
Effect of feeding *Bacillus coagulans* and *Bacillus subtilis* probiotics on growth performance, health, and blood parameters in suckling Holstein calves

Omid Bouzari¹, Armin Towhidi^{2*}, Mahdi Zhandi³

¹ M.S.c. Student, Department of Animal Science, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran,

² Professor, Department of Animal Science, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran, Email: atowhidi@ut.ac.ir

³ Professor, Department of Animal Science, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran,

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 03/08/2023
Revised: 05/13/2023
Accepted: 05/14/2023

Keywords:
Calf health
Diarrhea
Probiotic
Suckling calf

ABSTRACT

Background and Objectives: Gastrointestinal tract infections and subsequent diarrhea are the main reasons for the mortality of newborn calves. Diarrhea is the most common disease that occurs on cattle farms and causes death and serious economic losses to the livestock industry. Due to negative effects of antibiotics, including bacterial resistance to them, many countries in the world have banned the use of antibiotics in the animal industry since 1996. The use of probiotics is mostly seen as an alternative to antibiotics in animals, and many scientific works show the beneficial effects of supplements with probiotic strains in the diets of different farm animals. Probiotics have been shown to have positive effects on the whole body, including improved weight gain and immune function, and reducing the presence of pathogens. This study aimed to evaluate the probiotics *Bacillus coagulans* and *Bacillus subtilis* and their effect on the growth performance, health, and prevalence of diarrhea in suckling Holstein calves.

Materials and Methods: In the present study, 32 Holstein calves with an average weight of 43.03±9.07 kg were used in a completely randomized design with two treatments and 16 replications. The experimental treatments included the control group and the group consuming probiotics. The length of the experimental period was 28 days. Body weights were measured and recorded every week while the measurements for dry matter intake and health status were conducted every day. Every week, blood samples were taken from the calves, and the samples were kept at 4°C until reaching the laboratory. Blood samples were analyzed for complete blood parameters, including the number of white blood cells (WBC), red blood cells (RBC), platelets (PLT), percentage of basophils, percentage of neutrophils (NUT), percentage of eosinophils (E), percentage of lymphocytes (LYM), percentage of monocytes (M), and red blood cells indices such as hemoglobin (Hb) and compact cell volume (PVC). Fecal samples were taken on days 7, 14, and 28 of the experiment. Samples were cultured in the laboratory for

microbial analysis.

Results: The results showed that probiotic supplementation did not affect weight, daily weight gain, skeletal growth, feed efficiency, and blood parameters. The use of probiotic supplements increased the dry matter intake by 7.6% between days 1 to 7 of the experiment, 5.2% during days 22 to 28, and 4.5% for the whole period of the experiment. Moreover, the number of *lactobacilli* in feces increased significantly by 26.68% on the seventh day of the experiment ($P<0.05$). Fecal score, duration of diarrhea, and body temperature decreased by 7.61%, 4.4%, and 1.5%, respectively under the influence of probiotic supplements ($P<0.05$).

Conclusion: Probiotic oral supplement improved the symptoms of diarrhea and the negative effects of diarrhea, and it also improved the feed efficiency and increased the beneficial bacteria of the gastrointestinal tract system in suckling calves.

Cite this article: Bouzari, O., Towhidi, A., Zhandi, M. (2023). Effect of feeding *Bacillus coagulans* and *Bacillus subtilis* probiotics on growth performance, health, and blood parameters in suckling Holstein calves. *Journal of Ruminant Research*, 11(3), 81-96.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/ejrr.2023.21163.1890

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

اثر تغذیه پروبیوتیک‌های *Bacillus subtilis* و *Bacillus coagulans* بر عملکرد رشد، سلامت و برخی فراسنجه‌های خونی در گوساله‌های شیر خوار هلشتاین

امید بوذری^۱، آرمین توحیدی^{۲*}، مهدی ژندی^۳

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

^۲ استاد گروه علوم دامی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. atowhidi@ut.ac.ir

^۳ استاد گروه علوم دامی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله:	سابقه و هدف: عفونت‌های دستگاه گوارش و اسهال و در پی آن از دست دادن آب بدن، بخش عمده‌ای از مرگ‌ومیر و ناخوشی گوساله‌های نوزاد را به خود اختصاص می‌دهند. اسهال شایع‌ترین بیماری است که در گاو‌داری‌ها رخ می‌دهد و باعث مرگ و زیان اقتصادی جدی به صنعت دام‌پروری می‌شود. به دلیل مشکلات آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله ظهور باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، بسیاری از کشورهای جهان استفاده از این آنتی‌بیوتیک‌ها را در صنعت حیوانات از سال ۱۹۹۶ ممنوع اعلام کرده‌اند. استفاده از پروبیوتیک‌ها بیشتر به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک در حیوانات دیده می‌شود و بسیاری از آثار علمی، نشان‌دهنده اثر مفید مکمل‌های با سویه‌های پروبیوتیک در جیره‌های غذایی حیوانات مزرعه‌ای مختلف است. ثابت شده که پروبیوتیک‌ها اثرات مثبتی بر عملکرد بدن از جمله افزایش وزن و بهبود ایمنی و کاهش حضور پاتوژن‌ها دارد. این مطالعه باهدف ارزیابی پروبیوتیک‌های <i>Bacillus subtilis</i> و <i>Bacillus coagulans</i> و اثر آن بر عملکرد رشد، سلامت و شیوع اسهال در گوساله‌های شیرخوار هلشتاین انجام شد.
مقاله کامل علمی - پژوهشی	
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۱۷	
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۲/۲۳	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۲/۲۴	
واژه‌های کلیدی:	
اسهال	
پروبیوتیک	
سیستم ایمنی	
گوساله شیرخوار	
	مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر از ۳۲ رأس گوساله شیرخوار نژاد هلشتاین با میانگین وزن ۹/۰۷ ± ۴۳/۰۳ کیلوگرم در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تیمار و ۱۶ تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل گروه شاهد و گروه مصرف‌کننده پروبیوتیک بودند. طول دوره آزمایشی ۲۸ روز بود. وزن بدن هر هفته و مصرف ماده خشک و وضعیت سلامت هر روز بررسی و اندازه‌گیری شد. هر هفته از گوساله‌ها نمونه خون گرفته شد و خون‌ها تا رسیدن به آزمایشگاه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و سپس فراسنجه‌های خونی کامل از جمله تعداد گلبول‌های سفید (WBC)، گلبول‌های قرمز (RBC)، پلاکت‌ها (PLT)، درصد بازوفیل‌ها، درصد نوتروفیل‌ها (NUT)، درصد ائوزینوفیل‌ها (E)، درصد لنفوسیت‌ها (LYM)، درصد مونوسیت‌ها (M) و شاخص‌های گلبول قرمز مانند هموگلوبین (Hb) و حجم فشرده سلولی (PVC) اندازه‌گیری شد. نمونه مدفوع برای کشت میکروبی در روزهای هفتم، ۱۴ م و ۲۸ م گرفته شد و در آزمایشگاه کشت داده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد مکمل پروبیوتیک اثری بر وزن، افزایش وزن روزانه، رشد اسکلتی، بازده غذایی و فراسنجه‌های خونی نداشت. مصرف مکمل پروبیوتیک باعث افزایش میزان مصرف خوراک به مقدار ۷/۶ درصد در بازه یک تا هفت روزگی، ۵/۲ درصد در بازه ۲۲ تا ۲۸ روزگی و ۴/۵ درصد در کل دوره آزمایش شد. همچنین تعداد لاکتوباسیل‌های مدفوع در روز هفتم آزمایش به‌طور معنی‌داری به میزان ۲۶/۶۸ درصد افزایش یافت ($P < 0/05$). نمره مدفوع، مدت‌زمان اسهال و دمای بدن تحت تأثیر مکمل پروبیوتیک به ترتیب به میزان ۷/۶۱ درصد، ۴/۴ درصد و ۱/۵ درصد کاهش یافتند ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: مکمل خوراکی پروبیوتیک توانست اسهال و آثار منفی ناشی از اسهال را بهبود ببخشد و همچنین باعث بهبود عملکرد مصرف خوراک و افزایش باکتری‌های مفید دستگاه گوارش در گوساله‌های شیرخوار شود.

استناد: بوذری، ا.، توحیدی، آ.، ژندی، م. (۱۴۰۲). اثر تغذیه پروبیوتیک‌های *Bacillus subtilis* و *Bacillus coagulans* بر عملکرد رشد، سلامت و برخی فراسنجه‌های خونی در گوساله‌های شیرخوار هلستاین. پژوهش در نشخوارکنندگان، ۱۱(۳)، ۸۱-۹۶.

DOI: 10.22069/ejrr.2023.21163.1890



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

عفونت‌های دستگاه گوارش و اسهال و در پی آن از دست دادن آب بدن، بخش عمده‌ای از علل مرگ‌ومیر و ناخوشی گوساله‌های نوزاد را به خود اختصاص می‌دهند (USDA, 2007) و زیان اقتصادی جدی به صنعت دام‌پروری وارد می‌سازد (Radostits, 1975). از آنجایی که مقاومت به بیماری در گوساله‌ها در مقایسه با گاوهای بالغ کمتر است، گوساله‌ها به راحتی دچار اسهال می‌شوند. اسهال در گوساله‌های جوان باعث تأخیر در رشد و تسریع مرگ می‌شود، بنابراین لازم است تا از بروز اسهال در گوساله‌ها جلوگیری شود (Choi و همکاران، 2000؛ Lee و همکاران، 2012). به دلیل مشکلات آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله ظهور مقاومت باکتریایی، بسیاری از کشورهای جهان استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها را در صنعت دام‌پروری از سال 1996 ممنوع اعلام کرده‌اند (Jarlier و همکاران، 2012). استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک در حیوانات رایج است و بسیاری از گزارش‌های علمی نشان‌دهنده اثرات مفید مکمل‌های حاوی سویه‌های پروبیوتیکی در حیوانات مزرعه‌ای مختلف است (Veizaj-Delia و همکاران، 2010). استفاده از مکمل‌های پروبیوتیک‌ها باعث افزایش عملکرد و بهبود وضعیت سلامت می‌شود (Azizi Nasab و همکاران، 2020). کارآزمایی‌های بالینی استفاده از پروبیوتیک‌ها را در پیشگیری و درمان بیماری‌های گوارشی ناشی از میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا یا اختلالات در میکروفلور روده را مفید ارزیابی کرده‌اند (Ayichew و همکاران، 2017). باکتری‌های پروبیوتیک با تثبیت میکروبیوتای سالم و در نتیجه بهبود سد نفوذپذیری روده، با فرآیندهای التهابی مقابله می‌کنند (Casula و همکاران، 2022). علاوه بر تأثیرگذاری بر میکروبیوتای روده و سامانه ایمنی، سازوکارهای

دیگری از عملکرد پروبیوتیک‌ها هم چون مهار پاتوژن‌ها با رقابت برای مواد مغذی و مکان‌های اتصال یا تولید مواد ضد میکروبی، کاهش سطح کلسترول از طریق غیرهم‌یوغش^۱ کردن نمک‌های صفاوی یا اتصال به سموم و جلوگیری از جذب آن‌ها پیشنهاد شده است (Mercenier و همکاران، 2003). مزیت اصلی این مکمل‌ها، اثر افزایشی بر باکتری‌های مفید روده است (Heinrichs و همکاران، 2009). نشان داده شده است که پروبیوتیک‌ها اثرات مثبتی بر کل بدن از جمله افزایش وزن و عملکرد ایمنی و کاهش حضور پاتوژن‌ها دارد (Gibson و Roberfroid، 1995؛ karamzadeh و dehaghani و همکاران، 2020). استفاده از پروبیوتیک‌های اسپورزا به ویژه باسیلوس سوتیلیس^۲، به عنوان پروبیوتیک‌ها می‌تواند مزایای بسیاری را برای حیوانات فراهم کند (Cutting، 2011). تشکیل هاگ به پروبیوتیک‌ها توانایی بیشتری می‌بخشد تا در برابر تنش‌های موجود در طول فرآیندهای تولید و ذخیره‌سازی و همچنین در برابر شرایط معده (pH و آنزیم‌های گوارشی) و روده، مقاومت کنند (Gandhi و Haldar، 2016). در واقع، تعدادی از محصولات حاوی هاگ‌های باسیلوس سوتیلیس در حال حاضر به عنوان پروبیوتیک برای حیوانات اهلی به ویژه گاو (Peng و همکاران، 2012)، خوک (Larsen و همکاران، 2014) و مرغ (Jeong و Kim، 2014) تجاری شده‌اند. Peng و همکاران (2012) نشان دادند باسیلوس سوتیلیس هیچ اثر منفی بر فراسنجه‌های خون حیوانات نداشت، همچنین گاوهای تغذیه شده با محصول تخمیری، شیر بیشتری تولید کردند و کارایی غذایی بالاتری داشتند (Peng و

1. non-conjugated

2. *Bacillus subtilis*

همکاران، ۲۰۱۲). باسیلوس کواگولانز^۱ نیز یکی دیگر از امیدوارکننده‌ترین باکتری‌های اسپورساز مورد استفاده به‌عنوان یک عامل پروبیوتیک است (Ripamonti و همکاران، ۲۰۰۹). در واقع، باسیلوس کواگولانز را می‌توان باکتری تشکیل‌دهنده اسپور، گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری و میله‌ای متحرک تعریف کرد که قادر به رشد در دامنه وسیعی از دما (۳۰-۵۷ درجه سانتی‌گراد) و مقادیری متفاوت از pH (۴-۱۰) است (Drago و DeVecchi، ۲۰۰۶).

پژوهشگران نشان دادند که مکمل غذایی باسیلوس کواگولانز در جوجه‌های گوشتی باعث بهبود عملکرد رشد و میکروفلور روده آن‌ها می‌شود (Khajeh Bami و همکاران، ۲۰۲۰). محققین گزارش کردند که تغذیه سویه لاکتوباسیلوس به گوساله‌ها بروز اسهال را کاهش می‌دهد که منجر به بهبود افزایش وزن بدن و کارایی تغذیه می‌شود (Timmerman و همکاران، ۲۰۰۵). علی‌رغم مطالعات بسیار در زمینه انواع پروبیوتیک‌ها، هیچ گزارشی از ارزیابی عملکرد ترکیبی پروبیوتیک‌های *B. subtilis* و *coagulans* (به‌ویژه مورد اول) در دسترس نیست؛ بنابراین این مطالعه باهدف ارزیابی تأثیر دو پروبیوتیک مذکور بر عملکرد رشد، سلامت و شیوع اسهال در گوساله‌های شیرخوار هلشتاین بود.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایشی: از میان گوساله‌های شرکت تلیسه نمونه (شهریار، تهران، ایران) تعداد ۳۲ رأس گوساله هلشتاین تازه متولدشده با میانگین وزن بدن (۹/۰۷±۴۳/۰۳ کیلوگرم) از بدو تولد انتخاب و تحت یک دستورالعمل مدیریتی دقیق به مدت ۲۸ روز (از اواسط دی‌ماه تا اواخر اسفندماه ۱۴۰۰) در جایگاه‌های انفرادی و در بستر کاه نگهداری شدند. به‌طور تصادفی گوساله‌ها به دو تیمار با ۱۶ گوساله تقسیم شدند که

1. *Bacillus coagulans*

در هر تیمار تا حد ممکن از نظر تعداد زایش مادرانشان، ماه تولد و نیز وزن تولد متوازن بودند (تعداد نر و ماده در هر تیمار برابر بود). پروبیوتیک‌های تجاری *B. subtilis* و *B. coagulans* از شرکت بامداد رسپینا (مشهد، ایران) تهیه شد. گروه‌های آزمایشی شامل تغذیه تا ۲۸ روز پس از تولد با شیر غنی‌شده با پروبیوتیک (تیمار) و گروه شاهد^۲ (بدون دریافت پروبیوتیک) بودند. در هر وعده شیردهی ۲۵ گرم از پروبیوتیک‌های مذکور به شیر مصرفی هر گوساله اضافه و به‌طور کامل حل می‌شد. همچنین گوساله‌ها دسترسی آزاد به آب آشامیدنی و خوراک آغازین داشتند.

عملکرد رشد و شاخص‌های سلامت در گوساله‌ها:

وزن بدن هر گوساله در بدو تولد و سپس هر هفت روز یک‌بار پیش از تغذیه صبح اندازه‌گیری شد، همچنین فراسنجه‌های رشد اسکلتی نیز هر هفت روز یک‌بار اندازه‌گیری شد (Karamzadeh-Dehaghani و همکاران، ۲۰۲۱). مصرف خوراک روزانه از تفاوت بین خوراک ارائه‌شده و خوراک باقیمانده مشخص شد. وضعیت سلامت گوساله‌ها (دمای بدن، وضعیت ابتلا به اسهال، طول مدت اسهال) روزانه توسط دامپزشک ثابت ارزیابی شد. قوام مدفوع هر گوساله هر روز صبح قبل از تغذیه با شیر، توسط یک کاردان واجد شرایط نمره‌گذاری شد (McGuirk و Peek، ۲۰۱۴). در صورت تشخیص اسهال شدید، دمای بدن گوساله‌ها ثبت شد. برنامه درمانی گوساله‌ها شامل الکترولیت‌های خوراکی (ORS)، تولید داروهای دامی، تهران، ایران)، داروی ضد اسهال (اسکورز استاپ، تولید داروهای دامی، تهران، ایران) و Pantrisul و Pantex Holland, Smaragdweg، هلند) بود که در

۲. نام اختصاری گروه‌های آزمایشی در جداول و متن به‌ترتیب عبارتند از: تغذیه با مکمل پروبیوتیک تا ۲۸ روز: Pro و گروه شاهد (بدون دریافت هر نوع مکملی): Co.

صورت تشخیص اسهال به مدت سه روز دریافت می کردند.

جدول ۱- اجزای جیره و ترکیب شیمیایی خوراک آغازین گوساله‌های شیرخوار (برحسب درصد ماده خشک)

Table 1- Ingredients and Chemical composition of diet of suckling calves (% of dry matter)

کیلوگرم (kg)	ماده خوراکی (Feed ingredient)
43.00	دانه ذرت (Corn)
15.40	دانه جو (Barley)
36.00	کنجاله سویا (Soybean meal)
1.00	بافر (Buffer)
0.60	نمک (Salt)
0.50	بتونیت (Bentonite)
1.00	کربنات کلسیم (CaCO ₃)
2.50	مکمل ویتامینی و معدنی ^۱ (Vitamin and mineral premix)

درصد ماده خشک (%DM)	ترکیب شیمیایی (Chemical composition)
93.28	ماده خشک (DM)
2.73	انرژی قابل متابولیسم (ME Mcal/kg)
20.81	پروتئین خام (CP)
17.19	الیاف نامحلول در شوینده خنثی (NDF)
6.03	الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (ADF)
46.35	کربوهیدرات غیر الیافی (NFC)
3.81	عصاره اتری (EE)
5.81	خاکستر (Ash)

۱. پرمیکس در هر کیلوگرم از خوراک: ویتامین A: ۱۴۴۰۰۰ IU؛ ویتامین D3: ۴۸۰۰۰ IU؛ ویتامین E: ۱۰۰۰ IU؛ آهن: ۲۴۰۰ میلی‌گرم؛ مس: ۸۴۰ میلی‌گرم؛ منگنز: ۲۴۰۰ میلی‌گرم؛ روی: ۲۴۰۰ میلی‌گرم؛ سلنیوم ۱۶ میلی‌گرم؛ ید: ۲۴ میلی‌گرم؛ کبالت: ۱۶ میلی‌گرم؛ کلسیم: ۳۱/۴۴ گرم؛ فسفر: ۱۵/۹ گرم.

1. Premix per kg of feed: Vitamin A: 144,000 IU; Vitamin D3: 48,000 IU; Vitamin E: 1000 IU; Iron: 2400 mg; Copper: 840 mg; Manganese: 2400 mg; Zinc: 2400 mg; Selenium 16 mg; Iodine: 24 mg; Cobalt: 16 mg; Calcium: 31.44 grams; Phosphorus: 15.9 grams.

(E)، درصد لنفوسیت‌ها (LYM)، درصد مونوسیت‌ها (M) و شاخص‌های گلبول قرمز مانند هموگلوبین (Hb) و حجم فشرده سلولی (PVC) از روش فلوسیتومتری فلورسانس (آزمایشگاه دامپزشکی مینا، البرز، ایران) استفاده شد.

در ۲۸ روزگی نمونه مدفوع با دستکش استریل جمع‌آوری و در لوله‌های استریل قرار داده شد. جمعیت باکتریایی با استفاده از محیط‌های رشد آگار *de Man, Rogosa, and Sharpe* (MRS) برای کشت لاکتوباسیلوس، آگار *Violet Red Bile* (VRB) برای کشت *شریشاکلامی* و آگار *Violet Red Bile* (VRBD) *Dextrose* برای کشت کلی‌فرم‌ها اندازه‌گیری شد (Dibaji و همکاران، ۲۰۱۴). کشت

فراسنجه‌های خونی و کشت میکروبی مدفوع: برای

ارزیابی فراسنجه‌های خون شناسی گوساله‌ها، ابتدا ۲۴ تا ۴۸ ساعت پس از تولد و سپس هر هفت روز یکبار پس از تولد، نمونه‌های خون (۷ میلی‌لیتر) از طریق سیاهرگ وداج با استفاده از لوله‌های ونوجکت حاوی EDTA (Greiner BioOne, Vacuette) اتریش) گرفته شد. قبل از انجام آنالیز، نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس حمل و نگهداری شدند. برای تعیین تعداد انواع سلول‌های مختلف در خون کامل از جمله تعداد گلبول‌های سفید (WBC)، گلبول‌های قرمز (RBC)، پلاکت‌ها (PLT)، درصد بازوفیل‌ها، درصد نوتروفیل‌ها (NUT)، درصد ائوزینوفیل‌ها

میکروبی مدفوع در آزمایشگاه دامپزشکی مینا (البرز، ایران) انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

این آزمایش، در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌های جمع‌آوری شده، داده‌های تکرارشونده در زمان با رویه‌ی MIXED به وسیله نرم‌افزار آماری SAS 9.4 و اکاوی شد. اثر حیوانات آزمایشی به عنوان اثر تصادفی در معرض ساختارهای ماتریس واریانس-کوواریانس قرار گرفتند. میانگین‌ها به صورت LSMeans گزارش شد. نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون Shapiro-Wilk بررسی شد. هم‌چنین سطح معنی‌داری با آزمون توکی و در سطح $P < 0.05$ گزارش و تفسیر شد. معادله‌ی مدل مورد استفاده در زیر ذکر شده است.

مدل آماری مورد استفاده در رویه Mixed:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + (TP)_{ij} + A_{ijk}(T_i) + e_{ijk}$$

که در آن Y_{ijk} : میانگین مشاهده مربوط به صفت مورد بررسی، μ : میانگین جمعیت آزمایشی، T_i : اثر i امین تیمار، P_j : اثر j امین زمان، $(TP)_{ij}$: اثر متقابل i امین تیمار در j امین دوره آزمایشی، $A_{ijk}(T_i)$: اثر تصادفی حیوان در تیمار آزمایشی، e_{ijk} : اثر عوامل باقیمانده می‌باشند.

فرمول تئوری کوواریانس:

$$S_{xy} = \frac{\sum (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{n - 1}$$

که در آن X_i و Y_i : مشاهدات i ام از دو متغیر X و Y ، \bar{X} و \bar{Y} : میانگین مشاهدات دو متغیر X و Y ، n : حجم نمونه می‌باشند.

نتایج و بحث

عملکرد رشد و بازده غذایی: در جدول ۲ نتایج وزن بدن، افزایش وزن روزانه و رشد اسکلتی گوساله‌های تحت آزمایش ارائه شده است. تفاوت معنی‌داری بین

وزن بدن، افزایش وزن روزانه و رشد اسکلتی گوساله‌ها مشاهده نشد. باین حال تأثیر پروبیوتیک‌ها بر افزایش وزن در نیمه دوم دوره‌ی آزمایش بیشتر بود. نتایج پژوهش مشابهی نشان داد که گوساله‌هایی که پروبیوتیک یا سین‌بیوتیک دریافت کردند، اثر مفیدی بر روی وزن در اوایل دوره پیش از شیر گرفتن در آن‌ها دیده نشد (Lucy و همکاران، ۲۰۲۱). هم‌چنین در پژوهش دیگری تغذیه گوساله‌ها با مکمل *B. subtilis* تا ۶۰ روزگی نیز اثر معنی‌داری بر روی وزن نداشت (Molyanova و همکاران، ۲۰۲۱). همسو با این پژوهش، ژانگ و همکاران (۲۰۱۶) دریافتند که تفاوت معنی‌داری در وزن بدن، خوراک مصرفی، بازده خوراک در گوساله‌های هلشتاین تغذیه شده با مکمل *B. subtilis* یافت نشد (Zhang و همکاران، ۲۰۱۶). علاوه بر این، گوساله‌هایی که به‌طور معمول با شیر تغذیه می‌شوند ممکن است در هفته اول زندگی از دست بدهند یا افزایش وزن بسیار کمی داشته باشند (Weary و Jasper، ۲۰۰۲).

در مطالعه حاضر تفاوتی در فراسنجه‌های رشد اسکلتی مشاهده نشد با توجه به معنی‌دار نشدن افزایش وزن گوساله‌ها، همسو با پژوهش حاضر، پژوهش‌ها نشان داده است که این شاخص‌ها، همراه با افزایش وزن بدن تغییر می‌کنند (Riddell و همکاران، ۲۰۱۰). به‌طور مشابه، نشان داده شد که هیچ تفاوتی در فراسنجه‌های رشد اسکلتی با گنجاندن پروبیوتیک در جیره غذایی گوساله‌ها مشاهده نشد (Jenny و همکاران، ۱۹۹۱). هم‌چنین در پژوهشی دیگر در گوساله‌های شیرخوار، فراسنجه‌های رشد اسکلتی به مکمل پروبیوتیکی پاسخ ندادند (Windschitl و همکاران، ۱۹۹۱).

اثر تغذیه پروبیوتیک‌های *Bacillus subtilis* و *Bacillus coagulans* بر... / امید بوذری و همکاران

جدول ۲- اثر استفاده از پروبیوتیک بر عملکرد و شاخص‌های رشد گوساله‌های شیرخوار

Table 2. The effect of using probiotics on performance and growth indicators of weanling calves

P value		SEM	پروبیوتیک Probiotic	شاهد Control	دوره (روز) period (d)
تیمار× زمان Treat×Day	تیمار Treat				
					وزن بدن (کیلوگرم) Weight (Kg)
-	0.758	1.14	40.81	40.30	یک‌روزگی 1 d
-	0.234	1.07	40.56	38.66	۷ روزگی 7 d
-	0.698	1.19	41.29	40.61	۱۴ روزگی 14 d
-	0.955	1.18	42.77	42.67	۲۱ روزگی 21 d
-	0.546	1.13	46.64	45.65	۲۸ روزگی 28 d
					افزایش وزن روزانه (کیلوگرم) Daily Weight Gain (Kg)
0.020	0.128	0.08	-0.03	-0.23	یک تا ۷ روزگی 1-7 d
0.056	0.116	0.06	0.11	0.26	۸ تا ۱۴ روزگی 8-14 d
0.120	0.219	0.03	0.21	0.28	۱۵ تا ۲۱ روزگی 15-21 d
0.061	0.276	0.06	0.53	0.44	۲۲ تا ۲۸ روزگی 22-28 d
0.145	0.657	0.03	0.20	0.18	۱ تا ۲۸ روزگی 1-28 d
					ارتفاع جدوگاه (سانتی‌متر) Withers Height (cm)
-	0.212	0.42	74.84	74.91	یک روزگی 1 d
-	0.950	0.33	75.80	75.73	۷ روزگی 7 d
-	0.435	0.46	76.96	77.72	۱۴ روزگی 14 d
-	0.620	0.50	78.31	79.22	۲۱ روزگی 21 d
-	0.731	0.54	79.85	80.40	۲۸ روزگی 28 d
					ارتفاع هیپ (سانتی‌متر) Hip Height (cm)
-	0.952	0.49	78.50	78.54	یک روزگی 1 d
-	0.257	0.43	79.96	80.19	۷ روزگی 7 d
-	0.604	0.53	81.59	82.39	۱۴ روزگی 14 d
-	0.818	0.59	83.39	83.83	۲۱ روزگی 21 d
-	0.869	0.57	85.42	85.42	۲۸ روزگی 28 d

<i>P</i> value		SEM	پروبیوتیک Probiotic	شاهد Control	دوره (روز) period (d)
تیمار × زمان Treat × Day	تیمار Treat				
					28 d عرض هیپ (سانتی متر) Hip Width (cm)
-	0.354	0.17	17.91	17.78	یک روزگی
-	0.607	0.14	18.50	18.62	۷ روزگی
-	0.847	0.15	19.26	19.32	۱۴ روزگی
-	0.925	0.18	19.95	20.10	۲۱ روزگی
-	0.675	0.22	20.39	20.19	۲۸ روزگی
					28 d دور سینه (سانتی متر) Heart Girth (cm)
-	0.934	0.51	79.86	79.89	یک روزگی
-	0.558	0.48	80.57	79.91	۷ روزگی
-	0.131	0.52	82.35	82.02	۱۴ روزگی
-	0.339	0.57	84.26	83.68	۲۱ روزگی
-	0.347	0.68	85.79	84.86	۲۸ روزگی
					28 d

در تناقض با پژوهش حاضر افزایش وزن روزانه و وزن نهایی گوساله‌ها با مصرف پروبیوتیک‌ها بهبود یافت (Renaud و همکاران، ۲۰۱۹). با این تعریف، عدم افزایش وزن روزانه می‌تواند ناشی از کوتاه بودن طول دوره آزمایش و همچنین کاهش وزن طبیعی گوساله در دو هفته اول زندگی باشد (Jasper و Weary، ۲۰۰۲). نشان داده شده است که اسهال عامل اصلی تلفات در گوساله‌های شیرخوار است و کاهش شدید مصرف ماده خشک در اثر اسهال در این گوساله‌ها باعث تسریع مرگ و میر آنان می‌شود (Naylor، ۲۰۰۹). با این تعریف همان‌طور که نتایج پژوهش حاضر نشان‌دهنده با پیش‌گیری از اسهال به وسیله مکمل پروبیوتیک، مصرف ماده خشک در گروه دریافت‌کننده پروبیوتیک افزایش داشت.

نتایج واکاوی داده‌های مصرف ماده خشک (خوراک آغازین و شیر) و بازده غذایی در جدول ۳ ارائه شده است. مصرف ماده خشک در بازه‌های یک تا هفت‌روزگی، ۲۲ تا ۲۸ روزگی و یک تا ۲۸ روزگی در گروه مصرف‌کننده مکمل پروبیوتیک افزایش معنی داری داشت ($P < 0.05$)؛ اما بازده غذایی و وزن نهایی تحت تأثیر تیمار قرار نگرفت. پژوهش‌ها نشان داده است که استفاده از جایگزین‌های غیر آنتی‌بیوتیکی، سلامت و عملکرد گوساله‌های جوان را افزایش می‌دهد (Shaw و همکاران، ۲۰۲۰). همچنین در تحقیق دیگری استفاده از ترکیباتی چون پری بیوتیک‌ها، پروبیوتیک‌ها، یا ترکیبی از آن‌ها اثرات مثبتی بر عملکرد (افزایش خوراک مصرفی) و سلامت حیوانات به همراه داشت (Slizewska و Markowiak، ۲۰۱۸).

اثر تغذیه پروبیوتیک‌های *Bacillus subtilis* و *Bacillus coagulans* بر... / امید بوذری و همکاران

جدول ۳- اثر استفاده از پروبیوتیک بر ماده خشک مصرفی و بازده غذایی گوساله‌های شیرخوار

Table 3. The effect of using probiotics on dry matter consumption and feed efficiency of suckling calves

P value		SEM	پروبیوتیک Probiotic	شاهد Control	دوره (روز) period (d)
تیمار × روز Treat × Day	تیمار Treat				
					ماده خشک مصرفی (کیلوگرم بر روز) Dry Matter Intake (Kg/d)
0.579	0.026	0.004	0.28 ^a	0.26 ^b	یک تا ۷ روزگی 1-7 d
0.359	0.676	0.010	0.31	0.31	۸ تا ۱۴ روزگی 8-14 d
0.798	0.138	0.014	0.45	0.42	۱۵ تا ۲۱ روزگی 15-21 d
0.333	0.080	0.014	0.80 ^a	0.76 ^b	۲۲ تا ۲۸ روزگی 22-28 d
0.526	0.016	0.005	0.46 ^a	0.44 ^b	۱ تا ۲۸ روزگی 1-28 d
					بازده غذایی Feed Efficiency
0.066	0.115	0.32	-0.12	-0.88	یک تا ۷ روزگی 1-7 d
0.458	0.143	0.20	0.39	0.83	۸ تا ۱۴ روزگی 8-14 d
0.128	0.147	0.09	0.49	0.69	۱۵ تا ۲۱ روزگی 15-21 d
0.125	0.350	0.08	0.68	0.56	۲۲ تا ۲۸ روزگی 22-28 d
0.054	0.692	0.09	0.36	0.30	۱ تا ۲۸ روزگی 1-28 d

^{a-b} میانگین‌های با حروف غیرمشابه در هر ردیف از نظر آماری تفاوت معنی داری دارند ($P < 0.05$).

^{a-b} Means with different letters in each rows are statistically significantly different ($P < 0.05$).

شدید در فراسنجه‌های خونی می‌شود (Glagoleva و Medvedev، ۲۰۲۰). این نتایج همسو با پژوهش‌های (Shetawy و همکاران، ۲۰۲۲) و (Riddell و همکاران، ۲۰۱۰) می‌باشد.

کشت میکروبی و شاخصه‌های سلامت: نتایج مربوط شمارش میکروبی مدفوع گوساله‌های هلشتاین در جدول ۵ ارائه شده است. در هفت‌روزگی تعداد لاکتوباسیل‌های مدفوع در گروه مصرف‌کننده مکمل پروبیوتیک به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود ($P < 0.05$).

فراسنجه‌های خونی: نتایج مربوط به اثرات تیمارها بر فراسنجه‌های خونی گوساله‌ها در جدول ۴ نشان داده شده است. گروه‌های آزمایشی تأثیر معنی‌داری در فراسنجه‌های خونی نداشتند. فراسنجه‌های خونی گاو نظیر تعداد گلبول‌های قرمز و حجم سلولی از این نظر اهمیت دارند که در معرض تغییرات مهمی در ماه‌های اول زندگی هستند و ممکن است نشان‌دهنده تغییرات آسیب‌شناسی باشند (Golbeck و همکاران، ۲۰۱۹). عدم تفاوت معنی‌دار در فراسنجه‌های خونی در مطالعه حاضر، نشان‌دهنده سلامت گوساله‌ها و همچنین سازوکار هموستاتیکی می‌باشد که مانع از تغییرات

جدول ۴- اثر استفاده از پروبیوتیک بر فراسنج‌های خون‌شناسی گوساله‌های شیرخوار

Table 4. The effect of using probiotics on hematological parameters of suckling calves

P-value			SEM (Treat)	شاهد Control	پروبیوتیک Probiotic	فراسنج‌های خون‌شناسی Hematological parameters
تیمار × روز Treat×Day	روز Day	تیمار Treat				
0.577	<.0001	0.662	2.704	24.43	23.43	حجم خون بسته‌ای PCV (%)
0.106	0.002	0.323	0.660	6.25	6.68	گلبول‌های قرمز RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)
0.471	<.0001	0.537	1.006	8.86	9.06	هموگلوبین Hb g/dl
0.056	<.0001	0.130	0.479	5.66	5.62	پلاکت‌ها PLT $\times 10^5/\mu\text{l}$
0.276	0.612	0.526	1.341	13.14	10.65	گلبول‌های سفید WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)
0.403	0.002	0.885	1.310	75.10	73.50	لنفوسیت‌ها LYM (%)
0.171	0.868	0.483	0.181	1.45	1.56	مونوسیت‌ها M (%)
0.947	0.631	0.626	0.142	1.65	1.55	ائوزینوفیل‌ها E (%)
0.380	0.001	0.733	1.401	22.80	24.45	نوتروفیل‌ها NUT (%)

PCV: packed cell volume, RBC: red blood cells, Hb: hemoglobin, PLT: blood platelets, WBC: white blood cells, NUT: neutrophils, LYM: lymphocytes, M: monocytes, E: eosinophils.

همکاران، ۲۰۲۲). علاوه بر این، اعتقاد بر این است که گونه‌های باسیلوس با فعال کردن مسیرهای کلیدی بقا و تحریک سیستم ایمنی در سلول‌های اپیتلیال، کلونیزاسیون پاتوژن‌ها را کاهش می‌دهند (Wang و همکاران، ۲۰۲۲). علاوه بر آن نشان داده شده است پروبیوتیک‌هایی مانند لاکتوباسیلوس می‌توانند برخی ترکیبات ضد میکروبی مانند پراکسید هیدروژن، اسیدهای آلی و باکتریوسین را تولید کنند (Britton و Versalovic، ۲۰۰۸؛ Szczerbiec و همکاران، ۲۰۲۲). به‌طور کلی، به نظر می‌رسد که تغذیه پروبیوتیک‌ها اثر مثبتی بر کاهش پاتوژن‌هایی مانند *شریشیاکلی* و *کلی فرم* و افزایش لاکتوباسیل‌ها و در نتیجه، جلوگیری از ابتلا به اسهال در گوساله‌های تازه متولد شده دارد.

همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد کشت میکروبی سطوح بالاتری از جمعیت لاکتوباسیلوس‌ها در مدفوع گوساله‌های تغذیه‌شده با مکمل پروبیوتیک را نشان داد. در گوساله‌های کم سن به دلیل میکروبیوتای روده‌ای بسیار ناپایدار تحت شرایط تنش‌زا ممکن است افزایش میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا و کاهش جمعیت لاکتوباسیل‌ها (همان‌طور که در گروه شاهد مشاهده می‌شود) رخ دهد (Signorini و همکاران، ۲۰۱۲)؛ بنابراین، با استناد به سایر پژوهش‌ها می‌توان نتیجه گرفت، استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌تواند ابتلا به اسهال و امتیاز مدفوع را کاهش دهد، همچنین از افزایش باکتری‌های بیماری‌زا در دستگاه گوارش جلوگیری کند (Britton و Versalovic، ۲۰۰۸؛ Liu و

جدول ۵- اثر استفاده از پروبیوتیک بر جمعیت میکروبی مدفوع گوساله‌های شیرخوار

Table 5. The effect of using probiotics on the microbial population of the feces of infant calves

P value	SEM	پروبیوتیک Probiotic	شاهد Control	روز Day
				اشیرشیا کولی (log ₁₀ cfu/gr)
				<i>E. coli</i> (log ₁₀ cfu/gr)
0.375	0.442	6.07	6.67	۷ روزگی 7 d
0.123	0.341	5.85	6.71	۱۴ روزگی 14 d
0.900	0.670	6.29	6.41	۲۸ روزگی 28 d
				کلی‌فرم‌ها (log ₁₀ cfu/gr)
				<i>Coliform</i> (log ₁₀ cfu/gr)
0.133	0.407	5.88	6.88	۷ روزگی 7 d
0.135	0.364	5.93	6.81	۱۴ روزگی 14 d
0.975	0.669	6.51	6.54	۲۸ روزگی 28 d
				لاکتوباسیل‌ها (log ₁₀ cfu/gr)
				<i>Lactobacillus</i> (log ₁₀ cfu/gr)
0.037	0.272	4.75 ^a	3.72 ^b	۷ روزگی 7 d
0.398	0.282	5.51	4.15	۱۴ روزگی 14 d
0.764	0.407	4.64	4.46	۲۸ روزگی 28 d

^{a-b} میانگین‌های با حروف غیرمشابه در هر ردیف از نظر آماری تفاوت معنی داری دارند ($P < 0.05$).

^{a-b} Means with different letters in each rows are statistically significantly different ($P < 0.05$).

جیره گوساله‌های شیری، طول مدت علائم اسهال کاهش و وضعیت گوساله به سرعت بهبود بخشید (Renaud و همکاران، ۲۰۱۹). عفونت‌ها ممکن است با آسیب به اتصالات محکم^۱ سد نفوذپذیری پاراسلولی طبیعی اپیتلیوم روده را مختل کند که به تبع آن ابتلا به اسهال افزایش می‌یابد (Mingmongkolchai و Panbangred، ۲۰۱۸). در هنگام ابتلا به اسهال، دمای بدن گوساله‌ها به دلیل مبارزه با عوامل بیماری‌زا و عفونت‌ها افزایش می‌یابد (Studds و همکاران، ۲۰۱۸)؛ بنابراین اثر پیشگیری‌کننده از ابتلا به اسهال می‌تواند دلیل کاهش دمای بدن پس از مصرف مکمل پروبیوتیک باشد.

در جدول ۶ نتایج اندازه‌گیری نمره مدفوع، مدت‌زمان اسهال و دمای بدن گوساله‌ها ارائه شده است. در گروه مصرف‌کننده مکمل پروبیوتیک نمره مدفوع، مدت‌زمان اسهال و دمای بدن گوساله‌ها نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). ضروری است برای حفظ سلامت گوساله از اینکه گوساله به پتانسیل خود در مرحله تولید دست می‌یابد، اطمینان یافت (Alugongo و همکاران، ۲۰۱۷). ضعف در سلامت ممکن است باعث کاهش وزن و کاهش رشد پس از شیر گرفتن و در نتیجه نرخ رشد پایین شود که نمی‌توان آن را از طریق تغذیه در آینده جبران کرد (Weary و Jasper، ۲۰۰۲). در تأیید پژوهش حاضر، گزارش شد با استفاده از پروبیوتیک‌ها در

¹ Tight junctions

جدول ۶- اثر استفاده از پروبیوتیک بر فراسنجه‌های مدفوع و دمای راست‌روده گوساله‌های شیرخوار

Table 6. The effect of using probiotics on stool parameters and rectal temperature of suckling calves

P-value			SEM (Treat)	شاهد Control	پروبیوتیک Probiotic	شاخصه‌های سلامت Health indicators
تیمار × روز Treat×Day	روز Day	تیمار Treat				
0.305	<.0001	0.002	0.03	1.82 ^b	1.97 ^a	نمره مدفوع Fecal Score
0.107	0.002	0.049	0.06	5.43 ^b	5.68 ^a	مدت‌زمان اسهال (روز) Diarrhea Duration (day)
0.333	0.001	0.009	0.159	38.78 ^b	39.38 ^a	دمای راست‌روده (درجه سلسیوس) Rectal Temperature (C°)

^{a-b} میانگین‌های با حروف غیرمشابه در هر ردیف از نظر آماری تفاوت معنی‌داری دارند ($P < 0.05$).

نمره مدفوع: یک: طبیعی، دو: نرم، سه: شل، چهار: آبکی

^{a-b} Means with different letters in each rows are statistically significantly different ($P < 0.05$).

Fecal score: one: Normal, two: pasty, three: loose, four: watery

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، تأثیر مکمل پروبیوتیک در گوساله‌های شیرخوار *B. subtilis* و *B. coagulans* هلاشتاین مورد ارزیابی قرار گرفت. مصرف این مکمل خوراکی تا ۲۸ روزگی بعد از تولد، توانست با بهبود میکروب‌های روده، بهبود مصرف خوراک و کاهش شیوع اسهال، سلامت را در گوساله‌های شیرخوار بهبود ببخشد.

نوع ششم به شماره ۷۱۰۸۰۱۷/۶/۵۱ و شرکت بامداد رسپینا (قرارداد تحقیقاتی کاربردی به شماره ۸۱۷۳۸۴۷-۴۰۰) انجام شد. از آقایان سید مصطفی محسنی، محمدحسین مؤذنی‌زاده، سیداسماعیل قربی و احمدرضا علیپور (دانش‌آموختگان و دانشجویان گروه علوم دامی، دانشکده‌های کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج) و همچنین مدیریت و کارکنان محترم گاوداری تلیسه نمونه، برای همکاری و کمک در انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌شود.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه تهران (طرح

منابع

- Alugongo, G., Xiao, J., Chung, Y., Dong, S., Li, S., Yoon, I., Wu, Z. and Cao, Z. 2017. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products on dairy calves: Performance and health. *Journal of Dairy Science*, 100: 1189-1199.
- Azizi Nasab, F., Bayat Kouhsar, J., Ghanbari, F., Rahchamani, R. and Halakoo, G. 2020. Blood metabolites, Dairy calves, Performance, Probiotic, Skeletal growth indices. *Journal of Ruminant Research*, 8(1), 77-94.(In Persian).
- Britton, R. A. and Versalovic, J. 2008. Probiotics and gastrointestinal infections. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2008: 126-129.
- Dibaji, S. M., Seidavi, A., Asadpour, L. and da Silva, F. M. 2014. Effect of a synbiotic on the intestinal microflora of chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, 23: 1-6.
- Jasper, J. and Weary, D. 2002. Effects of ad libitum milk intake on dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 85: 3054-3058.
- Jenny, B., Vandijk, H. and Collins, J. 1991. Performance and fecal flora of calves fed a *Bacillus subtilis* concentrate. *Journal of Dairy Science*, 74: 1968-1973.
- Karamzadeh-Dehaghani, A., Towhidi, A., Zhandi, M., Mojgani, N. and Fouladi-Nashta, A. 2021. Combined effect of probiotics and specific immunoglobulin Y directed against

- Escherichia coli* on growth performance, diarrhea incidence, and immune system in calves. *Animal*, 15: 100124.
- Khajeh Bami, M., Afsharmanesh, M. and Ebrahimnejad, H. 2020. Effect of dietary *Bacillus coagulans* and different forms of zinc on performance, intestinal microbiota, carcass and meat quality of broiler chickens. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 12: 461-472.
- Liu, B., Wang, C., Huasai, S., Han, A., Zhang, J., He, L. and Aorigele, C. 2022. Compound Probiotics Improve the Diarrhea Rate and Intestinal Microbiota of Newborn Calves. *Animals*, 12: 322.
- Lucey, P., Lean, I., Aly, S., Golder, H., Block, E., Thompson, J. and Rossow, H. 2021. Effects of mannan-oligosaccharide and *Bacillus subtilis* supplementation to preweaning Holstein dairy heifers on body weight gain, diarrhea, and shedding of fecal pathogens. *Journal of Dairy Science* 104: 4290-4302.
- McGuirk, S. M. and Peek, S. F. 2014. Timely diagnosis of dairy calf respiratory disease using a standardized scoring system. *Animal Health Research Reviews*, 15: 145-147.
- Mingmongkolchai, S. and Panbangred, W. 2018. *Bacillus* probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. *Journal of Applied Microbiology*, 124: 1334-1346.
- Molyanova, G., Nogotkov, M. and Chigina, N. 2021. Effect of the *Bacillus subtilis*-based drug on the morphobiochemical and productive parameters of calves. *E3S Web of Conferences*, 273: 02011: EDP Sciences.
- Renaud, D., Kelton, D., Weese, J., Noble, C. and Duffield, T. 2019. Evaluation of a multispecies probiotic as a supportive treatment for diarrhea in dairy calves: A randomized clinical trial. *Journal of Dairy Science*, 102: 4498-4505.
- Riddell, J., Gallegos, A., Harmon, D. and Mcleod, K. 2010. Addition of a *Bacillus* based probiotic to the diet of preruminant calves: Influence on growth, health, and blood parameters^{1, 2, 3}. *The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 8: 78-85.
- Signorini, M., Soto, L., Zbrun, M., Sequeira, G., Rosmini, M. and Frizzo, L. 2012. Impact of probiotic administration on the health and fecal microbiota of young calves: a meta-analysis of randomized controlled trials of lactic acid bacteria. *Research in Veterinary Science*, 93: 250-258.
- Studds, M. J., Deikun, L. L., Sorter, D. E., Pempek, J. A. and Proudfoot, K. L. 2018. Short communication: The effect of diarrhea and navel inflammation on the lying behavior of veal calves. *Journal of Dairy Science*, 101: 11251-11255.
- Szczerbiec, D., Piechocka, J., Głowacki, R. and Torzewska, A. 2022. Organic Acids Secreted by *Lactobacillus spp.* Isolated from Urine and Their Antimicrobial Activity against Uropathogenic *Proteus mirabilis*. In *Molecules*, 27: 5557.
- Timmerman, H. M., Mulder, L., Everts, H., Van Espen, D., Van Der Wal, E., Klaassen, G., Rouwers, S., Hartemink, R., Rombouts, F. and Beynen, A. 2005. Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. *Journal of Dairy Science*, 88: 2154-2165.
- Wang, H., Yu, Z., Gao, Z., Li, Q., Qiu, X., Wu, F., Guan, T., Cao, B. and Su, H. 2022. Effects of compound probiotics on growth performance, rumen fermentation, blood parameters, and health status of neonatal Holstein calves. *Journal of Dairy Science*, 105: 2190-2200.
- Windschitl, P. M., Randall, K. M. and Brainard, D. J. 1991. Growth performance of Holstein dairy calves supplemented with a probiotic. *School of Agriculture and Land Resources Management, Agricultural, Research Progress Report* 22.
- Zhang, R., Zhou, M., Tu, Y., Zhang, N., Deng, K., Ma, T. and Diao, Q. 2016. Effect of oral administration of probiotics on growth performance, apparent nutrient digestibility and stress-related indicators in Holstein calves. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100: 33-38.

