

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

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.

Keywords: Calves, Probiotic, *Bacillus coagulans*, Growth

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

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 ($P < 0.05$). 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 ($P < 0.05$). روزهای با تب در هر دو دوره و دمای رکتال در طول روز ۵۱ تا ۷۰ کاهش یافت ($P < 0.05$). در مقایسه با گروه شاهد، در گروه تیماری پروبیوتیک سطح گلوکز، بتا هیدروکسی بوتیرات و لنفوسیت افزایش و سطح نوتروفیل و نسبت نوتروفیل به لنفوسیت در طول روز ۵۱ تا ۷۰ کاهش یافت ($P < 0.05$). 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.

کلمات کلیدی: گوساله، پروبیوتیک، باسیلوس کواگولانز و رشد

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 با سیلوس آمیلولیکوفا سینس¹ عملکرد رشد را با تحریک نسبت GH/IGF-1 بهبود می‌بخشد، 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، بی‌هوازی اختیاری، غیر بیماری‌زا، هاگ‌ساز و تولیدکننده 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 کواکولانز 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.

¹ Bacillus amyloliquefaciens

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 تو سعه خود را در جنین آغاز می‌کند اما تا زمانی که سلول‌های اپیتلیال مخاط در گوساله با میکروارگانیزم‌ها (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 تو سعه شکمبه در گو ساله‌های تازه 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 میکروارگانیزم‌های 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 پروبیوتیک‌ها 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). پروبیوتیک‌ها به دلیل فوایدی که برای دستگاه گوارش دارند و نقش آنها به عنوان یکی از بهترین جایگزین‌ها برای آنتی‌بیوتیک‌ها 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 پروبیوتیک‌ها در بخش مواد غذایی، مراقبت‌های پزشکی و دامپروری مانند لاکتوباسیلوس، بیفیدوباکتریوم و باسیلوس سوتیلیس مورد استفاده قرار می‌گیرند به طور خاص، سویه‌های متعلق به لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم پرمصرف‌ترین فرآورده‌های پروبیوتیکی هستند. با این حال، اکثر این سویه‌ها در برابر درجه حرارت شدید و همچنین اسید معده، آنزیم‌های گوارشی و نمک‌های صفاوی مقاوم نیستند (Zhou *et al.*, 2020). پروبیوتیک باسیلوس آمیلولیکوفا سینس 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 اسپوروزنتر^۱ 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 خوک‌ها 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 تخم‌های تولیدی، وزن زرده و ضخامت پوسته تخم‌مرغ و جوجه درآوری، کاهش مرگ و میر می‌شود.

¹ Lactobacillus sporogenes

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 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 روزگی ۷ لیتر، از سن ۵۱ تا ۶۰ روزگی 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 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 جمع‌آوری 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

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

* هر کیلوگرم مکمل ویتامینه حاوی ۱۱۰۰۰۰ 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 میلی گرم روی، ۱۲۰۰۰ میلی گرم آهن، ۹۶۰۰ میلی گرم منگنز، ۴۸۰۰ میلی گرم مس، ۲۴۰ میلی گرم ید، ۱۲۵ میلی گرم کبالت و ۱۲۰ میلی گرم سلنیوم است.

صفات مورد ارزیابی

گو ساله‌ها 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 دما سنج اندازه‌گیری شد و دقت دما سنج قبل از هر دوره با قرار دادن دما سنج 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 گو ساله‌ها 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 گو ساله به صورت

¹ Feed efficiency

² Average daily gain

³ Dry matter intake

جداگانه ثبت شد (Alimirzaei *et al.*, 2020). نمونه‌های مدفوع در روزهای ۶۴، ۶۵ و ۶۶ جمع‌آوری 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^۱ (NDF) و کربوهیدرات غیر الیافی^۲ (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 و داج 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، تری‌گلیسیرید، نیتروژن اوره خون، پروتئین کل و آلبومین با استفاده از کیت‌های آزمایشی پارس‌آزمون 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^۳)، 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 و داج و توسط لوله‌های خلأ حاوی EDTA جمع‌آوری شده و بلافاصله نمونه خون کامل در دمای ۴ درجه سلسیوس به آزمایشگاه دامپزشکی مینا-کرج منتقل و با استفاده از آنالیزر هماتولوژیک اتوماتیک^۴ (Technicon HI; Bayer, Toronto, Ontario) اندازه‌گیری شد.

روش آنالیز آماری

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 $P < 0.05$ گزارش شد.

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

Y_{ijkl} = مشاهده در روز k در حیوان z در تیمار i

μ = اثر میانگین جامعه

T_i = اثر تیمار i

A_{ij} = اثر تصادفی زمان z در تیمار i

D_k = اثر ثابت روز k

¹ Neutral detergent fibre

² Non-fibre carbohydrates

³ White blood cell

⁴ Automated hematology analyzer

$(TD)_{ik}$ = 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.

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

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 کواگولانز 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 ($P < 0.05$). 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 ($P < 0.05$) (جدول ۳). قابلیت هضم NDF با مصرف پروبیوتیک کاهش یافت، در حالی که قابلیت هضم NFC به صورت معنی‌دار افزایش یافت ($P < 0.05$).

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

صفات	گروه‌های آزمایشی ^۱			SEM	P value	
	شاهد	BC	تیمار		دوره	تیمار*دوره
روز ۱ تا ۵۰ آزمایش						
ماده خشک مصرفی ^۲ (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 ^۳	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 (روز ۱؛ 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 ^۲ (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 ^۳	۰/۵۱	۰/۵۵	۰/۰۳	۰/۳۵	-	-
تغییرات قد گوساله (cm)	۵/۹۳	۵/۹۳	۰/۳۱	۰/۹۹	-	-

وزن نهایی (روز ۷۰: kg)	۸۸/۳۷	۹۲/۱۲	۳/۰۹	۰/۴۰	-	-
(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)						
(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 کوآگولانز بر قابلیت هضم ظاهری مواد مغذی (برحسب درصد)

P value	SEM	گروه‌های آزمایشی ^۱		صفات
		BC	شاهد	
<۰/۰۱	۰/۷۲	۶۴/۶۷ ^b	۶۹/۱۱ ^a	ماده خشک
<۰/۰۱	۰/۶۹	۶۶/۷۴ ^b	۷۰/۸۰ ^a	ماده آلی
۰/۲۳	۲/۰۳	۵۹/۳۷	۶۳/۰۵	پروتئین خام
<۰/۰۱	۰/۷۲	۴۴/۹۲ ^b	۵۸/۶۹ ^a	^۲ NDF
۰/۰۳	۱/۲۳	۷۴/۷۳ ^a	۷۰/۰۵ ^b	^۳ NFC
۰/۴۶	۲/۳۳	۶۲/۷۷	۶۵/۳۳	چربی خام

(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 ($P < 0/05$).

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 کوآگولانز قوام مدفوع پایین‌تری داشتند ($P < 0/05$). وضعیت سلامت مانند نمرات چشم، گوش و بینی با مصرف پروبیوتیک باسیلوس کوآگولانز در مقایسه با گروه شاهد در هر دو دوره آزمایشی به صورت معنی‌دار بهبود یافت ($P < 0/05$).

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 ($P < 0/05$).

جدول ۴. اثر پروبیوتیک باسیلوس کواگولانز بر امتیاز قوام مدفوع و وضعیت سلامت گوساله‌های هلشتاین شیرخوار

صفات	گروه‌های آزمایشی ^۱		SEM	P value	
	شاهد	BC		دوره	تیمار
روز ۱ تا ۵۰ آزمایش					
امتیاز قوام مدفوع	۲/۱۵	۲/۰۲	۰/۰۵	<۰/۰۱	۰/۰۵
اسکور چشم	۱/۷ ^a	۱/۳۶ ^b	۰/۰۶	<۰/۰۱	<۰/۰۱
اسکور گوش	۱/۴۵ ^a	۱/۱۴ ^b	۰/۰۴	<۰/۰۱	۰/۰۲
اسکور بینی	۱/۶۶ ^a	۱/۴۵ ^b	۰/۰۵	<۰/۰۱	<۰/۰۱
روز ۵۱ تا ۷۰ آزمایش					
امتیاز قوام مدفوع	۱/۵۶ ^a	۱/۳۶ ^b	۰/۰۵	<۰/۰۱	۰/۲۲
اسکور چشم	۱/۵۱ ^a	۱/۲۵ ^b	۰/۰۵	<۰/۰۱	۰/۱۰
اسکور گوش	۱/۵۰ ^a	۱/۱۵ ^b	۰/۰۵	<۰/۰۱	۰/۲۴
اسکور بینی	۱/۴ ^a	۱/۱۲ ^b	۰/۰۵	<۰/۰۱	۰/۶۱

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 ($P < 0.05$).

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

صفات	گروه‌های آزمایشی ^۱		SEM	P value	
	شاهد	BC		دوره	تیمار
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 ^۲ (°C)	۰/۰۹	۰/۰۷	۰/۰۲	۰/۲۸	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 ^۲ (°C)	۰/۲۳ ^a	۰/۰۹ ^b	۰/۰۴	<۰/۰۱	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 باسیلوس کواگولانز DSM 32016 در تن شیر و ۶۰۰ گرم پروبیوتیک باسیلوس کواگولانز DSM 32016 در تن خوراک (BCf600+m600)؛ ۲) دمای رکتال $\leq 38.4^{\circ}\text{C}$ ؛ a، b: میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرهمسان اختلاف معنی‌دار دارند ($P < 0.05$).

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 ($P < 0.05$). در مقایسه با گروه شاهد، گروه تیماری پروبیوتیک باسیلوس کوآگولانز سطح افزایش یافته لنفوسیت و سطح کاهش یافته نوتروفیل و نسبت نوتروفیل به لنفوسیت را در طول روز ۵۱ تا ۷۰ نشان داد ($P < 0.05$).

جدول ۶. اثر پروبیوتیک باسیلوس کوآگولانز بر فراسنجه‌های خونی گوساله‌های هلشتاین شیرخوار

صفات	گروه‌های آزمایشی ^۱		SEM	P value	
	شاهد	BC		تیمار	دوره
روز ۱ تا ۵۰ آزمایش					
گلوکز (mg/dl)	۱۰۴/۲۵	۱۱۱/۵۰	۷/۶۵	۰/۵۲	۰/۱۶
کلسترول (mg/dl)	۱۰۲/۱۳ ^a	۷۷/۲۵ ^b	۶/۹۱	۰/۰۴	۰/۲۸
تری گلیسرید (mg/dl)	۲۳/۱۲	۱۶/۰۰	۲/۶۶	۰/۱۱	۰/۴۹
نیتروژن اورهای (mg/dl)	۱۷/۱۹	۱۹/۲۵	۱/۱۱	۰/۲۴	۰/۰۸
بتا هیدروکسی بوتیرات (mmol/l)	۰/۰۴۷	۰/۰۶۵	۰/۰۰۷	۰/۱۴	۰/۹۹
آلبومین (g/dl)	۳/۲۶	۳/۱۵	۰/۰۹	۰/۴۳	۰/۲۹
کل پروتئین پلاسما (g/dl)	۶/۲۱	۵/۷۹	۰/۱۸	۰/۱۵	۰/۲۸
گلوبولین (g/dl)	۲/۹۵	۲/۶۴	۰/۱۵	۰/۱۹	۰/۳۶
نسبت آلبومین به گلوبولین	۱/۱۶	۱/۲۳	۰/۰۷	۰/۵۲	۰/۳۴
روز ۵۱ تا ۷۰ آزمایش					
گلوکز (mg/dl)	۹۷/۰۰ ^b	۱۰۵/۷۵ ^a	۲/۶۲	۰/۰۵	۰/۰۵
کلسترول (mg/dl)	۱۶۱/۰۰	۱۰۷/۸۸	۱۶/۸۸	۰/۰۶	< ۰/۰۱
تری گلیسرید (mg/dl)	۳۰/۱۲	۳۹/۱۲	۷/۲۷	۰/۴۱	۰/۷۱
نیتروژن اورهای (mg/dl)	۱۸/۱۷	۱۷/۲۵	۱/۲۲	۰/۶۴	۰/۷۳
بتا هیدروکسی بوتیرات (mmol/l)	۰/۲۲۰ ^b	۰/۳۰۹ ^a	۰/۰۲۴	۰/۰۴	۰/۵۰
آلبومین (g/dl)	۳/۴۴	۳/۴۱	۰/۰۵	۰/۷۵	۰/۹۹
کل پروتئین پلاسما (g/dl)	۶/۰۲	۶/۱۵	۰/۱۸	۰/۶۳	۰/۱۷
گلوبولین (g/dl)	۲/۵۹	۲/۷۴	۰/۲۱	۰/۶۳	۰/۱۷
نسبت آلبومین به گلوبولین	۱/۳۴	۱/۳۰	۰/۱۲	۰/۸۳	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) دارند ($P < 0.05$).
 a، b: میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرهمسان اختلاف معنی‌دار دارند ($P < 0.05$).

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

صفات	گروه‌های آزمایشی ^۱		SEM	P value	
	شاهد	BC		تیمار	دوره
روز ۱ تا ۵۰ آزمایش					
گلوبول‌های سفید خون (μl)	۷۶۵۰/۰۰	۶۶۶۲/۵۰	۷۲۱/۴۵	۰/۳۷	۰/۹۲
لنفوسیت (%)	۷۴/۱۲	۷۳/۰۰	۱/۴۷	۰/۶۱	۰/۲۵
نوتروفیل (%)	۲۳/۷۵	۲۶/۱۲	۱/۷۲	۰/۳۷	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
اوتروفیل (%)	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	۷۵/۶۳ ^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
اوتروفیل (%)	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^۱ SB310، لاکتوباسیلوس پروکازئی زیر شاخه پروکازئی^۲ SB137 و باسیلوس کوآگولانز 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 تأثیری ندارد، اگرچه ماده خشک مصرفی برای گوساله‌های گروه تیماری در مقایسه با گوساله‌های گروه شاهد بیشتر بود. باکتری‌های باسیلوس کوآگولانز میکروارگانیزم‌های 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 میکروارگانیزم‌های مفید در روده تجویز می‌شوند (Morrison *et al.*, 2010). باسیلوس کوآگولانز 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 کوآگولانز سلامت روده را بهبود بخشد و رشد عوامل بیماری‌زا را در روده مهار کرد. باسیلوس کوآگولانز، 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

¹ *Lactobacillus animalis*

² *Lactobacillus paracasei* subspecies *paracasei* SB137

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/شیرشیا کلی از طریق تولید اسید لاکتیک (Cavazzoni *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 2006) که منجر به افزایش نسبت لاکتوباسیل‌ها به باکتری/شیرشیا 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^۱، نمره قوام مدفوع را کاهش می‌دهد. همچنین در مطالعه Geiger *et al.*, (2014) نیز بهبود نمره قوام مدفوع با مصرف پروبیوتیک DFM^۲ مشاهده شد. Galvão *et al.*, (2005) گزارش دادند که گوساله‌هایی که با مخمر ساکارومایسس سروویزه در جایگزین شیر تغذیه شده بودند، روزهای کمتری را درگیر اسهال در طول دوره شیرخواری 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 روده‌ای با «حذف رقابتی» محافظت کنند (Fuller, 1989). پروبیوتیک باسیلوس کواگولانز به عنوان یک پروبیوتیک در صنعت دامپروری مورد استفاده قرار گرفته است (X. Zhou *et al.*, 2010; Ripamonti *et al.*, 2009) و قادر به مهار رشد/شیرشیا 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 مہاری 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

¹ Lactobacillus rhamnosus

² direct-fed microbial

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، تری‌گلیسیرید، نیتروژن اوره خون^۱ (BUN)، پروتئین کل معمولاً برای ارزیابی وضعیت تغذیه دام استفاده می‌شود (Khajehdizaj *et al.*, 2014). تغذیه گوساله با پروبیوتیک اثر مضر بر متابولیت‌های سرم نداشت (جدول ۶). 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^۲ 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 تاثیر قرار نگرفت (جدول ۷). Akagawa *et al.*, (2016) گزارش دادند که باکتری‌های پروبیوتیک باسیلوس کوآگولانز در موش تاثیر 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 صحرائی از جمله دستگاه گوارش دستگاه با حداکثر دوز مصرفی پروبیوتیک باسیلوس کوآگولانز (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 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 کوآگولانز باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که تغذیه با پروبیوتیک باسیلوس کوآگولانز DSM 32016 باعث بهبود امتیاز قوام مدفوع و وضعیت سلامت گوساله، افزایش قابلیت هضم NFC و افزایش سطح لنفوسیت در گوساله‌های شیرخوار هلشتاین می‌شود

¹ Blood Urea Nitrogen

² Cytotoxic Leukocytes

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.

منابع

1. 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.
2. 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.
3. Agazzi, A., Tirloni, E., Stella, S., Marocolo, 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Cavazzoni, V., Adami, A., & Castrovilli, C. (1998). Performance of broiler chickens supplemented with *Bacillus coagulans* as probiotic. *British poultry science*, 39(4), 526-529.
11. Chase, C. C. (2018). Enteric immunity: Happy gut, healthy animal. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 34(1), 1-18.
12. Diao, Q., Zhang, R., & Fu, T. (2019). Review of strategies to promote rumen development in calves. *Animals*, 9(8), 490.
13. 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.
14. Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *The Journal of applied bacteriology*, 66(5), 365-378.
15. 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.
16. 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.
 17. 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.
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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.
 21. Hyronimus, Marrec, L., & Urdaci. (1998). Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4. *Journal of applied microbiology*, 85(1), 42-50.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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.
 26. 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.
 27. 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.
 28. McGuirk, S. (2013). Calf Health Scoring Chart. University of Wisconsin, School of Veterinary Medicine.
 29. Mingmongkolchai, S., & Panbangred, W. (2018). *Bacillus* probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. *Journal of applied microbiology*, 124(6), 1334-1346.
 30. 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.
 31. 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.
 32. 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.
 33. 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.
34. 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.
 35. 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.
 36. 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.
 37. 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.
 38. Ripamonti, B., Agazzi, A., Baldi, A., Balzaretto, 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.
 39. 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.
 40. SAS Institute 2013. SAS/STAT 9.1 User's Guide. SAS Inst., Inc., Cary, NC.
 41. 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.
 42. 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
 43. Swanson, J., & Morrow-Tesch, J. (2001). Cattle transport: Historical, research, and future perspectives. *Journal of Animal Science*, 79(suppl_E), E102-E109.
 44. 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
 45. 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.
 46. 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
 47. Von Kongslow, 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.
 48. 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.
 49. World Health Organization. Antibacterial agents in clinical development. Geneva; 2017.
 50. 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.
 51. 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.
 52. 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.

53. 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.
54. 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.
55. 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.

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.