Animal Production Research

Vol. 11, No. 4, 2022 (1-19)
doi: 10.22124/AR.2023.23067.1727
eISSN: 2538-6107 pISSN: 2252-0872

University of Guilan

RESEARCH PAPER **OPEN ACCESS**

Effect of adding biochar in diets containing probiotics on *in vitro* fermentation variables, health indicators, rectum bacteria, and blood enzymes of Holstein calves

M. H. Sirjani[1], J. Rezaei[2]*, M. Zahedifar[3], Y. Rouzbehan[4]

1. Ph.D. Student of Animal Nutrition, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Associate Professor of Animal Nutrition, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. Associate Professor of Ruminant Nutrition, Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
4. Professor of Ruminant Nutrition, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received: 15-10-2022 – Accepted: 24-12-2022)

Introduction: To be successful in rearing newborn calves, it is necessary to maximize feed efficiency and health status. One way is to use feed additives such as probiotics. Probiotics reduce the harmful microflora of the digestive tract (such as coliforms) and metabolic and infectious diseases and improve beneficial microbes, the defense system, nutrient absorption, feed consumption, and animal growth. However, the animal response to probiotics is not uniform. Therefore, if the conditions for the activity of probiotics in the digestive system are improved, it may be possible to increase the effectiveness of these microbial additives and achieve a more uniform and reproducible response. For this purpose, it may be possible to use biochar in diets containing probiotics. Biochar can absorb organic substances and gases, bind toxins, and provide a favorable environment for useful microorganisms, increasing fermentation efficiency and livestock performance. However, few findings are available on the effect of biochar, *Saccharomyces boulardii* (yeast), and different commercial lactobacilli mixtures in young calves. We hypothesized if biochar is included in diets containing probiotics, it could probably provide better conditions for the probiotic activity in the digestive system and thus improve the response of the calves to these additives. Therefore, this research investigated the effect of adding biochar (pomegranate and plum woods) in diets containing lactobacilli (*L. plantarum*, *L. rhamnosus,* and *Enterococcus faecium* mixture) and yeast (*S. boulardii*) on *in vitro* fermentation, microbial population, methane release, antioxidant capacity, as well as health indicators, rectum bacteria and blood enzymes of the pre- and post-weaning calves.

Materials and methods: The experimental treatments were: 1. Basal diet without probiotics and biochar (control), 2. Diet + lactobacilli mixture, 3. Diet + *S. boulardii*, 4. Diet + biochar, 5. Diet +lactobacilli-biochar, and 6. Diet + *S. Boulardii*-biochar. The *in vitro* experiment was conducted with three replicates and two different runs. Digestibility coefficients were determined using Tilley and Terry method. A gas production technique was used to assess truly digestible substrate (TDS), partitioning factor (PF), microbial biomass production (MBP), cellulolytic bacteria, total protozoa, methane release, and antioxidant capacity. The *in vivo* experiment was done using 60 newborn Holstein calves (six treatments and 10 replicates) in a randomized complete block design. The start of the experiment was at the age of 10 d, weaning at 75 d, and the end of the experiment at 100 d. The daily intake and growth of the animals were recorded. In pre- and post-weaning calves, the rectum bacteria (coliforms, lactobacillus, and total aerobics), urinary and fecal pH, health score criteria (including scores of feces, nose, eye, ear, cough, temperature, navel, and joint), and total average health score were determined using standard methods.

* Corresponding author: rezaei.j@modares.ac.ir

CC BY

Moreover, the blood serum enzymes (alkaline phosphatase, Gamma-glutamyl transferase, aspartate aminotransferase, alanine transaminase, and lactate dehydrogenase) were assessed. Data were analyzed using the MIXED procedure of SAS.

Results and discussion: Separate inclusion of the lactobacilli mixture, *S. boulardii*, and biochar in the diet improved *in vitro* digestibility, TDS, cellulolytic bacteria population, and antioxidant capacity compared to the control group ($P<0.05$) with maximum improvements when probiotic-biochar mixtures were used. The MBP and PF were improved by including the additives in the diet. Probiotics and probiotic-biochar mixtures decreased protozoa ($P<0.05$). Different additives decreased methane production, and the least methane was observed in diets containing lactobacilli-biochar and yeast-biochar ($P<0.05$). Probiotics provide better conditions for the growth and activity of appropriate microorganisms. In addition, the highly porous structure and high surface area of biochar increased the establishment, attachment, and growth of useful microbes. These properties improved cellulolytic bacteria, organic matter degradation, and MBP. The improved antioxidant status could be due to the effect of probiotics in eliminating oxidant compounds in the digestive system, and the activity of biochar in absorbing toxins and unfavorable factors in the fermentation environment. As a result, the simultaneous use of probiotics and biochar improved *in vitro* fermentation variables more effectively. The reduction of methane can be due to the decrease of protozoa and methanogens, and the increase of methanotrophs. The results of the second experiment (*in vivo*) showed the probiotics and biochar reduced the rectum coliforms and improved (reduced) the fecal score and average health score of pre- and post-weaning calves so that the greatest improvement was seen in probiotic-biochar treatments ($P<0.05$). Cough and body temperature scores also tended to improve by feeding additives. Alanine phosphatase, gamma-glutamyl transferase, aspartate aminotransferase, and alanine transferase were not affected by the treatments. However, lactate dehydrogenase in the pre-weaning period was lower in the additive treatments compared to the control group ($P<0.05$), and the minimum value was observed in probiotic-biochar groups. The use of probiotics can improve the rumen development, ruminal and intestinal population of useful microbes, and prevent diarrhea, which results in enhancing digestion, passage rate, feed consumption, and animal performance. Moreover, adding biochar enhances digestibility and microbial growth, binds toxins, reduces energy loss, and induces a suitable environment for beneficial microbes, resulting in better animal performance. The reduction of coliforms may be due to the binding of probiotics to the digestive system wall, nutrient competition, preventing harmful microbes, improving digesta flow, and changing the pH of the digestive tract. Moreover, biochar provides a suitable growth environment for beneficial microbes, removes toxins and unwanted substances from the digestion environment, reduces viscosity, and probably makes the digestive system unsuitable for harmful species including coliforms.

Conclusions: Separate inclusion of the lactobacilli mixture, *S. boulardii*, and biochar in the diet improved *in vitro* fermentation variables and the health status of pre and post-weaning Holstein calves, without negative effects on blood enzymes. The best *in vitro* and *in vivo* responses were observed when probiotics and biochar were used simultaneously. Therefore, the addition of biochar (1% of DM) to diets containing probiotics (lactobacilli and yeast; 2 g/d) can be recommended as a strategy to enhance the effectiveness of the probiotics in calves and to reduce environmental pollution due to the decreased methane emissions.

Keywords: Microbial additive, Biochar, *In vitro* fermentation, Health indicators, Calf

How to cite this article:

Sirjani M. H., Rezaei J., Zahedifar M. and Rouzbehan Y. 2022. Effect of adding biochar in diets containing probiotics on *in vitro* fermentation variables, health indicators, rectum bacteria, and blood enzymes of Holstein calves. Animal Production Research, 11(4): 1-19. doi: 10.22124/AR.2023.23067.1727

تحقیقات تولیدات دامی

سال یازدهم/شماره چهارم/زمستان ۱۴۰۱ (۱۹-۱)

Animal Production Research

مقاله پژوهشی

اثر افزودن بیوچار در جیره‌های حاوی پروبیوتیک بر متغیرهای تخمیر برون‌تنی، شاخص‌های سلامت، باکتری‌های رکتوم و آنزیم‌های خون گوساله‌های هلشتاین

محمد حسین سیرجانی[۱]، جواد رضائی[۲]، مجتبی زاهدی‌فر[۳]، یوسف روزبهان[۴]

۱- دانشجوی دکتری تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

۲- دانشیار تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

۳- دانشیار تغذیه نشخوارکنندگان، مؤسسه تحقیقات علوم دامی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، کرج، ایران

۴- استاد تغذیه نشخوارکنندگان، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۰۳)

چکیده

در این پژوهش، تأثیر افزودن بیوچار (چوب انار و آلو) در جیره‌های حاوی لاکتوباسیل (مخلوط *L. plantarum*، *L. rhamnosus* و *Enterococcus faecium*) و مخمر (*S. boulardii*) بر تخمیر، جمعیت میکروبی، متان و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی برون‌تنی (سه تکرار) و همچنین شاخص‌های سلامت، باکتری‌های رکتوم و آنزیم‌های خون گوساله‌های هلشتاین (۱۰ تکرار) در دوره پیش (۱۰ تا ۷۵ روزگی) و پس از شیرگیری (۷۶ تا ۱۰۰ روزگی) بررسی شد. جیره‌ها عبارت بودند از: ۱- شاهد (فاقد پروبیوتیک و بیوچار)، ۲- شاهد+لاکتوباسیل، ۳- شاهد+مخمر، ۴- شاهد+بیوچار، ۵- شاهد+لاکتوباسیل-بیوچار، و ۶- شاهد+مخمر-بیوچار. مصرف جداگانه لاکتوباسیل، مخمر و بیوچار موجب بهبود گوارش‌پذیری، باکتری‌های سلولولیتیک و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی برون‌تنی شد ($P<۰/۰۵$)، اما، بهترین پاسخ با مصرف پروبیوتیک-بیوچار مشاهده شد. تیمارهای پروبیوتیک و پروبیوتیک-بیوچار، جمعیت پروتوزوآ را کاهش داد ($P<۰/۰۵$). تولید متان در تمامی تیمارهای حاوی افزودنی کاهش یافت و کمترین مقدار مربوط به لاکتوباسیل-بیوچار و مخمر-بیوچار بود ($P<۰/۰۵$). افزودنی‌ها موجب بهبود مصرف خوراک ($P=۰/۰۶۶$) و افزایش معنی‌دار رشد گوساله‌ها شدند ($P<۰/۰۵$) و بیشترین رشد مربوط به تیمارهای پروبیوتیک-بیوچار بود. با مصرف پروبیوتیک‌ها و بیوچار، جمعیت کلیفرم‌های رکتوم کاهش پیدا کرد، نمره مدفوع و میانگین امتیاز سلامت حیوانات بهبود یافت، و برترین تیمارها، مخلوط پروبیوتیک-بیوچار بودند ($P<۰/۰۵$). غلظت آنزیم‌های خون تغییر نکرد، به‌جز لاکتات دهیدروژناز که در دوره پیش از شیرگیری در گروه‌های افزودنی (به‌ویژه پروبیوتیک-بیوچار) کمتر از شاهد بود ($P<۰/۰۵$). در مجموع، افزودن بیوچار به جیره‌های حاوی پروبیوتیک (لاکتوباسیل و/یا مخمر) موجب بهبود تخمیر برون‌تنی، کاهش کلیفرم‌های رکتوم و بهبود شاخص‌های سلامت شد و می‌تواند به عنوان یک راه‌کار برای تقویت اثربخشی پروبیوتیک‌ها در گوساله‌های نوزاد توصیه شود.

واژه‌های کلیدی: افزودنی میکروبی، بیوچار، تخمیر برون‌تنی، شاخص‌های سلامت، گوساله

* نویسندهٔ مسئول: rezaei.j@modares.ac.ir

doi: 10.22124/AR.2023.23067.1727

مقدمه

دوره تولد تا مدتی پس از شیرگیری یکی از مهم‌ترین مراحل تنش‌زا در پرورش گوساله‌ها است، زیرا حیوان باید از نظر متابولیکی، تغذیه‌ای و رفتاری به یک نشخوارکننده کارآمد تبدیل شود. بنابراین، احتمال بیماری و تلفات در این دوره بیشتر است. برای موفقیت در پرورش گوساله، لازم است تنش‌های مذکور مدیریت شوند و نیازهای حیوان از منابع مناسب و در سطوح مطلوب تأمین شود. همچنین، لازم است بازده مصرف مواد مغذی را به بیشترین حد رسانید (Davis and Drackley, 1998). یکی از راه‌کارهای بهبود بازده مواد مغذی، استفاده از افزودنی‌های خوراکی مانند پروبیوتیک‌ها است که عمل خود را با تأثیر بر دستگاه گوارش، سلول‌های دیواره آن و یا زیستگاه میکروبی شکمبه انجام می‌دهند (McDonald *et al.,* 2011).

در مجموع، پروبیوتیک‌ها و از جمله لاکتوباسیل‌ها موجب حفظ تعادل میکروبی دستگاه گوارش، رشد و توسعه بهتر و سریع‌تر شکمبه، ایجاد ثبات در جمعیت‌های میکروبی و افزایش فعالیت آنزیمی می‌شوند و در نتیجه، باعث بهبود گوارش‌پذیری، سرعت رشد و تقویت سیستم ایمنی می‌شوند (Radzikowski, 2017; Di Gioia and Biavati, 2018). این افزودنی‌ها با افزایش تعداد و استقرار میکروب‌های مفید، سبب پیش‌گیری از اسهال و افزایش مصرف خوراک جامد و رشد در گوساله و بره نوزاد می‌شوند. لاکتوباسیل‌ها از راه کاهش میکروفلور مضر دستگاه گوارش (از جمله کلیفرم‌ها) باعث تقویت سیستم دفاعی بدن و جلوگیری از ابتلای گوساله‌ها به بیماری‌های مختلف متابولیکی و عفونی می‌شوند (Didarkhah and Sarir, 2018). همچنین، با ایجاد تعادل میکروبی روده، آثار مثبتی مانند کاهش عفونت‌های روده‌ای و افزایش میزان جذب مواد از جمله ایمنوگلوبولین‌ها دارند (Uyeno *et al.,* 2015; Di Gioia and Biavati, 2018). مخمرها نیز در مجموع موجب برقراری شرایط رشد مناسب برای میکروب‌ها، جلوگیری از اختلال در فلور میکروبی، حذف اکسیژن از شکمبه، بافرینگ بهتر اسید لاکتیک در هنگام تغذیه جیره‌های پرکنسانتره، بهبود مصرف خوراک (Fonty and Chaucheyras-Durand, 2006; Sales, 2011; Ayad *et al.,* 2013) و در نتیجه، سلامت متابولیکی میزبان، افزایش هضم و بهبود عملکرد دام شده‌اند. در تحقیق دیگری نیز گزارش شد که افزودن مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* به جیره پرکنسانتره می‌تواند تخمیرپذیری شکمبه‌ای و گوارش‌پذیری خوراک را بهبود دهد (Taghizadeh *et al.,* 2021). به هرحال، شدت پاسخ حیوان بر اساس نوع پروبیوتیک، جیره، شیوه مصرف، مدیریت پرورش، شرایط محیطی و اثر متقابل افزودنی با سایر اجزای جیره متفاوت است (Di Gioia and Biavati, 2018). بنابراین، اگر بتوان شرایط استقرار و عمل پروبیوتیک‌ها را در دستگاه گوارش (از جمله در شکمبه) بهبود داد یا از افزودنی‌های دارای اثر هم‌کنش‌افزایی در کنار پروبیوتیک‌ها استفاده نمود، می‌توان امیدوار بود که اثربخشی این افزودنی‌های میکروبی افزایش یابد و پاسخ مطمئن‌تر، یکنواخت‌تر و با تکرارپذیری بیشتری از حیوانات حاصل شود. این رویکرد در بهبود یکنواختی گله نیز مؤثر است. بدین منظور، شاید بتوان از توان بالقوه بیوچار (Biochar) در جیره‌های حاوی پروبیوتیک بهره برد.

همه‌ساله مقادیر زیادی ضایعات باغی و شاخه و برگ درختان هرس می‌شود که ممکن است در طبیعت رها شوند یا سوزانده شوند و مشکلات زیست‌محیطی ایجاد کنند. اما با تبدیل ضایعات مذکور به بیوچار، می‌توان استفاده مناسبی از آن‌ها در تغذیه دام برد. بیوچار یک ماده کربنی متخلخل است که از گرماکافت ضایعات گیاهی-دامی در حرارت ۲۰۰ تا ۹۰۰ درجه سلسیوس، در محیط بدون اکسیژن یا با اکسیژن محدود به‌دست می‌آید (Hansen *et al.,* 2012). از فرآورده مذکور به منظور بهبود عملکرد و به عنوان سم‌زدا در جیره نشخوارکنندگان استفاده می‌شود و مشخص شده که جایگزین مناسبی برای برخی افزودنی‌ها از قبیل آنتی‌بیوتیک‌ها است (Prasai *et al.,* 2016). یکی از ویژگی های بیوچار، دارا بودن سطح ویژه بالا (۲ تا ۴۰ مترمربع به ازای هر گرم) و منافذ بسیار ریز است که نقش مهمی در جذب مواد آلی و گازها دارد. همچنین، محیطی مطلوب را برای تجمع میکروارگانیسم‌های شکمبه فراهم می‌کند و موجب ارتباطات نزدیک‌تر و بهبود انتقال مواد بین جمعیت های میکروبی می‌شود. این‌ها ثبات بهتر میکروبی، بهبود تولید میکروبی و افزایش بازده تخمیر را موجب خواهد شد. به‌علاوه، کاهش آزادسازی گازهای گلخانه‌ای از شکمبه با مصرف بیوچار گزارش شده است (Vongsamphanh *et al.,* 2015; Di Gioia and Biavati, 2018; Teoh *et al.,* 2019). در تحقیقی، افزودن بیوچار به جیره سبب پیوند سموم، بهبود گوارش‌پذیری و ابقای نیتروژن شد (Rashidi *et al.,*

2018). از سوی دیگر، آثار مثبت تغذیه بیوچار بر عملکرد گوسفند (Mirheidari *et al.,* 2018a,b)، بز (Gerlach and Schmidt, 2014) و گاو گوشتی (Saroeun *et al.,* 2018) گزارش شده است، هر چند تحقیقات بیشتری باید انجام شود.

علی‌رغم تحقیقات مختلف، یافته‌های چندانی درباره تأثیر تغذیه بیوچار در گوساله نوزاد در دسترس نیست. همچنین، اطلاعات در مورد اثربخشی مخمر *ساکارومایسس بولاردی* (*S. boulardii*) و مخلوط‌های لاکتوباسیلی مختلف تجاری بر عملکرد و سلامت گوساله نوزاد کامل نیست. از سوی دیگر، پیش‌فرض تحقیق حاضر این بود که اگر بیوچار در جیره‌های حاوی پروبیوتیک گنجانده شود، احتمالاً بتواند شرایط بهتری را برای اثربخشی پروبیوتیک‌ها در دستگاه گوارش فراهم کند. همچنین، ممکن است هم‌کنش‌افزایی مناسبی بین پروبیوتیک و بیوچار در شکمبه برقرار شود و بدین ترتیب، تأثیرگذاری پروبیوتیک‌ها و پاسخ گوساله‌های نوزاد به این نوع افزودنی بهبود یابد. بر این اساس، هدف از پژوهش حاضر، بررسی تأثیر افزودن بیوچار در جیره‌های حاوی لاکتوباسیل (مخلوط *L. plantarum*، *L. rhamnosus* و *Enterococcus faecium*) و مخمر (*S. boulardii*) در قالب دو آزمایش برون‌تنی (گوارش‌پذیری، متغیرهای تخمیر، جمعیت باکتری‌های سلولولیتیک، پروتوزوآ، آزادسازی متان و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی) و درون‌تنی (شاخص‌های امتیاز سلامت، جمعیت باکتریایی رکتوم و آنزیم‌های خون گوساله‌های هلشتاین در دوره پیش و پس از شیرگیری) بود.

مواد و روش‌ها

بیوچار، منابع پروبیوتیکی و تیمارهای آزمایشی: بیوچار از راه حرارت دادن چوب ضایعاتی درختان انار و آلو در محیط بدون اکسیژن (در دمای ۵۰۰ درجه سلسیوس) به مدت سه ساعت به‌دست آمد (Hansen *et al.,* 2012). مکمل لاکتوباسیلی مصرفی مخلوطی از گونه‌های *L. plantarum*، *L. rhamnosus* و *Enterococcus faecium* (به ترتیب با مقادیر ۲×۱۰^{۹}، ۲×۱۰^{۱۰}، و ۲×۱۰^{۱۰} CFU در گرم)، و مخمر مصرفی از گونه *S. boulardii* (۲×۱۰^{۱۰} CFU در گرم) بود. پروبیوتیک‌ها از شرکت فرآورده‌های زیستی پردیس رشد مهرگان (شیراز) خریداری شد. تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از: ۱- جیره شاهد (فاقد پروبیوتیک و بیوچار)، ۲- شاهد + مخلوط لاکتوباسیل، ۳- شاهد + *ساکارومایسس بولاردی*، ۴- شاهد + بیوچار، ۵- شاهد + لاکتوباسیل + بیوچار، و ۶- شاهد + *ساکارومایسس بولاردی* + بیوچار. جیره پایه بر اساس نیازمندی‌های گوساله هلشتاین برای دو دوره پیش و پس از شیرگیری بر اساس توصیه‌های انجمن ملی تحقیقات (NRC, 2001) تنظیم شد. اجزای خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره پایه در جدول ۱ ارائه شده است. تأثیر افزودن بیوچار به جیره‌های حاوی پروبیوتیک در قالب دو آزمایش برون‌تنی و درون‌تنی بررسی شد.

آزمایش اول (تأثیر منابع پروبیوتیکی/بیوچار بر هضم و تخمیر برون‌تنی): آزمایش برون‌تنی با استفاده از جیره پس از شیرگیری انجام شد. برای آزمون برون‌تنی، سطح هر یک از مکمل‌های پروبیوتیکی برابر یک درصد و سطح بیوچار نیز برابر یک درصد ماده خشک جیره بود، که معادل مقادیر توصیه شده برای مصرف روزانه گوساله است. برای تعیین گوارش‌پذیری جیره‌ها، از روش برون‌تنی دومرحله‌ای اصلاح شده (Tilley and Terry, 1963) استفاده شد (نه آزمون گاز)، زیرا برخی افزودنی‌ها مانند بیوچار یا متابولیت‌های گیاهی به هضم کمک می‌کنند، اما ممکن است موجب کاهش حجم گاز، و در نتیجه، برآورد کمتر از حد واقعی گوارش‌پذیری و انرژی شوند. بنابراین، برای مقایسه چنین تیمارهایی توصیه می‌شود به‌جای روش‌های مبتنی بر حجم گاز (آزمون گاز)، از روش‌های مبتنی بر وزن‌سنجی نمونه و بقایای تخمیر (مانند روش تلی و تری) استفاده شود. بدین منظور، مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم از هر جیره آزمایشی (با یا بدون افزودنی) در سه تکرار مجزا در داخل لوله‌های سانتریفیوژ ویژه توزین شد. سه لوله فاقد نمونه نیز به عنوان بلنک در نظر گرفته شد. آزمون هضم دومرحله‌ای برای افزایش دقت در دو سری (run) مجزا در دو هفته مختلف تکرار شد. شیرابه شکمبه پیش از خوراک‌دهی صبحگاهی از سه رأس حیوان تغذیه شده با جیره پس از شیرگیری (مطابق جدول ۱) جمع‌آوری و صاف شد. دو هفته عادت‌پذیری به جیره برای حیوانات رعایت شد. بافر مک‌دوگال (McDougall) تهیه شد و به نسبت چهار به یک با شیرابه مخلوط، و آماده تزریق به لوله‌های تخمیر شد. در مرحله بعد، ۳۵ میلی‌لیتر مخلوط بافر-شیرابه به داخل هر لوله تزریق، و دی اکسید کربن دمیده شد.

جدول ۱- اجزای خوراکی، ترکیب شیمیایی (درصد ماده خشک) و انرژی قابل سوخت و ساز (مگاکالری در کیلوگرم ماده خشک) جیره‌های پایه پیش و پس از شیرگیری

Table 1. Ingredients, chemical composition (% of DM) and metabolizable energy (Mcal/kg DM) of the pre- and post-weaning diets

Diets	Pre-weaning	Post-weaning
Feedstuffs		
Alfalfa, dry	10	20
Barley grain	16.5	14.6
Corn grain	39	36
Wheat bran	4.40	5.45
Soybean meal	26	20
Na bicarbonate	0.50	0.50
Ca carbonate	0.85	0.55
Di-Ca phosphate	0.25	0.40
NaCl	0.50	0.50
Min-Vit premix	2.0	2.0
Chemical composition		
Crude protein	18.92	17.78
Neutral detergent fiber	18.00	21.11
Acid detergent fiber	9.20	11.61
Ash	7.94	7.75
Ether extract	2.85	2.84
Metabolizable energy	2.94	2.80

To perform the *in vitro* gas production technique, the post-weaning diet was used.

کلاهک مجهز به روزنه خروج گاز روی هر لوله قرار داده شد و برای مدت زمان ۴۸ ساعت، در دمای ۳۹ درجه سلسیوس قرار گرفتند. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، لوله‌ها سانتریفیوژ شدند و مایع رویی دور ریخته شد. در هر لوله حاوی بقایای تخمیر، ۳۵ میلی‌لیتر محلول پپسین اسیدی ریخته شد و انکوباسیون به مدت ۴۸ ساعت صورت گرفت. بقایا صاف شد، در آون خشک، و سپس توزین شد. بقایای خشک شده به وسیله کوره الکتریکی سوزانده شدند و در نهایت، ضرایب هضم ماده خشک و آلی و انرژی قابل سوخت و ساز بر اساس روابط زیر به‌دست آمد:

DMD (%) = [(Initial DM weight - Final DM weight)/Initial DM weight] × 100

OMD (%) = [(Initial OM weight - Final OM weight)/Initial OM weight] × 100

DOMD (%) = OMD × %OM

ME (MJ/kg DM) = 0.0157 × DOMD (g/kg DM)

در روابط بالا، DMD= گوارش‌پذیری ماده خشک، OMD= گوارش‌پذیری ماده آلی، DOMD= ماده آلی قابل هضم در ماده خشک و ME= انرژی قابل سوخت و ساز است (AFRC, 1993).

برای برآورد متغیرهای تخمیر برون‌تنی از آزمون تولید گاز استفاده شد (Menke *et al.,* 1979). مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از هر جیره در سه تکرار داخل سرنگ‌های شیشه‌ای ریخته شد. آزمون در دو سری (run) مختلف و سه بلنک در هر سری اجرا شد. شیرابه شکمبه مانند مرحله قبل (بخش بالا) تهیه شد و در شرایط بی‌هوازی حفظ شد. بزاق مصنوعی (تهیه شده طبق استاندارد) به نسبت دو به یک با شیرابه مخلوط شد. سپس، ۳۰ میلی‌لیتر مخلوط بزاق مصنوعی-شیرابه به داخل هر سرنگ تزریق شد و حجم در زمان صفر یادداشت شد. انکوباسیون برای مدت ۲۴ ساعت در حمام آب با دمای ۳۹ درجه سلسیوس صورت گرفت. در پایان، حجم کل گاز هر سرنگ ثبت شد. برای تعیین سوبسترای تجزیه شده حقیقی (Truly degraded substrate; TDS)، محتویات سرنگ در بالن ریخته شد و همراه با محلول شوینده خنثی طبق روش استاندارد جوشانده شد. سپس، فیلتراسیون با کاغذ صافی، و خشک‌کردن در آون انجام شد. برای برآورد TDS، عامل تفکیک‌پذیری (Partitioning factor; PF) و تولید توده میکروبی (Microbial biomass production; MBP) از معادلات زیر استفاده شد (Blümmel *et al.,* 1997):

TDS = [(W1 – W2)/W1] × 100

PF = TDS / GP

MBP = TDS – (GP × 2.2)

در معادلات بالا، TDS سوبسترای تجزیه شده حقیقی (میلی‌گرم در گرم ماده خشک)، W1 وزن خشک نمونه اولیه، W2 وزن خشک پس از پایان تخمیر و جوشاندن در شوینده خنثی، PF عامل تفکیک‌پذیری (میلی‌گرم به ازای

هر میلی‌لیتر)، GP گاز تولیدی (میلی‌لیتر به ازای یک گرم ماده خشک)، MBP تولید توده میکروبی (میلی‌گرم در گرم ماده خشک) و ۲/۲ ضریب ثابت استوکیومتری است.

تعیین جمعیت باکتری‌های سلولولیتیک با استفاده از پنج میلی‌لیتر محتویات سرنگ و طبق روش Dehority (2003) انجام شد. محیط کشت بی‌هوازی در داخل لوله‌های هانگیت (Hungate) ریخته شد و از کاغذ صافی واتمن شماره یک به عنوان منبع کربوهیدرات (الیاف) استفاده شد. سری‌های رقیق شده از شیرابه تهیه، و در لوله‌های هانگیت تزریق شد. انکوباسیون به مدت ۲۱ روز در دمای ۳۹ درجه سلسیوس به طول انجامید و جمعیت سلولولیتیک‌ها از روی تجزیه کاغذ صافی در لوله‌های مربوط به تیمارهای مختلف تعیین شد. برای بررسی جمعیت پروتوزوآیی، بخشی از شیرابه با محلول فرمالین ۵۰ درصد مخلوط شد و جمعیت پروتوزوآیی با شمارش به وسیله لام هموسیتومتر و میکروسکوپ نوری تعیین شد (Dehority, 2003).

ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی محتویات تخمیری بر اساس روش FRAP (توان احیاکنندگی آهن فریک)، و رنگ‌سنجی در طول موج ۵۹۳ نانومتر برآورد شد (Benzie and Strain, 1996). برای بررسی تولید متان، کل تولید گاز پس از پایان تخمیر ۲۴ ساعته قرائت شد. سپس، چهار میلی‌لیتر محلول هیدروکسید سدیم ۱۰ مولار به داخل سرنگ گاز تزریق شد تا دی اکسید کربن را جذب کند. حجم گاز باقی‌مانده در سرنگ، برآورد متان (و البته همراه اندکی هیدروژن) خواهد بود (Anele *et al.,* 2011).

آزمایش دوم (تأثیر منابع پروبیوتیکی/بیوچار بر وضعیت گوساله‌های نوزاد): این بخش از مطالعه با استفاده از ۶۰ رأس گوساله هلشتاین انجام شد (شش تیمار و ۱۰ تکرار). وزن تولد گوساله‌ها ثبت شد و تغذیه آغوز انجام شد. در سن ۱۰ روزگی، هر یک از حیوانات در جایگاه‌های انفرادی ویژه، به یکی از شش جیره آزمایشی (با یا بدون هر یک از افزودنی‌ها، بر اساس تیمارهای ذکرشده در بالا) اختصاص یافتند. وزن آغاز آزمایش در گروه‌های مختلف تقریباً یکسان بود و اعمال تیمارها در دو دوره پیش و پس از شیرگیری صورت گرفت. قبل از شیرگیری (۱۰ تا ۷۵ روزگی)، حیوانات به میزان ۱۰ درصد وزن تولد خود شیر (در دو وعده صبح و عصر) دریافت کردند و علاوه بر آن، دسترسی آزاد به جیره پیش از شیرگیری (خوراک آغازین) داشتند. در ۷۵ روزگی، قطع شیر کامل شد، و حیوانات از روز ۷۶ تا ۱۰۰ (دوره پس از شیرگیری)، جیره با نسبت علوفه به کنسانتره ۸۰ به ۲۰ را آزادانه دریافت نمودند. مدیریت تغذیه و جیره پایه برای تمامی حیوانات یکسان بود، به‌جز دریافت یا عدم دریافت بیوچار و منابع پروبیوتیکی در گروه‌های مختلف. هر یک از منابع پروبیوتیکی به میزان دو گرم در روز به ازای هر رأس گوساله تغذیه شد. بیوچار مصرفی به ازای هر رأس حیوان برابر یک درصد جیره بود. خوراک تازه هر روز در آخورها توزیع، و پس‌آخور جمع‌آوری شد. وزن‌کشی دام در زمان تولد، سن ۱۰ روزگی (آغاز آزمایش) و انتهای دوره انجام شد تا افزایش وزن روزانه در کل دوره برآورد شود.

در طول دوره، بار باکتریایی رکتوم، وضعیت فیزیکی و شاخص‌های امتیاز سلامت، pH ادرار و مدفوع و وضعیت آنزیم‌های خون (به عنوان شاخص سلامت) بررسی شدند. به منظور تعیین باکتری‌های رکتوم، نمونه‌گیری از مدفوع، سه دفعه پیش از شیرگیری (هر سه هفته یک‌بار) و دو بار پس از شیرگیری (هر ۱۲ روز یک‌بار) انجام پذیرفت و نمونه‌ها بلافاصله در ظروف استریل با دمای پایین (روی یخ) به آزمایشگاه ارسال شدند. در آزمایشگاه، یک گرم نمونه در سری‌های استاندارد رقیق‌سازی شد. کشت کلیفرم‌ها در محیط مک‌کانکی آگار (MacConkey Agar)، و کشت لاکتوباسیل‌ها در محیط MRS آگار (De Man, Rogosa and Sharpe agar) صورت گرفت. برای کل باکتری‌های هوازی از محیط PCA (Plate Count Agar) استفاده شد. پلیت‌های حاوی محیط کشت و نمونه به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت (به ترتیب برای کلیفرم‌ها و لاکتوباسیل‌ها و برای باکتری‌های هوازی) در ۳۷ درجه سلسیوس انکوباسیون شدند. در پایان، شمارش کلنی انجام شد و جمعیت‌های باکتریایی با در نظر گرفتن حجم کشت و ضریب رقت برآورد شدند (Forbes *et al.,* 2007). وضعیت فیزیکی و شاخص‌های امتیاز سلامت شامل نمره مدفوع (بر اساس قوام)، بینی (رطوبت، میزان و نوع تراوش‌ها)، چشم (میزان و نوع تراوش‌ها)، گوش (حالت، زاویه و حرکات)، سرفه (تعداد، تکرار و توالی)، دما (رکتوم)، ناف (التهاب، گرما، درد و تراوش‌ها) و مفصل (التهاب، درد و عملکرد حرکتی) به‌طور روزانه بررسی و با نظارت و معاینه کارشناس دامپزشکی مستقر در مزرعه ثبت شد. بدین منظور، از دستورالعمل استاندارد چهار امتیازی دانشگاه ویسکانسین (SVMUNW, 2020) استفاده شد. به بهترین وضعیت هر

یک از شاخص‌ها، نمره یک، و به بدترین وضعیت، نمره چهار تعلق می‌گرفت (هر چه امتیاز بالاتر باشد، وضعیت سلامت نامناسب‌تر است). همچنین، میزان pH ادرار و مدفوع در دوره پیش و پس از شیرگیری ثبت شد.

به منظور تعیین آنزیم‌های شاخص سلامت، خون‌گیری در اواخر دوره پیش از شیرگیری و اواخر دوره پس از شیرگیری (سه ساعت پس از تغذیه صبح‌گاهی) انجام شد. سرم به وسیله سانتریفیوژ در ۲۵۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه (چهار درجه سلسیوس) جدا شد، و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار گرفت. در آزمایشگاه، آسپارتات آمینوترانسفراز، گاماگلوتامیل ترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز و لاکتات دهیدروژناز با کیت‌های ویژه و طبق روش شرکت سازنده، با استفاده از روش نورسنجی (Microplate reader, Epoch) اندازه‌گیری شد.

تجزیه آماری داده‌ها: داده‌های آزمایش اول (آزمون برون‌تنی) با رویه GLM نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۱) به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار، با در نظر گرفتن اثر تیمار و سری (run) تجزیه شد، زیرا آزمون در دو سری طی دو هفته مجزا انجام شد. در مدل آماری مورد استفاده، تیمار به عنوان اثر ثابت و سری به عنوان اثر تصادفی فرض شد:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + R(T)_{ij} + e_{ijk} + e_{ijkl}$$

در این مدل، Y_{ijkl}= مقدار مشاهده، μ= میانگین، T_i= اثر تیمار، $R(T)_{ij}$= اثر سری در تیمار، e_{ijk}= خطای آزمایشی و e_{ijkl}= خطای نمونه‌برداری است. برای تجزیه داده‌های آزمایش دوم (درون‌تنی؛ پاسخ گوساله‌ها) از طرح بلوک‌های کامل تصادفی، رویه MIXED و مدل آماری زیر استفاده شد:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + (TB)_{ij} + e_{ij} + e_{ijk}$$

در مدل بالا، Y_{ijk}= مقدار مشاهده، μ= میانگین، T_i= اثر تیمار، B_j= اثر بلوک، $(TB)_{ij}$= اثر متقابل تیمار و بلوک، e_{ij}= خطای آزمایشی و e_{ijk}= خطای نمونه‌برداری است. میانگین‌های مربوط به تیمارهای مختلف با استفاده از آزمون LSD در سطح معنی‌داری پنج درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

آزمایش اول (تأثیر منابع پروبیوتیکی/بیوچار بر هضم و تخمیر برون‌تنی): اثر تیمارهای آزمایشی بر گوارش‌پذیری و انرژی قابل سوخت و ساز جیره‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است. افزودن منابع مختلف پروبیوتیک (لاکتوباسیل و *ساکارومایسس بولاردی*) و هم‌چنین بیوچار به‌صورت مجزا موجب بهبود هضم و محتوای انرژی جیره‌ها در مقایسه با شاهد شد (P<۰/۰۵). بیشترین بهبود در زمان مصرف هم زمان پروبیوتیک-بیوچار مشاهده شد، به عبارت دیگر، افزودن بیوچار در جیره‌های حاوی پروبیوتیک موجب بیشینه شدن گوارش‌پذیری ماده خشک و ماده آلی و افزایش بهره‌وری پروبیوتیک‌ها شد. مطالعات قبل نشان داده که پروبیوتیک‌ها با ایجاد تغییرات مفید در فرآیند تخمیر شکمبه، شرایط بهتری را برای رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌ها و در نتیجه، تجزیه و هضم جیره فراهم می‌کنند (Sales, 2011; Di Gioia and Biavati, 2018). بنابراین، بهبود هضم جیره با افزودن منابع پروبیوتیکی در پژوهش حاضر منطقی به نظر می‌رسد. از سوی دیگر، علت بهبود هضم در اثر مصرف بیوچار، به ساختار بسیار متخلخل آن مربوط است که سبب استقرار بهتر میکروبی، افزایش اتصال و رشد گونه‌های میکروبی و در نتیجه، بهبود تجزیه مواد آلی می‌شود (Mirheidari *et al.,* 2018b). این بهبود جمعیت میکروبی را می‌توان در افزایش باکتری‌های سلولولیتیک (جدول ۳) در گروه‌های حاوی پروبیوتیک یا بیوچار در مقایسه با شاهد مشاهده نمود. برخی محققان دیگر نیز گزارش کردند که افزایش هضم مواد مغذی (به ویژه الیاف) می‌تواند به دلیل اثر مثبت پروبیوتیک‌ها بر عملکرد باکتری‌های سلولولیتیک شکمبه باشد (Mosoni *et al.,* 2007; Sheikh *et al.,* 2022). همان‌طور که اشاره شد، بیشترین افزایش در گوارش‌پذیری و محتوای انرژی مربوط به جیره‌های حاوی مخلوط پروبیوتیک-بیوچار بود، که تأییدکننده فرضیه پژوهش حاضر است، یعنی اولاً بین پروبیوتیک و بیوچار یک اثر هم‌کنش‌افزایی و تقویت‌کنندگی ایجاد شده است. از سوی دیگر، احتمالاً روزنه‌های فراوان و سطح ویژه بسیار بالای بیوچار موجب شده افزودنی‌های پروبیوتیکی همانند میکروب‌های بومی شکمبه در این منافذ بهتر مستقر شوند و با تکثیر و کلونیزاسیون قوی‌تر، فرآیند تجزیه بهتری را رقم بزنند. مطالعه‌ای در زمینه تأثیر ترکیب پروبیوتیک-بیوچار بر ضرایب هضمی جیره وجود ندارد. همچنین، اطلاعات چندانی درباره اثر مخلوط لاکتوباسیلی پژوهش حاضر و *ساکارومایسس بولاردی* در دست نیست. به هر حال، افزودن سایر منابع پروبیوتیکی به جیره بره (Khalid and Sarwar, 2011) و میش (Le *et al.,* 2017) دارای تأثیر مثبت بر گوارش‌پذیری جیره بوده است.

جدول ۲- اثر بیوچار در جیره حاوی افزودنی میکروبی بر گوارش‌پذیری و متغیرهای تخمیر برون‌تنی

Table 2. Effect of biochar in the diet containing microbial additive on *in vitro* digestibility and fermentation variables

	Tilley and Terry method			Gas production technique			
Diet	DMD	OMD	ME	GP	TDS	MBP	PF
Control diet	73.2^{c}	74.6^{c}	2.57^{c}	270^{b}	75.0^{b}	157^{d}	2.78^{c}
Diet + lactobacilli	76.4^{ab}	78.3^{ab}	2.70^{ab}	285^{a}	79.8^{a}	172^{cd}	2.80^{c}
Diet + yeast	75.5^{b}	77.7^{b}	2.68^{b}	280^{a}	79.6^{a}	180^{bc}	2.84^{c}
Diet + biochar	75.0^{b}	77.1^{b}	2.66^{b}	254^{c}	79.8^{a}	240^{a}	3.15^{a}
Diet + lactobacilli-biochar	77.1^{a}	79.9^{a}	2.76^{a}	266^{b}	81.3^{a}	229^{ab}	3.06^{ab}
Diet + yeast-biochar	77.2^{a}	79.2^{a}	2.73^{a}	266^{b}	81.1^{a}	226^{ab}	3.05^{b}
SEM	0.611	0.622	0.021	4.23	0.727	7.41	0.025
P-value	0.014	0.012	0.001	0.021	0.14	0.013	0.010

DMD: Dry matter digestibility (%); OMD: Organic matter digestibility (%); ME: Metabolizable energy (Mcal/kg DM); GP: 24-h gas production (mL/g DM); TDS: Truly degraded substrate (%); MBP: Microbial biomass production (g/mg DM); PF: Partitioning factor (mg TDS/mL GP); Lactobacilli (2 g/d per animal): Mixture of *L. plantarum*, *L. rhamnosus* and *Enterococcus faecium* (2×10^{9}, 2×10^{10} and 2×10^{10} CFU/g, respectively); Yeast (2 g/d per animal): *S. boulardii* (2×10^{10} CFU/g); Biochar (1% of diet): Obtained from pomegranate and plum woods: SEM: Standard error of the means.

[a-d] Means in the same column with different superscripts differ significantly ($P<0.05$).

مخالف با نتایج بالا، عدم تأثیر پروبیوتیک‌ها بر هضم جیره نشخوارکنندگان در برخی مطالعات گزارش شد (Sun *et al.,* 2013; Souza *et al.,* 2017). از سوی دیگر، بیوچار در تحقیقی موجب افزایش گوارش‌پذیری جیره شد (Mirheidari *et al.,* 2018b). اما در تحقیق دیگری، بیوچار تأثیری بر هضم جیره بزها نسبت به گروه شاهد نداشت (Silivong and Preston, 2015). علت این نتایج متناقض ممکن است به عواملی مانند نوع و سن حیوان، دز مصرف افزودنی، وضعیت فیزیولوژیکی حیوانات، شرایط محیطی، ترکیب جیره و سطح تغذیه مربوط باشد (El-Tawab *et al.,* 2016; Le *et al.,* 2017).

همان‌طوری‌که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، گاز تولیدی در جیره‌های حاوی پروبیوتیک بیشتر از شاهد بود، اما کاربرد بیوچار به تنهایی موجب کاهش تولید گاز برون‌تنی شد ($P<۰/۰۵$). در حقیقت، بیوچار از مسیر مطلوب کردن محیط سکونت جمعیت میکروبی و تغییر بیوفیلم‌های میکروبی، کاهش متانوژن‌های شکمبه و افزایش متانوتروف‌ها (قادر به متابولیزه کردن متان به عنوان تنها منبع کربن و انرژی خود) باعث کاهش کل انتشار گازها از جمله متان می‌شود (Porsavathdy *et al.,* 2017; Saleem *et al.,* 2018). همچنین، علت کاهش گاز با مصرف بیوچار به وجود منافذ بسیار ریز آن مربوط است که نقش مهمی در جذب گازها دارند (Vongsamphanh *et al.,* 2015; Mirheidari *et al.,* 2018a,b). از سوی دیگر، با گنجاندن بیوچار در جیره‌های پروبیوتیکی (مخلوط پربیوتیک-بیوچار)، حجم گاز در مقایسه با جیره‌های فقط پروبیوتیک کاهش یافت و به شاهد نزدیک شد. در نتیجه، به نظر می‌رسد تأثیر پروبیوتیک‌ها در افزایش کل تولید گاز شکمبه‌ای با اثر کاهشی بیوچار بر گاز خنثی شده، و بیانگر تأثیر ارزشمند بیوچار در کاهش آزادسازی گازهای گلخانه‌ای از شکمبه دام است (Vongsamphanh *et al.,* 2015; Teoh *et al.,* 2019).

منابع مختلف پروبیوتیکی، بیوچار و ترکیب پروبیوتیک-بیوچار موجب بهبود TDS، MBP و PF شدند ($P<۰/۰۵$). هرچند تفاوت بین تیمارهای پروبیوتیکی و بیوچار معنی‌دار نبود، اما همانند گوارش‌پذیری، بیشترین مقدار TDS در تیمارهای پروبیوتیک-بیوچار مشاهده شد. مشابه بخش قبل، علت بهبود TDS به افزایش و استقرار مناسب‌تر جمعیت‌های میکروبی مختلف و بهبود فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیکی آن‌ها مربوط است. هم‌کنش‌افزایی بین پروبیوتیک و بیوچار در دو تیمار آخر موجب حداکثر بودن این فراسنجه شد. بین تیمارهای مختلف، بیشترین PF در جیره چهارم (حاوی بیوچار) مشاهده شد، زیرا این جیره کمترین آزادسازی گاز را داشت که موجب بهبود بازده انرژی و همچنین حداکثر شدن MBP می‌شود (Blümmel *et al.,* 1997). علت تأثیر مثبت پروبیوتیک‌ها بر MBP آن است که فعالیت میکروبی را بهبود می‌بخشند و همچنین موجب افزایش مصرف آمونیاک برای ساخت پروتئین میکروبی می‌شوند (Uyeno *et al.,* 2015; Di Gioia and Biavati, 2018). بیوچار نیز یک زیستگاه مطلوب برای میکروب‌ها ایجاد می‌کند و شرایط اتصال و رشد میکروبی را بهبود می‌دهد (Vongsamphanh *et al.,* 2015;

Mirheidari *et al.,* 2018b). دلیل دیگر افزایش MBP در جیره‌های حاوی پروبیوتیک و پروبیوتیک-بیوچار، به کاهش جمعیت پروتوزوآ (جدول ۳) مربوط است، زیرا پروتوزوآها باکتری‌ها را شکار می‌کنند و موجب افزایش بازچرخ نیتروژن میکروبی در محیط تخمیر می‌شوند. در نتیجه، کاهش آن‌ها دارای تأثیر مثبت بر رشد توده میکروبی است (Dehority, 2003). با کاربرد سایر گونه‌های افزودنی میکروبی نیز آثار مثبت بر تولید پروتئین میکروبی گزارش شده است. برای نمونه، افزودن ترکیب باکتری *L. acidophilus* و مخمر *S. cerevisiae* در جیره گوسفند (Sheikh *et al.,* 2022)، مصرف *L. acidophilus* در شرایط برون‌تنی (Chen *et al.,* 2017) و کاربرد *B. licheniformis* در گاوهای هلشتاین (Qiao *et al.,* 2010) موجب افزایش پروتئین میکروبی شد. از سوی دیگر، افزودن بیوچار به جیره پر علوفه (Saleem *et al.,* 2018) و جیره پرواری (Mirheidari *et al.,* 2018a) موجب بهبود ساخت پروتئین میکروبی شده است. اما، پژوهشی درباره تأثیر استفاده هم زمان این افزودنی‌ها در دسترس نیست.

همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، مصرف لاکتوباسیل، *ساکارومایسس بولاردی* و بیوچار موجب افزایش جمعیت باکتری‌های سلولولیتیک نسبت به شاهد شد ($P<۰/۰۵$). لاکتوباسیل کمترین افزایش را نسبت به گروه شاهد موجب شد و بیوچار مؤثرترین افزودنی بود. از سوی دیگر، افزودن بیوچار به جیره‌های پروبیوتیکی (پروبیوتیک-بیوچار) باعث شد بهبود بیشتری در جمعیت باکتری‌های سلولولیتیک ایجاد شود، به‌طوری که بیشترین افزایش مربوط به ترکیب مخمر-بیوچار بود. تأثیر انواع پروبیوتیک‌ها بر جمعیت میکروب‌های شکمبه یکسان نیست و هر جنس و گونه میکروبی می‌تواند تأثیری کاملاً اختصاصی داشته باشد. محققان نشان دادند که مصرف مخلوط *L. acidophilus* و *S. cerevisiae* باعث افزایش باکتری‌های سلولولیتیک در شکمبه گوسفند می‌شود (Sheikh *et al.,* 2022). اما، برخی دیگر نشان دادند که مصرف *L. plantarum* و *B. subtilis*، تعداد باکتری‌های مذکور را در شکمبه گوساله کاهش می‌دهد (Zhang *et al.,* 2017). از سوی دیگر، تأثیر مثبت بیوچار بر باکتری‌های سلولولیتیک منطقی است، زیرا ناحیه سطحی بسیار وسیع و ماهیت متخلخل بیوچار موجب افزایش سطوح ساکن در شکمبه می‌شود که بهبود زیستگاه میکروبی، تغییر در جمعیت میکروبی و رشد بیشتر میکروب‌ها را در پی خواهد داشت (Teoh *et al.,* 2019). همین خصوصیات باعث شده در پژوهش حاضر، جمعیت باکتری‌های اشاره شده با افزودن بیوچار به جیره‌های پروبیوتیکی به بیشترین مقدار خود برسد، و بنابراین، بیوچار می‌تواند عدم اطمینان در اثربخشی کامل برخی پروبیوتیک‌ها را جبران کند و بهبود جمعیت سلولولیتیک‌ها و هضم الیاف حتماً مشاهده شود.

بر اساس جدول ۳، تیمارهای آزمایشی موجب کاهش جمعیت پروتوزوآی برون‌تنی شدند ($P<۰/۰۵$). لاکتوباسیل بیشترین تأثیر را داشت، به‌طوری که کمترین پروتوزوآها در تیمارهای لاکتوباسیل و مخلوط لاکتوباسیل-بیوچار مشاهده شد. کمترین کاهش در جمعیت پروتوزوآها در تیمار چهارم (بیوچار) بود، که البته اختلاف این تیمار با شاهد معنی‌دار نبود. کاهش یا حذف پروتوزوآ از شکمبه مانع بازچرخ نیتروژن بین آن‌ها و باکتری‌ها می‌شود و سبب تجزیه کمتر پروتئین باکتریایی خواهد شد. کاهش پروتوزوآ موجب تأمین یک زیستگاه امن برای باکتری‌ها می‌شود و جمعیت باکتریایی شکمبه افزایش می‌یابد. به‌علاوه، کاهش این ریزموجودات می‌تواند تولید متان را کاهش دهد (Dehority, 2003). این تفاسیر با نتایج مشاهده شده در جمعیت باکتری‌های سلولولیتیک و متان در پژوهش حاضر مطابقت دارد. اطلاعات دقیقی درباره ساز و کار تأثیر مکمل‌های پروبیوتیکی بر جمعیت پروتوزوآی شکمبه وجود ندارد. به هر حال، روابط متقابل گسترده‌ای بین میکروب‌ها حاکم است و فرآورده‌های تولیدی به وسیله یک گونه یا غالب شدن یک جمعیت میکروبی خاص ممکن است آثار مثبت یا منفی بر تعداد و فعالیت سایر گونه‌ها داشته باشد (Dehority, 2003). موافق با نتایج این پژوهش، محققان دیگر نیز گزارش کردند که مصرف لاکتوباسیلوس در گوسفند باعث کاهش پروتوزوآی شکمبه می‌شود (Lettat *et al.,* 2012). اما، در تحقیق دیگری، کاربرد مخلوط *L. acidophilus* و *S. cerevisiae* موجب افزایش تعداد کل پروتوزوآ شد (Sheikh *et al.,* 2022).

جدول ۳- اثر بیوچار در جیره حاوی افزودنی میکروبی بر جمعیت باکتری‌های سلولولیتیک، پروتوزوآها، آزادسازی متان و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی برون‌تنی

Table 3. Effect of biochar in the diet containing microbial additive on *in vitro* cellulolytic bacteria count, protozoa, methane release, and antioxidant capacity

Diet	Cellulolytic bacteria (Log_{10}/mL)	Total protozoa (Log_{10}/mL)	Methane (% of total gas)	Antioxidant power (µmol Fe^{2+}/L)
Control diet	8.74^{c}	4.08^{a}	21.6^{a}	1021^{b}
Diet + lactobacilli	8.79^{bc}	3.73^{c}	18.1^{ab}	1072^{ab}
Diet + yeast	8.81^{b}	3.86^{b}	17.4^{bc}	1058^{ab}
Diet + biochar	8.84^{b}	4.04^{ab}	14.5^{cd}	1101^{a}
Diet + lactobacilli-biochar	8.86^{b}	3.78^{c}	13.4^{d}	1100^{a}
Diet + yeast-biochar	8.93^{a}	3.90^{b}	13.2^{d}	1122^{a}
SEM	0.015	0.010	1.02	12.46
P-value	0.007	0.002	0.018	0.012

Lactobacilli (2 g/d per animal): Mixture of *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, and *Enterococcus faecium* (2×10^9, 2×10^{10} and 2×10^{10} CFU/g, respectively); Yeast (2 g/d per animal): *S. boulardii* (2×10^{10} CFU/g); Biochar (1% of diet): Obtained from pomegranate and plum woods; SEM: Standard error of the means.

[a-d] Means in the same column with different superscripts differ significantly ($P<0.05$).

مقالات زیادی در رابطه با تأثیر بیوچار بر پروتوزوآی شکمبه منتشر نشده است، اما، موافق با پژوهش حاضر، جمعیت این میکروارگانیسم‌ها در آزمایش‌های برون‌تنی دیگر تحت تأثیر بیوچار پوست گردو و بیوچار کود مرغی (Mirheidari *et al.,* 2019) و کربن زیستی (حاصل از تراشه‌های چوب کاج) (Saleem *et al.,* 2018) قرار نگرفت. به هر حال، همانند توضیحات قبل، یافته مطالعه حاضر نشان داد رویکرد مصرف هم‌زمان پروبیوتیک و بیوچار می‌تواند در زمانی که به دنبال کاهش حتمی در جمعیت پروتوزوآیی هستیم، مفید باشد.

مطابق با یافته‌های جدول ۳، افزودن منابع پروبیوتیکی و بیوچار موجب کاهش قابل توجه در تولید متان برون‌تنی شد ($P<۰/۰۵$). بیشترین درصد افت تولید متان نسبت به گروه شاهد در تیمارهای حاوی بیوچار بود، به ویژه وقتی که بیوچار به جیره‌های پروبیوتیکی اضافه شد (یعنی تیمارهای لاکتوباسیل-بیوچار و مخمر-بیوچار). یکی از دلایل کاهش متان در تیمارهای حاوی پروبیوتیک (علی‌رغم افزایش کل گاز) به جمعیت پروتوزوآیی کمتر این تیمارها مربوط است، زیرا این موجودات به عنوان گیرنده هیدروژن و انتقال‌دهنده آن به متانوژن‌ها عمل می‌کنند و کاهش در پروتوزوآ محرک کاهش تولید متان است (Mosoni *et al.,* 2011). در مورد تیمار حاوی بیوچار باید اشاره کرد این افزودنی از راه مطلوب کردن محیط سکونت جمعیت میکروبی و تغییر بیوفیلم‌های میکروبی، کاهش متانوژن‌های شکمبه و افزایش متانوتروف‌ها (قادر به متابولیزه کردن متان به عنوان تنها منبع کربن و انرژی خود) باعث کاهش انتشار متان می‌شود (Porsavathdy *et al.,* 2017; Saleem *et al.,* 2018). همچنین، بخشی از کاهش متان در تیمارهای حاوی افزودنی ممکن است به دلیل افزایش گوارش‌پذیری باشد، زیرا هضم بهتر یعنی کاهش اتلاف منابع آلی به شکل گازها (Denev *et al.,* 2007). کمترین آزادسازی متان در جیره‌های پروبیوتیک-بیوچار مشاهده شد، زیرا از یک سو، این تیمارها جمعیت پروتوزوآیی کمتری داشتند و از سوی دیگر، بیوچار نقش خود را در جذب گازها داشته است. موافق با پژوهش حاضر، محققان دیگر نیز کاهش تولید متان با مصرف پروبیوتیک‌های باکتریایی و مخمر را گزارش کردند (Denev *et al.,* 2007). کاربرد بیوچار نیز در دیگر تحقیقات برون‌تنی (Vongsamphanh *et al.,* 2015; Porsavathdy *et al.,* 2017) و درون‌تنی (Saleem *et al.,* 2018; Saroeun *et al.,* 2018) موجب کاهش تولید کل متان شد. به هر حال، درباره تأثیر مصرف بیوچار در جیره‌های پروبیوتیکی بر تولید متان مطالعه‌ای صورت نگرفته است.

در نهایت، نتایج جدول ۳ نشان داد که افزودن لاکتوباسیل و مخمر به جیره فاقد تأثیر معنی‌دار بر ظرفیت کل آنتی اکسیدانی بود. اما، وقتی بیوچار به تنهایی یا در کنار پروبیوتیک‌ها به جیره اضافه شد، موجب بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با شاهد شد. اطلاعاتی در رابطه با تأثیر پروبیوتیک-بیوچار بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی شکمبه وجود ندارد. به هر حال، بیوچار به دلیل خاصیت جذب سموم و عوامل نامساعد محیط تخمیر می‌تواند بهبود دهنده وضعیت آنتی‌اکسیدانی حاکم در محیط باشد. در نتیجه، کاربرد این دو افزودنی در کنار هم در پژوهش حاضر موجب

بهبود مؤثرتر قدرت آنتی‌اکسیدانی محیط تخمیر شد. در برخی تحقیقات نیز بیان شده است که پروبیوتیک‌ها ممکن است از مسیر دفع ترکیبات اکسیدانی یا جلوگیری از تولید آن‌ها در دستگاه گوارش، اثر آنتی‌اکسیدانی داشته باشند (Di Gioia and Biavati, 2018; Rashidi *et al.,* 2018).

آزمایش دوم (تأثیر منابع پروبیوتیکی/بیوچار بر گوساله‌های نوزاد): طبق جدول ۴، با مصرف پروبیوتیک و بیوچار در جیره گوساله، مصرف روزانه خوراک در کل دوره، اندکی افزایش یافت که متمایل به معنی‌داری بود (P=۰/۰۶۶). کمترین افزایش در تیمار بیوچار (تیمار چهارم) مشاهده شد، ولی هم‌کنش‌افزایی بین پروبیوتیک و بیوچار اثر بهتری بر مصرف خوراک داشت. رشد روزانه حیوانات در کل دوره آزمایشی با مصرف تمامی افزودنی‌ها نسبت به شاهد افزایش داشت (P<۰/۰۵) و بیشترین نرخ رشد در زمان مصرف ترکیب پروبیوتیک-بیوچار مشاهده شد. تمایل به بهبود در مصرف خوراک ممکن است به هضم بهتر جیره (به دلیل همبستگی مثبت بین هضم خوراک و مصرف خوراک؛ McDonald *et al.,* 2011) مربوط باشد. در واقع، پروبیوتیک‌ها با بهبود خمل و پرزها و توسعه مناسب‌تر و سریع‌تر شکمبه، افزایش جمعیت میکروب‌های مفید شکمبه و روده و پیشگیری از اسهال، می‌توانند موجب بهبود هضم جیره، نرخ عبور خوراک و در نتیجه، افزایش مصرف خوراک و عملکرد رشد حیوان شوند (El-Tawab *et al.,* 2016; Di Gioia and Biavati, 2018; Didarkhah and Sarir, 2018). افزودن بیوچار به جیره نیز از راه پیوند کردن سموم، کاهش اتلاف منابع انرژی، ایجاد محیط مناسب برای رشد میکروب‌های مفید، موجب بهبود گوارش‌پذیری، تولید پروتئین میکروبی و در نهایت، رشد بهتر حیوان می‌شود (Vongsamphanh *et al.,* 2015; Rashidi *et al.,* 2018). موافق با نتایج حاضر، آثار مثبت بیوچار بر عملکرد گوسفند (Mirheidari *et al.,* 2018a,b) و گاو گوشتی (Saroeun *et al.,* 2018) گزارش شده است. از دیگر دلایل مهم بهبود عملکرد گوساله‌ها در اثر مصرف افزودنی‌ها می‌توان به بهتر بودن شاخص‌های سلامت و وضعیت میکروبی رکتوم (کاهش میکروب‌های مضر مانند کلیفرم‌ها) اشاره کرد (جداول ۵ و ۶). بهترین عملکرد مربوط به تیمارهای لاکتوباسیل-بیوچار و مخمر-بیوچار بود، یعنی دو گروهی که بهترین پاسخ تخمیر و سلامت آنتی‌اکسیدانی (جدول ۳) و برترین امتیاز مدفوع (جدول ۵) و شاخص‌های سلامت (جدول ۶) را داشتند، این یعنی تأثیر تقویت‌کنندگی بیوچار در جیره‌های پروبیوتیکی و حداکثر شدن بهره‌وری منابع پروبیوتیکی.

مطابق جدول ۵، استفاده از افزودنی‌های میکروبی و بیوچار در پژوهش حاضر تأثیری بر جمعیت لاکتوباسیل‌های روده گوساله نوزاد نداشت. همچنین، تغذیه لاکتوباسیل، *ساکارومایسس بولاردی* و بیوچار موجب تغییر قابل ملاحظه کل باکتری‌های هوازی رکتوم نشد، اما کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۵) در باکتری‌های مضر کلیفرمی در دوره‌های پیش و پس از شیرگیری رخ داد. نکته قابل تأمل آن بود که کمترین حد کلیفرم‌ها زمانی مشاهده شد که بیوچار به جیره‌های پروبیوتیکی اضافه شد (تیمارهای پروبیوتیک-بیوچار). به عبارت دیگر، تأثیر هم‌کنش‌افزایی بین این افزودنی‌ها و نقش بهبود دهنده بیوچار در جیره پروبیوتیکی وجود داشت.

جدول ۴- اثر بیوچار در جیره حاوی افزودنی میکروبی بر مصرف خوراک و رشد گوساله‌های هلشتاین

Table 4. Effect of biochar in the diet containing microbial additive on feed intake and growth of Holstein calves

Diet	Starter intake (g/d)	Daily gain (kg/d)
Control diet	1579	0.793^{c}
Diet + lactobacilli	1663	0.874^{ab}
Diet + yeast	1655	0.870^{ab}
Diet + biochar	1642	0.848^{b}
Diet + lactobacilli-biochar	1662	0.896^{ab}
Diet + yeast-biochar	1692	0.903^{a}
SEM	41.29	2.14
P-value	0.066	0.011

Lactobacilli (2 g/d per animal): Mixture of *L. plantarum*, *L. rhamnosus* and *Enterococcus faecium* (2×10^{9}, 2×10^{10} and 2×10^{10} CFU/g, respectively); Yeast (2 g/d per animal): *S. boulardii* (2×10^{10} CFU/g); Biochar (1% of diet): Obtained from pomegranate and plum woods; SEM: Standard error of the means.

[a-c] Means in the same column with different superscripts differ significantly (P<0.05).

جدول ۵- اثر بیوچار در جیره حاوی افزودنی میکروبی بر جمعیت باکتریایی رکتوم گوساله‌های هلشتاین

Table 5. Effect of biochar in the diet containing microbial additive on rectum bacterial population (Log_{10} CFU/g) of Holstein calves

Diet	Coliforms	Lactobacil	Total aerobics
		Pre-weaning	
Control diet	8.301[a]	7.964	8.611
Diet + lactobacilli	8.181[ab]	7.994	8.608
Diet + yeast	8.165[ab]	7.998	8.603
Diet + biochar	8.085[b]	8.007	8.594
Diet + lactobacilli-biochar	8.014[b]	8.007	8.591
Diet + yeast-biochar	8.019[b]	8.009	8.580
SEM	0.036	0.025	0.032
P-value	0.018	0.40	0.67
		Post-weaning	
Control diet	8.214[a]	8.031	8.614
Diet + lactobacilli	8.111[ab]	8.040	8.606
Diet + yeast	8.100[ab]	8.040	8.616
Diet + biochar	8.042[b]	8.046	8.615
Diet + lactobacilli-biochar	8.032[b]	8.042	8.602
Diet + yeast-biochar	8.025[b]	8.051	8.600
SEM	0.021	0.024	0.035
P-value	0.012	0.72	0.87

Lactobacilli (2 g/d per animal): Mixture of *L. plantarum*, *L. rhamnosus* and *Enterococcus faecium* (2×10^9, 2×10^{10} and 2×10^{10} CFU/g, respectively); Yeast (2 g/d per animal): *S. boulardii* (2×10^{10} CFU/g); Biochar (1% of diet): Obtained from pomegranate and plum woods; SEM: Standard error of the means.

[a-b] Means in the same column with different superscripts differ significantly ($P<0.05$).

بر اساس تحقیقات قبل در گونه‌های مختلف دامی، پروبیوتیک‌ها نقش مفیدی در تأمین سلامت حیوانات در شرایط تنش دارند (از جمله تنش‌های فیزیولوژیکی و محیطی) و هنگامی‌که احتمال بروز تنش، بیماری‌های روده‌ای و اسهال وجود داشته باشد، آثار مثبت پروبیوتیک ها بر بهبود سلامت روده بهتر نشان داده می‌شود (Azimzadeh *et al.,* 2016). علل کاهش کلیفرم‌ها در اثر افزودن پروبیوتیک به جیره عبارتند از: ۱- اتصال پروبیوتیک‌ها به دیواره دستگاه گوارش و جلوگیری از استقرار میکروب‌های مضر، ۲- رقابت غذایی، ۳- بهبود هضم و جریان گوارشی که موجب کاهش ماندگاری و استقرار گونه‌های مضر می‌شود و ۴- آثار میکروب‌کشی و تغییر pH محیط گوارش (McDonald *et al.,* 2011; Di Gioia and Biavati, 2018). این تفاسیر با کاهش شدیدتر جمعیت کلیفرم‌های روده در دوره پیش از شیرگیری (که به علت تکامل کمتر شکمبه، احتمال عبور افزودنی به روده و اثربخشی در آن ناحیه بیشتر است) در مقایسه با پس از شیرگیری نیز تطابق دارد. بر خلاف پروبیوتیک‌ها، در مورد تأثیر بیوچار بر جمعیت باکتریایی رکتوم، تحقیق خاصی در حیوانات مختلف صورت نگرفته و ساز و کار خاصی ارائه نشده است. هر چند، مشاهدات حاکی از افت اسهال، بهبود امتیاز مدفوع و سلامت دام است و خصوصیات ویژه بیوچار (که پیش از این بیان شد) می‌تواند تا حدی در تفسیر موضوع کمک کند. این ماده کربنی متخلخل با فراهم کردن محیط رشد مناسب برای میکروب‌های مفید و بومی، حذف سموم و مواد ناخواسته از محیط هضم، کمک به گوارش بهتر مواد آلی، بهبود جریان شیرابه گوارشی و کاهش ویسکوزیته، احتمالاً محیط دستگاه گوارش را برای استقرار گونه‌های بیماری‌زا و مضر، از جمله کلیفرم‌ها، نامساعد می‌کند. همان‌طور که بیان شد، بیشترین کاهش کلیفرمی مربوط به تیمارهای پروبیوتیک-بیوچار بود، یعنی بیوچار علاوه بر اثرگذاری معمول خود، محیط را برای فعالیت افزودنی‌های پروبیوتیکی لاکتوباسیلی و *ساکارومایسس بولاردی* مساعدتر نموده، و این هم‌کوشی موجب افت شدیدتر جمعیت میکروبی مضر شده است. به هر حال، در تحقیق دیگری از افزودنی سینبیوتیکی در تغذیه گوساله استفاده شد، اما تأثیری بر باکتری‌های روده مشاهده نشد (Azimzadeh *et al.,* 2016). تفاوت در نتایج می‌تواند به دلیل نوع افزودنی میکروبی، دز مصرف، جیره پایه، مرحله فیزیولوژیکی، رشد حیوان و تنش‌های محیطی باشد.

جدول ۶- اثر بیوچار در جیره حاوی افزودنی میکروبی بر pH ادرار و مدفوع و معیارهای امتیاز سلامت گوساله‌های هلشتاین

Table 6. Effect of biochar in the diet containing microbial additive on urinary and fecal pH and health score criteria of Holstein calves

Diets	Feces pH	Urine pH	Health score criteria								
			Feces	Nose	Eye	Ear	Cough	Temperature	Navel	Joint	Total average
					Pre-weaning score						
Control diet	6.57	7.63	1.292[a]	1.011	1.008	1.006	1.024	1.008	1.006	1.002	1.045[a]
Diet + lactobacilli	6.33	7.68	1.149[b]	1.002	1.008	1.002	1.017	1.002	1.002	1.006	1.024[b]
Diet + yeast	6.44	7.17	1.145[b]	1.004	1.002	1.002	1.021	1.006	1.002	1.002	1.023[b]
Diet + biochar	6.51	7.67	1.136[b]	1.004	1.011	1.006	1.019	1.004	1.004	1.004	1.024[b]
Diet + lactobacilli-biochar	6.49	7.51	1.138[b]	1.002	1.006	1.004	1.011	1.006	1.002	1.002	1.021[b]
Diet + yeast-biochar	6.59	7.53	1.133[b]	1.004	1.002	1.004	1.004	1.004	1.006	1.002	1.020[b]
SEM	0.112	0.133	0.0120	0.0015	0.023	0.0010	0.0028	0.0015	0.0013	0.0010	0.0031
P-value	0.57	0.10	<0.001	0.39	0.68	0.53	0.076	0.73	0.69	0.45	<0.001
					Post-weaning score						
Control diet	6.31	7.55	1.121[a]	1.016	1.007	1.007	1.021	1.012	1.007	1.002	1.024[a]
Diet + lactobacilli	6.35	7.55	1.050[ab]	1.007	1.002	1.012	1.007	1.002	1.002	1.002	1.011[b]
Diet + yeast	6.24	7.60	1.045[ab]	1.012	1.002	1.002	1.002	1.007	1.002	1.007	1.010[b]
Diet + biochar	6.31	7.61	1.040[ab]	1.002	1.007	1.002	1.007	1.002	1.002	1.002	1.008[b]
Diet + lactobacilli-biochar	6.24	7.56	1.031[b]	1.012	1.002	1.002	1.002	1.002	1.002	1.002	1.007[b]
Diet + yeast-biochar	6.26	7.53	1.026[b]	1.002	1.007	1.002	1.010	1.002	1.007	1.002	1.007[b]
SEM	0.085	0.067	0.0132	0.0042	0.0015	0.0019	0.0022	0.0015	0.0014	0.0010	0.0035
P-value	0.56	0.91	0.040	0.82	0.66	0.43	0.063	0.084	0.57	0.43	0.012

Lactobacilli (2 g/d per animal): Mixture of *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, and *Enterococcus faecium* (2×10^9, 2×10^{10} and 2×10^{10} CFU/g, respectively); Yeast (2 g/d per animal): *S. boulardii* (2×10^{10} CFU/g); Biochar (1% of diet): Obtained from pomegranate and plum woods; SEM: Standard error of the means.

[a-b] Means in the same column with different superscripts differ significantly ($P<0.05$).

از بین شاخص‌های مختلف، امتیاز مدفوع در پیش و پس از شیرگیری با گنجاندن پروبیوتیک و بیوچار در جیره به‌طور معنی‌داری کاهش (بهبود) یافت (P<۰/۰۵) و درصد بهبود در دوره پیش از شیرگیری بیشتر بود. امتیاز سرفه در دوره پیش از شیرگیری (P=۰/۰۷۶) و پس از شیرگیری (P=۰/۰۶۳) و نمره دمای بدن در دوره پس از شیرگیری (P=۰/۰۸۴) در گروه‌های افزودنی در مقایسه با شاهد تمایل به بهبود داشتند. میانگین کل شاخص امتیاز سلامت نیز در دوره‌های پیش و پس از شیرگیری کاهش (بهبود) یافت (P<۰/۰۵). بیشترین بهبود مربوط به تیمارهای پروبیوتیک-بیوچار بود. از جمله دلایل بهبود شاخص‌های امتیاز سلامت (به ویژه امتیاز مدفوع، سرفه و میانگین امتیاز کل سلامت) در اثر مصرف پروبیوتیک‌ها می‌توان به مواردی اشاره نمود: ۱- متعادل نگه داشتن فلور میکروبی دستگاه گوارش به ویژه رکتوم، کمک به فعالیت گونه‌های مفید میکروبی و رقابت با گونه‌های مضر یا حذف آن‌ها (منجر به بهبود نمره مدفوع)، ۲- بهبود هضم و جذب خوراک، و دریافت مواد مغذی برای حفظ سلامت، کاهش و خنثی کردن سموم روده، ۳- تقویت سیستم ایمنی، افزایش سطح ایمنوگلوبولین و تحریک پاسخ ایمنوگلوبولینی، تحریک ایمنی دستگاه گوارش، و ۴- افزایش فعالیت ماکروفاژی (McDonald *et al.,* 2011; Di Gioia and Biavati, 2018). موارد مذکور موجب افزایش پاسخ کلی ایمنی در حیوانات (از جمله گوساله‌های نوزاد) خواهد شد که بهبود سلامت گوارشی، تنفسی و میانگین کل امتیاز سلامت را در پژوهش حاضر رقم زد. در مورد تأثیر بیوچار بر سلامت و ایمنی، همان‌طوری‌که در بخش بالا هم اشاره شد، اطلاعات خاصی در دست نیست. به هر حال، جذب سموم، تحریک رشد و استقرار گونه‌های میکروبی مفید، و بهبود هضم و جذب در دستگاه گوارش می‌تواند توجیهی بر اثربخشی این ماده کربنی بر سلامت دام باشد.

یافته‌های علمی درباره آثار مخلوط لاکتوباسیلی مصرف شده در تحقیق حاضر وجود ندارد. همچنین، آثار مخمر *ساکارومایسس بولاردی* در گوساله نوزاد چندان بررسی نشده است. به هر حال، ساز و کارهای قابل قیاسی درباره اثرگذاری پروبیوتیک‌های گروه‌های مختلف در پژوهش‌ها پیشنهاد شده است. پروبیوتیک‌ها می‌توانند به‌صورت غیرمستقیم با تغییر در جمعیت میکروبی موجب بهبود ایمنی نشخوارکنندگان شوند. پروبیوتیک‌ها ممکن است با ترشح باکتریوسین‌ها و دست‌کاری در جمعیت میکروب‌های شکمبه، سبب بهبود فرآیند تخمیر و افزایش ایمنوگلوبولین‌های خون و ایمنی دام، و در نهایت، باعث بهبود سلامت میزبان در شرایط مختلف شوند (Qiao *et al.,* 2010; Lettat *et al.,* 2012; Uyeno *et al.,* 2015; Di Gioia and Biavati, 2018). نتایج تحقیقی نشان داد که مصرف *B. subtilis* در جیره گوساله‌های نوزاد باعث تقویت ایمنی از راه افزایش سطح ایمنوگلوبولین G سرم و سلول‌های T کمکی شد (Sun *et al.,* 2010). در پژوهشی دیگر، استفاده از لاکتوباسیلوس در جیره گاوها باعث فعال شدن سیستم ایمنی سلول‌های اپیتلیال و لیمفوئیدی روده و در نهایت، افزایش ایمنی شد (Kawakami *et al.,* 2010). تحقیقی نشان داد مکمل‌سازی جیره گوساله با پروبیوتیک ها (شامل *L. plantarum*، *Enterococcus faecium* و *Clostridium butyricum*) از راه افزایش لوکوسیت‌ها باعث بهبود ایمنی گوساله به ویژه در برابر بیماری‌هایی مانند اسهال می‌شود (Qadis *et al.,* 2014). موارد مذکور دلیل بهبود کلی شاخص‌های سلامت با مصرف چنین افزودنی‌هایی است.

بر اساس نتایج ارائه شده در جدول ۷، غلظت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز، گاماگلوتامیل ترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین ترانسفراز در دوره پیش و پس از شیرگیری تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت، اما غلظت لاکتات دهیدروژناز در پیش از شیرگیری در تیمارهای پروبیوتیک، بیوچار و پروبیوتیک-بیوچار در مقایسه با شاهد کمتر بود (P<۰/۰۵)، و کمترین آن در تیمارهای ترکیبی مشاهده شد. غلظت آنزیم مذکور در دوره پس از شیرگیری، اختلاف معنی‌داری بین تیمارها نداشت. فعالیت مناسب آنزیم‌های خون نشانگر فعالیت مناسب و سلامت اندام‌ها است. نوسان شدید در فعالیت آنزیم‌های مذکور ممکن است بازتابی از سمیت احتمالی ترکیبات خوراکی و متابولیت‌های مصرفی در بدن، و یا بیانگر افزایش فعالیت کبد به علت آسیب‌های متابولیکی باشد (Kurtz and Travlos, 2017). چنانچه فعالیت آن‌ها افزایش یابد، نشان‌دهنده اختلال در فعالیت کبد است و احتمالاً مرتبط با کاهش اشتها و یا تجمع بیش از حد چربی در کبد است. افزایش فعالیت آنزیم‌هایی مانند آسپارتات آمینوترانسفراز، آلانین‌آمینوترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز در سرم ممکن

است به دلیل نکروز سلول‌های کبدی و تغییر در نفوذپذیری غشای سلول‌های کبدی باشد (Mojabi, 2011).

از دلایل دیگر افزایش فعالیت لاکتات دهیدروژناز خون می توان به همولیز و تخریب گلبول‌های قرمز (حتی به مقدار ناچیز) اشاره کرد (Mojabi, 2011). به‌علاوه، افزایش لاکتات دهیدروژناز خون با بیماری‌های تنفسی ارتباط دارد و در شرایط هیپوکسی ناشی از کم‌خونی و تشنج، التهابات عفونی و غیرعفونی و مسمومیت با آلکالوئیدها نیز مشاهده می‌شود (Klein *et al.,* 2020).

از سوی دیگر، سوء تغذیه می‌تواند فعالیت آلکالین فسفاتاز خون را کم کند (Kurtz and Travlos, 2017)، اما برخی بیماری‌های مزمن کبدی، مشکلات استخوانی و بیماری‌های غده فوق کلیوی ممکن است باعث افزایش آلکالین فسفاتاز خون شوند. همچنین، افزایش فعالیت آنزیم‌هایی مانند آلکالین فسفاتاز و گاماگلوتامیل ترانسفراز در سرم ممکن است به دلیل توقف تولید کبدی آن‌ها باشد (Mojabi, 2011). نتایج تحقیق حاضر تأیید کرد که بیوچار فاقد آثار سوء بر سلامت اندام‌ها از جمله کبد یا روند فعالیت آنزیم‌های کبدی است. از سوی دیگر، افت نسبی فعالیت لاکتات دهیدروژناز خون طبق دلایل بالا می‌تواند با بهبود سلامت کلی گوساله‌ها مرتبط باشد. در مورد تأثیر احتمالی بیوچار و مخلوط پروبیوتیک-بیوچار بر فعالیت آنزیم‌های سرم خون اطلاعات چندانی در دسترس نیست. به هر حال، عدم تأثیر بیوچار بر فعالیت آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز در تحقیق حاضر با نتایج یک پژوهش در گوسفند (Mirheidari *et al.,* 2018a) موافق بود.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج تحقیق حاضر نشان داد افزودن جداگانه پروبیوتیک لاکتوباسیلی (مخلوط *L. plantarum*، *L. rhamnosus* و *Enterococcus faecium*)، مخمر (*S. boulardii*) و بیوچار (چوب انار و آلو) در جیره موجب بهبود تخمیر و کاهش آزادسازی متان در شرایط برون‌تنی شد. همچنین، افزودنی‌های مذکور موجب بهبود شاخص‌های وضعیت سلامت و کاهش جمعیت میکروب‌های نامطلوب رکتوم در گوساله‌های هلشتاین در دوره پیش و پس از شیرگیری (بدون آثار منفی بر آنزیم‌های خون) شدند. از سوی دیگر، بهترین پاسخ‌های برون‌تنی و درون‌تنی در زمان مصرف ترکیب پروبیوتیک-بیوچار مشاهده شد. بنا بر نتایج به‌دست‌آمده، افزودن بیوچار (یک درصد ماده خشک) در جیره‌های حاوی پروبیوتیک (دو گرم در روز) می‌تواند به عنوان یک راه‌کار برای تقویت توان اثربخشی پروبیوتیک‌ها

جدول ۷- اثر بیوچار در جیره حاوی افزودنی میکروبی بر آنزیم‌های خون (U/L) گوساله‌های هلشتاین

Table 7. Effect of biochar in the diet containing microbial additive on blood enzymes (U/L) of Holstein calves

Diet	ALP	GGT	AST	ALT	LDH
			Pre-weaning		
Control diet	173	15.64	92.20	25.44	679[a]
Diet + lactobacilli	181	17.02	87.60	25.96	592[b]
Diet + yeast	174	17.24	87.47	24.88	582[b]
Diet + biochar	186	16.79	84.02	29.52	557[b]
Diet + lactobacilli-biochar	176	17.30	92.16	27.85	544[b]
Diet + yeast-biochar	179	15.83	89.37	24.70	509[c]
SEM	6.61	1.38	9.05	1.74	16.34
P-value	0.74	0.92	0.98	0.34	<0.001
			Post-weaning		
Control diet	161	14.36	105.3	22.98	674
Diet + lactobacilli	165	13.89	104.4	25.36	644
Diet + yeast	154	14.42	96.37	24.19	610
Diet + biochar	161	14.20	98.32	23.36	639
Diet + lactobacilli-biochar	157	15.86	102.5	24.74	638
Diet + yeast-biochar	163	13.71	104.4	24.01	627
SEM	9.27	1.62	3.79	1.05	23.58
P-value	0.96	0.95	0.47	0.64	0.55

ALP: Alkaline phosphatase; GGT: Gamma-glutamyl transferase; ASP: Aspartate aminotransferase; ALT: Alanine transaminase; LDH: Lactate dehydrogenase: Lactobacilli (2 g/d per animal): A mixture of *L. plantarum*, *L. rhamnosus* and *Enterococcus faecium* (2×10^9, 2×10^{10} and 2×10^{10} CFU/g, respectively); Yeast (2 g/d per animal): *S. boulardii* (2×10^{10} CFU/g); Biochar (1% of diet): Obtained from pomegranate and plum woods; SEM: Standard error of the means.

[a-c] Means in the same column with different superscripts differ significantly ($P<0.05$).

در بهبود تخمیر برون‌تنی و وضعیت سلامت گوساله‌های نوزاد توصیه شود و ضمن کمک به حفظ محیط زیست، باعث بهبود بهره‌وری مصرف پروبیوتیک‌ها خواهد شد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب قدردانی خویش را از دانشگاه تربیت مدرس، به دلیل حمایت مادی و معنوی از پژوهش حاضر ابراز می‌نمایند.

فهرست منابع

AFRC. 1993. *Energy and Protein Requirements of Ruminants*. Agricultural and Food Research Council, Technical Committee on Responses to Nutrients. Wallingford (UK): CABI Publishing.

Anele U. Y., Südekum K.-H., Hummel J., Arigbede O. M., Oni A. O., Olanite J. A., Böttger C., Ojo V. O. and Jolaosho A. O. 2011. Chemical characterization, *in vitro* dry matter and ruminal crude protein degradability and microbial protein synthesis of some cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) haulm varieties. Animal Feed Science and Technology, 163: 161-169.

Ayad M. A., Benallou B., Saim M. S., Smadi M. A. and Meziane T. 2013. Impact of feeding yeast culture on milk yield, milk components, and blood components in Algerian dairy herds. Journal of Veterinary Science and Technology, 5: 1-5.

Azimzadeh V., Assadi-Alamouti A., Khadem A., Bagheri Varzaneh M. and Mohammad Moradi J. 2016. Effects of supplementation of a symbiotic product on growth performance and health of Holstein calves. Research on Animal Production (Scientific and Research), 6(12): 105-114. (In Persian).

Benzie I. F. F. and Strain J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239: 70-76.

Blümmel M., Steingss H. and Becker K. 1997. The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and15N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. British Journal of Nutrition, 77: 911-921.

Chen L., Ren A., Zhou C. and Tan Z. 2017. Effects of Lactobacillus acidophilus supplementation for improving *in vitro* rumen fermentation characteristics of cereal straws. Italian Journal of Animal Science, 16(1): 52-60.

Davis C. L. and Drackley J. K. 1998. *The Development, Nutrition, and Management of the Young Calf* (1st ed.). Iowa (USA): Iowa State University Press.

Dehority B. A. 2003. *Rumen Microbiology* (1st ed.). Nottingham (UK): Nottingham University Press.

Denev S. A., Peeva T. Z., Radulova R., Stancheva N., Stanykova G., Beev G., Todorova P. and Tchobanova S. 2007. Yeast cultures in ruminant nutrition. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 18: 357-374.

Di Gioia D. and Biavati B. 2018. *Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety* (1st ed.). Gewerbestrasse (Switzerland): Springer International Publishing.

Didarkhah M. and Sarir H. 2018. Effects of probiotic and peribiotic supplements on production performance of dairy cows. Animal Production, 20(2): 293-304. (In Persian).

El-Tawab M. A., Youssef I. M. I., Bakr H. A., Fthenakis G. C. and Giadinis N. D. 2016. Role of probiotics in nutrition and health of small ruminants. Polish Journal of Veterinary Sciences, 19(4): 893-906.

Fonty G. and Chaucheyras-Durand F. 2006. Effects and modes of action of live yeasts in the rumen. Biologia, 61(6): 741-750.

Forbes B. A., Sahm D. F. and Weissfeld A. S. 2007. *Diagnostic Microbiology* (12th ed.). Missouri (USA): Mosby, Elsevier.

Gerlach A. and Schmidt H. P. 2014. The use of biochar in cattle farming. The Biochar Journal, Arbaz, Switzerland. ISSN 2297-1114.

Hansen H. H., Storm I. D. and Sell A. M. 2012. Effect of biochar on *in vitro* rumen methane production. Acta Agriculturae Scandinavica, Section A–Animal Science, 62(4): 305-309.

Kawakami S. I., Yamada T., Nakanishi N., Cai Y. and Ishizaki H. 2010. Leukocyte phagocytic activity with or without probiotics in Holstein calves. Research Journal of Biological Sciences, 4: 13-16.

Khalid M. F. and Sarwar M. 2011. Response of growing lambs fed on different vegetable protein sources with or without probiotics. International Journal of Agriculture & Biology, 13(3): 332-338.

Klein R., Nagy O., Tóthová C. and Chovanová F. 2020. Clinical and diagnostic significance of lactate dehydrogenase and its isoenzymes in animals. Veterinary Medicine International, 2020: 5346483.

Kurtz D. M. and Travlos G. S. 2017. *The Clinical Chemistry of Laboratory Animals* (3rd ed.). Boca Raton, FL (USA): CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC.

Le O. T., Schofield B., Dart P. J., Callaghan M. J., Lisle A. T., Ouwerkerk D., Klieve A. V. and McNeill D. M. 2017. Production responses of reproducing ewes to a by-product-based diet inoculated with the probiotic Bacillus amyloliquefaciens strain H57. Animal Production Science, 57(6): 1097-1105.

Lettat A., Noziere P., Silberberg M., Morgavi D. P., Berger C. and Martin C. 2012. Rumen microbial and fermentation characteristics are affected differently by bacterial probiotic supplementation during induced lactic and subacute acidosis in sheep. BMC Microbiology, 12(1): 142.

McDonald P., Edwards R. A., Greenhalgh J. F., Morgan C. A., Sinclair L. A. and Wilkingson R. G. 2011. *Animal Nutrition* (7th ed.). Essex (UK): Prentice Hall.

Menke K., Raab L., Salewski A., Steingass H., Fritz D. and Schneider W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. Journal of Agricultural Science, 93(1): 217-222.

Mirheidari A., Torbatinejad N. M., Hassani S. and Shakeri P. 2018a. Effects of pistachio by-product biochar on performance, microbial protein, some of ruminal fermentation parameters and blood metabolites in fattening lambs. Animal Sciences Journal, 30(117): 151-62. (In Persian).

Mirheidari A., Torbatinejad N. M, Hassani S. and Shakeri P. 2018b. Effect of different levels of walnut shell and chicken manure biochar on ruminal fermentation parameters and methane production. Journal of Ruminant Research, 1: 1-16. (In Persian).

Mirheidari A., Torbatinejad N. M., Shakeri P. and Mokhtarpour A. 2019. Effects of walnut shell and chicken manure biochar on *in vitro* fermentation and *in vivo* nutrient digestibility and performance of dairy ewes. Tropical Animal Health and Production, 51: 1-8.

Mojabi A. 2011. *Veterinary Clinical Biochemistry* (2nd ed.). Tehran (Iran): Noorbakhsh Publishing. (In Persian).

Mosoni P., Chaucheyras-Durand F., Béra-Maillet C. and Forano E. 2007. Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. Journal of Applied Microbiology, 103(6): 2676-2685.

Mosoni P., Martin C., Forano E. and Morgavi D. P. 2011. Long-term defaunation increases the abundance of cellulolytic Ruminococci and Methanogens but does not affect the bacterial and methanogen diversity in the rumen of sheep. Journal of Animal Science, 8: 783-791.

NRC. 2001. *Nutrient requirements of Dairy Animals* (7th ed.). Washington, DC (USA): National Academy Press.

Porsavathdy P., Phongphanith S., Preston T. R. and Leng R. A. 2017. Methane production in an *in vitro* rumen fermentation of molasses-urea was reduced by supplementation with fresh rather than dried cassava (Manihot esculenta, Crantz) leaves and by biochar. Livestock Research for Rural Development, 29(3): 41.

Prasai T. P., Walsh K. B., Bhattarai S. P., Midmore D. J., Van T. T., Moore R. J. and Stanley D. 2016. Biochar, bentonite and zeolite supplemented feeding of layer chickens alters intestinal microbiota and reduces Campylobacter load. PLoS One, 11(4): e0154061.

Qadis A. Q., Goya S., Ikuta K., Yatsu M., Kimura A., Nakanishi S. and Sato S. 2014. Effects of a bacteria-based probiotic on ruminal ph, volatile fatty acids, and bacterial flora of Holstein calves. Journal of Veterinary Medical Science, 76(6): 877-885.

Qiao G. H., Shan A. S., Ma N., Ma Q. Q. and Sun Z. W. 2010. Effect of supplemental Bacillus cultures on rumen fermentation and milk yield in Chinese Holstein cows. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 8: 429-436.

Radzikowski D. 2017. Effect of probiotics, prebiotics and synbiotics on the productivity and health of dairy cows and calves. World Scientific News, 78: 193-198.

Rashidi N., Khatibjoo A., Taherpour K., Akbari Gharaei M. and Shirzadi H. 2018. Effect of licorice extract, probiotic, antifungal and biochar on performance of broiler chickens fed aflatoxin B1 contaminated diet. Animal Production, 20(1): 145-157. (In Persian).

Saleem A. M., Ribeiro Jr G. O., Yang W. Z., Ran T., Beauchemin K. A., McGeough E. J. and McAllister T. A. 2018. Effect of engineered biocarbon on rumen fermentation, microbial protein synthesis, and methane production in an artificial rumen (RUSITEC) fed a high forage diet. Journal of Animal Science, 96(8): 3121-3130.

Sales J. 2011. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation of ruminal parameters, nutrient digestibility and growth in sheep: A meta-analysis. Small Ruminant Research, 10: 19-29.

Saroeun K., Preston T. R. and Leng R. A. 2018. Rice distillers' byproduct and molasses-urea blocks containing biochar improved the growth performance of local Yellow cattle fed ensiled cassava roots, cassava foliage and rice straw. Livestock Research for Rural Development, 30(9): 162.

Sheikh G. G., Ganai A. M., Ahmad Sheikh A. and Mir D. M. 2022. Rumen microflora, fermentation pattern and microbial enzyme activity in sheep fed paddy straw based complete feed fortified with probiotics. Biological Rhythm Research, 53(4): 547-558.

Silivong P. and Preston T. R. 2015. Growth performance of goats was improved when a basal diet of foliage of *Bauhinia acuminata* was supplemented with water spinach and biochar. Livestock Research for Rural Development, 27(3): 58.

Souza V. L., Lopes N. M., Zacaroni O. F., Silveira V. A., Pereira R. A. N., Freitas J. A., Almeida R., Salvati G. G. S. and Pereira M. N. 2017. Lactation performance and dietdigestibility of dairy cows in response to the supplementation of *Bacillus subtilis* spores. Livestock Science, 5: 35-39.

Sun P., Wang J. Q. and Deng L. F. 2013. Effects of *Bacillus subtilis* natto on milk production, rumen fermentation and ruminal microbiome of dairy cows. Animal, 7(2): 216-222.

Sun P., Wang J. Q. and Zhang H. T. 2010. Effects of *Bacillus subtilis* natto on performance and immune function of preweaning calves. Journal of Dairy Science, 5: 5851-5855.

SVMUNW. 2020. *Calf Health Scoring Criteria*. University of Wisconsin-Madison Data Collection Tools, Food Animal Production Medicine, University of Wisconsin-Madison, USA.

Taghizadeh M., Yousef Elahi M., Mirzaei H. R., Salem A. Z. M., Azarfar A. and Azizi A. 2021. Effect of different levels of yeast in comparison with monensin on the ruminal fermentation parameters and protein degradability in high concentrate diets. Animal Production Research, 10(2): 73-85. (In Persian).

Teoh R., Caro E., Holman D. B., Joseph S., Meale S. J. and Chaves A. V. 2019. Effects of hardwood biochar on methane production, fermentation characteristics, and the rumen microbiota using rumen simulation. Frontiers in Microbiology, 10: 1534.

Tilley J. M. A. and Terry R. A. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. Grass and Forage Science, 18(2): 104-111.

Uyeno Y., Shigemori S. and Shimosato T. 2015. Effect of probiotics/prebiotics on cattle health and productivity. Microbes and Environments, 30(2): 126-132.

Vongsamphanh P., Napasirth V., Inthapanya S. and Preston T. R. 2015. Effect of biochar and leaves from sweet or bitter cassava on gas and methane production in an *in vitro* rumen incubation using cassava root pulp as source of energy. Livestock Research for Rural Development, 27(04): 72.

Zhang R., Dong X., Zhou M., Tu Y., Zhang N., Deng K. and Diao Q. 2017. Oral administration of *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis* on rumen fermentation and the bacterial community in calves. Animal Science Journal, 88(5): 755-762.