایش و باکتریهای کلیفرم را در نمونههای مدفوع کاهش داده است. گزارش شده است که گونه لاکتوباسیلوس محیط گوارشی را بهبود میبخشد و میتواند سامانه ایمنی و پاسخ التهابی را تعدیل کند (Abe et al., 1995; Oikonomou *et al.*, 2013). Sun *et al.*, (2022) گزارش دادند که مصرف پروبیوتیک *باسیلوس کواگولانز* در خوک پس از شیرگیری تاثیر مثبتی بر عملکرد رشد و اسهال داشته و تنوع میکروبی روده را بهبود میبخشد و میتواند به عنوان جایگزینی برای آنتیبیوتیکها در خوراک استفاده شود. با توجه به کاهش نمره مدفوع و اسهال در گروه تیماری و با توجه به نشانگرهای التهابی سیستمیک، روزهای کمتر با تب در گوسالههای گروه تیماری ممکن است نشان دهنده حساسیت کمتر این گوسالهها به بیماریها و عفونتها باشد.

متابولیتهای سرم خون و شاخصهای هماتولوژی

وزن بدن و امتیازدهی وضعیت بدن به طور طبیعی برای ارزیابی وضعیت تغذیهای دام استفاده میشود، اما غلظت متابولیتهای سرم ارزیابی دقیقتری را ارائه میدهد. به طوری که غلظت سرمی متابولیتهایی نظیر گلوکز، کلسترول، تریگلیسرید، نیتروژن اوره خون[1](BUN)، پروتئین کل معمولاً برای ارزیابی وضعیت تغذیه دام استفاده میشود (Khajehdizaj *et al.*, 2014). تغذیه گوساله با پروبیوتیک اثر مضری بر متابولیتهای سرم نداشت (جدول ۶). L. Zhang *et al.*, (2019) به این نتیجه رسیدند که تغذیه گوسالههای شیرخوار هلشتاین با *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، سبب افزایش غلظت بتا هیدروکسی بوتیرات پلاسما میشود. سلامت گوسالهها را میتوان از طریق ارزیابی تعداد نوتروفیلها، تعداد لنفوسیتها و نسبت نوتروفیل به لنفوسیت ارزیابی کرد (Von Konigslow *et al.*, 2019). استرس و التهاب را میتوان با استفاده از این پارامترهای خونی برای ارزیابی آسایش دام مشخص نمود. Novak *et al.*, (2012) گزارش دادند که مصرف پروبیوتیک بر پایه باسیلوس در گوسالههای شیرخوار، لکوسیتهای سیتوتوکسیک[2]و سلولهای T را افزایش داده و تاثیر مثبتی بر تکثیر لنفوسیتها دارد. علاوه بر این، Kodali & Sen, (2008) نشان دادند که پروبیوتیک *باسیلوس کوآگولانز* قادر به تقویت عملکرد فاکتورهای سلولی، بهبود فاگوسیتوز سلولهای فاگوسیتوز، افزایش فعالیت سلولهای NK، T و B و افزایش بیان IgA، IgG و IgM است.

درصد ائوزینوفیل در مطالعه حاضر در هیچ یک از دو دوره تحت تأثیر قرار نگرفت (جدول ۷). Akagawa *et al.*, (2016) گزارش دادند که باکتریهای پروبیوتیک *باسیلوس کوآگولانز* در موش تاثیری در پارامترهای هماتولوژی ندارد، زیرا هیچ تغییری در تعداد گلبولهای سفید، نوتروفیلها، یا ائوزینوفیلها، یا هر گونه تغییرات هیستوپاتولوژی نشان دهنده التهاب در هر اندام/ بافت موش صحرایی از جمله دستگاه گوارش دستگاه با حداکثر دوز مصرفی پروبیوتیک *باسیلوس کواگولانز* SANK70258 (۲۰۰۰ میلیگرم/کیلوگرم/روز) مشاهده نکردند. بر خلاف نتایج ما، Agazzi *et al.*, (2014) با مصرف پروبیوتیک بر پایه باسیلوس در گوساله، افزایش درصد ائوزینوفیل را مشاهده کردند، در حالی که درصد بازوفیل کاهش یافته بود. McDonnell *et al.*, (2019) مقادیر مشابهی از تعداد نوتروفیلها و لنفوسیتها را در طول مرحله قبل از شیرگیری یافتند، با این حال، گروههای تیماری پروبیوتیک سطوح کاهش یافته نوتروفیل و افزایش سطح درصد لنفوسیت را در طول روز ۵۱ تا ۷۰ آزمایش نشان دادند. نسبت نوتروفیل به لنفوسیت مطابق با McDonnell *et al.*, (2019) بود. نسبت نوتروفیل به لنفوسیت بالاتر با پاسخ ایمنی به عوامل استرسزا همراه بود (Swanson & Morrow-Tesch, 2001) نشان میدهد که گوسالهها با مصرف پروبیوتیک در طول دوره ۱ تا

1Blood Urea Nitrogen
2Cytotoxic Leukocytes

۵۰ روزگی درگیر هیچ چالش عفونتی نبوده است، در حالی که نسبت بهبود یافته در طول روز ۵۱ تا ۷۰ نشان دهنده این موضوع است. همچنین افزایش پاسخ ایمنی گوسالهها و افزایش تعداد لنفوسیتهای مشاهده شده در گروه تیماری، میتواند نشان دهنده یک سیستم ایمنی با عملکرد بالاتر و پاسخگوتر با مصرف پروبیوتیک *باسیلوس کواگولانز* باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که تغذیه با پروبیوتیک *باسیلوس کواگولانز* DSM 32016 باعث بهبود امتیاز قوام مدفوع و وضعیت سلامت گوساله، افزایش قابلیت هضم NFC و افزایش سطح لنفوسیت در گوسالههای شیرخوار هلشتاین میشود که نشان دهنده بهبود پاسخ ایمنی گوسالههای تغذیه شده با پروبیوتیک، کاهش علائم بیماریهایی نظیر اسهال و تأثیر مثبت بر فلور روده، است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از شرکت بیوشیم آلمان به دلیل حمایت مالی از این طرح و همچنین از دانشگاه تهران، کرج، ایران و شرکت شریف آباد، قزوین، ایران جهت حمایت از اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی میکنند.

RERERENCES

Abdallah, A., Elemba, E., Zhong, Q., & Sun, Z. (2020). Gastrointestinal interaction between dietary amino acids and gut microbiota: with special emphasis on host nutrition. *Current Protein and Peptide Science*, *21*(8), 785-798.

Abe, F., Ishibashi, N., & Shimamura, S. (1995). Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *Journal of dairy science*, *78*(12), 2838-2846.

Agazzi, A., Tirloni, E., Stella, S., Maroccolo, S., Ripamonti, B., Bersani, C., ni Savoini, G. (2014). Effects of species-specific probiotic addition to milk replacer on calf health and performance during the first month of life. *Annals of Animal Science*, *14*(1), 101.

Akagawa, Y., Ohnishi, Y., Takaya, M., & Watanabe, Y. (2016). Safety assessment of probiotic bacteria, Bacillus coagulans strain SANK70258, in rats. *Fundamental Toxicological Sciences*, *3*(6), 243-250.

Alimirzaei, M., Alijoo, Y., Dehghan-Banadaky, M., & Eslamizad, M. (2020). The effects of feeding high or low milk levels in early life on growth performance, fecal microbial count and metabolic and inflammatory status of Holstein female calves. Animal, 14(2), 303-311.

Apas, A. L., Arena, M. E., Colombo, S., & Gonzalez, S. N. (2015). Probiotic administration modifies the milk fatty acid profile, intestinal morphology, and intestinal fatty acid profile of goats. *Journal of dairy science*, *98*(1), 47-54.

Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., & Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, *61*(2), 160-174.

Boonmar, S., Bangtrakulnonth, A., Pornruangwong, S., Samosornsuk, S., Kaneko, K.-i., & Ogawa, M. (1998). Significant increase in antibiotic resistance of Salmonella isolates from human beings and chicken meat in Thailand. *Veterinary Microbiology*, *62*(1), 73-80.

Cao, J., Yu, Z., Liu, W., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., & Chen, W. (2020). Probiotic characteristics of Bacillus coagulans and associated implications for human health and diseases. *Journal of Functional Foods*, *64*, 103643.

Cavazzoni, V., Adami, A., & Castrovilli, C. (1998). Performance of broiler chickens supplemented with Bacillus coagulans as probiotic. *British poultry science*, *39*(4), 526-529.

Chase, C. C. (2018). Enteric immunity: Happy gut, healthy animal. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, *34*(1), 1-18.

Diao, Q., Zhang, R., & Fu, T. (2019). Review of strategies to promote rumen development in calves. *Animals*, *9*(8), 490.

Du, R., Jiao, S., Dai, Y., An, J., Lv, J., Yan, X., Han, B. (2018). Probiotic Bacillus amyloliquefaciens C-1 improves growth performance, stimulates GH/IGF-1, and regulates the gut microbiota of growth-retarded beef calves. *Frontiers in microbiology, 9*, 2006.

Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *The Journal of applied bacteriology, 66*(5), 365-378.

Galvão, K. N., Santos, J. E., Coscioni, A., Villaseñor, M., Sischo, W. M., & Berge, A. C. B. (2005). Effect of feeding live yeast products to calves with failure of passive transfer on performance and patterns of antibiotic resistance in fecal Escherichia coli. *Reproduction Nutrition Development, 45*(4), 427-440.

Geiger, A., Ward, S., Williams, C., Rude, B., Cabrera, C., Kalestch, K., & Voelz, B. (2014). Effects of increasing protein and energy in the milk replacer with or without direct-fed microbial supplementation on growth and performance of preweaned Holstein calves. *Journal of dairy science, 97*(11), 7212-7219.

Guo, X., Li, D., Lu, W., Piao, X., & Chen, X. (2006). Screening of Bacillus strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of Bacillus subtilis MA139 in pigs. *Antonie van leeuwenhoek, 90*, 139-146.

Hammon, H., Liermann, W., Frieten, D., & Koch, C. (2020). Importance of colostrum supply and milk feeding intensity on gastrointestinal and systemic development in calves. *Animal, 14*, s133-s143.

Harris, T., Liang, Y., Sharon, K., Sellers, M., Yoon, I., Scott, M., Ballou, M. (2017). Influence of Saccharomyces cerevisiae fermentation products, SmartCare in milk replacer and Original XPC in calf starter, on the performance and health of preweaned Holstein calves challenged with Salmonella enterica serotype Typhimurium. *Journal of dairy science, 100*(9), 7154-7164.

Hung, A. T., Lin, S.-Y., Yang, T.-Y., Chou, C.-K., Liu, H.-C., Lu, J.-J., Lien, T.-F. (2012). Effects of Bacillus coagulans ATCC 7050 on growth performance, intestinal morphology, and microflora composition in broiler chickens. *Animal Production Science, 52*(9), 874-879.

Hyronimus, Marrec, L., & Urdaci. (1998). Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by Bacillus coagulans I4. *Journal of applied microbiology, 85*(1), 42-50.

Khajehdizaj, F. P., Taghizadeh, A., & Nobari, B. B. (2014). Effect of feeding microwave irradiated sorghum grain on nutrient utilization, rumen fermentation and serum metabolites in sheep. *Livestock Science, 167*, 161-170.

Kodali, V. P., & Sen, R. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of an exopolysaccharide from a probiotic bacterium. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology, 3*(2), 245-251.

Le Marrec, C., Hyronimus, B., Bressollier, P., Verneuil, B., & Urdaci, M. C. (2000). Biochemical and genetic characterization of coagulin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by Bacillus coagulans I4. *Applied and environmental microbiology, 66*(12), 5213-5220.

Lesmeister, K., & Heinrichs, A. (2004). Effects of corn processing on growth characteristics, rumen development, and rumen parameters in neonatal dairy calves. *Journal of dairy science, 87*(10), 3439-3450.

Lonkar, P., Harne, S., Kalorey, D., & Kurkure, N. (2005). Isolation, in vitro antibacterial activity, bacterial sensitivity and plasmid profile of Lactobacilli. *Asian-australasian journal of animal sciences, 18*(9), 1336-1342.

McDonnell, R. P., O'Doherty, J. V., Earley, B., Clarke, A. M., & Kenny, D. A. (2019). Effect of supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and/or β-glucans on performance, feeding behaviour and immune status of Holstein Friesian bull calves during the pre-and post-weaning periods. *Journal of animal science and biotechnology, 10*, 1-17.

McGuirk, S. (2013). Calf Health Scoring Chart. University of Wisconsin, School of Veterinary Medicine.

Mingmongkolchai, S., & Panbangred, W. (2018). Bacillus probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. *Journal of applied microbiology, 124*(6), 1334-1346.

Morrison, S., Dawson, S., & Carson, A. (2010). The effects of mannan oligosaccharide and Streptococcus faecium addition to milk replacer on calf health and performance. *Livestock Science, 131*(2-3), 292-296.

Nagashima, K., Yasokawa, D., Abe, K., Nakagawa, R., Kitamura, T., Miura, T., & Kogawa, S. (2010). Effect of a Lactobacillus species on incidence of diarrhea in calves and change of the microflora associated with growth. *Bioscience and microflora, 29*(2), 97-110.

Novak, K., Davis, E., Wehnes, C., Shields, D., Coalson, J., Smith, A., & Rehberger, T. (2012). Effect of supplementation with an electrolyte containing a Bacillus-based direct-fed microbial on immune development in dairy calves. *Research in Veterinary Science, 92*(3), 427-434.

Oikonomou, G., Teixeira, A. G. V., Foditsch, C., Bicalho, M. L., Machado, V. S., & Bicalho, R. C. (2013). Fecal microbial diversity in pre-weaned dairy calves as described by pyrosequencing of metagenomic 16S rDNA. Associations of Faecalibacterium species with health and growth. *PloS one, 8*(4), e63157.

Parhizkar, S., Zaghari, M., & Zhandi, M. (2022). Beneficial effect of Bacillus coagulans DSM 32016 on performance and productivity of broiler breeders. *Journal of Livestock Science and Technologies, 10*(1), 31-40.

Pinos-Rodríguez, J., González, S., Mendoza, G., Bárcena, R., Cobos, M., Hernández, A., & Ortega, M. (2002). Effect of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. *Journal of Animal Science, 80*(11), 3016-3020.

Pinto, M. G. V., Gómez, M. R., Seifert, S., Watzl, B., Holzapfel, W. H., & Franz, C. M. (2009). Lactobacilli stimulate the innate immune response and modulate the TLR expression of HT29 intestinal epithelial cells in vitro. *International journal of food microbiology, 133*(1-2), 86-93.

Riazi, S., Wirawan, R., Badmaev, V., & Chikindas, M. (2009). Characterization of lactosporin, a novel antimicrobial protein produced by Bacillus coagulans ATCC 7050. *Journal of applied microbiology, 106*(4), 1370-1377.

Ripamonti, B., Agazzi, A., Baldi, A., Balzaretti, C., Bersani, C., Pirani, S., Stenico, A. (2009). Administration of Bacillus coagulans in calves: recovery from faecal samples and evaluation of functional aspects of spores. *Veterinary Research Communications, 33*, 991-1001.

Sánchez, B., Delgado, S., Blanco-Míguez, A., Lourenço, A., Gueimonde, M., & Margolles, A. (2017). Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Molecular nutrition & food research, 61*(1), 1600240.

SAS Institute 2013. SAS/STAT 9.1 User's Guide. SAS Inst., Inc., Cary, NC.

Schofield, B. J., Lachner, N., Le, O. T., McNeill, D. M., Dart, P., Ouwerkerk, D., Klieve, A. V. (2018). Beneficial changes in rumen bacterial community profile in sheep and dairy calves as a result of feeding the probiotic Bacillus amyloliquefaciens H57. *Journal of applied microbiology, 124*(3), 855-866.

Sun, T., Miao, H., Zhang, C., Wang, Y., Liu, S., Jiao, P., Huang, Z. (2022). Effect of dietary Bacillus coagulans on the performance and intestinal microbiota of weaned piglets. *Animal, 16*(7), 100561

Swanson, J., & Morrow-Tesch, J. (2001). Cattle transport: Historical, research, and future perspectives. *Journal of Animal Science, 79*(suppl_E), E102-E109.

Timmerman, H. M., Mulder, L., Everts, H., van Espen, D. C., van der Wal, E., Klaassen, G., Beynen, A. C. (2005). Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. *J Dairy Sci, 88*(6), 2154-2165. jds.S0022-0302(05)72891-5

Van Keulen, J., & Young, B. (1977). Evaluation of acid-insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. *Journal of Animal Science, 44*(2), 282-287.

Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci, 74*(10), 3583-3597. jds.S0022-0302(91)78551-2

Von Konigslow, T., Renaud, D., Duffield, T., Higginson, V., & Kelton, D. (2019). Validation of an automated cell counter to determine leukocyte differential counts in neonatal Holstein calves.

Journal of dairy science, *102*(8), 7445-7452.

Wagner, D., Quinonez, J., & Bush, L. (1990). The effect of corn-or wheat-based diets and yeast culture on performance, ruminal pH, and volatile fatty acids in dairy calves. *Agri-Practice, 11*(2), 7-12.

World Health Organization. Antibacterial agents in clinical development. Geneva; 2017.

Xie, S., Zhang, H., Matjeke, R. S., Zhao, J., & Yu, Q. (2022). Bacillus coagulans protect against Salmonella enteritidis-induced intestinal mucosal damage in young chickens by inducing the differentiation of goblet cells. *Poultry Science*, *101*(3), 101639.

Xu, H., Huang, W., Hou, Q., Kwok, L.-y., Sun, Z., Ma, H., Zhang, H. (2017). The effects of probiotics administration on the milk production, milk components and fecal bacteria microbiota of dairy cows. *Science Bulletin*, *62*(11), 767-774.

Zhang, L., Jiang, X., Liu, X., Zhao, X., Liu, S., Li, Y., & Zhang, Y. (2019). Growth, health, rumen fermentation, and bacterial community of Holstein calves fed Lactobacillus rhamnosus GG during the preweaning stage. *Journal of Animal Science, 97*(6), 2598-2608.

Zhang, Y., Wu, S., Ma, J., Xia, Y., Ai, X., & Sun, J. (2015). Bacterial protein AvrA stabilizes intestinal epithelial tight junctions via blockage of the C-Jun N-terminal kinase pathway. *Tissue Barriers*, *3*(1-2), e972849.

Zhou, X., Wang, Y., Gu, Q., & Li, W. (2010). Effect of dietary probiotic, Bacillus coagulans, on growth performance, chemical composition, and meat quality of Guangxi Yellow chicken. *Poultry Science*, *89*(3), 588-593.

Zhou, Y., Zeng, Z., Xu, Y., Ying, J., Wang, B., Majeed, M., Li, W. (2020). Application of Bacillus coagulans in animal husbandry and its underlying mechanisms. *Animals*, *10*(3), 454.