



**POLITECHNIKA
BYDGOSKA**
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

ROZPRAWA DOKTORSKA

**W FORMIE ZBIORU OPUBLIKOWANYCH I POWIĄZANYCH
TEMATYCZNIE ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH W DYSCYPLINIE
ZOOTECHNIKA I RYBACTWO**

mgr inż. Julita Milik

**EFEKTYWNOŚĆ ZASTOSOWANIA DODATKÓW
PASZOWYCH DO PREPARATU MLEKOZASTĘPCZEGO
NA WYNIKI ODCHOWU CIELĄT**

*Effectiveness of feed additives use in milk replacer on
rearing results of calves*

**DZIEDZINA: NAUKI ROLNICZE
DYSCYPLINA: ZOOTECHNIKA I RYBACTWO**

PROMOTOR

dr hab. inż. Katarzyna Budzińska, prof. PBŚ
Katedra Biologii i Środowiska Zwierząt, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

PROMOTOR POMOCNICZY

dr hab. inż. Paweł Górka, prof. URK
Katedra Żywienia Zwierząt i Rybactwa, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie



BYDGOSZCZ 2024

Podziękowania

Serdeczne podziękowania kieruję do Pani Promotor, dr hab. inż. Katarzyny Budzińskiej, profesor PBS, której pomoc w powstaniu niniejszej rozprawy doktorskiej jest nieoceniona.

Dziękuję za zaufanie, poświęcony mi czas, wsparcie w trudnym dla mnie czasie i cenne merytoryczne wskazówki.

Składam serdeczne podziękowania pomocniczemu Panu Promotor, dr hab. inż. Pawłowi Górcze, profesorowi URK za nieustanne wsparcie i wskazówki na każdym etapie rozwoju naukowego.

Serdecznie dziękuję Pani dr inż. Anicie Jurek za wskazówki które udzieliła mi podczas prac w laboratorium.

Dziękuję również mojej rodzinie i przyjaciołom za ogromne wsparcie i wiarę we mnie w ciągu ostatnich, intensywnych lat.

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	5
2. WYKAZ ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH STANOWIĄCYCH CYKL PUBLIKACJI ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	7
3. UZASADNIENIE SPÓJNOŚCI TEMATYCZNEJ CYKLU PUBLIKACJI	8
3.1. HIPOTEZA BADAWCZA, CEL I ZAKRES BADAŃ	8
4. MATERIAŁ I METODY BADAŃ	10
4.1. MIEJSCE REALIZACJI DOŚWIADCZEŃ I WYMAGANE ZGODY	10
4.2. ETAP 1	12
4.2.1. Cel i ogólne założenia	12
4.2.2. Zwierzęta, postępowanie przed rozpoczęciem doświadczenia i ich utrzymanie	12
4.2.3. Grupy doświadczalne i żywienie zwierząt.....	12
4.2.4. Ocena odporności biernej cieląt.....	13
4.2.5. Kontrola pobrania pasz	13
4.2.6. Kontrola masy ciała	14
4.2.7. Analiza składu pasz	14
4.2.8. Kontrola płynności kału i zdrowia cieląt.....	14
4.2.9. Analiza mikrobiologiczna próbek kału	14
4.3. ETAP 2	16
4.3.1. Cel i ogólne założenia	16
4.3.2. Zwierzęta, postępowanie z nimi przed rozpoczęciem doświadczenia i ich utrzymanie	16
4.3.3. Grupy doświadczalne i żywienie zwierząt.....	16
4.3.4. Obserwacje na cielętach i analizy	16
4.4. ANALIZA STATYSTYCZNA	16
5. WYNIKI	18
5.1. ETAP 1	18
5.1.1. Doświadczenie A1	18
5.1.2. Doświadczenie B1	18
5.1.3. Podsumowanie	19
5.2. ETAP 2	19
5.2.1. Doświadczenie A2	19
5.2.2. Doświadczenie B2	19
5.2.3. Podsumowanie	20
6. DYSKUSJA	21
7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	25
8. LITERATURA	26

9. STRESZCZENIE	30
10. ABSTRACT	32
11. ZAŁĄCZNIKI	34
11.1. Kopie artykułów naukowych stanowiących cykl publikacji rozprawy doktorskiej....	34
11.2. Oświadczenie Autora rozprawy doktorskiej.....	35
11.3. Oświadczenia Współautorów artykułów naukowych	36

1. WSTĘP

Odchów cieląt to jeden z najważniejszych, a także bardzo kosztownych etapów produkcji mleka oraz mięsa wołowego. W przypadku bydła mlecznego, efekty odchowu decydują o uzyskaniu odpowiedniej ilości jałówek na remont stada, wartości użytkowej przyszłych krów, a przede wszystkim wpływają na zysk gospodarstwa z tytułu prowadzonej produkcji. Szacuje się, że odchów jałówek remontowych stanowi ponad 12% kosztów produkcji mleka [Gabler i in., 2000], tym samym jest pokaźnym kosztem w całej produkcji.

Ze względów organizacyjnych i ekonomicznych, cielęta ras mlecznych są powszechnie żywione preparatem mlekozastępczym, zamiast mlekiem pełnym. Głównym celem stosowania preparatów mlekozastępczych jest pozytywny wpływ na rozwój i funkcjonowanie przewodu pokarmowego zwierząt [Rozporządzenie (WE) NR 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 sierpnia 2003 r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu]. Przewód pokarmowy cieląt nie jest w pełni rozwinięty w momencie urodzenia [Guilloteau i in., 2009], a w efekcie zwierzęta w tym okresie są podatne na choroby, zwłaszcza biegunki o różnym podłożu etiologicznym. Z przeprowadzonych badań wynika, że występowanie biegunek może dotyczyć nawet kilkudziesięciu procent odchowywanych zwierząt [Windeyer i in., 2014; Medrano-Galarza i in., 2018].

Spośród stosowanych w preparatach mlekozastępczych dla cieląt dodatków paszowych, bardzo dużą popularnością cieszą się probiotyki. Można je uznać za standardowy dodatek paszowy stosowany w żywieniu najmłodszych cieląt. Duża popularność ich stosowania w preparatach mlekozastępczych wynika z pozytywnego wpływu na efekty odchowu cieląt (przyrosty masy ciała i zdrowie), wykazanego w wielu doświadczeniach [Frizzo i in., 2011; Signorini i in., 2012; Cangiano i in., 2020]. Badania wykazały, że podawanie probiotyków cielętom powoduje rozwój w układzie pokarmowym pożytecznych mikroorganizmów [PlazaDiaz i in., 2019], np. *Lactobacillus* spp, jednocześnie zmniejszając w kale liczbę patogennych lub potencjalnie chorobotwórczych (*Escherichia coli*) [Roodposhti i Dabiri, 2012; Signorini i in., 2012]. Bakterie probiotyczne są powszechnie łączone z innymi dodatkami paszowymi w preparatach mlekozastępczych w celu dalszej poprawy efektów odchowu cieląt [Górka i in., 2021; Stefańska i in., 2021; Górka i in., 2023]. Obok probiotyków do najczęściej stosowanych dodatków paszowych należą: prebiotyki, związki fitogeniczne, immunoglobuliny żółtka jaja kurzego i sole kwasu masłowego [Górka i in., 2011a i b; Friten i in., 2017; Erhard i in., 2000; Stefańska i in., 2021; Jahani-Azizabadi i in., 2022]. Łączenie ze sobą różnych dodatków paszowych w preparacie mlekozastępczym niekoniecznie musi być jednak uzasadnione. W części prowadzonych doświadczeń, w których weryfikowano wpływ połączenia różnych dodatków paszowych w preparacie mlekozastępczym dla cieląt, pozytywny efekt takiej praktyki był niewidoczny [Ozpinar i in., 1996; Górka i in., 2021] lub też efekty te były zdecydowanie mniejsze niż oczekiwano [Ballou, 2011; Kehoe i Carlson, 2015]. Warto również wspomnieć, że generalnie ilość doświadczeń, w których badano wpływ łączenia różnych dodatków paszowych w preparacie mlekozastępczym dla cieląt nie jest duża [Górka i in., 2011a i b; Erhard i in., 2000; Stefańska i in., 2021]. W jednym z dostępnych doniesień naukowych stwierdzono nawet, że niektóre kombinacje dodatków paszowych występujące w preparatach mlekozastępczych mogą negatywnie wpływać na efekty odchowu i zdrowie cieląt [Wood i in., 2019]. Nowonarodzone cielęta są szczególnie podatne na biegunki, w związku z tym czynniki wpływające na mikrobiom ich przewodu pokarmowego są w kręgu szczególnych zainteresowań.

Wpływ na ilościowy i gatunkowy skład mikroorganizmów układu pokarmowego wywierają nie tylko zastosowane w paszy bakterie probiotyczne, ale także inne dodatki paszowe. Wykazano, że dodatek związków fitogenicznych w preparatach mlekozastępczych dla cieląt wpływa na populację bakterii zwacza [Jahani-Azizabadi i in., 2022], a także

przyczynia się do zmniejszania występowania i wydalania pierwotniaków *Cryptosporidium parvum* i *Giardia duodenalis* w kale [Stefańska i in., 2021]. Z drugiej strony stwierdzono, że nadmierne dawki takiego rodzaju dodatku paszowego mogą prowadzić do negatywnych skutków [Brand i in., 2019; Kholif i in., 2021]. Wyniki tych badań dodatkowo uzasadniają potrzebę lepszej charakterystyki efektów stosowania różnych dodatków paszowych w żywieniu cieląt, gdyż nie zawsze lub nie we wszystkich układach ich stosowanie może być uzasadnione.

Łączenie różnych dodatków paszowych w preparacie mlekozastępczym może być w szczególności nieuzasadnione, gdy żywienie cieląt taką paszą rozpoczyna się w nieco późniejszym wieku. Jeżeli w pierwszych dniach życia cielętom podaje się nadwyżkę siary lub mleka posiarowego, do czego zachęcają wyniki dostępnych badań [Van Soest i in., 2022], to efekt stosowania dodatków paszowych może być o wiele mniejszy, niż gdy rozpoczyna się żywienie preparatem mlekozastępczym od 2-4 dnia życia. Wydłużony okres karmienia cieląt siarą korzystnie wpływa na rozwój mikroflory jelitowej [Fischer i in., 2018; Milik in., 2023], a w szczególności nabłonka jelita cienkiego. W efekcie, tak żywione w pierwszych dniach życia cielęta, są odporniejsze na choroby w późniejszym okresie odchowu [Van Soest i in., 2022]. Stąd też efekt stosowania dodatków paszowych może być ograniczony, na co wskazują wyniki niektórych badań, w których podawanie nadwyżki siary i mleka kontynuowano przez pierwsze 10 dni życia cieląt [Górka i in., 2021].

Biorąc powyższe pod uwagę, celem badań było określenie wpływu dodatku maślanu sodu, związków fitogenicznych oraz immunoglobulin żółtka jaja kurzego do preparatu mlekozastępczego zawierającego bakterie probiotyczne na efekty odchowu cieląt oraz liczbę wybranych bakterii w kale cieląt żywionych w pierwszych dniach życia nadwyżką siary i mleka przejściowego.

2. WYKAZ ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH STANOWIĄCYCH CYKL PUBLIKACJI ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

P1. Górka P., **Milik J.**, Budziński W., Przybyło M., Kański J., Jankowiak T., Budzińska K. Effect of sodium butyrate, phytogetic compounds and egg yolk antibodies supplementation in calf milk replacer containing probiotic bacteria on farms feeding a mixture of surplus colostrum and transition milk to calves in their first days of life. *Journal of Animal Feed Science and Technology* 2023, 302, 115675, DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2023.115675,

Punktacja MNiSW = 200, Impact Factor = 3.247

P2. **Milik J.**, Górka P., Budzińska K., Kański J., Jankowiak T. Effect of supplementing sodium butyrate, phytogetic compounds and egg yolk antibodies supplementation in calf milk replacer containing probiotic bacteria on selected fecal bacteria in calves. *Journal of Animal and Feed Sciences* 2023, 32, 4, 438-446, DOI: 10.22358/jafs/166154/2023,

Punktacja MNiSW = 100, Impact Factor = 1.0

Podsumowanie wskaźników cyklu publikacji:

Sumaryczna liczba punktów MNiSW = 300 pkt.

Sumaryczny Impact Factor = 4,247

3. UZASADNIENIE SPÓJNOŚCI TEMATYCZNEJ CYKLU PUBLIKACJI

Zastosowanie w preparacie mlekozastępczym takich dodatków jak: probiotyki, maślan sodu, związki fitogeniczne oraz immunoglobuliny żółtka jaja kurzego, może korzystnie wpływać na funkcjonowanie przewodu pokarmowego cieląt, a w efekcie na wyniki ich odchowu. Spośród wymienionych dodatków paszowych, probiotyki są szczególnie często stosowane w preparatach mlekozastępczych dla cieląt. Jakkolwiek można by oczekiwać, że zastosowanie kombinacji probiotyku z innymi dodatkami paszowymi w preparacie mlekozastępczym powinno mieć korzystny wpływ na efekty odchowu cieląt, to wyniki dostępnych badań wskazują, że nie zawsze tak musi być. W szczególności efekty łączenia różnych dodatków paszowych w preparacie mlekozastępczym nie zawsze muszą być korzystne, zwłaszcza gdy cielęta w pierwszych dniach życia, tj. przed wprowadzeniem do dawki pokarmowej preparatu mlekozastępczego, są żywione nadwyżką siary i mleka przejściowego, a więc paszami, które mają bardzo pozytywny wpływ na rozwój ich przewodu pokarmowego.

W skład niniejszej dysertacji wchodzi dwie publikacje naukowe, których celem było określenie wpływu połączenia dodatku probiotycznego z dodatkami paszowymi zawierającymi maślan sodu, związki fitogeniczne i immunoglobuliny żółtka jaja kurzego na efekty odchowu cieląt oraz skład wybranych bakterii w kale. Publikacja **P1** prezentuje wyniki czterech wzajemnie powiązanych doświadczeń, wykonanych w dwóch różnych gospodarstwach. W publikacji tej zaprezentowano wyniki dotyczące efektów odchowu cieląt (przyrosty masy ciała, pobranie pasz, parametry zdrowia itp.). Publikacja **P2** prezentuje wyniki ilości wybranych bakterii w kale cieląt. Skład bakterii kałowych został wykorzystany w pracy jako wskaźnik oddziaływania badanych dodatków paszowych na funkcjonowanie przewodu pokarmowego cieląt. Materiał do badań opisanych w pracy **P2** został pobrany w trakcie jednego z doświadczeń opisanego w publikacji **P1**. Opisane w pracy **P2** wyniki charakteryzują wpływ wszystkich badanych dodatków paszowych na ilość wybranych bakterii w kale. W związku z powyższym obie publikacje dotyczą efektów stosowania tych samych dodatków paszowych i opisują wyniki uzyskane w ramach cyklu kilku powiązanych ze sobą doświadczeń.

3.1. HIPOTEZA BADAWCZA, CEL I ZAKRES BADAŃ

Hipoteza badawcza pracy zakładała, że kombinacja bakterii probiotycznych z maślanem sodu, związkami fitogenicznymi lub immunoglobulinami żółtka jaja kurzego ma niekoniecznie pozytywny wpływ na efekty odchowu i skład bakterii kałowych cieląt żywionych w pierwszych dniach życia nadwyżką siary i mleka przejściowego.

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie wpływu dodatku maślanu sodu, związków fitogenicznych oraz immunoglobulin żółtka jaja kurzego do preparatu mlekozastępczego zawierającego bakterie probiotyczne na efekty odchowu cieląt i ilość wybranych bakterii w kale cieląt żywionych w pierwszych dniach życia nadwyżką siary i mleka przejściowego.

Przyjęto następujące cele szczegółowe skorelowane z hipotezą badawczą:

- Określenie wpływu zastosowania pojedynczych dodatków paszowych do preparatu mlekozastępczego zawierającego bakterie probiotyczne na efekty odchowu cieląt.
- Określenie wpływu dodatku pojedynczych dodatków paszowych do preparatu mlekozastępczego zawierającego probiotyk na ilość wybranych bakterii w kale.
- Określenie wpływu kombinacji kilku dodatków do preparatu mlekozastępczego zawierającego probiotyk na efekty odchowu cieląt.

Badania realizowane były zgodnie ze schematem przedstawionym na rysunku 1 obejmowały: ocenę odporności biernej cieląt, analizę wykorzystania paszy, kontrolę

pobrania pasz, ocenę płynności kału i zdrowia cieląt oraz oznaczenie w próbkach kału ogólnej liczby bakterii, liczby *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* i *Clostridium perfringens*.

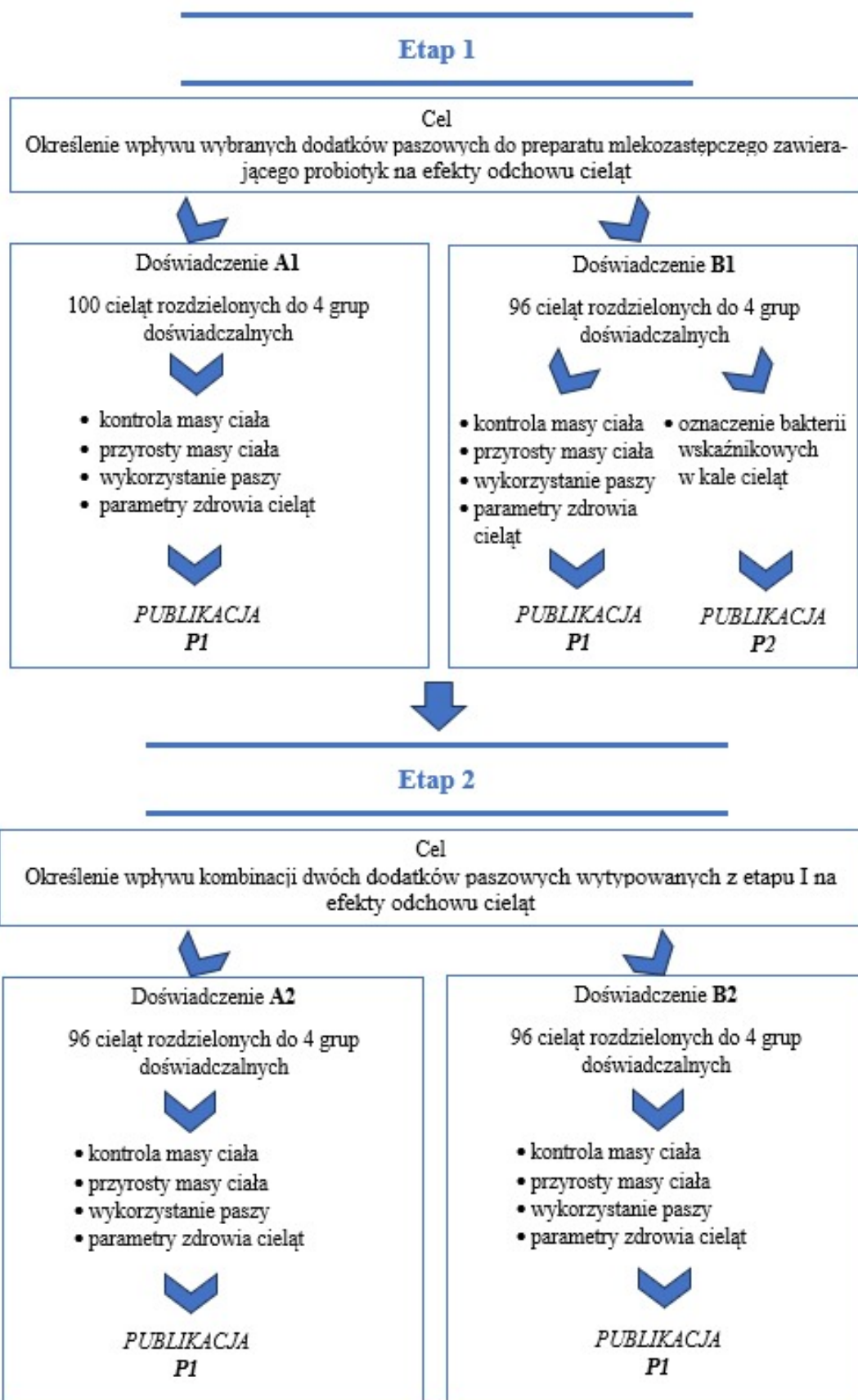
4. MATERIAŁ I METODY BADAŃ

4.1. MIEJSCE REALIZACJI DOŚWIADCZEŃ I WYMAGANE ZGODY

Badania przeprowadzono w latach 2019 i 2020 w dwóch gospodarstwach mlecznych położonych w zachodniej (Hodowla zwierząt Zarodowych Osowa Sień Sp. z o. o., Przyczyna Górna 1, 67-400 Wschowa; gospodarstwo **A**) i północno-zachodniej Polsce (Gospodarstwo Rolno-Hodowlane Żydowo Sp. z o.o. Żydowo; gospodarstwo **B**).

W każdym gospodarstwie wykonano dwa doświadczenia. Procedury doświadczalne były zgodne z polskim prawodawstwem, które jest kompatybilne z dyrektywą UE 2010/63/UE dotyczącą ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych. W związku z tym, że badania były prowadzone w typowych warunkach produkcyjnych i nie wprowadzały dodatkowych procedur w stosunku do typowych procedur hodowlanych, które są rutynowo wykonywane na cielętach w trakcie procesu odchowu, lub też wykonywanych przez lekarza weterynarii w celach bieżącej kontroli zdrowia zwierząt, prowadzone badania nie wymagały zgody Lokalnej Komisji ds. Doświadczeń na Zwierzętach.

Badania przeprowadzono w dwóch etapach zaprezentowanych na rysunku 1.



Rys.1. Przebieg badań

4.2. ETAP 1

Wyniki etapu 1 zostały opisane w publikacji **P1** oraz publikacji **P2**. W publikacji **P1** opisano wyniki dotyczące parametrów odchowu cieląt uzyskanych w trakcie realizacji doświadczenia A1 i B1 (szczegóły poniżej). W publikacji **P2** opisano z kolei wyniki ilości bakterii w próbach kału pobranych w ramach doświadczenia B1 (Rys. 1).

4.2.1. Cel i ogólne założenia

Celem etapu 1 było określenie wpływu dodatku maślanu sodu, związków fitogenicznych i immunoglobulin żółtka jaja kurzego do preparatu mlekozastępczego zawierającego probiotyk na efekty odchowu i liczbę wybranych bakterii w kale cieląt. W 1 etapie badań wykonano dwa doświadczenia. Jedno w gospodarstwie A (doświadczenie **A1**) i jedno w gospodarstwie B (doświadczenie **B1**). Eksperyment A1 prowadzono w okresie od lipca do grudnia 2019 roku, natomiast doświadczenie B1 pomiędzy sierpniem 2019 roku a styczniem 2020 roku. Doświadczenia były więc prowadzone prawie równolegle. Ze względu na mniejszą liczbę krów w gospodarstwie B w porównaniu do gospodarstwa A zebranie wymaganej liczby cieląt trwało znacznie dłużej, stąd też doświadczenie B1 zakończyło się później niż doświadczenie A1. Na podstawie wyników etapu 1 badań wybrano dwa dodatki paszowe, których efekty stosowania dalej weryfikowano w etapie 2. Co szczególnie istotne w etapie 2 weryfikowano wpływ połączenia wytypowanych dodatków paszowych w preparacie mlekozastępczym (potencjalnych interakcji pomiędzy ich efektami).

4.2.2. Zwierzęta, postępowanie przed rozpoczęciem doświadczenia i ich utrzymanie

Do doświadczenia A1 przydzielono 100 cieląt (52 jałówki i 48 buhajków), a do doświadczenia B1 96 cieląt (48 jałówek i 48 buhajków). Oba doświadczenia prowadzono na zwierzętach rasy holsztyńsko-fryzyjskiej. Cielęta rozpoczynały doświadczenie w 10 dniu życia. Przed przystąpieniem do badań cielęta po urodzeniu oddzielono od matek i umieszczono w indywidualnych plastikowych budkach o wymiarach (150×120×125 cm; długość × szerokość × wysokość) z dodatkową powierzchnią zewnętrzną (150×120 cm). Plastikowe budki firmy Sano zostały wyścielone słomą, z umocowanymi pojemnikami na paszę i wiadrem. Budki były ulokowane pod wiatą dodatkowo chroniącą cielęta przed niekorzystnymi warunkami pogodowymi. Doświadczenie obejmowało okres pierwszych 60 dni życia cieląt.

W obu gospodarstwach w ciągu pierwszych dwóch godzin życia cielęta otrzymywały po 4 l siary od matki lub siary mrożonej (z tzw. banku siary) przez sondę żołądkową. Następnie do 9 dnia życia były karmione mieszaniną nadmiarowej ilości siary i mleka przejściowego. Żywnienie takie było standardem przyjętym w gospodarstwach.

4.2.3. Grupy doświadczalne i żywienie zwierząt

Zwierzęta w obu gospodarstwach zostały przydzielone do 4 grup żywionych preparatem mlekozastępczym: 1) zawierającym bakterie probiotyczne, bez innych dodatków paszowych (grupa kontrolna); 2) zawierającym bakterie probiotyczne i maślan sodu (3,4 kg/tonę, co dawało pobranie wynoszące 3,1 g/cielę/dzień; Adimix Easy, Nutriad, Belgia); 3) zawierającym bakterie probiotyczne i związki fitogeniczne (0,5 kg/tonę, co stanowiło pobranie 0,45 g/cielę/dzień; Digestarom, Biomin, Austria) składające się głównie z kminku, ekstraktu z lukrecji, kory dębu i aromatu waniliowego oraz 4) zawierającym bakterie probiotyczne i przeciwciężca żółtka jaja (sproszkowane żółtko jaja zawierające specyficzne przeciwciężca; 3 kg/tonę, co dawało pobranie 2,7 g/cielę/dzień; Globigen Life Start, EW Nutrition, Niemcy). Preparat mlekozastępczy (21% białka surowego i 18% tłuszczu) użyty w badaniu zawierał

bakterie *Bacillus licheniformis* i *B. subtilis* ($1,3 \times 10^6$ jtk/g) oraz *Enterococcus faecium* ($1,2 \times 10^6$ jtk/g). Zastosowanie każdego dodatku paszowego do preparatu mlekozastępczego było zgodne z zaleceniami producentów.

Jak już wspomniano, do momentu rozpoczęcia doświadczenia cielęta żywiono siarą oraz mlekiem posiarowym według standardowych procedur przyjętych w gospodarstwie. Cielęta otrzymywały w pierwszych 2 godzinach życia po 4 litry siary. Następnie do 10 dnia życia podawano im mieszaninę nadwyżki siary, mleka przejściowego (oraz mleka, jeśli było to konieczne do uzyskania wymaganej objętości) w ilości 3×2 l. W tym okresie cielęta nie otrzymywały mieszanki treściwej typu starter.

Począwszy od 10 dnia życia cielęta otrzymywały 6 l preparatu mlekozastępczego, trzy razy dziennie (ok. 6-godzinna przerwa pomiędzy karmieniami; 2 l/karmienie; 150 g proszku MR na 1 litr wody). Pójła preparatów mlekozastępczych przygotowywano w osobnych wiadrach, „dedykowanych” dla każdej grupy lub w ogólnym mieszalniku. Po zakończeniu odpoju wiadra do przygotowywania pójła lub mieszalnik dokładnie myto. Każde cielę miało swoje wiadro do żywienia preparatem mlekozastępczym.

Od pierwszego dnia doświadczenia cielęta otrzymywały standardowo stosowaną w gospodarstwie mieszankę treściwą typu starter do woli. Mieszanka treściwa podawana cielętom nie była zmieniana w trakcie trwania badań i pochodziła z tej samej partii. W tym czasie zwierzęta nie otrzymywały siana. W przypadku biegunki lub innej choroby, stosowane było standardowe postępowanie przyjęte w gospodarstwie, a zdarzenia były odnotowywane. Każdy doświadczalny preparat mlekozastępczy został wykonany tego samego dnia z materiałów pochodzących z tej samej partii. W związku z powyższym doświadczalne preparaty mlekozastępcze różniły się tylko obecnością lub brakiem w ich składzie konkretnych składników aktywnych. Szczegóły dotyczące składu pasz stałych zastosowanych w doświadczeniach zostały podane w publikacji (P1).

4.2.4. Ocena odporności biernej cieląt

Pomiędzy 48 a 50 godziną życia od zwierząt pobrano krew w celu określenia odporności biernej cieląt, na podstawie zawartości białka ogólnego w surowicy. Pomiaru dokonano za pomocą refraktometru. Krew do badań pobierano od cieląt zawsze około godziny 13:00, tj. około 1,5-2 godziny po ostatnim podaniu mleka. Następnie po pobraniu krew została pozostawiona w chłodnym pomieszczeniu przez 1-2 godziny w celu wytrącenia skrzepu, a następnie odwirowana aby uzyskać surowicę. W tak otrzymanej surowicy wykonany został pomiar białka ogólnego. Procedura ta była postępowaniem standardowo wykonywanym w gospodarstwach jako jedna z procedur hodowlanych. Uzyskane wyniki odporności biernej wykorzystano do takiego rozdziału zwierząt do grup doświadczalnych, aby odporność bierna zwierząt pomiędzy grupami była podobna.

4.2.5. Kontrola pobrania pasz

W trakcie trwania badań kontrolowano pobranie pasz, w tym pójła preparatu mlekozastępczego oraz pobranie paszy stałej (startera). Pobranie pójła preparatu mlekozastępczego mierzono miarką i zapisano ilość niewypitego pójła (objętościowo). Pobranie startera odbywało się za pomocą zapisywania ilości paszy dosypywanej do karmnika i usuniętej z niego w przypadku zabrudzenia. Następnie określono spożycie startera rejestrując ilość startera podanego w całym cyklu badania. Efektywność wykorzystania paszy obliczono poprzez podzielenie przyrostu masy ciała przez spożycie suchej masy.

4.2.6. Kontrola masy ciała

Cielęta ważono w dniu urodzenia, a następnie w 10, 20, 30, 40, 50 i 60 dniu życia. Ważenie zwierząt odbywało się zawsze o tej samej godzinie, tj. około godziny 20:00, około 2 godziny po ostatnim pojeniu preparatem mlekozastępczym.

4.2.7. Analiza składu pasz

Raz w tygodniu pobierano próbki pasz (proszek preparatu mlekozastępczego oraz starter) oraz pójła preparatu mlekozastępczego do dalszych badań. Proszek preparatu mlekozastępczego był pobierany 1 w tygodniu w ilości około 500 g, a następnie próbki pobrano do worków opisanych datą i rodzajem preparatu (grupa doświadczalna). Pobierano raz w tygodniu około 500 g próbki mieszanki treściwej typu starter do worka opisanego datą. W próbkach preparatów zostały oznaczone: zawartość suchej masy, popiołu surowego, białka ogólnego, tłuszczu surowego, włókna i skrobi standardowymi metodami. Badanie składu pasz zostało wykonane także przed rozpoczęciem badań w celu upewnienia się, że doświadczalne preparaty mlekozastępcze nie różnią się istotnie zawartością podstawowych składników pokarmowych.

4.2.8. Kontrola płynności kału i zdrowia cieląt

W trakcie doświadczenia kontrolowano codziennie występowanie biegunek na podstawie płynności odchodów cieląt stosując system punktacji od 1-4 opracowany przez Larson i in., [1977], gdzie: ocena 1-kał normalny uformowany (lecz nie twardy), ocena 2-kał miękki (nie utrzymuje formy, przypomina rozpuszczające się lody), ocena 3-kał płynny, ciekący (rozplywa się łatwo, jak ciasto naleśnikowe; początek biegunki), ocena 4-kał wodnisty (biegunka). Ocena kontroli płynności kału była wykonywana raz dziennie o godzinie 12:00. Codziennie kontrolowano stan zdrowia cieląt a wszelkie choroby i zastosowane środki lecznicze były notowane.

4.2.9. Analiza mikrobiologiczna próbek kału

W trakcie doświadczenia B1, w 14 (± 2) i 28 (± 2) dniu jego trwania badano próbki kału od 8 losowo wybranych cieląt (4 jałówki i 4 buhajki) z każdej grupy doświadczalnej. Próbki kału cieląt z poszczególnych grup doświadczalnych zostały pobrane z prostnicy cieląt przez lekarza weterynarii poprzez manualne drażnienie zwieracza odbytu za pomocą palca, zawsze około godziny 8:00. W trakcie pobierania próbek kału osoba wykonująca tę czynność pracowała w jednorazowych rękawiczkach, które były zmieniane po każdym pobraniu kału od cielęcia. Próbki kału od cieląt, z poszczególnych grup doświadczalnych, były pobrane indywidualnie do sterylnych pojemników, o pojemności 120 ml, następnie umieszczone i szczelnie zamknięte w woreczkach z saszetką wytwarzającą warunki beztlenowe wraz ze wskaźnikiem warunków anaerobowych AnaeroGen Compact (Thermo Fisher Scientific Oxoid Ltd., Basingstoke, Wielka Brytania). Przygotowany materiał do badań został przetransportowany w lodówce z wkładami chłodzącymi w jak najkrótszym czasie do laboratorium Katedry Biologii i Środowiska Zwierząt na Politechnice Bydgoskiej.

W próbkach kału oznaczono liczbę bakterii *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* oraz ogólną liczbę bakterii mezofilnych. W celu oznaczenia liczby bakterii w badanym materiale, próbki kału o masie 10 g umieszczano w 250 ml kolbie Erlenmeyera z 90 ml rozcieńczalnika (0,85% NaCl z dodatkiem 0,1% peptonu). Próbki wytrząsano przez 3 minuty, następnie z otrzymanej zawiesiny wyjściowej wykonano rząd rozcieńczeń dziesiętnych od 10^{-1} do 10^{-8} . Z przygotowanego inoculum oraz poszczególnych rozcieńczeń wykonano posiewy na odpowiednie podłoża mikrobiologiczne

metodą płytkową, techniką posiewu wgłębnego. Analiza ilościowa bakterii wyizolowanych z próbek kału cieląt polegała na przygotowaniu sterylnych płytek Petriego (po 3 dla każdego rozcieńczenia), do których następnie wprowadzano po 1 ml wyjściowej zawiesiny. Analogicznie powtarzano procedurę z dalszymi rozcieńczeniami. Następnie do każdej szalki Petriego wlewano po 15 ml upłynnionej pożywki schłodzonej do temperatury $46\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Do określenia ogólnej liczby bakterii użyto pożywki agarowej Tryptic Soy Agar (TSA; Merck, Darmstadt, Niemcy). Inkubacje prowadzono przez 24 godziny w temperaturze 37°C . Do hodowli bakterii *Bifidobacterium* spp. wykorzystano BSM-agar (Bifidus Selective Medium Agar) (Sigma). Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* rosną na tej pożywce, podczas gdy szczepy *Lactobacillus* i *Streptococcus* są hamowane. Dodane do pożywki trzy antybiotyki są środkami selektywnymi i hamują towarzyszącą florę bakteryjną, taką jak *Bacillus*, *Enterobacteriaceae* i *Pseudomonas*. Typowe kolonie *Bifidobacterium* spp. na agarze BSM są fioletowo-brązowe. Do hodowli i wzrostu bakterii *Lactobacillus* spp. wykorzystano podłoże MRS [Merck]. Agar MRS zawiera w swym składzie polisorbinię, octan i mangan, które działają jako czynniki wzmagające wzrost pałeczek kwasu mlekowego.

W celu izolacji i oznaczenia liczby *Clostridium perfringens* próbki kału o masie 10 g umieszczano w kolbie Erlenmeyera z 90 ml rozcieńczalnika, następnie kolbę podgrzewano w łaźni wodnej z wytrząsarką w temperaturze $60\pm 2^{\circ}\text{C}$ przez 15 minut (wyselekcjonowanie spor), po wyznaczonym czasie wykonano rozcieńczenia dziesiętne. W hodowli wykorzystano podłoże z tryptozą, siarczynem i cykloseryną (TSC) [Merck]. W wyniku reakcji disiarczynu sodu z cytrynianem-amonowo-żelazowym(III) *Clostridium perfringens* tworzy na powierzchni pożywki czarne kolonie. Dodatek cykloseryny przyczynia się do zahamowania wzrostu towarzyszących bakterii. W dalszym etapie płytki z hodowlami *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. oraz *Clostridium perfringens* zostały umieszczone w pojemnikach AnaeroJar [Oxoid] wraz z saszetkami Anaerogen [Oxoid] zapewniającymi odpowiednie warunki beztlenowe. Inkubację prowadzono w temperaturze 37°C przez 24-48 godzin.

Oznaczanie liczby bakterii *Escherichia coli* przeprowadzono metodą płytkową na chromogennym podłożu TBX [Merck], służącym do oznaczania β -glukuronidazo-dodatnich *Escherichia coli*. Obecny w podłożu chromogen 5-bromo-4-chloro-indolilo β -D-glukuronid jest absorbowany przez komórki *Escherichia coli* i rozkładany przez wewnątrzkomórkowy enzym glukuronidazę na barwny kompleks i glukuronid. Po 24 godzinach inkubacji, w warunkach tlenowych w temperaturze $44\pm 1^{\circ}\text{C}$ zostały zliczone wyrosłe niebiesko-zielone kolonie.

Do obliczeń wybierano płytki, na których liczba kolonii mieściła się w zakresie od 15 do 300 jtk. Liczbę bakterii wyrażoną w jednostkach tworzących kolonie w 1 g kału, obliczono według wzoru:

$$N = \frac{\Sigma C}{[n_1 + (0,1 \cdot n_2)] \cdot d}$$

gdzie: N - liczba bakterii jtk/1 g kału, ΣC - suma kolonii wyrosłych na płytkach uwzględnionych do liczenia, n_1 - liczba płytek z pierwszego liczonego rozcieńczenia, n_2 - liczba płytek z drugiego liczonego rozcieńczenia, d - wskaźnik rozcieńczenia odpowiadający pierwszemu liczonemu rozcieńczeniu.

4.3. ETAP 2

Wyniki etapu 2 zostały opisane w publikacji **P1**.

4.3.1. Cel i ogólne założenia

W etapie 2 określono wpływ na efekty odchowu cieląt tych dodatków, których wprowadzenie do preparatu mlekozastępczego zawierającego bakterie probiotyczne miało pozytywny wpływ na efekty odchowu cieląt w etapie 1. W efekcie, do etapu 2 wybrano do dalszych testów dodatek paszowy zawierający związki fitogeniczne oraz immunoglobuliny żółtka jaja kurzego. Ponadto w etapie 2 zbadano wpływ połączenia tych dwóch dodatków w preparacie mlekozastępczym zawierającym dodatek probiotyczny, w celu zweryfikowania, czy uzasadnione jest łączenie w paszy więcej niż dwóch dodatków paszowych (Rys. 1).

W etapie 2 badań również wykonano dwa doświadczenia. Jedno w gospodarstwie A (doświadczenie **A2**) i jedno w gospodarstwie B (doświadczenie **B2**). Doświadczenie A2 przeprowadzono w okresie od marca do sierpnia 2020 r., a doświadczenie 2B w okresie od marca do września 2020 r. Doświadczenia były więc prowadzone prawie równolegle, podobnie jak to miało miejsce w etapie 1.

4.3.2. Zwierzęta, postępowanie z nimi przed rozpoczęciem doświadczenia i ich utrzymanie

Do doświadczenia A2 i B2 przedzielono po dziewięćdziesiąt sześć cieląt (48 jałówek i 48 buhajków). Oba doświadczenia prowadzono na zwierzętach rasy holsztyńsko-fryzyjskiej. Cielęta rozpoczynały doświadczenie w 10 dniu życia. Zwierzęta utrzymywano i żywiono przed doświadczeniem tak samo jak w etapie 1 badań.

4.3.3. Grupy doświadczalne i żywienie zwierząt

Zwierzęta w obu gospodarstwach zostały przydzielone do 4 grup żywionych preparatem mlekozastępczym: 1) zawierającym bakterie probiotyczne, ale nie zawierającym innych dodatków paszowych (grupa kontrolna); 2) zawierającym bakterie probiotyczne i związki fitogeniczne (0,5 kg/tonę, co dawało pobranie 0,45 g/cielę/dzień; Digestarom, Biomin, Austria) składające się głównie z kminku, ekstraktu z lukrecji, kory dębu i aromatu waniliowego; 3) zawierającym bakterie probiotyczne i przeciwciężła żółtka jaja (sproszkowane żółtko jaja zawierające specyficzne przeciwciężła; 3 kg/tonę, co dawało pobranie 2,7 g/cielę/dzień; Globigen Life Start, EW Nutrition, Niemcy); oraz 4) zawierającym bakterie probiotyczne, związki fitogeniczne i przeciwciężła żółtka jaja. Preparat mlekozastępczy (21% białka surowego i 18% tłuszczu) użyty w badaniu zawierał *Bacillus licheniformis* i *B. subtilis* ($1,3 \times 10^6$ jtk/g) oraz *Enterococcus faecium* ($1,2 \times 10^6$ jtk/g). Zastosowanie każdego dodatku paszowego do preparatu mlekozastępczego było zgodne z zaleceniami producentów.

4.3.4. Obserwacje na cielętach i analizy

Kontrola zdrowia, pobrania pasz, masy ciała, sposób pobierania paszy i ich analizy wykonywano tak samo jak w doświadczeniach opisanych w etapie 1 badań.

4.4. ANALIZA STATYSTYCZNA

Dane uzyskane z obu etapów badań analizowano przy użyciu procedury MIXED oprogramowania SAS (wersja 9.4, SAS Institute, Cary, NC, USA Inc., 2014). Wyniki dotyczące efektów produkcyjnych cieląt z doświadczeń A1 i B1 oraz A2 i B2 analizowano oddzielnie. Dane dotyczące liczby bakterii w kale przed analizą logarytmowano, a wyniki analizowano oddzielnie dla każdego punktu pobierania próbek. Przed analizą danych testowano

normalność danych i jednorodność wariancji przy użyciu PROC UNIVARIATE. Model statystyczny obejmował efekt grupy doświadczalnej, wpływ płci cieląt oraz efekt interakcji płć × grupa doświadczalna, jako efekty stałe, a także w etapie 2 badań efekt interakcji pomiędzy zastosowanymi dodatkami paszowym. W przypadku analizy masy ciała, średnich dziennych przyrostów masy ciała, spożycia startera, efektywności wykorzystania paszy, początkową masę ciała cieląt uwzględniano w modelu statystycznym jako zmienną towarzyszącą. Dane dotyczące oceny kału analizowano przy użyciu PROC GLIMMIX, stosując rozkład Poissona i strukturę kowariancji typu AR(1). Częstotliwość i czas trwania biegunki (ocena kału ≥ 3) oraz częstość leczenia (w tym biegunki, choroby układu oddechowego i inne) analizowano przy użyciu PROC GENMOD i rozkładu Poissona. Występowanie biegunki (ocena kału ≥ 3) i leczenie cieląt testowano za pomocą regresji logistycznej, stosując rozkład dwumianowy i PROC GLIMMIX. Model statystyczny uwzględniał wpływ czasu (dzień doświadczenia). Ponieważ cielęta przydzielono do doświadczenia w rzutach (blokach), efekt bloku w modelu statystycznym uwzględniano jako zmienną losową. Model statystyczny dla zmiennych powtarzalnych uwzględniał także wpływ czasu i maksymalnie czterokierunkowe interakcje pomiędzy wpływem grupy doświadczalnej, płci i czasu, jako efekty stałe [Littell i in., 1998]; jednak dla większości analizowanych parametrach dwu-, trój- i czterokierunkowe interakcje pomiędzy tymi efektami okazały się nieistotne, a co za tym idzie zostały usunięte z modelu. Gdy zaobserwowano istotny efekt interakcji leczenia × płć cieląt, średnie rozdzielono za pomocą procedury PDIFF i testu Tukeya. Wyniki $P \leq 0,05$ traktowano jako istotne, natomiast $0,05 < P \leq 0,10$, jako tendencję.

5. WYNIKI

5.1. ETAP 1

5.1.1. Doświadczenie A1

Ocena kału u cieląt otrzymujących w preparacie mlekozastępczym maślan sodu była wyższa pomiędzy 1 a 20 dniem doświadczenia oraz w całym jego okresie, w porównaniu z cielętami w grupie kontrolnej, które nie otrzymywały tego dodatku ($P = 0,05$), wskazując na bardziej biegunkowy kał. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w zakresie czasu występowania biegunki pomiędzy grupami zwierząt. Nie wykazano także różnic w prawdopodobieństwie występowania biegunek pomiędzy grupami. Cielęta spożywały mniejsze ilości preparatu mlekozastępczego zawierającego dodatek związków fitogenicznych i maślan sodu w porównaniu do tych z grupy bez dodatków ($P \leq 0,10$), jednak różnica wynosiła tylko 0,2-0,5 kg przez cały okres trwania doświadczenia. Wyniki te zostały opisane szczegółowo w publikacji (P-1).

Pomimo tego, że w trakcie badań wykazano wpływ płci cieląt przydzielonych do doświadczenia na niektóre badane parametry, efekty te nie były przedmiotem niniejszej pracy i nie będą opisywane oraz dyskutowane, zarówno w przypadku doświadczenia A1 jak i innych doświadczeń wchodzących w skład dysertacji.

5.1.2. Doświadczenie B1

Średni dzienny przyrost pomiędzy 1 a 20 dniem doświadczenia oraz masa ciała w 20 dniu trwania badań były niższe u cieląt, które otrzymywały maślan i immunoglobuliny żółtka jaja kurzego w porównaniu z grupą kontrolną ($P \leq 0,10$). Z drugiej strony, średnie dzienne przyrosty masy ciała pomiędzy dniem 21 i 50 doświadczenia były większe dla cieląt otrzymujących dodatek immunoglobulin w porównaniu z cielętami z grupy kontrolnej ($P = 0,03$). Natomiast spożycie startera było mniejsze (tendencja) w przypadku cieląt otrzymujących maślan sodu ($P = 0,07$) i mniejsze w grupie otrzymującej dodatek fitogeniczny ($P < 0,01$) w porównaniu z grupą kontrolną. Mniejsze zużycie startera przez cielęta otrzymujące dodatek fitogeniczny w połączeniu z większą masą końcową zwierząt z tej grupy przełożył się na większą efektywność wykorzystania paszy w porównaniu do grupy kontrolnej ($P = 0,05$). Cielęta z grupy otrzymującej dodatek fitogeniczny miały także niższą ocenę kału pomiędzy 1 a 20 dniem doświadczenia, jak i w całym jego okresie, w porównaniu do grupy kontrolnej ($P \leq 0,06$). Biegunka u cieląt otrzymujących dodatek fitogeniczny trwała znacznie krócej w porównaniu z cielętami z grupy kontrolnej. Pobranie preparatu mlekozastępczego było większe u cieląt otrzymujących dodatek maślanu sodu i immunoglobulin żółtka jaja kurzego ($P = 0,03$), w porównaniu z cielętami kontrolnymi, jednakże różnica ta wynosiła jedynie 0,1 kg przez cały czas trwania doświadczenia. Wyniki te opisano szczegółowo w publikacji (P-1).

W 14 dniu badania ogólna liczba bakterii była wyższa u cieląt otrzymujących w preparacie mlekozastępczym dodatek immunoglobulin żółtka jaja kurzego w porównaniu z cielętami w grupie kontrolnej ($P = 0,02$). Ponadto liczba bakterii *Lactobacillus* spp. kształtowała się na wyższym poziomie u cieląt w grupie otrzymującej dodatek fitogeniczny i immunoglobuliny jaja kurzego, w porównaniu z grupą kontrolną ($P < 0,01$). W grupie cieląt otrzymującej dodatek fitogeniczny i immunoglobuliny jaja kurzego odnotowano występowanie w kale bakterii *Bifidobacterium* spp. na wyższym poziomie, w porównaniu z grupą kontrolną ($P \leq 0,02$). Z drugiej strony, liczba bakterii *E. coli* była wyższa w grupie zwierząt otrzymujących immunoglobuliny ($P = 0,02$), a także wyższa (tendencja, $P = 0,06$) u cieląt otrzymujących maślan sodu, w porównaniu z grupą kontrolną. Stosunek *Lactobacillus* spp. do *E. coli* był niższy (tendencja, $P = 0,09$) u zwierząt żywionych preparatem z maślanem sodu w porównaniu z grupą kontrolną cieląt, natomiast wyższy ($P = 0,03$) dla cieląt otrzymujących dodatek

fitogeniczny w porównaniu z grupą kontrolną. Stosunek *Bifidobacterium* spp. do *E. coli* również był wyższy (tendencja, $P = 0,08$) w grupie otrzymującej dodatek fitogeniczny w porównaniu do grupy kontrolnej.

W 28 dniu doświadczenia ogólna liczba bakterii była niższa u cieląt otrzymujących dodatek maślanu sodu w porównaniu z grupą kontrolną (tendencja, $P = 0,09$). W grupie zwierząt otrzymujących immunoglobuliny żółtka jaja kurzego odnotowano wyższe liczebności bakterii *Lactobacillus* spp. ($P = 0,02$), w porównaniu do cieląt żywionych bez zastosowania dodatków paszowych do preparatu mlekozastępczego. Odwrotny wynik wykazano w stosunku do liczebności bakterii *Clostridium perfringens*. Wynik był niższy dla grupy otrzymującej immunoglobuliny niż dla grupy kontrolnej ($P < 0,01$). Wyniki analiz mikrobiologicznych kału zostały zaprezentowane w publikacji (P-2)

5.1.3. Podsumowanie

Łącznie wyniki dwóch doświadczeń przeprowadzonych w ramach etapu 1 badań wykazały, że dodatek maślanu sodu do preparatu mlekozastępczego dla cieląt żywionych w pierwszych 9 dniach życia nadmiarem siary i mleka przejściowego miał negatywny wpływ na efekty ich odchowu. Cielęta otrzymujące preparat mlekozastępczy z maślanem sodu miały tendencję do mniejszych przyrostów masy ciała na początkowych etapach odchowu i gorszej struktury kału, a wyniki badań mikrobiologicznych wykazały niekorzystny wpływ na skład bakterii kałowych. Liczba bakterii *E. coli* w kale wzrastała, a stosunek bakterii *Lactobacillus* spp. do *E. coli* zmniejszał się. Z kolei dodatek związków fitogenicznych miał najbardziej korzystny wpływ, widoczny w postaci pozytywnego oddziaływania na strukturę kału i efektywność wykorzystania paszy. Dodatek immunoglobulin żółtka jaja kurzego do preparatu mlekozastępczego zmniejszał liczbę bakterii *Clostridium perfringens* w kale cieląt. Na podstawie tych wyników do dalszych badań w etapie 2 wybrano dodatek fitogeniczny i dodatek zawierający immunoglobuliny jaja kurzego. Co równie istotne, odnotowano duże różnice w podstawowych parametrach odchowu cieląt między gospodarstwami (niższą całkowitą zawartość białka w surowicy cieląt z gospodarstwa B (~ 6,3 vs. 5,7 g/L) ale wyższe przyrosty masy ciała (~ 620 vs. 830 g/d) w porównaniu do cieląt z gospodarstwa A), jak i w reakcji cieląt na stosowane dodatki paszowe pomiędzy tymi gospodarstwami.

5.2. ETAP 2

5.2.1. Doświadczenie A2

Nie stwierdzono istotnego wpływu zastosowanych dodatków paszowych na którykolwiek z badanych parametrów odchowu cieląt. Jednakże wykazano tendencję do wpływu interakcji pomiędzy badanymi dodatkami paszowymi na końcową masę ciała i średnie dzienne przyrosty masy ciała na jednym z etapów doświadczenia ($P \leq 0,07$) oraz istotny wpływ tej interakcji na pobranie startera ($P = 0,05$). Masa ciała, przyrost dobowy masy ciała i pobranie startera były największe w przypadku cieląt otrzymujących osobno dodatek fitogeniczny i immunoglobuliny żółtka jaja kurzego, średnie w przypadku cieląt kontrolnych, a najniższe dla cieląt otrzymujących jednocześnie wspomniane dodatki w preparacie mlekozastępczym. Prawdopodobieństwo wystąpienia biegunki nie różniło się w zależności od grupy doświadczalnej. Wyniki te opisano szczegółowo w publikacji (P-1).

5.2.2. Doświadczenie B2

Efektywność wykorzystania paszy była wyższa (tendencja) w przypadku cieląt karmionych preparatem z dodatkiem fitogenicznym ($P = 0,07$). Cielęta z tej grupy przyrastały na masie ciała także lepiej w pierwszym okresie doświadczenia ($P < 0,01$). Ocena kału

między dniem 1, a 20 doświadczenia oraz w całym jego okresie, a także długość trwania biegunki i częstość występowania biegunek była najniższa w grupie kontrolnej i grupie otrzymującej zarówno dodatek fitogeniczny, jak i immunoglobuliny jaja kurzego (interakcja między badanymi czynnikami ($P \leq 0,04$)). Prawdopodobieństwo wystąpienia biegunki było mniejsze w przypadku grupy kontrolnej, w porównaniu z cielętami otrzymującymi dodatek fitogeniczny lub immunoglobuliny jaja kurzego ($P = 0,04$). Natomiast częstotliwość leczenia zwierząt była największa w grupie otrzymującej immunoglobuliny, pośrednia u cieląt otrzymujących dodatek fitogeniczny i obydwa dodatki jednocześnie, a najmniejsza u cieląt w grupie kontrolnej (interakcja pomiędzy badanymi czynnikami ($P = 0,02$)). Wyniki te opisano w publikacji **P1**.

5.2.3. Podsumowanie

Łącznie wyniki etapu 2 wykazały, że zastosowanie dodatku fitogenicznego może poprawiać przyrosty masy ciała cieląt i efektywność wykorzystania paszy, podobnie jak to wykazano w etapie 1. Wpływ ten nie był jednakże powtarzalny pomiędzy doświadczeniami prowadzonymi w różnych gospodarstwach. Nie wykazano natomiast pozytywnego wpływu dodatku immunoglobulin żółtka jaja kurzego. Co więcej, dodatek zarówno związków fitogenicznych jak i immunoglobulin jaja kurzego do preparatu, który zawierał bakterie probiotyczne, znosił działanie tych dodatków. Wpływ ten jednakże nie był powtarzalny w badaniach prowadzonych w dwóch różnych gospodarstwach. Wskazuje to jednak, że łączenie wielu dodatków w jednym preparacie może nie mieć uzasadnienia. Podobnie jak w przypadku różnic zaobserwowanych pomiędzy gospodarstwami w etapie 1, w etapie 2 cielęta w gospodarstwie A (doświadczenie A2) miały ogólnie wyższe stężenie całkowitego białka w surowicy (~ 6,2 vs. 5,4 g/L), natomiast znacznie niższe dobowe przyrosty masy ciała w całym okresie badań w porównaniu z cielętami z gospodarstwa B (doświadczenie B2; ~ 600 vs. 780 g/dzień).

6. DYSKUSJA

W celu zapobieganiu problemom zdrowotnym i poprawieniu efektywności odchowu cieląt w pierwszych tygodniach życia do preparatów mlekozastępczych można stosować różne dodatki paszowe, przy czym najbardziej popularnymi są probiotyki, prebiotyki, związki fitogeniczne, źródła jonów maślanowych oraz immunoglobuliny żółtka jaja [Frizzo i in., 2011; Diraviyam i in., 2014; Froehlich i in., 2017; Górka i in., 2018]. Pozytywne efekty dodatku bakterii probiotycznych do preparatu mlekozastępczego na efekty odchowu cieląt wykazano w licznych doświadczeniach [Froehlich i in., 2017; Heinrichs i in., 2003; Hill i in., 2007; Masanetz i in., 2010]. Dość często do preparatu mlekozastępczego wprowadza się jednocześnie kilka dodatków paszowych, aby wykorzystać ich potencjalne działanie synergistyczne lub co najmniej addytywne [Ballou, 2011; Kehoe i Carlson, 2015]. Jednak niewiele badań wykazało jednoznacznie, że połączenie różnych dodatków paszowych w preparacie mlekozastępczym dla cieląt skutkuje dodatkowymi, pozytywnymi efektami [Erhard i in., 2000; Roodposhti i Dabiri, 2012]. Ponadto efekt mieszaniny różnych dodatków paszowych w preparacie mlekozastępczym może być bardzo różny w zależności od zastosowanej ich mieszaniny.

Preparat mlekozastępczy wykorzystany we wszystkich doświadczeniach własnych zawierał *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis* oraz *Enterococcus faecium*. Wykazano, że spośród różnych bakterii probiotycznych stosowanych w preparatach mlekozastępczych dla cieląt, bakterie z rodzaju *Bacillus* mają pozytywny wpływ na wzrost i zdrowie nowonarodzonych cieląt [Jenny i in., 1991; Kowalski i in., 2009]. Ponadto w licznych doświadczeniach wykazano, że dodatek bakterii z rodzaju *Bacillus* do paszy dla nowonarodzonych ssaków zwiększał liczbę bakterii *Lactobacillus* spp. i obniżała ilość *Escherichia coli* w kale [Hu i in., 2007; Hu i in., 2014; Nguyen i in., 2019], co świadczy o pozytywnym wpływie probiotyku o takim składzie na funkcjonowanie przewodu pokarmowego. Chociaż podobne badania nie zostały przeprowadzone u cieląt, to oczekiwać można analogicznego efektu. Wykazano, że szczepy *Bacillus* kolonizują przewód pokarmowy cieląt i prawdopodobnie wpływają na populację innych drobnoustrojów [Jenny i in., 1991].

W badaniach własnych jednym z zastosowanych dodatków paszowych w preparacie mlekozastępczym zawierającym bakterie probiotyczne był maślan sodu. Wyniki doświadczeń przeprowadzonych w ramach etapu pierwszego badań wykazały, że dodatek maślanu w preparacie mlekozastępczym dla cieląt żywionych w pierwszych 9 dniach życia nadmiarem siary i mleka przejściowego miał negatywny wpływ na efekty ich odchowu (**P-1**). Odnotowano, że cielęta otrzymujące preparat mlekozastępczy z tym dodatkiem paszowym charakteryzowały się mniejszymi przyrostami masy ciała w początkowym etapie odchowu, miały częściej biegunki, a wyniki badań mikrobiologicznych wykazały niekorzystny wpływ na skład bakterii kałowych. Ponadto zastosowanie tego dodatku w dawce pokarmowej dla cieląt skutkowało mniejszym spożyciem startera.

Wyniki badań dotyczące stosowania maślanu sodu w preparatach mlekozastępczych dla cieląt są rozbieżne. Niektórzy autorzy twierdzą, że maślan jest jednym z najważniejszych stymulatorów rozwoju, dojrzewania i funkcjonowania nabłonka przewodu pokarmowego [Górka i in., 2009; Guilloteau i in., 2009]. Dane literaturowe wskazują, że dodatek ten stymuluje proliferację komórek nabłonka przewodu pokarmowego poprzez aktywację genów regulujących przebieg cyklu komórkowego oraz zmniejsza ilość komórek w obrębie nabłonka, które ulegają programowej śmierci. Łącznie prowadzi to do zwiększenia brodawek żwaczowych oraz kosmków jelitowych i powierzchni wchłaniania składników pokarmowych z przewodu pokarmowego [Mentschel i in., 2001; Malhi i in., 2013; Górka i in. 2018]. Wyniki badań Niwińskiej i in. [2011] wykazały, że wprowadzenie maślanu sodu do pasz w okresie wychowu od 7 do 56 dnia życia poprawiło przyrosty masy ciała oraz wykorzystanie pasz

i składników pokarmowych przez cielęta. Podobne efekty stosowania maślanu sodu w preparacie mlekozastępczym wykazał także Górka i in. [2011a i b]. W efekcie dość powszechnie przyjmuje się, że ten dodatek paszowy ma pozytywny wpływ na efekty odchowu cieląt [Górka i in., 2018].

W przeprowadzonych doświadczeniach własnych stwierdzono jednakże, że dodatek maślanu sodu do preparatu mlekozastępczego nie tylko pogarszał parametry odchowu, ale także zwiększał liczebność *E. coli* w kale i zmniejszał stosunek *Lactobacillus* spp. do *Escherichia coli*, co wskazuje niekorzystny wpływ na mikrobiotę jelit cieląt (**P-2**). Zbliżone wyniki zastosowania maślanu sodu w preparacie mlekozastępczym na efekty odchowu cieląt wykazał Wolfswinkel [2017]. Autor ten zaobserwował zwiększoną częstość występowania biegunek u cieląt karmionych preparatem z dodatkiem maślanu sodu. Z kolei w badaniach przeprowadzonych przez Wood i in. [2019] odnotowano niekorzystny zastosowania maślanu sodu w preparacie mlekozastępczym, wykazując wyższą śmiertelność cieląt po zastosowaniu tego dodatku. Na negatywny wpływ tego dodatku na wyniki odchowu cieląt wskazują także rezultaty doświadczeń prowadzonych przez O'Hara i in., [2018].

Podsumowując, wyniki badań własnych wskazują, że zastosowanie połączenia maślanu sodu z bakteriami probiotycznymi w preparacie mlekozastępczym może nie zawsze poprawiać efekty odchowu cieląt, a nawet przeciwnie – może je pogarszać. Możliwe, że dodatek bakterii probiotycznych i maślanu sodu w preparacie mlekozastępczym nadmiernie stymuluje układ odpornościowy cieląt, jak sugerują w swoich obserwacjach Wood i in. [2019]. To z kolei może prowadzić do negatywnego wpływu na funkcje układu pokarmowego.

Zastosowanie dodatków paszowych w preparatach mlekozastępczych w formie związków fitogenicznych stwarza możliwość poprawy stanu zdrowia, wykorzystania paszy i przyrostów masy ciała cieląt [Stefańska i in., 2021]. Informacje zawarte w publikacjach wielu autorów sugerują, że związki fitogeniczne mają działanie przeciwbakteryjne [Froehlich i in., 2017; Hill i in., 2007; Upadhaya i Kim, 2017], modulują fermentację w żwaczu oraz działają przeciwwzapalnie [Calsamiglia i in., 2007]. Co bardzo istotne, wykazano, że połączenie w preparacie mlekozastępczym fitogenicznego dodatku paszowego z bakteriami probiotycznymi ma synergistyczny wpływ na efekty odchowu cieląt [Stefańska i in., 2021]. Podobnie sugerują wyniki badań własnych zawarte w publikacjach **P-1** i **P-2**, które wykazały, że połączenie w preparacie mlekozastępczym *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* i *E. faecium* ze związkami fitogenicznymi korzystnie wpływa na poprawę wzrostu cieląt i skład bakterii kałowych. W etapie pierwszym w doświadczeniu B1 zaobserwowano znacznie krócej trwającą biegunkę u cieląt spożywających dodatek fitogeniczny w porównaniu z cielętami z grupy kontrolnej. Ponadto, w doświadczeniu B1 liczba bakterii *Lactobacillus* spp. i *Bifidobacterium* spp. kształtowała się na wyższym poziomie u cieląt, które otrzymywały dodatek fitogeniczny w porównaniu do grupy kontrolnej. Jednocześnie stosunek *Lactobacillus* spp. do *E. coli* oraz *Bifidobacterium* spp. do *E. coli* kształtował się na wyższym poziomie u cieląt żywionych preparatem z dodatkiem fitogenicznym w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto, związki fitogeniczne miały korzystny wpływ na strukturę kału, efektywność wykorzystania paszy oraz przynajmniej w niektórych etapach prowadzonych badań wpływ na uzyskiwane przyrosty masy ciała. Wpływ taki odnotowano przynajmniej w jednym z prowadzonych kilku doświadczeń.

Podsumowując, wyniki badań własnych wykazały, że zastosowanie dodatku fitogenicznego w preparacie mlekozastępczym zawierającym bakterie probiotyczne miało pozytywny wpływ na badane mikroorganizmy w kale oraz uzyskiwane efekty odchowu cieląt przynajmniej w niektórych przeprowadzonych doświadczeniach.

W żywieniu zwierząt gospodarskich bardzo popularne jest stosowanie immunoglobuliny jaja kurzego jako dodatku paszowego. Szczególnie korzystne efekty stosowania tego dodatku w preparacie mlekozastępczym można uzyskać w połączeniu z bakteriami probiotycznymi, co

udowodnili w badaniach Erhard i in. [2000]. W badaniach, w których dodatek ten zastosowano u cieląt z biegunkę wywołaną koronawirusem, poprawiał on stan zdrowia zwierząt oraz ich przyrosty masy ciała [Ikemori i in., 1997]. Potwierdzone to zostało w badaniach nad skutecznością tego dodatku w zapobieganiu chorobom zakaźnym wywołanym przez patogeny jelitowe u wielu gatunków zwierząt [Diraviyam i in., 2014].

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że zastosowanie immunoglobuliny jaja kurzego w preparacie mlekozastępczym dla cieląt wywarło korzystny wpływ na bakterie kałowe w 14 dniu doświadczenia, podobnie do wpływu dodatków fitogenicznych (**P-1**). Całkowita liczba bakterii w 14 dniu badań była istotnie wyższa u cieląt karmionych preparatem mlekozastępczym z dodatkiem immunoglobuliny jaja kurzego, w porównaniu do grupy kontrolnej. Stwierdzono także wyższy poziom *Lactobacillus* spp. i *Bifidobacterium* spp. w kale w porównaniu do grupy kontrolnej. Jednocześnie liczba bakterii *E. coli* była wyższa u cieląt otrzymujących immunoglobuliny jaja kurzego. Z kolei w przypadku liczebności bakterii *C. perfringens* wynik ten był niższy niż w grupie kontrolnej w dalszym etapie odchowu. W efekcie zastosowanie immunoglobuliny jaja kurzego w preparacie mlekozastępczym może zmniejszyć wydalanie bakterii *Clostridium perfringens* wraz z kałem. Z drugiej jednak strony, wyniki przeprowadzonych badań nie wykazały wyraźnego pozytywnego wpływu zastosowania tego dodatku paszowego na przyrosty masy ciała cieląt, ilość biegunek oraz wykorzystanie paszy. W swoich badaniach autorzy Ozpinar i in. [1996] uzyskali odmienne rezultaty stosowania takiego dodatku paszowego.

Cielęta w badaniu własnym otrzymywały siarę i mleko przejściowe przez pierwsze 9 dni życia, co w świetle dostępnych wyników badań miało najprawdopodobniej bardzo duży wpływ na rozwój bakterii jelitowych, a także nabłonka przewodu pokarmowego [Fischer i in., 2018]. W rezultacie efekty stosowania tego typu dodatku paszowego mogą być znacznie ograniczone, gdyż cielęta żywione siarą dłużej niż standardowe 1-4 dni mają mniejszą podatność na schorzenia układu pokarmowego [Fischer i in., 2018]. Niemniej jednak ograniczenie ilości *C. perfringens* w kale w końcowym okresie odchowu dzięki zastosowaniu immunoglobulin jaja kurzego do preparatu mlekozastępczego może uzasadniać wykorzystanie tego dodatku paszowego.

Podsumowując, pomimo wyraźnego wpływu na ilość badanych bakterii w kale, dodatek immunoglobulin jaja kurzego do preparatu mlekozastępczego zawierającego bakterie probiotyczne miał niewielki wpływ na efekty odchowu cieląt. Zastosowanie tego dodatku w preparacie mlekozastępczym zawierającym bakterie probiotyczne może jednakże ograniczać wydalanie *C. perfringens* w kale, a tym samym rozprzestrzenianie się tej bakterii powodującej biegunki u cieląt w środowisku ich bytowania.

W przeprowadzonych badaniach szczególną uwagę należy zwrócić na wyniki doświadczeń przeprowadzonych w etapie drugim (**P-1**), w których badano wpływ kombinacji probiotyku, dodatku fitogenicznego i dodatku immunoglobulin jaja kurzego do preparatu mlekozastępczego na efekty odchowu cieląt. Tylko w niewielu doświadczeniach badano wpływ interakcji pomiędzy różnymi dodatkami paszowymi podawanymi w preparacie mlekozastępczym, a w tych, które taką interakcję badano w niewielu ją wykazano [Erhard i in., 2000; Roodposhti i Dabiri, 2012; Stefańska i in., 2021; Górka i in., 2021]. Poza już diskutowanym generalnie negatywnym wpływem dodatku maślanu sodu do preparatu mlekozastępczego na efekty odchowu cieląt, gdy w składzie preparatu znajdował się probiotyk [wyniki niniejszej pracy oraz Wood i in., 2019], wyniki etapu drugiego prowadzonych doświadczeń jednoznacznie dokumentują możliwą negatywną interakcję pomiędzy stosowanymi w paszy dla cieląt dodatkami paszowymi. W ujęciu szczegółowym, w jednym z przeprowadzonych doświadczeń połączenie dodatku fitogenicznego z immunoglobulinami jaja kurzego znosiło pozytywny efekt tego pierwszego. Wynik taki jest sprzeczny z powszechnie przyjętym łączeniem różnych dodatków paszowych w preparacie w celu uzyskania ich synergistycznego lub addytywnego

efektu [Erhard i in., 2000; Roodposhti i Dabiri, 2012; Stefańska i in., 2021; Górka i in., 2021]. Mechanizm takiego efektu połączenia badanych dodatków w preparacie mlekozastępczym zawierającym bakterie probiotyczne jest trudny do wyjaśnienia. Przynajmniej częściowo może wynikać z faktu, że w prowadzonych badaniach cielęta w pierwszych dniach życia otrzymywały siarę i tzw. mleko posiarowe. Niemniej jednak taki wynik badań potwierdza przyjętą hipotezę badawczą.

Podsumowując, wyniki przeprowadzonych doświadczeń, w których łączono w jednym preparacie mlekozastępczym trzy różne dodatki paszowe, wskazują na możliwe znoszenie się ich efektów, w przeciwieństwie do oczekiwanego ich działania addytywnego lub synergistycznego.

Istotnym wynikiem prowadzonych badań jest również zmienność efektów stosowania badanych dodatków paszowych pomiędzy gospodarstwami, a także doświadczeniami prowadzonymi w tym samym gospodarstwie. Wynikom tym towarzyszyły różnice w początkowej masie ciała cieląt w trakcie kilkumiesięcznej przerwy pomiędzy dwoma badaniami przeprowadzonymi w tym samym gospodarstwie (gospodarstwie A). Odnotowano także odporność bierną u cieląt na niższym poziomie w badaniu B1 w porównaniu z badaniem B2, które przeprowadzono w tym samym gospodarstwie B. W efekcie różnice wyników badań pomiędzy gospodarstwami, a także pomiędzy doświadczeniami prowadzonymi w tym samym gospodarstwie, mogą wynikać z różnic między nimi oraz pewnych zmian zachodzących w gospodarstwie w czasie. W licznych badaniach odnotowano wpływ roku i sezonu na wzrost i parametry zdrowotne cieląt [Chester-Jones i in., 2017; Donovan i in., 1998; Place i in., 1998]. Na zróżnicowane wyniki stosowania dodatków paszowych w preparacie mlekozastępczym podawanym cielętom mogą wpływać także takie czynniki jak: wiek zwierząt [Alawneh i in., 2020], dawka dodatku paszowego [Froehlich i in., 2017], jakość preparatu mlekozastępczego [Cangiano i in., 2020]. Ponadto, ekspozycja cieląt na patogeny w gospodarstwie i stres, na który narażone są cielęta, mogą mieć wpływ na efekty stosowania dodatku paszowego lub ich kombinacji [Cangiano i in., 2020; Krehbiel i in., 2003]. Jeśli chodzi o warunki panujące w gospodarstwie, to mogą one zmieniać się w sposób dynamiczny w niewielkim przedziale czasowym, wpływając na wyniki stosowania dodatku paszowego. Zmiany te mogą obejmować częstość występowania patogenów, które wywołują biegunki u cieląt oraz ich oporność na leczenie antybiotykami [Berge i in., 2005; Hordijk i in., 2013]. Stąd też, wyniki badań opisane w ramach niniejszej pracy doktorskiej dość jednoznacznie sugerują, że stosowany dodatek paszowy w preparacie mlekozastępczym powinien być indywidualnie dobrany do gospodarstwa i panujących w nim warunków, a także przetestowany przed jego rutynowym stosowaniem. Wykorzystanie jednego lub kilku dodatków może bowiem nie przynosić pożądanych efektów w przypadku konkretnego gospodarstwa lub panującej w nim sytuacji, co można sprawdzić wykonując niewielkie doświadczenie (tzw. próbę polową).

Podsumowując, można stwierdzić, że wyniki przeprowadzonych badań wykazały dużą zmienność efektów stosowania dodatków paszowych w preparacie mlekozastępczym dla cieląt. Przed rutynowym stosowaniem dodatku paszowego w gospodarstwie powinno się rozważyć sprawdzenie jego efektywności.

7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Podsumowując, postawiona hipoteza dysertacji została zweryfikowana w serii czterech powiązanych doświadczeń na cielętach, przeprowadzonych w dwóch różnych gospodarstwach. W celu weryfikacji postawionej hipotezy i osiągnięcia celów pracy badano szczegółowo parametry odchowu cieląt na ich dużej populacji oraz zbadano liczbę wybranych bakterii w kale, jako wskaźnika badanych czynników na zdrowie i funkcjonowanie przewodu pokarmowego zwierząt.

Uzyskane wyniki badań pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Dodatek związków fitogenicznych do preparatu mlekozastępczego zawierającego bakterie probiotyczne wpływał korzystnie na skład bakterii kałowych u cieląt żywionych siarą i mlekiem przejściowym w pierwszych 9 dniach życia. Ten pozytywny efekt był odzwierciedlony w większej liczbie *Lactobacillus* spp. i *Bifidobacterium* spp. oraz wyższym stosunku *Lactobacillus* spp. do *E. coli* i *Bifidobacterium* spp. do *E. coli* w kale.

2. Dodatek maślanu sodu do preparatu mlekozastępczego zawierającego prebiotyk miał niekorzystny wpływ na badane bakterie w kale, co zostało potwierdzone w postaci większej liczby *E. coli* i mniejszym stosunkiem *Lactobacillus* spp. do *E. coli*.

3. Dodatek immunoglobulin żółtka jaja kurzego zmniejszył liczbę *C. perfringens* w kale cieląt, co sugeruje potencjalne korzyści z tego dodatku do preparatu mlekozastępczego dla cieląt żywionych w pierwszych dniach życia siarą i mlekiem przejściowym.

4. Dodatek maślanu sodu do preparatu mlekozastępczego zawierającego bakterie probiotyczne nie miał lub miał negatywny wpływ na efekty odchowu badanych cieląt.

5. Dodatek związków fitogenicznych i immunoglobulin jaja kurzego do preparatu mlekozastępczego poprawił efektywność wykorzystania paszy, przyrosty masy ciała cieląt oraz ocenę kału oraz zmniejszył podatność cieląt na biegunkę na niektórych etapach odchowu. Efekt ten był w szczególności widoczny w przypadku stosowania w preparacie dodatku fitogenicznego.

6. Wpływ dodatków paszowych różnił się istotnie między gospodarstwami, w których prowadzono badania, a także między doświadczeniami prowadzonymi w tym samym gospodarstwie.

8. LITERATURA

- [1]. Alawneh J.I., Barreto M.O., Moore R.J., Soust M., Al-harbi H., James A.S., Krishnan D., Olchoway T.W., 2020. Systematic review of an intervention: the use of probiotics to improve health and productivity of calves. *Prev. Vet. Med.* 183:105147.
- [2]. Ballou M.A., 2011. Case Study: Effects of a blend of prebiotics, probiotics, and hyperimmune dried egg protein on the performance, health, and innate immune responses of Holstein calves. *27(3)*, 262-268.
- [3]. Berge A.C.B., Atwill E.R., Sisco W.M., 2005. Animal and farm influences on the dynamics of antibiotic resistance in faecal *Escherichia coli* in young dairy calves. *Prev. Vet. Med.* 69, 25-38.
- [4]. Brand T., Hünerberg M., McAllister T. A., He M., Saleem A.M., Shen Y., Miller B., Yang W., 2019. Impact of a phytogenic feed additive on growth performance, feed intake, and carcass traits of finishing steers. *Transl. Anim. Sci.* 3(4), 1162-1172.
- [5]. Calsamiglia, S., Busquet M., Cardozo P. W., Castillejos L., Ferret A., 2007. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 90(6), 2580–2595.
- [6]. Cangiano L.R., Yohe T.T., Steele M.A., Renaud D.L., 2020. Invited review: Strategic use of microbial-based probiotics and prebiotics in dairy calf rearing. *Appl. Anim. Sci.* 36(5) 630-651.
- [7]. Chester-Jones H., Heins B. J., Ziegler D., Schimek D., Schuling S., Ziegler B., de Ondarza M. B., Sniffen C. J., Broadwater N., 2017. Relationships between early-life growth, intake, and birth season with first-lactation performance of Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100(1), 3697-3704.
- [8]. Diraviyam T., Zhao B., Wang Y., Schade R., Michael A., Zhang X., 2014. Effect of chicken egg yolk antibodies (IgY) against diarrhea in domesticated animals: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 20, 9(5), e97716.
- [9]. Donovan G. A., Dohoo I. R., Montgomery D. M., Bennett F. L., 1998. Calf and disease factors affecting growth in female Holstein calves in Florida, USA. *Prev. Vet. Med.* 33, 1-10.
- [10]. Erhard M. H., Leuzinger K., Stangassinger M. 2000. Studies on the prophylactic effect of feeding probiotics, pathogen-specific colostrum antibodies or egg yolk antibodies in ne newborn calves. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 84, 85-94.
- [11]. Froehlich K.A., Abdelsalam K.W., Chase C., Koppien-Fox, J., Casper D.P., 2017. Evaluation of essential oils and prebiotics for newborn dairy calves. *J. Anim. Sci.* 95(8), 3772-3782.
- [12]. Fischer A.J., Song Y., He, Z., Haines D.M., Guan L.L., Steele M.A., 2018. Effect of delaying colostrum feeding on passive transfer and intestinal bacterial colonization in neonatal male Holstein calves. *J. Dairy Sci.* 101(4), 3099-3109.
- [13]. Frieten D., Gerbert C., Koch C., Dusel G., Eder K., Kanitz E., Weitzel J.M., Hammon H.M., 2017. Ad libitum milk replacer feeding, but not butyrate supplementation, affects growth performance as well as metabolic and endocrine traits in Holstein calves. *J. Dairy Sci.* 100(8), 6648-6661.
- [14]. Frizzo L.S., Zbrun M.V., Soto L.P., Signorini M.L., 2011. Effects of probiotics on growth performance in young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials. *AFST* 169, 147-156.
- [15]. Gabler M.T., Tozer P.R., Heinrichs A.J., 2000. Development of a cost analysis spreadsheet for calculating the costs to raise a replacement dairy heifer. *J. Dairy Sci.* 83(5), 1104-1109.
- [16]. Górka P., Kowalski Z.M., Pietrzak P., Kotunia A., Kiljańczyk R., Flaga J., Holst J.J., Guilloteau P., Zabielski R., 2009. Effect of sodium butyrate supplementation in milk replacer and starter diet on rumen development in calves. *J. Physiol. Pharmacol.*, 60(3), 47-53.
- [17]. Górka, P., Kowalski Z.M., Pietrzak P., Kotunia A., Jagusiak W., Holst J. J., Guilloteau P., Zabielski R., 2011a. Effect of method of delivery of sodium butyrate on rumen development in newborn calves. *J. Dairy Sci.* 94:5578–5588.
- [18]. Górka P., Kowalski Z.M., Pietrzak P., Kotunia A., Jagusiak W., Zabielski R., 2011b. Is rumen development in newborn calves affected by different liquid feeds and small intestine development? *J. Dairy Sci.* 94(6), 3002-3013.

- [19]. Górka P., Śliwiński B., Flaga J., Wieczorek J., Godlewski M. M., Wierzchoś E., Zabielski R., Kowalski Z.M., 2017. Effect of butyrate infusion into the rumen on butyrate flow to the duodenum, selected gene expression in the duodenum epithelium, and nutrient digestion in sheep. *J. Anim. Sci.* 95(5), 2144-2155.
- [20]. Górka P., Kowalski Z.M. Zabielski R., Guilloteau P., 2018. Use of butyrate to promote gastrointestinal tract development in calves. *J. Dairy Sci.* 101(6), 4785-4800.
- [21]. Górka P., Budzińska K., Budziński W., Jankowiak T., Kehoe S., Kański J., 2021. Effect of probiotic and nucleotide supplementation in milk replacer on growth performance and fecal bacteria in calves. *Livest. Sci.* 250(1), 104556.
- [22]. Górka P., Milik J., Budziński W., Przybyło M., Jankowiak T., Budzińska K., 2023. Effect of sodium butyrate, phytogetic compounds and egg yolk antibodies supplementation in calf milk replacer containing probiotic bacteria on farms feeding a mixture of surplus colostrum and transition milk to calves in their first days of life. *AFST* 302, 115675.
- [23]. Guilloteau P., Zabielski R., David J. C., Blum J. W., Morisset J. A., Biernat M., Woliński J., Laubitz D., Hamon Y., 2009. Sodium-butyrate as a growth promoter in milk replacer formula for young calves. *J. Dairy Sci.* 92(3), 1038-1049.
- [24]. Heinrichs A.J., Jones C.M., Heinrichs B.S., 2003. Effects of mannan oligosaccharide or antibiotics in neonatal diets on health and growth of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 86(12), 4064-4069.
- [25]. Hill T.M., Aldrich J.M. Schlotterbeck R.L. Bateman H.G., 2007. Apex plant botanicals for neonatal calf milk replacers and starters. *PAS* 23(5), 521-526.
- [26]. Hordijk J., Mevius D. J., Kant A., Bos M. E. H., Graveland H., Bosman A. B., Hartskeerl C. M., Heederik D. J.J., Wagenaar J.A., 2013. Within-farm dynamics of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in veal calves: a longitudinal approach. *J. Antimicrob. Chemother.* 68(11), 2468-2476.
- [27]. Hu Z., Guo Y., 2007. Effects of dietary sodium butyrate supplementation on the intestinal morphological structure, absorptive function and gut flora in chickens. *AFST* 132, 240-249.
- [28]. Hu, Y., Y. Dun, S. Li, S. Zhao, N. Peng, and Y. Liang. 2014. Effects of *Bacillus subtilis* KN-42 on growth performance, diarrhea and fecal bacterial flora of weaned piglets. *Asian Austral J. Anim.* 27(8), 1131-1140.
- [29]. Ikemori I., Ohta M., Umeda K., Icatlo F.C., Kuroki M., Yokoyama H., Kodama, Y., 1997. Passive protection of neonatal calves against bovine coronavirus-induced diarrhea by administration of egg yolk or colostrum antibody powder. *Vet. Microbiol.* 58,105-111.
- [30]. Jahani-Azizabadi H., Baraz H., Bagheri N., Ghaffari M.H., 2022. Effects of a mixture of phytobiotic-rich herbal extracts on growth performance, blood metabolites, rumen fermentation, and bacterial population of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 105(6), 5062-5073..
- [31]. Jenny B.F., Vandijk H.J., Collins J. A., 1991. Performance and fecal flora of calves fed a *Bacillus subtilis* concentrate. *J. Dairy Sci.* 74(6), 1968-1973.
- [32]. Kehoe S.I., Heinrichs A.J., Baumrucker C.R., Greger D.L., 2008. Effects of nucleotide supplementation in milk replacer on small intestinal absorptive capacity in dairy calves. *J. Dairy Sci.* 91(7), 2759-2770.
- [33]. Kehoe, S.I., Carlson, D.B., 2015, Influence of nonmedicated additives as alternatives to antibiotics on calf growth and health. *Professional Animal Scientist.* 31(6), 516-522.
- [34]. Kholif A.E., Hassan A.A., El Ashry G.M., Bakr M.H., El-Zaiat H.M., Olafadehan O.A., Matloup O.H., Sallam S.M.A., 2021. Phytogetic feed additives mixture enhances the lactational performance, feed utilization and ruminal fermentation of Friesian cows. *Anim. Biotechnol.* 32(6), 708-718.
- [35]. Kowalski Z.M., Górka P., Schlagheck A., Jagusiak W., Micek P., Strzetelski J., 2009. Performance of Holstein calves fed milk-replacer and starter mixture supplemented with probiotic feed additive *J. Anim. Feed Sci.* 18(3), 399-411.
- [36]. Krehbiel R.C., Rust S.R., Zhang G., Gilliland S.E., 2003. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. *J. Anim. Sci.* 81(14), 120-132.
- [37]. Larson L.L., Owen F.G., Albright J.L., Appleman R.D., Lamb R.C., Muller L.D., 1977. Guidelines toward more uniformity in measuring and reporting calf experimental data. *J. Dairy Sci.* 60(6), 989-991.

- [38]. Malhi M., Gui H., Yao L., Aschenbach J.R., Gäbel G., Shen Z., 2013. Increased papillae growth and enhanced short-chain fatty acid absorption in the rumen of goats are associated with transient increases in cyclin D1 expression after ruminal butyrate infusion. *J. Dairy Sci.* 96(12), 7603-7616.
- [39]. Masanetz S., Wimmer N., Plitzner C., Limbeck E., Preissinger W., Pfaffl M.W., 2010. Effects of inulin and lactulose on the intestinal morphology of calves. *Animal* 4(5), 739-744.
- [40]. Medrano-Galarza C., LeBlanc S.J., Jones-Bitton A., DeVries T.J., Rushen J., de Passillé A.M., Endres M.I., Haley D.B., 2018. Associations between management practices and within-pen prevalence of calf diarrhea and respiratory disease on dairy farms using automated milk feeders. *J. Dairy Sci.*, 101(3), 2293-2308.
- [41]. Mentschel J., Leiser R., Mülling C., Pfarrer C., Claus R., 2001. Butyric acid stimulates rumen mucosa development in the calf mainly by a reduction of apoptosis. *Arch. Tierernähr.* 55(2), 85-102.
- [42]. Milik J., Górka P., Budzińska K., Kański J., Jankowiak T., 2023. Effect of supplementing sodium butyrate, phytogenic compounds and egg yolk antibodies supplementation in calf milk replacer containing probiotic bacteria on selected fecal bacteria in calves. *J. Ani. Feed Sci.* 32(4), 438-446.
- [43]. Niwińska B., Hańczakowska E., Węglarzy K., 2011. Efektywność wychowu cieląt otrzymujących pasze wzbogacone w glutaminę, glukozę lub maślan sodu. *Rocz. Nauk. Zoot.* 38(1), 61-72.
- [44]. Nguyen, D.H., Nyachoti C.M., Kim I.H., 2019. Evaluation of effect of probiotics mixture supplementation on growth performance, nutrient digestibility, faecal bacterial enumeration, and noxious gas emission in weaning pigs. *Italian Journal of Animal Science* 18(1), 466-473.
- [45]. O'Hara E., Kelly A., McCabe M.S., Kenny D.A., Waters S.M., 2018. Effect of a butyrate-fortified milk replacer on gastrointestinal microbiota and products of fermentation in artificially reared dairy calves at weaning. *Sci. Rep.* 8, 14901.
- [46]. Ozpinar H., Erhar, M.H., Aytug N., Ozpinar A., Baklaci C., Karamuptuoglu S., Hofmann A., Losch U., 1996. Dose-dependent effects of specific egg-yolk antibodies on diarrhea of newborn calves. *Prev. Vet. Med.* 27, 67-73.
- [47]. Place N.T., Heinrichs A.J., Erb. H.N., 1998. The effects of disease, management, and nutrition on average daily gain of dairy heifers from birth to four months. *J. Anim. Sci.*, 81(4), 1004-1009.
- [48]. Plaza-Diaz J., Ruiz-Ojeda F.J., Gil-Campos M., Gil A., 2019. Mechanisms of action of probiotics. *Adv. Nutr.* 10(1), 49-66.
- [49]. Rozporządzenie (WE) nr 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 sierpnia 2003 r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt.
- [50]. Roodposhti P.M., Dabiri N., 2012. Effects of probiotic and prebiotic on average daily gain, fecal shedding of *Escherichia coli*, and immune system status in newborn female calves. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 25(9), 1255-1261.
- [51]. Santos F.H.R., De Paula M.R., Lezier D., Silva J.T., Santos G., Bittar C.M.M., 2015. Essential oils for dairy calves: effects on performance, scours, rumen fermentation and intestinal fauna. *Animal* 9(6), 958-965.
- [52]. Signorini M.L., Soto L.P., Zbrun M.V., Sequeira G.J., Rosmini M.R., Frizzo L.S., 2012. Impact of probiotic administration on the health and fecal microbiota of young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials of lactic acid bacteria. *Res. Vet. Sci.* 93(1), 250-258.
- [53]. Stefańska B., Sroka J., Katzer F., Goliński P., Nowak W., 2021. The effect of probiotics, phytobiotics and their combination as feed additives in the diet of dairy calves on performance, rumen fermentation and blood metabolites during the preweaning period. *Anim. Feed Sci. Tech.* 272, 114738.
- [54]. Upadhaya S.D., Kim I.H., 2017. Efficacy of phytogenic feed additive on performance, production and health status of monogastric animals – A review. *Ann. Anim. Sci.* 17(4), 929-948.

- [55]. Van Soest B., Weber Nielsen M., Moeser A.J., Abuelo A., VandeHaar M.J., 2022. Transition milk stimulates intestinal development of neonatal Holstein calves. *J. Dairy Sci.* 105(8), 7011-7022.
- [56]. Wolfswinkel T.L., 2017. The effects of feeding prebiotics, antibiotics, and alternative proteins during the preweaning period to dairy calves on growth, health, and the gastrointestinal microbiota, PhD, Iowa State University. <https://doi.org/10.31274/etd-180810-5082>
- [57]. Windeyer M.C., Lesliea K.E., Godden S.M., Hodgins D.C., Lissemore K.D., LeBlanc S.J., 2014. Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. *Prev. Vet. Med.* 113(2), 231-240.
- [58]. Wood D.R., Blome R.M., Keunen A.J., Keunen B.W., Crenshaw J.D., Campbell J.M., Renaud D.L., 2019. Effects of porcine plasma or combined sodium butyrate and *Bacillus subtilis* on growth and health of grain-fed veal calves. *J. Dairy Sci.* 102(8), 7183-7188.

9. STRESZCZENIE

Efektywność zastosowania dodatków paszowych do preparatu mlekozastępczego na wyniki odchowu cieląt

mgr inż. Julita Milik

Słowa kluczowe: cielę, dodatek paszowy, zdrowie, bakterie kałowe

W celu poprawy efektów odchowu cieląt w podawanych im preparatach mlekozastępczych powszechnie stosuje się dodatki paszowe. Do najpopularniej stosowanych należą: probiotyki, prebiotyki, związki fitogeniczne, immunoglobuliny żółtka jaja kurzego i sole kwasu masłowego. Spośród nich najczęściej stosowanymi w preparatach mlekozastępczych są dodatki probiotyczne. Dodatki tego rodzaju jednakże często łączy się w preparacie mlekozastępczym z innymi dodatkami paszowymi, pomimo braku mocnych dowodów na zasadność takiego postępowania. Stąd też celem badań była ocena wpływu zastosowania w preparacie mlekozastępczym bakterii probiotycznych w połączeniu z maślanem sodu, związkami fitogenicznymi oraz immunoglobulinami żółtka jaja kurzego na efekty odchowu cieląt oraz skład wybranych bakterii w kale. Badania prowadzono na cielętach, które przez pierwsze 9 dni życia otrzymywały siarę oraz tzw. mleka przejściowego. Badania podzielono na dwa etapy. W każdym z nich wykonano dwa bliźniacze doświadczenia na cielętach w dwóch różnych gospodarstwach. W etapie 1 zbadano wpływ dodatku maślanu sodu, związków fitogenicznych i immunoglobulin żółtka jaja kurzego do preparatu mlekozastępczego zawierającego probiotyk na efekty odchowu i liczbę wybranych bakterii w kale cieląt. Wyniki doświadczeń przeprowadzonych w ramach tego etapu badań wykazały, że dodatek maślanu sodu do preparatu mlekozastępczego dla cieląt żywionych w pierwszych dniach życia nadmiarem siary i mleka przejściowego miał negatywny wpływ na efekty ich odchowu. Cielęta otrzymujące preparat mlekozastępczy z maślanem sodu miały tendencję do mniejszych przyrostów masy ciała na początkowych etapach odchowu i gorszej struktury kału, a wyniki badań mikrobiologicznych wykazały niekorzystny wpływ na skład bakterii kałowych. Dodatek związków fitogenicznych miał najbardziej korzystny wpływ na badane parametry, w tym miał pozytywny wpływ na strukturę kału i efektywność wykorzystania paszy. Z kolei dodatek immunoglobulin żółtka jaja kurzego do preparatu mlekozastępczego zmniejszył liczbę bakterii *Clostridium perfringens* w kale cieląt. W etapie 2 zbadano wpływ dodatku związków

fitogenicznych, immunoglobulin żółtka jaja kurzego oraz kombinacji tych dwóch dodatków w preparacie mlekozastępczym zawierającym probiotyk na efekty odchowu cieląt. Dodatki badane w etapie 2 wybrano na podstawie wyników etapu 1 badań. Przeprowadzone badania wykazały, że zastosowanie dodatku fitogenicznego poprawiało przyrosty masy ciała cieląt i efektywność wykorzystania paszy. Wpływ ten nie był jednakże powtarzalny pomiędzy doświadczeniami prowadzonymi w różnych gospodarstwach. Nie wykazano natomiast pozytywnego wpływu dodatku immunoglobulin żółtka jaja kurzego na badane parametry odchowu cieląt. Ponadto wykazano, że dodatek zarówno związków fitogenicznych jak i immunoglobulin jaja kurzego do preparatu, który zawierał bakterie probiotyczne, znosił działanie tych dodatków w jednym z przeprowadzonych doświadczeń. Wynik taki wskazywał, że łączenie wielu dodatków w jednym preparacie może nie mieć uzasadnienia. Łącznie wyniki przeprowadzonych czterech doświadczeń na zwierzętach w dwóch wzajemnie uzupełniających się etapach badań wykazały, że dodatek związków fitogenicznych i immunoglobulin jaja kurzego do preparatu mlekozastępczego dla cieląt zawierającego dodatek probiotyczny poprawiał efektywność wykorzystania paszy, przyrosty masy ciała, ocenę kału oraz zmniejszył podatność cieląt żywionych w pierwszych dniach życia nadmiarem siary i mleka posiarowego na biegunkę na niektórych etapach odchowu. Ponadto miał pozytywny wpływ na skład bakterii kałowych. Wpływ badanych dodatków paszowych różnił się jednakże między gospodarstwami, w których prowadzono badania, a także między doświadczeniami prowadzonymi w tym samym gospodarstwie.

10. ABSTRACT

Effectiveness of feed additives use in milk replacer on rearing results of calves

Julita Milik, MSc

Key words: calf, feed additive, health, fecal bacteria

In order to improve the results of calf rearing, feed additives are commonly used in calf milk replacers. The most popularly used ones include: probiotics, prebiotics, phytogetic compounds, egg yolk antibodies as well as salts of butyric acid. Among them, probiotics are most frequently used in calf milk replacers. Such additives, however, are often combined in a milk replacer with other feed additives, despite the lack of strong evidence justifying such a practice. Hence, the aim of this thesis was to determine the effect of supplementing probiotic bacteria in the milk replacer in combination with sodium butyrate, phytogetic compounds as well as egg yolk antibodies, on the results of calf rearing and composition of selected fecal bacteria. The research project was conducted on calves fed in first 9 days of the life colostrum and the so-called transition milk. The project was divided into two stages. In each of them, two identical experiments were carried out on calves on two different farms. In the first stage, the impact of adding sodium butyrate, phytogetic compounds and egg yolk antibodies into a milk replacer containing probiotic on rearing results and count of selected bacteria in calf faeces was investigated. The results of the studies conducted within this stage of research indicated that addition of sodium butyrate into the milk replacer for calves fed in their first days of their life with surplus colostrum and transition milk, had a negative effect on the results of their rearing. The calves receiving the milk replacer with sodium butyrate, showed a tendency to a lower body weight gain in the initial stages of rearing and lower fecal score, while the results of microbiological tests indicated its unfavorable effect on the composition of fecal bacteria. Addition of phytogetic compounds had the most beneficial effect on the tested parameters, including the positive effect on the structure of faeces and feed efficiency. On the other hand, addition of egg yolk antibodies into the milk replacer, reduced the number of *Clostridium perfringens* in calf faeces. In the second stage, the effect of adding phytogetic compounds, egg yolk antibodies as well as a combination of these two additives was investigated in the milk replacer containing probiotic on the results of calf rearing. Additives tested in the second stage were selected based on the results of stage one. The conducted

studies indicated that application of the phytogenic additive improved body weight gain in calves as well as feed efficiency. However, this effect was not repeatable between studies conducted on different farms. No positive effect was indicated of supplementing egg yolk antibodies on the tested parameters in reared calves. Furthermore, it was shown that addition of both phytogenic compounds and egg yolk antibodies into the milk replacer that contained probiotic bacteria, removed the effect of these additives in one of the conducted studies. This result indicated that combining many additives in one milk replacer may not be justifiable. In summary, the results of the conducted four studies on animals in two complementary stages indicated that supplementing phytogenic compounds and egg yolk antibodies in calf milk replacer containing probiotic bacteria improved feed efficiency, body weight gain, fecal score, and decreased susceptibility to diarrhea of calves fed in their first days of life with colostrum surplus and transition milk in some stages of rearing. Furthermore, positive impact on faecal bacteria was shown. The impact of the studied feed additives, however, differed between farms on which studies were conducted, and also between studies carried out on the same farm.

11. ZAŁĄCZNIKI

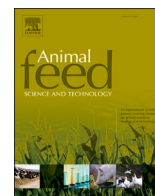
11.1. Kopie artykułów naukowych stanowiących cykl publikacji rozprawy doktorskiej



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Animal Feed Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anifeedsci

Effect of sodium butyrate, phytogetic compounds and egg yolk antibodies supplementation in calf milk replacer containing probiotic bacteria on farms feeding a mixture of surplus colostrum and transition milk to calves in their first days of life

Paweł Górka^{a,*}, Julita Milik^{b,e}, Waldemar Budziński^c, Marcin Przybyło^a,
Jarosław Kański^a, Tomasz Jankowiak^d, Katarzyna Budzińska^e

^a Department of Animal Nutrition and Biotechnology, and Fisheries, University of Agriculture in Krakow, al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Krakow, Poland

^b Research-Experimental Laboratory, Faculty of Civil and Environmental Engineering, and Architecture, Bydgoszcz University of Science and Technology, ul. S. Kaliskiego 7, 85-796 Bydgoszcz, Poland

^c Polmass S.A., ul. Fordońska 40, 85-719 Bydgoszcz, Poland

^d Vetbovis, Zydowo, Poland

^e Department of Biology and Animal Environment, Bydgoszcz University of Science and Technology, ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Dairy heifer
Average daily gain
Health
Feed additive

ABSTRACT

The same study methodology and treatments were used on two different farms and in two consecutive studies on each farm to determine whether supplementation with sodium butyrate (SB), phytogetic compounds (PC), and egg yolk antibodies (EY) in milk replacer (MR) containing probiotic bacteria would affect the body weight (BW), average daily gain (ADG), feed efficiency (FE), fecal score (FS), and health of calves. On both farms, calves were fed a mixture of surplus colostrum, transition milk and whole milk for the first 9 days of life. In Stage 1, 100 calves on Farm A (Study 1A) and 96 calves on Farm B (Study 1B) were allocated to one of four treatments: 1) MR (CTRL); 2) MR with SB (3.1 g/day/calf); 3) MR with PC (0.45 g/day/calf); and 4) MR with EY (2.7 g/day/calf). In Stage 2, 96 calves on Farm A (Study 2A) and the same number on Farm B (Study 2B) were allocated to one of four treatments: 1) MR (CTRL); 2) MR with PC; 3) MR with EY; and 4) MR with PC and EY (PCEY). The feed additives used in Stage 2 were chosen based on the results of Stage 1. The calves were allocated to studies on day 10 of life and their growth performance and health parameters were monitored for 50 days. From the first day of the study, the calves were fed daily 6 L of MR and starter mixture ad libitum. The MR (21% crude protein and 18% fat) used in the studies contained *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* (1.3×10^6 CFU/g), and *Enterococcus faecium* (1.2×10^6 CFU/g). In Study 1A, SB increased FS compared to CTRL. In Study 1B, SB and EY tended to decrease the ADG of calves between day 1 and 20 of the study, EY increased the ADG of calves between day 21 and 50 of the study, PC decreased the FS

Abbreviations: ADF, acid detergent fiber; ADG, average daily gain; aNDF, neutral detergent fiber; BW, body weight; CTRL, control; DM, dry matter; EY, egg yolk antibodies; FE, feed efficiency; FS, fecal score; MR, milk replacer; PC, phytogetic compounds; PCEY, phytogetic compounds and egg yolk antibodies; SB, sodium butyrate.

* Correspondence to: Department of Animal Nutrition and Biotechnology, and Fisheries, University of Agriculture in Krakow, al. Mickiewicza 21, 31-120 Krakow, Poland.

E-mail address: pawel.gorka@urk.edu.pl (P. Górka).

<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115675>

Received 23 October 2022; Received in revised form 19 February 2023; Accepted 17 May 2023

Available online 19 May 2023

0377-8401/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

between day 1 and 20 of the study and in the whole study period, and increased FE compared to CTRL. Moreover, PC calves had fewer days with diarrhea and a lower likelihood of developing diarrhea compared to CTRL calves. In Study 2A, final BW, ADG and starter intake were or tended to be the greatest for PC calves and EY calves, intermediate for CTRL calves, and the lowest for PCEY calves. In Study 2B, PC increased the ADG of calves between day 1 and 20 of the study and tended to improve FE. In summary, SB supplementation in MR containing probiotic bacteria had no or a negative impact on the performance of calves, PC supplementation improved the performance of calves at some but not all stages of rearing, whereas EY supplementation had no substantial impact. Consumption of a mixture of colostrum, transition milk and whole milk by calves in the first days of life has to be taken into account when interpreting those results. The impact of tested feed additives was inconsistent between the farms on which the studies were conducted as well as between studies conducted on the same farm.

1. Introduction

Various feed additives, such as probiotics, prebiotics, phytogetic compounds or butyrate sources, are used in milk replacer (MR) in order to enhance the health and growth performance of newborn calves (Frieten et al., 2017; Stefańska et al., 2021; Jahani-Azizabadi et al., 2022). Of those mentioned, probiotics are likely the most commonly used, due to their well-established positive impact on calf growth and health (Frizzo et al., 2011; Signorini et al., 2012; Cangiano et al., 2020). Probiotic supplementation is also considered as having a low risk, i.e. unlikely to have a negative impact on the performance and health of calves, based on the results of multiple studies (Frizzo et al., 2011; Signorini et al., 2012; Cangiano et al., 2020). Thus, probiotic bacteria supplementation in calf MR is very common. However, in commercial calf MR, other feed additives are commonly included in addition to probiotics, which is done as a potential strategy allowing for further improvement in the performance of the calves (Górka et al., 2021; Stefańska et al., 2021). Moreover, 'top dressing' of MR solution already containing probiotic bacteria with other feed additives by farmers seems a not uncommon practice (authors' observations). Such practices are implemented, although not many studies have investigated their effectiveness.

Of the various feed additives that can be used in MR, sodium butyrate and egg yolk antibodies have an especially well-proven, positive impact on the performance of reared calves, based on available literature reviews and meta-analyses (Diraviyam et al., 2014; Górka et al., 2018). Furthermore, a ban on using in-feed antibiotics which has been implemented in numerous countries has contributed to the increasing popularity of phytogetic compounds, as a source of natural substances that are effective in preventing diseases and enhancing the growth performance of animals, including calves (Froehlich et al., 2017; Jahani-Azizabadi et al., 2022). Knowledge on whether combinations of those mentioned feed additives with probiotic bacteria in MR results in additional benefits in terms of the performance of calves and their health is limited to only several studies (Erhard et al., 2000; Wood et al., 2019; Stefańska et al., 2021). Furthermore, Wood et al. (2019) showed that the combination in MR of probiotic bacteria with butyrate sources may be not advantageous, indicating that, prior to routine use, the potential advantages of different feed additive combinations in calf MR should be verified.

The effectiveness of feed additive use may also differ depending on the pathogen load on the farm and other stressors that calves may be exposed to (Krehbiel et al., 2003; Cangiano et al., 2020). Furthermore, other factors, including environmental and management factors, seem to have a profound impact on the effectiveness of feed additive usage, contributing to the variability of results between studies (and farms), even when the same or similar feed additive is investigated (Signorini et al., 2012; Diraviyam et al., 2014; Cangiano et al., 2020). For example, the results of numerous studies encourage feeding calves with colostrum or transition milk for an extended period of time, e.g. several days to several weeks (Van Soest et al., 2020; Kargar et al., 2021). When such a practice is applied, it may substantially affect the efficiency of feed additive usage, due to the substantial impact of the intake of bioactive components that are present in colostrum on the calves' gastrointestinal tract and immune system development (Pyo et al., 2020; Van Soest et al., 2022). Taking this into account, the most efficient feed additive or combination of feed additives may differ depending on the farm and its unique environmental and management factors.

The aim of the project was to determine the effectiveness of sodium butyrate, phytogetic compounds and egg yolk antibodies supplementation in calf MR containing probiotic bacteria when the same MR and the same feed additives were supplemented on different farms and in two consecutive studies on each farm, and when calves were fed surplus colostrum and transition milk for an extended period. It was hypothesized that a combination of various feed additives with probiotic bacteria may not necessarily result in additional, positive effects. Additionally, we were expecting that the most effective feed additive or feed additives combination with probiotic bacteria in calf MR may depend on the farm on which it was used. Consequently, the feed additive combinations that are recommended for use on a particular farm should ideally be tested prior to routine supplementation in MR.

2. Materials and methods

The studies were conducted on two dairy farms located in the western (Hodowla Zwierząt Zarodowych Osowa Sień Sp. z o. o., Przyczyna Górna; Farm A) and the northwestern part of Poland (Gospodarstwo Rolno-Hodowlane Żydowo Sp. z o. o., Żydowo; Farm B). The experimental procedures followed Polish legislation, which is in accordance with EU Directive 2010/63/EU for the protection of animals used for scientific purposes.

2.1. Project stages and overall assumptions

The project was divided into two stages. In Stage 1, two studies were conducted to investigate the impact of sodium butyrate (SB), phytogetic compounds (PC) and egg yolk antibodies (EY) supplementation in MR containing probiotic bacteria on growth performance, feed efficiency (FE), and the health of calves. One study was conducted on Farm A (Study 1A) and one study on Farm B (Study 1B). Study 1A was conducted between July and December 2019 and Study 1B between August 2019 and January 2020. During Study 1A, the temperature averaged 19.6 ± 3.3 °C (mean \pm SD) and 3.6 ± 2.6 °C during the hottest (July) and the coldest (December) month of the study, respectively, and 20.5 ± 2.3 °C and 2.4 ± 2.5 °C in Study 1B (August and January).

In Stage 2, the two most effective feed additive combinations with probiotic bacteria selected based on the results of Study 1A and 1B were verified once again on the same farms (Study 2A and Study 2B on Farm A and B, respectively), and additionally the impact of the use of a combination of these feed additives in MR containing probiotic bacteria was investigated. Such an approach allowed us to test whether the effect of a combination of investigated feed additives with probiotic bacteria in MR would be repeatable, and at the same time, whether a combination of more than one feed additive with probiotic bacteria may result in additional benefits. Study 2A was conducted between March and August 2020 and Study 2B between March and September 2020. In Study 2A, the temperature averaged 19.3 ± 2.5 °C (mean \pm SD) and 4.8 ± 2.8 °C during the hottest (July) and the coldest (March) month of the study, respectively, and 18.0 ± 2.5 °C and 4.6 ± 3.0 °C in Study 1B (July and March). Both for Stage 1 and 2, temperatures were recorded at research stations located approximately 30 and 40 km away from the calf barns for Farm A and B, respectively (<https://danepubliczne.imgw.pl>; Institute of Meteorology and Water Management, National Research Institute, Warsaw, Poland).

Both in Stage 1 and Stage 2, the same methodology was used and the methodology of the studies was as similar as possible between the farms. Furthermore, Study 1A and 1B as well as Study 2A and 2B were conducted nearly in parallel [due to the smaller number of cows on Farm B compared to Farm A (~ 400 vs. 1000) it always took longer to collect the required number of calves for studies conducted on Farm B, and thus Study 1B and 2B lasted longer than Study 1A and 2A], and milk replacers for each stage of the project were prepared the same day, using ingredients from the same batches.

2.2. Study 1A and 1B

2.2.1. Animals, housing, feeding and treatments

One hundred Holstein calves (52 females and 48 males; 43.3 ± 4.0 kg and 6.39 ± 0.44 g of total serum protein/L; mean \pm SD) in Study 1A and ninety six Holstein calves (48 females and 48 males; 45.3 ± 4.1 kg and 5.71 ± 0.73 g of total serum protein/L) in Study 1B were blocked by date of birth and sex at 10 days of age and within a block allocated to one of four treatments: 1) MR (CTRL); 2) MR with SB (3.4 kg/ton resulting in SB intake of 3.1 g/day/calf; Adimix Easy, Nutriad, Belgium); 3) MR with PC (0.5 kg/ton resulting in PC intake of 0.45 g/day/calf; Digestarom, Biomin, Austria); and 4) MR with EY (egg yolk powder containing specific antibodies; 3 kg/ton resulting in EY intake of 2.7 g/day/calf; Globigen Life Start, EW Nutrition, Germany). The MR (21% crude protein and 18% fat) contained *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* (1.3×10^6 CFU/g), and *Enterococcus faecium* (1.2×10^6 CFU/g). Probiotic bacteria used in the MR were bacteria routinely used by the MR manufacturer, which was encouraged by the results of available studies (Kowalski et al., 2009; EFSA, 2012). The SB and EY were chosen to test in combination with those probiotic bacteria based on literature reviews and meta-analyses showing the positive impact of these feed additives on the performance and health of reared calves in numerous studies (Diraviyam et al., 2014; Górka et al., 2018). In turn, PC were chosen to test based on the increasing popularity of PC usage in animal nutrition (Upadhaya and Kim, 2017). The choice was also justified by the results of studies showing possible positive but also negative interactions between these feed additives and probiotic bacteria when used in calf MR (Erhard et al., 2000; Wood et al., 2019; Stefańska et al., 2021). Commercial feed additives containing SB and EY popular on the Polish market were used. On the other hand, commercial feed additive containing PC was chosen from among many available on the market based on a review of available on-line papers and conference abstracts. The product whose effect was tested in the largest number of studies and which showed most often a positive impact on the performance of calves was chosen.

The incorporation of each feed additive into the MR followed the manufacturer's recommendations. Dosages of tested feed additives, including probiotic bacteria, were not consulted with their manufacturers and manufacturers' representatives were not involved in preparation of study protocols. Thus, their recommendations in terms of product inclusion in MR for this particular conducted studies may differ.

Allocation of calves to treatments ensured similar initial body weight (BW) and total serum protein between treatments.

Maintenance, feeding and observations done on calves followed those described in our past studies (Górka et al., 2021). Briefly, before initiating the study, the calves followed the routine procedures for newborn calves which, with minor exceptions, were the same for both farms. This included immediate separation from the dam after birth, placing the calf in an individual hutch [150 × 120 × 125 cm (length × width × high) with additional outside area of 150 × 120 cm] bedded with straw, and feeding 4 L of maternal colostrum via stomach tube within the first two hours of life. On Farm A, colostrum quality was not controlled and frozen colostrum was used only when the colostrum showed signs of mastitis. On Farm B, only maternal colostrum of good quality (≥ 23 BRIX) was fed to the calves, and when the maternal colostrum did not fulfill the quality criteria, frozen colostrum was used. Thereafter, a mixture of surplus colostrum, transition milk and, if necessary to obtain the needed volume, whole milk (tank milk) was offered (3 × 2 L) until day 10 of life.

Between day three to six of life, blood samples were collected from each calf and the obtained serum was used for total serum protein determination using a refractometer (Reichert VET 360, Reichert Technologies, New York, USA). Total serum protein was determined as part of the farms' standard procedures for newborn calves, and subsequently used to determine passive immunity for

each treatment.

On day 10 of age, the calves were allocated to treatments and were fed 6 L of MR three times a day (~ 6 h interval between feedings; 2 L/feeding). The MR (Polmass Red Full, Polmass S.A., Poland; 21% crude protein and 18% fat) was reconstituted in the ratio of 150 g of MR powder in 1 L of water, which resulted in 900 g of MR powder/day/calv. The MR was fed from a nipple bucket and refusals were recorded after each feeding; MR was considered refused when the calf did not consume the whole offered volume after 15 min. Also, beginning on the first day of the study, in Study 1A calves were provided with pelleted starter mixture (MPU CALF STARTER, Cargill Poland Sp. z o. o., Poland) that was mixed with whole corn grain (50:50; w/w) and in Study 1B texturized starter (Chrupka, Lira Wytwórnia Pasz, Poland). Thus, starter feed offered to calves on each farm differed, both in terms of structure, ingredients and chemical composition. On the first day of the study, 1 kg of starter was added to the feeder. Once this amount was consumed, another 1 kg was added, and when this amount was fully consumed over two consecutive days, the amount added to the feeder was increased to 2 kg, and subsequently to 3 kg, etc. Therefore, daily starter intake was not monitored but consumption over the whole study period (amount added to the feeder) was recorded. If the feed was dirty or spoiled, it was removed and weighed. The amount of feed remaining in the feeder was also weighed on the last day of the study. The calves also had unlimited access to water.

The calves remained in the study until day 60 of age, thus the study lasted 50 days (from day 10 to 60 of age).

2.2.2. Measurements and observations

The calves were weighed on the first day of the study and then on days 20, 30, 40, and 50 of the study, always at the same hour of the day (1400 h in both studies; ~ 3 h after last MR feeding and ~ 5 h after last starter adding to the feeder in both studies). The scale was calibrated once a week. The fecal scores (fluidity; FS) of the calves were recorded daily, using a 4-point scale [1 = normal, 4 = diarrhea; Larson et al. (1977)], by two trained persons working on each farm. Calves displaying a FS ≥ 3 were considered to have diarrhea. Additionally, in cases of a persisting FS ≥ 3 , severe diarrhea (fecal score 4) or dehydration, the calves were treated on an individual basis according to a veterinarian's recommendations. More specifically, on Farm A calves were treated against diarrhea and navel inflammation with Cobactan (Intervet International B.V., Netherlands) or Borgal (Merck Animal Health, Canada) in combination with Biovetalgin (Biowet-Drwalew, Poland) and were also offered Pro-Pect (HerbiLINE, Poland) in between MR feedings. On the other hand, in the case of pneumonia, calves were treated with Forcyl (Vetoquinol Biowet Sp. z o.o., Poland) or Cobactan (Intervet International B.V.) in combination with Melovem (Dopharma Research B.V., Netherlands). On Farm B, calves were treated against diarrhea and navel inflammation with Tetravet (Ceva Sante Animale, Zone Industrielle La Ballastiere, France) in Study 1B and Synulox (Zoetis Polska sp. z o.o., Poland) in Study 2B in combination with Meloxidyl (Ceva Sante Animale) and were orally dosed Lexicor Gel and Hydrocor Gel (BoviCor, Poland) in between MR feedings. On the other hand, in the case of pneumonia, calves were treated with Zuprevo (Intervet International B.V.) in combination with Meloxidyl (Ceva Sante Animale).

2.2.3. Feed samples and analysis

Samples of each batch of MR were collected during MR production at the plant, whereas samples of starter were collected weekly at the farm and then composited by month of study; however, liquid feed offered prior to study initiation (a mixture of colostrum, transition milk and whole milk) was not sampled for chemical analysis. Feeds were analyzed for dry matter (DM), ash, crude protein, crude fat, neutral detergent fiber (aNDF; NDF assayed with a heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash), and acid detergent fiber (ADF), as previously described by Górka et al. (2017). Starch content was determined using the polarimetric method in line with the recommendation of the European Union Commission Regulation (No. 152/2009).

2.2.4. Statistical analysis

Each study was analyzed separately as a randomized complete block design using PROC MIXED of SAS (version 9.4, SAS Institute, Cary, NC, USA). Prior to data analysis, the normality of the data and homogeneity of variance were also tested using PROC UNIVARIATE of SAS. Effects of the treatment, sex of the calves and sex \times treatment interaction were considered in the statistical model as fixed effects, whereas the sex of the calves within a block as a random effect. The statistical model for repeated variables also included the effect of time and its interactions with treatment and sex, as fixed effects (Littell et al., 1998); however, for most of the analyzed parameters, two- and three-way interactions turned out to be not significant ($P > 0.05$), and thus were removed from the model. Only those which were significant were left in the model and P -values for those effects are presented under the tables. An optimal covariance structure (autoregressive order one, unstructured or compound symmetry) was chosen based on Akaike's criterion. For BW, average daily gain (ADG), starter intake, and FE analysis, initial BW was included in the model as a covariate. Fecal score data were analyzed using PROC GLIMMIX of SAS using Poisson distribution and AR(1) type covariance structure. Frequency and duration of diarrhea (fecal score ≥ 3) and frequency of medical treatments (including diarrhea and respiratory diseases) were analyzed using PROC GENMOD of SAS and Poisson distribution. The occurrence of diarrhea (fecal score ≥ 3) and medical treatment were tested by logistic regression using a binomial distribution and PROC GLIMMIX of SAS. The odds ratio of developing diarrhea and requiring medical treatment were discussed. Each study was divided into two sub-periods, i.e. from day 1–20 of study and day 21–50 of study, where day 1–20 of study (approximately day 10–30 of the calves' life) was considered to be the period when the calves were the most susceptible to disease, and thus the effect of feed additive supplementation (positive or negative) should be the most apparent. A planned contrasts were used for results interpretation (CTRL vs. SB, CTRL vs. PC and CTRL vs. EY). Significance was declared when $P \leq 0.05$, and a tendency was declared when $0.05 < P \leq 0.10$.

2.3. Study 2A and 2B

2.3.1. Animals, housing, feeding and treatments

Ninety six Holstein calves (48 females and 48 males; 42.3 ± 3.5 kg and 6.21 ± 0.44 g of total serum protein/L; mean \pm SD) in Study 2A and ninety six Holstein calves (48 females and 48 males; 47.2 ± 4.1 kg and 5.38 ± 0.69 g of total serum protein/L) in Study 2B were blocked by date of birth and sex at 10 days of age and within a block allocated to one of four treatments: 1) MR (CTRL); 2) MR with PC (0.5 kg/ton; Digestarom, Biomin, Austria); 3) MR with EY (3 kg/ton; Globigen Life Start, EW Nutrition, Germany); and 4) MR with both PC and EY (PCEY). The MR (21% crude protein and 18% fat) contained *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* (1.3×10^6 CFU/g), and *Enterococcus faecium* (1.2×10^6 CFU/g). Allocation to treatments ensured similar BW and total serum protein between treatments.

Feeding procedures prior to study initiation and during the study resembled those in Study 1A and 1B. Also, measurements and observations taken on each animal as well as feed sampling and analysis followed the protocols described for Study 1A and 1B.

2.3.2. Statistical analysis

In line with the data analysis for Study 1A and 1B, the results of Study 2A and 2B were analyzed separately. Each study was analyzed as a randomized complete block design using PROC MIXED of SAS (version 9.4, SAS Institute, Cary, NC, USA). Prior to data analysis, the normality of the data and homogeneity of variance were also tested using PROC UNIVARIATE of SAS. The effect of PC supplementation, EY supplementation, the interaction between these two, the sex of the calves, and two- and three-way interactions between sex, PC and EY supplementation were considered in the model as fixed effects. The sex of the calves within a block was included in the model as a random effect. The statistical model for repeated variables also included the effect of time and up to four-way interactions between the effects of feed additives, sex and time, as fixed effects (Littell et al., 1998); however, for most of the analyzed parameters, two-, three- and four-way interactions between these effects turned out to be not significant ($P > 0.05$), and thus were removed from the model. An optimal covariance structure (autoregressive order one, unstructured or compound symmetry) was chosen based on Akaike's criterion. For BW, ADG, starter intake, and FE analysis, initial BW was included in the model as a covariate. Fecal score data were analyzed using PROC GLIMMIX of SAS using Poisson distribution and AR(1) type covariance structure. Frequency and duration of diarrhea (fecal score ≥ 3) and frequency of medical treatments (including diarrhea, respiratory diseases and other) were analyzed using PROC GENMOD of SAS and Poisson distribution. The occurrence of diarrhea (fecal score ≥ 3) and medical treatment were tested by logistic regression using a binomial distribution and PROC GLIMMIX of SAS. The odds ratio of developing diarrhea and requiring medical treatment were discussed. Significance was declared when $P \leq 0.05$, and a tendency was declared when $0.05 < P \leq 0.10$.

Table 1

Chemical composition of experimental feeds (mean \pm standard deviation) – Study 1A and 1B.

	Milk replacer/treatment ^{a, b}				Starter mixture ^c	Corn grain ^c
	CTRL	SB	PC	EY		
Study 1A						
Dry matter (DM), g/kg	964 \pm 7.3	961 \pm 3.3	963 \pm 5.1	966 \pm 1.1	919 \pm 38.8	942 \pm 38.8
Ash, g/kg DM	85 \pm 0.5	82 \pm 1.1	86 \pm 0.5	79 \pm 1.2	75 \pm 3.3	23 \pm 0.8
Crude protein, g/kg DM	215 \pm 3.2	212 \pm 0.9	213 \pm 2.6	214 \pm 2.7	284 \pm 12.6	108 \pm 10.0
Crude fat, g/kg DM	185 \pm 4.8	183 \pm 1.7	181 \pm 3.3	178 \pm 3.0	ND	ND
aNDF ^d , g/kg DM	ND ^e	ND	ND	ND	265 \pm 10.7	189 \pm 2.3
ADF ^f , g/kg DM	ND	ND	ND	ND	119 \pm 10.1	65 \pm 7.5
Starch, g/kg DM	ND	ND	ND	ND	197 \pm 14.0	554 \pm 1.9
Study 1B						
DM, g/kg	960 \pm 0.1	964 \pm 1.1	966 \pm 0.7	965 \pm 0.6	965 \pm 1.7	–
Ash, g/kg DM	86 \pm 0.4	87 \pm 0.3	86 \pm 0.1	81 \pm 1.9	74 \pm 5.8	–
Crude protein, g/kg DM	214 \pm 2.3	211 \pm 1.6	214 \pm 1.7	215 \pm 1.2	209 \pm 9.9	–
Crude fat, g/kg DM	178 \pm 4.0	178 \pm 3.0	180 \pm 0.6	181 \pm 2.0	ND	–
aNDF, g/kg DM	ND	ND	ND	ND	114 \pm 5.2	–
ADF, g/kg DM	ND	ND	ND	ND	49 \pm 2.4	–
Starch, g/kg DM	ND	ND	ND	ND	432 \pm 0.9	–

^a Treatment: CTRL = milk replacer containing probiotic bacteria but no other feed additives; SB = milk replacer containing probiotic bacteria and sodium butyrate (3.4 kg/ton resulting in intake of 3.1 g/day/calf; Adimix Easy, Nutriad, Belgium); PC = milk replacer containing probiotic bacteria and phytogenic compounds (0.5 kg/ton resulting in intake of 0.45 g/day/calf; Digestarom, Biomin, Austria); EY = milk replacer containing probiotic bacteria and egg yolk antibodies (egg yolk powder containing specific antibodies; 3 kg/ton resulting in intake of 2.7 g/day/calf; Globigen Life Start, EW Nutrition, Germany).

^b n = 4/treatment.

^c n = 6.

^d Neutral detergent fiber.

^e Not determined.

^f Acid detergent fiber.

3. Results

3.1. Study 1A and 1B

The chemical compositions of experimental feeds used in Study 1A and 1B are presented in Table 1, whereas data on passive immunity and performance parameters are presented in Table 2 and Table 3 for Study 1A and Study 1B, respectively.

Two calves from the SB treatment in Study 1A, and one calf from the SB treatment and one from the EY treatment in Study 1B died. Those calves were not replaced.

In Study 1A, there was no interaction between the effect of the sex of the calves and the effect of treatment. Compared to heifer calves, bull calves had greater initial BW (44.6 vs. 42.0 kg; $P < 0.01$) and tended to have lesser starter intake (14.5 vs. 17.4 kg; $P = 0.06$); however, the impact of the sex of the calves on the investigated parameters was not the main subject of the study and will not be discussed further or presented in tables, nor will it be for other studies. This is further justified by the fact that only a few interactions between the effect of sex and treatment were detected. Fecal score between day 1 and 20 of the study as well as in the whole study period was greater (indicating looser feces) for SB calves compared to CTRL calves ($P = 0.05$). However, the number of days with diarrhea as well as frequency of diarrhea and medical treatments did not differ between treatments. Also, the likelihood of developing diarrhea and medical treatment did not differ between treatments (Supplemental Table S1). The MR intake was less for SB calves ($P < 0.01$) and tended to be less for PC calves compared to CTRL calves ($P = 0.10$); however, the difference was only 0.2–0.5 kg for the whole study duration.

In Study 1B, there was no interaction between the effect of the sex of calves and the effect of treatment, but several differences between bull and heifer calves were detected. Bull calves had greater initial BW than heifer calves (47.2 vs. 43.6 kg; $P < 0.01$), tended to weigh more on the last day of the study (87.6 vs. 85.5 kg; $P = 0.07$), had greater ADG between day 1 and 20 of the study (711 vs. 612 g/day; $P = 0.03$), tended to have greater ADG in the whole study period (854 vs. 811 g/day; $P = 0.06$), and tended to have higher overall FE (746 vs. 714 g gain/kg DM; $P = 0.07$; data not presented). Average daily gain between day 1 and 20 of the study and BW on day 20 of the study tended to be less for SB and EY calves compared to CTRL calves ($P \leq 0.10$). On the other hand, ADG between day 21 and 50 of the study was greater for EY calves compared to CTRL calves ($P = 0.03$). Starter intake tended to be less for SB calves ($P = 0.07$) and was less for PC calves ($P < 0.01$) compared to CTRL calves. The last starter intake for PC calves in combination with

Table 2

Passive immune status at the initiation of the study (serum total protein concentration), body weight, average daily gain, feed intake, feed efficiency, and fecal score of calves – Study 1A.

	Treatment ^a				SE ^b	Contrasts ^c		
	CTRL	SB	PC	EY		1	2	3
n	25	23	25	25				
Total serum protein, g/L	6.25	6.30	6.31	6.27	0.061	0.60	0.51	0.81
Body weight, kg								
Day ^d 1	44.2	43.1	43.6	43.5	0.77	0.92	0.70	0.79
Day 20	50.9	49.8	50.6	50.7	0.55	0.16	0.62	0.74
Day 50	75.0	73.2	74.9	74.5	1.12	0.26	0.93	0.73
Average daily gain, g/day								
Day 1–20 ^e	483	428	465	472	28.7	0.17	0.65	0.77
Day 21–50 ^e	811	780	816	781	26.9	0.46	0.92	0.45
Day 1–50 ^e	635	609	634	612	23.6	0.42	0.97	0.48
Milk replacer intake, kg DM ^f	42.5	42.0	42.2	42.2	0.15	< 0.01	0.10	0.11
Starter intake, kg DM ^f	16.3	15.6	17.4	14.5	1.32	0.73	0.55	0.33
Overall feed efficiency, g gain/kg DM	507	501	502	519	12.0	0.70	0.77	0.47
Fecal score								
Day 1–20 ^e	1.30	1.40	1.35	1.29	0.035	0.05	0.28	0.84
Day 21–50 ^e	1.06	1.07	1.06	1.05	0.015	0.76	0.98	0.56
Day 1–50 ^e	1.15	1.18	1.17	1.14	0.017	0.19	0.32	0.70
Diarrhea, days	1.12	1.50	1.44	0.96	0.225	0.24	0.32	0.58
Diarrhea, n/calf	1.00	1.04	1.04	0.96	0.200	0.88	0.89	0.88
Treatments, n/calf	0.56	0.46	0.56	0.40	0.143	0.62	1.00	0.41

^a Treatment: CTRL = milk replacer containing probiotic bacteria but no other feed additives; SB = milk replacer containing probiotic bacteria and sodium butyrate (3.4 kg/ton resulting in intake of 3.1 g/day/calf; Adimix Easy, Nutriad, Belgium); PC = milk replacer containing probiotic bacteria and phytogetic compounds (0.5 kg/ton resulting in intake of 0.45 g/day/calf; Digestarom, Biomin, Austria); EY = milk replacer containing probiotic bacteria and egg yolk antibodies (egg yolk powder containing specific antibodies; 3 kg/ton resulting in intake of 2.7 g/day/calf; Globigen Life Start, EW Nutrition, Germany).

^b Standard error or standard error of the mean.

^c 1 = CTRL vs. SB; 2 = CTRL vs. PC; 3 = CTRL vs. EY.

^d Day of study.

^e Significant time effect ($P \leq 0.05$).

^f Cumulative intake over whole study period.

Table 3

Passive immune status at the initiation of the study (serum total protein concentration), body weight, average daily gain, feed intake, feed efficiency, and fecal score of calves – Study 1B.

	Treatment ^a				SE ^b	Contrasts ^c		
	CTRL	SB	PC	EY		1	2	3
n	24	23	24	23				
Total serum protein, g/L	5.67	5.72	5.68	5.75	0.156	0.81	0.98	0.69
Body weight, kg								
Day ^d 1	45.9	44.9	45.2	45.5	0.79	0.34	0.49	0.67
Day 20	59.1	57.7	58.8	57.5	0.63	0.09	0.76	0.06
Day 50	86.6	85.2	87.2	87.2	0.90	0.26	0.66	0.64
Average daily gain, g/day								
Day 1–20	702	633	689	622	33.2	0.10	0.76	0.06
Day 21–50 ^e	927	921	940	1000	24.8	0.86	0.69	0.03
Day 1–50 ^e	836	805	841	850	18.5	0.22	0.85	0.58
Milk replacer intake, kg DM ^f	44.0	44.1	44.1	44.1	0.03	0.14	0.03	0.03
Starter intake, kg DM ^f	13.8	12.2	11.2	16.6	0.61	0.07	< 0.01	0.17
Overall feed efficiency, g gain/kg DM	716	709	756	739	14.6	0.76	0.05	0.25
Fecal score								
Day 1–20 ^e	1.22	1.19	1.09	1.15	0.053	0.70	0.06	0.31
Day 21–50 ^e	1.01	1.01	1.01	1.02	0.008	0.96	0.90	0.23
Day 1–50 ^e	1.10	1.08	1.04	1.07	0.002	0.64	0.05	0.35
Diarrhea, days	1.13	1.39	0.33	1.17	0.203	0.42	< 0.01	0.88
Diarrhea, n/calf	0.46	0.39	0.21	0.30	0.112	0.72	0.13	0.39
Treatments, n/calf	0.83	0.61	0.50	0.61	0.163	0.36	0.16	0.36

^a Treatment: CTRL = milk replacer containing probiotic bacteria but no other feed additives; SB = milk replacer containing probiotic bacteria and sodium butyrate (3.4 kg/ton resulting in intake of 3.1 g/day/calf; Adimix Easy, Nutriad, Belgium); PC = milk replacer containing probiotic bacteria and phytochemical compounds (0.5 kg/ton resulting in intake of 0.45 g/day/calf; Digestarom, Biomin, Austria); EY = milk replacer containing probiotic bacteria and egg yolk antibodies (egg yolk powder containing specific antibodies; 3 kg/ton resulting in intake of 2.7 g/day/calf; Globigen Life Start, EW Nutrition, Germany).

^b Standard error or standard error of the mean.

^c 1 = CTRL vs. SB; 2 = CTRL vs. PC; 3 = CTRL vs. EY.

^d Day of study.

^e Significant time effect ($P \leq 0.05$).

^f Cumulative intake over whole study period.

Table 4

Chemical composition of experimental feeds (mean \pm standard deviation) – Study 2A and 2B.

	Milk replacer/treatment ^{a, b}				Starter mixture ^c	Corn grain ^c
	CTRL	PC	EY	PCEY		
Study 2A						
Dry matter (DM), g/kg DM	959 \pm 1.9	963 \pm 0.7	960 \pm 1.1	959 \pm 2.2	893 \pm 2.1	900 \pm 2.7
Ash, g/kg DM	92 \pm 0.7	92 \pm 0.5	92 \pm 0.2	92 \pm 0.6	76 \pm 1.2	26 \pm 2.5
Crude protein, g/kg DM	205 \pm 1.5	209 \pm 3.6	207 \pm 0.6	209 \pm 2.3	266 \pm 3.2	104 \pm 1.2
Crude fat, g/kg DM	186 \pm 2.3	185 \pm 0.6	183 \pm 1.8	180 \pm 0.5	ND	ND
aNDF ^d , g/kg DM	ND ^e	ND	ND	ND	291 \pm 10.6	173 \pm 15.1
ADF ^f , g/kg DM	ND	ND	ND	ND	131 \pm 8.0	65 \pm 6.9
Starch, g/kg DM	ND	ND	ND	ND	199 \pm 2.1	579 \pm 1.9
Study 2B						
DM, g/kg	959 \pm 2.4	963 \pm 0.7	960 \pm 1.9	961 \pm 0.5	905 \pm 0.6	–
Ash, g/kg DM	93 \pm 0.6	92 \pm 0.4	92 \pm 0.3	92 \pm 0.5	79 \pm 5.5	–
Crude protein, g/kg DM	206 \pm 2.4	208 \pm 1.4	208 \pm 1.9	206 \pm 1.5	233 \pm 12.2	–
Crude fat, g/kg DM	183 \pm 2.5	179 \pm 1.6	182 \pm 2.1	182 \pm 1.8	ND	–
aNDF, g/kg DM	ND	ND	ND	ND	110 \pm 16.6	–
ADF, g/kg DM	ND	ND	ND	ND	52 \pm 5.2	–
Starch, g/kg DM	ND	ND	ND	ND	430 \pm 3.2	–

^a Treatment: CTRL = milk replacer containing probiotic bacteria but no other feed additives; PC = milk replacer containing probiotic bacteria and phytochemical compounds (0.5 kg/ton resulting in intake of 0.45 g/day/calf; Digestarom, Biomin, Austria); EY = milk replacer containing probiotic bacteria and egg yolk antibodies (egg yolk powder containing specific antibodies; 3 kg/ton resulting in intake of 2.7 g/day/calf; Globigen Life Start, EW Nutrition, Germany); PCEY = milk replacer containing probiotic bacteria and both phytochemical compounds and egg yolk antibodies.

^b n = 4/treatment.

^c n = 5–8.

^d Neutral detergent fiber.

^e Not determined.

^f Acid detergent fiber.

final BW comparable to CTRL calves resulted in greater FE for the former ($P = 0.05$). Both between day 1 and 20 of the study and in the whole study period FS was less or tended to be less for PC calves compared to CTRL calves ($P \leq 0.06$). Moreover, PC calves had fewer days with diarrhea compared to CTRL calves ($P < 0.01$), and CTRL calves tended to ($P = 0.09$) have a higher (3.5 times) likelihood of developing diarrhea compared to PC calves (Supplemental Table S1). The MR intake was greater for SB and EY calves ($P = 0.03$), compared to CTRL calves ($P = 0.10$); however, the difference was only 0.1 kg for the whole study duration.

It is also worth noticing that, in general, the calves in Study 1A had higher total serum protein compared to the calves in Study 1B (~ 6.3 vs. 5.7 g/L) but had a much lower ADG in the whole study period (~ 620 vs. 830 g/d).

3.2. Study 2A and 2B

The chemical compositions of experimental feeds used in Study 2A and 2B are presented in Table 4, whereas data on passive immunity and performance parameters are presented in Table 5 and Table 6 for Study 2A and Study 2B, respectively.

One calf from the PCEY treatment in Study 2A and one calf from the EY treatment in Study 2B died. Those calves were not replaced.

In Study 2A, compared to heifer calves, bull calves had greater starter intake (16.0 vs 13.1; $P = 0.02$), and tended to have a greater ADG between day 1 and 20 of the study (484 vs. 432; $P = 0.06$) and in the whole study period (621 vs. 576; $P = 0.06$; data not presented). There was no significant effect of any feed additive on any investigated parameter. However, final BW and ADG between day 21 and 50 of the study tended to ($P \leq 0.07$), whereas ADG in the whole study period and starter intake was ($P = 0.05$) affected by PC \times EY interaction. Body weight, ADG and starter intake were the greatest for PC calves and EY calves, intermediate for CTRL calves, and the lowest for PCEY calves. Fecal score, number of days with diarrhea and frequency of diarrhea and medical treatments were not affected by treatments. Also, the likelihood of developing diarrhea or medical treatment did not differ between treatments (Supplemental Table S2).

In Study 2B, bull calves tended to have a greater ADG in the whole study period compared to heifer calves (808 vs. 763; $P = 0.06$; data not presented). Average daily gain between day 1 and 20 of the study and BW on day 20 of the study was greater for calves fed MR with phytogetic compounds ($P < 0.01$); however, neither ADG in the whole study period nor final BW was affected by this feed additive. Feed efficiency tended to be higher for calves fed MR with phytogetic compounds ($P = 0.07$). Fecal score between day 1 and 20 of the study and in the whole study period as well as the number of days with diarrhea and frequency of diarrhea was the lowest for CTRL and PCEY calves (PC \times EY interaction, $P \leq 0.04$). The likelihood of diarrhea was less for CTRL compared to PC and EY calves

Table 5

Passive immune status at the initiation of the study (serum total protein concentration), body weight, average daily gain, feed intake, feed efficiency, and fecal score of calves – Study 2A.

	Treatment ^a				SE ^b	Main effects		
	CTRL	PC	EY	PCEY		PC	EY	PC \times EY
n	24	24	24	23				
Total serum protein, g/L	6.22	6.23	6.18	6.22	0.091	0.88	0.77	0.84
Body weight, kg								
Day ^c 1	42.4	42.8	42.4	41.7	0.73	0.87	0.45	0.49
Day 20	51.5	51.4	51.7	51.1	0.44	0.39	0.92	0.42
Day 50	71.9	73.0	72.7	71.2	0.82	0.80	0.45	0.06
Average daily gain, g/day								
Day 1–20 ^d	454	472	470	436	21.1	0.66	0.58	0.18
Day 21–50 ^d	685	715	698	672	18.8	0.90	0.32	0.07
Day 1–50 ^d	593	618	605	578	15.9	0.90	0.30	0.05
Milk replacer intake, kg DM ^e	42.7	42.5	42.5	42.6	0.13	0.77	0.57	0.23
Starter intake, kg DM ^e	14.2	14.9	15.5	13.6	0.77	0.34	0.97	0.03
Overall feed efficiency, g gain/kg DM	520	534	523	513	11.6	0.82	0.46	0.31
Fecal score								
Day 1–20 ^{d,f}	1.48	1.47	1.53	1.45	0.055	0.27	0.76	0.37
Day 21–50 ^{d,g}	1.06	1.07	1.03	1.05	0.019	0.17	0.11	0.69
Day 1–50 ^{d,f}	1.21	1.22	1.21	1.19	0.027	0.99	0.58	0.67
Diarrhea, days	1.33	1.42	1.67	1.35	0.245	0.66	0.61	0.43
Diarrhea, n/calf	0.75	0.67	0.92	0.78	0.180	0.56	0.44	0.93
Treatments, n/calf	0.17	0.38	0.46	0.26	0.115	0.75	0.41	0.07

^a Treatment: CTRL = milk replacer containing probiotic bacteria but no other feed additives; PC = milk replacer containing probiotic bacteria and phytogetic compounds (0.5 kg/ton resulting in intake of 0.45 g/day/calf; Digestarom, Biomin, Austria); EY = milk replacer containing probiotic bacteria and egg yolk antibodies (egg yolk powder containing specific antibodies; 3 kg/ton resulting in intake of 2.7 g/day/calf; Globigen Life Start, EW Nutrition, Germany); PCEY = milk replacer containing probiotic bacteria and both phytogetic compounds and egg yolk antibodies.

^b Standard error or standard error of the mean.

^c Day of study.

^d Significant time effect ($P \leq 0.05$).

^e Cumulative intake over whole study period.

^f Significant interaction PC \times EY \times time ($P \leq 0.05$).

^g Significant interaction PC \times sex ($P \leq 0.05$).

Table 6

Passive immune status at the initiation of the study (serum total protein concentration), body weight, average daily gain, feed intake, feed efficiency, and fecal score of calves – Study 2B.

	Treatment ^a				SE ^b	Main effects		
	CTRL	PC	EY	PCEY		PC	EY	PC × EY
n	24	24	23	24				
Total serum protein, g/L	5.42	5.36	5.40	5.34	0.14	0.68	0.89	0.99
Body weight, kg								
Day ^c 1	46.8	47.3	47.5	47.3	0.86	0.81	0.66	0.69
Day 20	59.0	60.6	59.2	61.6	0.68	< 0.01	0.35	0.50
Day 50	85.4	86.6	86.2	87.6	1.09	0.22	0.38	0.95
Average daily gain, g/day								
Day 1–20 ^d	603	656	601	721	33.3	< 0.01	0.32	0.31
Day 21–50 ^d	887	863	912	855	29.5	0.13	0.75	0.54
Day 1–50 ^{d,e}	764	789	781	807	21.5	0.24	0.41	0.98
Milk replacer intake, kg DM ^f	44.1	44.0	44.1	44.1	0.02	0.77	0.86	0.29
Starter intake, kg DM ^f	11.0	10.8	10.8	10.4	0.57	0.48	0.56	0.78
Overall feed efficiency, g gain/kg DM	692	720	710	743	11.9	0.07	0.22	0.86
Fecal score								
Day 1–20 ^d	1.06	1.14	1.15	1.09	0.035	0.68	0.50	0.04
Day 21–50 ^{d,§}	1.00	1.02	1.00	1.00	0.001	0.35	0.92	0.19
Day 1–50 ^d	1.02	1.07	1.06	1.04	0.017	0.47	0.52	0.03
Diarrhea, days	0.13	0.67	0.74	0.25	0.123	0.45	0.30	< 0.01
Diarrhea, n/calf	0.04	0.33	0.30	0.09	0.065	0.19	0.26	0.01
Treatments, n/calf	0.04	0.08	0.18	0.13	0.065	0.47	0.47	0.02

^a Treatment: CTRL = milk replacer containing probiotic bacteria but no other feed additives; PC = milk replacer containing probiotic bacteria and phytogetic compounds (0.5 kg/ton resulting in intake of 0.45 g/day/calf; Digestarom, Biomin, Austria); EY = milk replacer containing probiotic bacteria and egg yolk antibodies (egg yolk powder containing specific antibodies; 3 kg/ton resulting in intake of 2.7 g/day/calf; Globigen Life Start, EW Nutrition, Germany); PCEY = milk replacer containing probiotic bacteria and both phytogetic compounds and egg yolk antibodies.

^b Standard error or standard error of the mean.

^c Day of study.

^d Significant time effect ($P \leq 0.05$).

^e Significant interaction PC × time ($P = 0.05$).

^f Cumulative intake over whole study period.

[§] Significant interaction EY × sex ($P = 0.05$).

($P = 0.04$; Supplemental Table S2). On the other hand, the frequency of treatments was the greatest for EY calves, intermediate for PCEY and PC calves, and the least for CTRL calves (PC × EY interaction, $P = 0.02$).

Similarly to the differences observed between farms in Stage 1, in Stage 2 calves on Farm A (Study 2A) had, in general, higher total serum protein (~ 6.2 vs. 5.4 g/L) but had much lower ADG in the whole study period, compared to the calves on Farm B (Study 2B; ~ 600 vs. 780 g/d).

4. Discussion

Prior to in-depth discussion of the results, the specificity of the experimental treatments used in the conducted studies needs several words of explanation. From a scientific point of view, studies investigating feed additives usage in calf MR that include treatment without any feed additive as a control should be preferred. However, at the stage of research project planning of many MR that can be found on the Polish market, only one (of those intended for the youngest calves) did not contain probiotic feed additive. This indicated that probiotic feed additives are commonly used in commercial calf MR. Producers are also generally unwilling to use MR without any feed additive, because, in their opinion, the probability of health issues in calves may increase. This fact is supported by the specificity of the experimental treatments used in other studies investigating the effectiveness of feed additives usage in calf MR and provided justification for this specificity, e.g. a lack of typical control treatment (Fleige et al., 2007; Guilloteau et al., 2009). Taking into account that the aim of the project described in this paper was to propose recommendations on feed additives usage in calf MR nowadays, e.g. taking into account the various feed additives available on the market and current feeding practices of dairy calves, a typical control treatment without probiotic feed additive was not absolutely necessary to reach this aim. In other words, omitting such a treatment would not limit the strength and practical value of the project substantially. Last but not least, an important aim of the project was to determine how repeatable the effects of particular feed additives can be. In order to reach this aim of the project, a typical control treatment was also not absolutely necessary.

It is also worth mentioning that in the conducted studies, the calves were fed a mixture of surplus colostrum, transition milk and, if necessary to obtain the required volume of feed, whole milk for the first 9 days of life. Such a feeding strategy substantially differs from that where calves are fed MR from the 1st or 2nd day of life. Particularly, intake of colostrum and transition milk for the first several days or weeks of life is known to positively affect gastrointestinal tract development and the immune status of calves (Hare et al., 2020; Van Soest et al., 2022), and this has a long term, positive impact on their performance (Kargar et al., 2020; Van Soest et al., 2020). In

consequence, the effect of feed additives supplementation in MR for such calves may be limited, or effective dosages may differ.

An important finding from the four studies presented in this paper is that the effect of feed additive supplementation in calf MR containing probiotics or the combination of various feed additives in such MR does not necessarily have to be positive. Furthermore, the effect of combination of particular feed additives in MR is inconsistent not only between various farms, but also may change with time when used on the same farm.

The positive effect of various feed additive combinations in MR can be expected based on, in most cases, the different mechanisms of their action. For example, probiotic supplementation in MR is known to affect intestinal microbiota composition, and this, as well as probiotic bacteria consumption itself, affect the functioning of the gastrointestinal mucosa immune system (Plaza-Diaz et al., 2019). On the other hand, for example, SB supplementation in MR stimulates intestinal epithelium growth as well as pancreatic secretion and brush border enzymes production, which is elicited mostly via neuroendocrine pathways (Guilloteau et al., 2010; Górka et al., 2018). Thus, it can be expected that the combination of probiotic and SB in MR should have at least an additive effect, since the mechanisms by which these two feed additives affect the gastrointestinal tract are different.

Of the feed additives used in the conducted studies, SB has an especially well-established positive impact on the gastrointestinal tract of calves (Guilloteau et al., 2009; Górka et al., 2011). Its supplementation in MR has been shown to have a positive impact on the growth performance and health of calves in numerous studies (Górka et al., 2018). However, in the current studies, no positive impact of SB supplementation was observed. Actually, SB tended to decrease overall starter intake and the ADG of the calves in the first 20 days of one study (Study 1B) and a similar numeric trend was observed in combination with reduced MR intake as well as increased FS in other study (Study 1A). Also, other reports showed not only a positive, but also a negative impact of butyrate supplementation in calf MR. Wolfswinkel (2017) showed more diarrhea in calves supplemented with tributyrin in MR that was used as a butyrate source (although the ADG of calves was positively affected) whereas in a study by Wood et al. (2019), calves supplemented with SB in MR had a higher risk of mortality. Importantly, in the study by Wood et al. (2019), SB was supplemented in MR in combination with *Bacillus subtilis*, which was also the case in the studies presented in this paper. Furthermore, in Study 1B, SB supplementation increased *E. coli* counts in feces in the first 20 days of the study (Milik et al., unpublished). Various probiotic bacteria are combined in commercial MR with various butyrate sources (authors' observations) in order to enhance the performance of calves, based on literature reviews indicating the advantages of both probiotic bacteria (Frizzo et al., 2011; Alawneh et al., 2020; Cangiano et al., 2020) and butyrate source (Górka et al., 2018) supplementation in MR on the performance of calves. The results of the studies presented in this paper and a study by Wood et al. (2019) provide arguments against such practices prior to detailed verification of their efficiency.

Additionally, in neither of the conducted studies did combined supplementation of PC and EY with probiotic bacteria have an additive or synergistic impact on the investigated growth and health parameters of the calves. In general, not many studies showed an additive or synergistic impact of supplementation with several feed additives in MR on the performance of calves (Erhard et al., 2000; Roodposhti and Dabiri, 2012; Stefańska et al., 2021). Importantly, in one study (Study 2A), the addition of both PC and EY to MR decreased intake of starter, which resulted in a lower ADG and a tendency to a lower final BW of calves. The beneficial effects of EY supplementation were shown to be apparent predominantly when this feed additive is combined in MR with probiotic bacteria (Erhard et al., 2000). However, in Study 1B, EY supplementation in MR even initially (day 1–20 of study) decreased the ADG of the calves; in the latter part of the study (day 21–50), a reverse trend was observed, resulting in similar ADG of EY and CTRL calves in the whole study period. Egg yolk antibodies supplementation in MR is especially expected to reduce the number of occurrences of diarrhea in calves (reviewed by Diraviyam et al., 2014); however, this was not the case. The efficiency of EY supplementation in MR for the youngest calves may depend substantially on the dosage of this feed additive (Ozpınar et al., 1996), but the dosage used in this study was within a range of doses used by other authors (Diraviyam et al., 2014). Once again, the effect of feed additive supplementation may be very variable even when used on the same farm and with the same feeding protocol, and a combination of various feed additives in one MR may be not advantageous. However, at least part of the inconsistent results observed between farms could be a result of the different starter feed used on each farm as well. Although the feeding protocol of MR and liquid feeding prior to the study were standardized as much as possible between farms, usage of exactly the same starter feed was impossible. The same was true for treatment protocols of calves in the case of disease. Thus, these differences between farms also have to be taken into account when interpreting the results of studies. More studies investigating possible interactions between various combinations of feed additives in calf MR should be conducted to better explore these interactions and explain their mechanisms.

Of the feed additives investigated, PC had the most apparent, positive impacts on the growth performance of calves. In both studies conducted on Farm B, PC supplementation improved the FE of calves, and also the ADG and FS in the first 20 days in at least one study. Phytogetic compounds may have a wide range of action, from a stimulatory impact on digestive enzyme secretion to antimicrobial action (Hill et al., 2007; Froehlich et al., 2017; Upadhaya and Kim, 2017). It has been also shown that phytogetic feed additive combination in MR with probiotic bacteria may result in their additive action (Stefańska et al., 2021). Thus, PC supplementation in MR may positively affect ADG, FE and also the health of calves when the MR already contains probiotics. However, when CTRL calves were compared with PC calves across all studies with the effect of the study included in the statistical model as a random term, only FE was significantly improved by this feed additive supplementation (628 vs. 608 g of BW gain/kg of DM for PC and CTRL, respectively; $P = 0.04$; data not presented). When a similar analysis comparing CTRL and EY calves was run, no significant differences were found for any of the investigated parameters. Therefore, it can be speculated that of the investigated feed additives, PC supplementation in calf MR had the highest potential to positively interact with probiotic bacteria supplementation, assuming that these positively affect the growth performance of calves (Frizzo et al., 2011; Alawneh et al., 2020; Cangiano et al., 2020). Furthermore, such an effect can also be observed when calves are fed for the first 9 days of life a mixture of surplus colostrum, transition milk and whole milk. However, based on the results of the conducted studies, it can be speculated that the results of such interaction may be not very apparent and thus the final return of this feed additive supplementation in calf MR containing probiotic bacteria should be carefully verified. This is

particularly justified taking into account that in Study 2B, the likelihood of developing diarrhea was less for CTRL calves compared to PC calves.

The inconsistent results of feed additives supplementation in calf MR are widely known. For example, the positive effects of prebiotic supplementation were shown in some (Heinrichs et al., 2003; Masanetz et al., 2010) but not all studies (Hill et al., 2008; Froehlich et al., 2017). Similarly, the positive effects of PC supplementation were observed in some (Hill et al., 2007; Froehlich et al., 2017) but not in other studies (Santos et al., 2015). In line with those observations, in the current studies, for example, PC supplementation in combination with probiotic bacteria had a positive impact on the ADG of calves only on one farm and only in one of the two studies conducted on this farm. These inconsistent results of the effectiveness of feed additives supplementation in calf MR can be attributed to many factors, such as the age of the animals (Alawneh et al., 2020), the dosage of feed additive (Froehlich et al., 2017) or the liquid feed type (milk or MR; Cangiano et al., 2020), but particularly to the pathogen load on the farm, as well as to the extent and intensity of other stressors that calves are exposed to (Krehbiel et al., 2003; Cangiano et al., 2020). With regard to on-farm conditions, these can change dynamically within a relatively short period of time, affecting the results of feed additive supplementation. These changes include possible rapid changes in the prevalence of pathogens causing diarrhea in calves and their resistance to medical treatments (Berge et al., 2005; Hordijk et al., 2013). Despite only a several-month gap between the two studies conducted on Farm A (Study 1A and Study 2A), a substantial difference in the initial BW of calves was noticed between these studies. In turn, the passive immunity of calves and ADG were lower in Study 1B compared to Study 2B, both conducted on the same farm (Farm B). Even though the calves were managed in a very similar way in all the conducted studies and fed the same MR, inconsistent effects of the investigated feed additives were still observed, likely due to the previously mentioned short- and also long-term changes that occur on the farm. These possible short- and long-term changes in on-farm conditions are also supported by the significant effect of the year and season of the year on the growth and health parameters of calves observed in numerous studies (Donovan et al., 1998; Place et al., 1998; Chester-Jones et al., 2017). These more or less dynamic changes in environmental conditions, the health status of calves, or their management in practical conditions can justify (and are commonly used to justify) the routine usage of various feed additives in MR as a prophylactic strategy against various diseases. This includes the use of a combination of various feed additives in commercial MR. Feed additives can also be additionally supplemented in MR (i.e. 'top dressing'), as a strategy potentially limiting or solving health problems occurring in calves, independently of feed additives that are already present in the MR that is fed to them. However, the results of the studies presented in this paper question such practices.

5. Conclusions

Sodium butyrate supplementation in MR containing probiotic bacteria had no or a negative impact on the performance of calves, whereas PC and EY supplementation improved ADG, FE, FS, and reduced susceptibility to diarrhea of calves at some but not all stages of rearing; however, consumption of a mixture of colostrum, transition milk and whole milk by calves in the first 9 days of life has to be taken into account when interpreting these results. The impact of feed additives was inconsistent between the farms in which the studies were conducted as well as between studies conducted on the same farm. There were no additional benefits of inclusion of both PC and EY in MR containing probiotic bacteria.

Funding sources

This study was partially funded from: Program Operacyjny Inteligentny Rozwój 2014–2020 Poddziałanie 2.3.2 Bony na innowacje dla MŚP, and partially supported by Polmass S.A. (Bydgoszcz, Poland), which provided experimental milk replacers.

CRedit authorship contribution statement

Paweł Górka: Conceptualization, Methodology, Investigation, Project administration, Writing – original draft. **Julita Milik:** Investigation, Data curation, Formal analysis, Methodology, Writing - review & editing. **Waldemar Budziński:** Methodology, Resources. **Marcin Przybyło:** Formal analysis, Writing – review & editing. **Jarosław Kański:** Investigation, Writing – review & editing. **Tomasz Jankowiak:** Investigation. **Katarzyna Budzińska:** Methodology, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

One author of the paper is employed by Polmass S.A. (Bydgoszcz, Poland), a company with commercial interests in calf milk replacers, and the costs of this study were partially funded by Polmass S.A. No other relationship (personal or financial) with other relevant organizations or people is declared.

Acknowledgments

The authors wish to thank the staff of Hodowla Zwierząt Zarodowych Osowa Sień Sp. z o. o. (Przyczyna Górna, Poland) and Gospodarstwo Rolno-Hodowlane Żydowo Sp. z o. o. (Żydowo, Poland) for help with animal care, samples, and data collection, and Polmass S.A. for providing experimental milk replacers.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.anifeedsci.2023.115675](https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115675).

References

- Alawneh, J.I., Barreto, M.O., Moore, R.J., Soust, M., Al-harbi, H., James, A.S., Krishnan, D., Olchoway, T.W.J., 2020. Systematic review of an intervention: the use of probiotics to improve health and productivity of calves. *Prev. Vet. Med.* 183, 105147 <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105147>.
- Berge, A.C.B., Atwill, E.R., Sischo, W.M., 2005. Animal and farm influences on the dynamics of antibiotic resistance in faecal *Escherichia coli* in young dairy calves. *Prev. Vet. Med.* 69, 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.01.013>.
- Cangiano, L.R., Yohe, T.T., Steele, M.A., Renaud, D.L., 2020. Invited review: Strategic use of microbial-based probiotics and prebiotics in dairy calf rearing. *Appl. Anim. Sci.* 36, 630–651. <https://doi.org/10.15232/aas.2020-02049>.
- Chester-Jones, H., Heins, B.J., Ziegler, D., Schimek, D., Schuling, S., Ziegler, B., de Ondarza, M.B., Sniffen, C.J., Broadwater, N., 2017. Relationships between early-life growth, intake, and birth season with first-lactation performance of Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100, 3697–3704. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12229>.
- Diraviyam, T., Zhao, B., Wang, Y., Schade, R., Michael, A., Zhang, X., 2014. Effect of chicken egg yolk antibodies (IgY) against diarrhea in domesticated animals: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 9, e97716. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097716>.
- Donovan, G.A., Dohoo, I.R., Montgomery, D.M., Bennett, F.L., 1998. Calf and disease factors affecting growth in female Holstein calves in Florida, USA. *Prev. Vet. Med.* 33, 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(97\)00059-7](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(97)00059-7).
- EFSA, 2012. EFSA Panel on Additives and Products of Substances used in Animal Feed (FEEDAP); Scientific Opinion on Lactiform® (*Enterococcus faecium*) as a feed additive for weaned piglets and calves. *EFSA J.* 10 (2), 2574 <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2574> [15 pp.].
- Erhard, M.H., Leuzinger, K., Stangassinger, M., 2000. Studies on the prophylactic effect of feeding probiotics, pathogen-specific colostrum antibodies or egg yolk antibodies in newborn calves. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 84, 85–94. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0396.2000.00284.x>.
- Fleige, S., Preißinger, W., Meyer, H.H.D., Pfaffl, M.W., 2007. Effect of lactulose on growth performance and intestinal morphology of pre-ruminant calves using a milk replacer containing *Enterococcus faecium*. *Animal* 1, 367–373. <https://doi.org/10.1017/S1751731107661850>.
- Frieten, D., Gerbert, C., Koch, C., Dusel, G., Eder, K., Kanitz, E., Weitzel, J.M., Hammon, H.M., 2017. Ad libitum milk replacer feeding, but not butyrate supplementation, affects growth performance as well as metabolic and endocrine traits in Holstein calves. *J. Dairy Sci.* 100, 6648–6661. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12722>.
- Frizzo, L.S., Zbrun, M.V., Soto, L.P., Signorini, M.L., 2011. Effects of probiotics on growth performance in young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Anim. Feed Sci. Tech.* 169, 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.06.009>.
- Froehlich, K.A., Abdelsalam, K.W., Chase, C., Koppen-Fox, J., Casper, D.P., 2017. Evaluation of essential oils and prebiotics for newborn dairy calves. *J. Anim. Sci.* 95, 3772–3782. <https://doi.org/10.2527/jas.2017.1601>.
- Górka, P., Kowalski, Z.M., Pietrzak, P., Kotunia, A., Jagusiak, W., Zabielski, R., 2011. Is rumen development in newborn calves affected by different liquid feeds and small intestine development? *J. Dairy Sci.* 94, 3002–3013. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3499>.
- Górka, P., Śliwiński, B., Flaga, J., Wiczorek, J., Godlewski, M.M., Wierchoś, E., Zabielski, R., Kowalski, Z.M., 2017. Effect of butyrate infusion into the rumen on butyrate flow to the duodenum, selected gene expression in the duodenum epithelium, and nutrient digestion in sheep. *J. Anim. Sci.* 95, 2144–2155. <https://doi.org/10.2527/jas.2016.1218>.
- Górka, P., Kowalski, Z.M., Zabielski, R., Guilloteau, P., 2018. Invited review: use of butyrate to promote gastrointestinal tract development in calves. *J. Dairy Sci.* 101, 4785–4800. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14086>.
- Górka, P., Budzińska, K., Budziński, W., Jankowiak, T., Kehoe, S., Kański, J., 2021. Effect of probiotic and nucleotide supplementation in milk replacer on growth performance and fecal bacteria in calves. *Livest. Sci.* 250, 104556 <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104556>.
- Guilloteau, P., Zabielski, R., David, J.C., Blum, J.W., Morisset, J.A., Biernat, M., Woliński, J., Laubit, D., Hamon, Y., 2009. Sodium-butyrate as a growth promoter in milk replacer formula for young calves. *J. Dairy Sci.* 92, 1038–1049. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1213>.
- Guilloteau, P., Martin, L., Eeckhaut, V., Ducatelle, R., Zabielski, R., Van Immerseel, F., 2010. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutr. Res. Rev.* 23, 366–384. <https://doi.org/10.1017/S0954422410000247>.
- Hare, K.S., Pletts, S., Pyo, J., Haines, D., Guan, L.L., Steele, M., 2020. Feeding colostrum or a 1:1 colostrum:whole milk mixture for 3 days after birth increases serum immunoglobulin G and apparent immunoglobulin G persistency in Holstein bulls. *J. Dairy Sci.* 103, 11833–11843. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18558>.
- Heinrichs, A.J., Jones, C.M., Heinrichs, B.S., 2003. Effects of mannan oligosaccharide or antibiotics in neonatal diets on health and growth of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 86, 4064–4069. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)74018-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)74018-1).
- Hill, T.M., Aldrich, J.M., Schlotterbeck, R.L., Bateman, H.G., 2007. Apex plant botanicals for neonatal calf milk replacers and starters. *Prof. Anim. Sci.* 23, 521–526. [https://doi.org/10.1532/S1080-7446\(15\)31014-7](https://doi.org/10.1532/S1080-7446(15)31014-7).
- Hill, T.M., Bateman, H.G., Aldrich, J.M., Schlotterbeck, R.L., 2008. Oligosaccharides for dairy calves. *Prof. Anim. Sci.* 24, 460–464. [https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)30881-0](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30881-0).
- Hordijk, J., Mevius, D.J., Kant, A., Bos, M.E.H., Graveland, H., Bosman, A.B., Hartskeerl, C.M., Heederik, D.J.J., Wagenaar, J.A., 2013. Within-farm dynamics of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in veal calves: a longitudinal approach. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 2468–2476. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt219>.
- Jahani-Azizabadi, H., Baraz, H., Bagheri, N., Ghaffari, M.H., 2022. Effects of a mixture of phytobiotic-rich herbal extracts on growth performance, blood metabolites, rumen fermentation, and bacterial population of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 105, 5062–5073. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20687>.
- Kargar, S., Roshan, M., Ghoreishi, S.M., Akhlaghi, A., Kanani, M., Shams-Abadi, A.R.A., Ghaffari, M.H., 2020. Extended colostrum feeding for 2 weeks improves growth performance and reduces the susceptibility to diarrhea and pneumonia in neonatal Holstein dairy calves. *J. Dairy Sci.* 103, 8130–8142. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18355>.
- Kargar, S., Bahadori-Moghaddam, M., Ghoreishi, S.M., Akhlaghi, A., Kanani, M., Pazoki, A., Ghaffari, M.H., 2021. Extended transition milk feeding for 3 weeks improves growth performance and reduces the susceptibility to diarrhea in newborn female Holstein calves. *Animal* 15, 100151. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100151>.
- Kowalski, Z.M., Górka, P., Schlagheck, A., Jagusiak, W., Micek, P., Strzetelski, J., 2009. Performance of Holstein calves fed milk-replacer and starter mixture supplemented with probiotic feed additive. *J. Anim. Feed Sci.* 18, 399–411. <https://doi.org/10.22358/jafs/66409/2009>.
- Krehbiel, R.C., Rust, S.R., Zhang, G., Gilliland, S.E., 2003. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. *J. Dairy Sci.* 81, E120–E132. https://doi.org/10.2527/2003.8114_suppl_2E120x.
- Larson, L.L., Owen, F.G., Albright, J.L., Appleman, R.D., Lamb, R.C., Muller, L.D., 1977. Guidelines toward more uniformity in measuring and reporting calf experimental data. *J. Dairy Sci.* 60, 989–991. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(77\)83975-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(77)83975-1).
- Littell, R.C., Henry, P.R., Ammerman, C.B., 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* 76, 1216–1231. <https://doi.org/10.2527/1998.7641216x>.
- Masanetz, S., Wimmer, N., Piltzner, C., Limbeck, E., Preissinger, W., Pfaffl, M.W., 2010. Effects of inulin and lactulose on the intestinal morphology of calves. *Animal* 4, 739–744. <https://doi.org/10.1017/S1751731109991728>.
- Ozpinar, H., Erhard, M.H., Aytug, N., Ozpinar, A., Baklaci, C., Karamuhtuoglu, S., Hofmann, A., Losch, U., 1996. Dose-dependent effects of specific egg-yolk antibodies on diarrhea of newborn calves. *Prev. Vet. Med.* 27, 67–73. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(95\)00561-7](https://doi.org/10.1016/0167-5877(95)00561-7).

- Place, N.T., Heinrichs, A.J., Erb, H.N., 1998. The effects of disease, management, and nutrition on average daily gain of dairy heifers from birth to four months. *J. Dairy Sci.* 81, 1004–1009. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75661-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75661-9).
- Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, F.J., Gil-Campos, M., Gil, A., 2019. Mechanisms of action of probiotics. *Adv. Nutr.* 10, S49–S66. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy063>.
- Pyo, J., Hare, K., Pletts, S., Inabu, Y., Haines, D., Sugino, T., Guan, L.L., Steele, M., 2020. Feeding colostrum or a 1:1 colostrum:milk mixture for 3 days postnatal increases small intestinal development and minimally influences plasma glucagon-like peptide-2 and serum insulin-like growth factor-1 concentrations in Holstein bull calves. *J. Dairy Sci.* 103, 4236–4251. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17219>.
- Roodposhti, P.M., Dabiri, N., 2012. Effects of probiotic and prebiotic on average daily gain, fecal shedding of *Escherichia coli*, and immune system status in newborn female calves. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 25, 1255–1261. <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.11312>.
- Santos, F.H.R., De Paula, M.R., Lezier, D., Silva, J.T., Santos, G., Bittar, C.M.M., 2015. Essential oils for dairy calves: effects on performance, scours, rumen fermentation and intestinal fauna. *Animal* 9, 958–965. <https://doi.org/10.1017/S175173111500018X>.
- Signorini, M.L., Soto, L.P., Zbrun, M.V., Sequeira, G.J., Rosmini, M.R., Frizzo, L.S., 2012. Impact of probiotic administration on the health and fecal microbiota of young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials of lactic acid bacteria. *Res. Vet. Sci.* 93, 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.05.001>.
- Stefańska, B., Sroka, J., Katzer, F., Goliński, P., Nowak, W., 2021. The effect of probiotics, phytobiotics and their combination as feed additives in the diet of dairy calves on performance, rumen fermentation and blood metabolites during the preweaning period. *Anim. Feed Sci. Tech.* 272, 114738 <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114738>.
- Upadhaya, S.D., Kim, I.H., 2017. Efficacy of phytogenic feed additive on performance, production and health status of monogastric animals – a review. *Ann. Anim. Sci.* 17, 929–948. <https://doi.org/10.1515/aoas-2016-0079>.
- Van Soest, B., Cullens, F., VandeHaar, M.J., Weber Nielsen, M., 2020. Short communication: Effects of transition milk and milk replacer supplemented with colostrum replacer on growth and health of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 103, 12104–12108. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18361>.
- Van Soest, B., Weber Nielsen, M., Moeser, A.J., Abuelo, A., VandeHaar, M.J., 2022. Transition milk stimulates intestinal development of neonatal Holstein calves. *J. Dairy Sci.* 105, 7011–7022. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21723>.
- T.L. Wolfswinkel The Effects of Feeding Prebiotics, Antibiotics, and Alternative Proteins during the Preweaning Period to Dairy Calves on Growth, Health, and the Gastrointestinal Microbiota 2017. <https://doi.org/10.3274/etd-180810-5082>.
- Wood, D.R., Blome, R.M., Keunen, A.J., Keunen, B.W., Crenshaw, J.D., Campbell, J.M., Renaud, D.L., 2019. Short communication: effects of porcine plasma or combined sodium butyrate and *Bacillus subtilis* on growth and health of grain-fed veal calves. *J. Dairy Sci.* 102, 7183–7188. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16672>.

Effect of supplementing sodium butyrate, phytogetic compounds and egg yolk antibodies in calf milk replacer containing probiotic bacteria on selected faecal bacteria in calves

J. Milik^{1,3,*}, P. Górka², K. Budzińska³, J. Kański² and T. Jankowiak⁴

¹ Bydgoszcz University of Science and Technology, Faculty of Civil and Environmental Engineering, and Architecture, Research-Experimental Laboratory, S. Kaliskiego 7, 85-796 Bydgoszcz, Poland

² University of Agriculture in Krakow, Faculty of Animal Science, Department of Animal Nutrition and Biotechnology, and Fisheries, al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków, Poland

³ Bydgoszcz University of Science and Technology, Faculty of Animal Breeding and Biology, Department of Biology and Animal Environment, Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz, Poland

⁴ Vetbovis, 62-241 Żydowo, Poland

KEY WORDS: dairy heifer, diarrhoea, feed additive, health

Received: 16 March 2023

Revised: 14 May 2023

Accepted: 15 May 2023

ABSTRACT. Thirty two Holstein calves were used to investigate the effects of sodium butyrate (SB), phytogetic compounds (PC; consisting mainly of caraway, liquorice extract, oak bark and vanilla flavour), and egg yolk antibodies (EY) supplementation in milk replacer (MR) containing probiotic bacteria on the counts of total bacteria and selected bacteria in faeces. The calves were fed a mixture of surplus colostrum, transition milk and whole milk for the first 9 days of life. On day 10, they were assigned to one of four treatments (8 calves/treatment): 1) MR containing probiotic bacteria but no other feed additives (control treatment; CTRL); 2) MR with SB; 3) MR with PC; and 4) MR with EY. On day 14 of the study, total bacteria counts were higher in EY calves, *Lactobacillus* spp. counts were higher in PC and EY calves, and *Bifidobacterium* spp. counts were higher in SB, PC and EY calves compared to CTRL calves. *Escherichia coli* counts were higher in EY calves and tended to be higher in SB calves compared to CTRL. On day 28 of the study, total bacteria counts tended to be lower in PC calves, *Lactobacillus* spp. counts were higher, while *Clostridium perfringens* counts were lower in EY calves compared to CTRL calves. It was concluded that the supplementation of SB, PC and EY in MR already containing probiotic bacteria may either increase or reduce the abundance of beneficial (*Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp.) but also undesired (*E. coli*, and *C. perfringens*) bacteria in calf faeces. Of the investigated feed additives, PC supplementation exerted the most beneficial effect on the composition of faecal bacteria, while EY supplementation can reduce *C. perfringens* shedding in faeces.

* Corresponding author:
e-mail: julita.milik@pbs.edu.pl

Introduction

Probiotics, prebiotics, phytogetic compounds and butyrate sources are commonly used feed additives in calf milk replacers (MR) (Frieten et al., 2017; Stefańska et al., 2021; Jahani-Azizabadi

et al., 2022). Among these feed additives, probiotic bacteria are most often included in calf MR formulas due to their well-established positive effect on calf growth and health, as confirmed by the results of numerous studies (Signorini et al., 2012; Cangiano et al., 2020). One of the mechanisms through

which probiotics exert their beneficial impacts involves modulating the intestinal microbiome. Probiotic bacteria can colonise the gastrointestinal tract (GIT) and enhance settlement of other beneficial bacteria (Plaza-Diaz et al., 2019), thereby reducing the probability of GIT colonisation by pathogenic bacteria. Numerous studies have demonstrated that feeding probiotics to calves increases the counts of beneficial bacteria (e.g. *Lactobacillus* spp.) and reduces the counts of harmful or potentially harmful bacteria (e.g. *Escherichia coli*) in faeces (Roodposhti and Dabiri, 2012; Signorini et al., 2012). Consequently, calves receiving probiotic feed additives often experience fewer episodes of diarrhoea (Signorini et al., 2012; Cangiano et al., 2020).

The gastrointestinal microbiome in newborn ruminants is not only affected by feeding probiotic bacteria, but also by other feed additives. For example, sodium butyrate supplementation in MR was shown to affect microbiota composition in the colon of calves (O'Hara et al., 2018), nucleotide addition to MR affected *Lactobacillus* spp. counts in the faeces of calves (Górka et al., 2021), while egg yolk antibodies, derived from eggs laid by immunised hens, reduced the shedding of certain pathogens in the faeces of lambs (Cook et al., 2005). Moreover, pathogenic compound supplementation in calf MR was demonstrated to affect rumen bacterial population (Jahani-Azizabadi et al., 2022) and reduce the occurrence and shedding of *Cryptosporidium* and *Giardia duodenalis* in faeces (Stefańska et al., 2021). Of the aforementioned feed additives, knowledge regarding the effects of phyto-genic additives in calf MR is particularly limited. This is due to the wide variation in composition of different phyto-genic additives, which depend on the specific plant materials or extracts and their combinations in the formulation. It has also been repeatably observed that the doses of this type of feed additives are critical for their final effects, as excessive doses may lead to negative outcomes (Brand et al., 2019; Kolif et al., 2021; Jahani-Azizabadi et al., 2022). Therefore, further research is needed to fill the gap in our understanding of the effects of phyto-genic feed additives supplementation in calf MR.

Probiotic bacteria are commonly combined with other feed additives in calf MR, as a potential strategy to further improve performance of the calves (Górka et al., 2021; 2023; Stefańska et al., 2021). Moreover, farmers often supplement other feed additives in MR that already contains probiotic bacteria (authors' observations); however, there is limited evidence demonstrating that combining various feed additives in calf MR results in additional

benefits (Von Erhard et al., 2000; Stefańska et al., 2021). In fact, some combinations of feed additives in MR may negatively affect calf performance and health (Wood et al., 2019; Górka et al., 2023) or abolish the positive effect of feed additive already present in MR (Górka et al., 2023). Furthermore, the effect of such a practice can be highly variable depending on the farm where a combination of various feed additives is applied (Górka et al., 2023).

The effectiveness of feed additives may be also affected by the age of calves and their nutrition before the initiation of supplementation. Most studies investigating the effect of various feed additives in calf MR focused on the period from first 2 to 4 days of the calves' life (Von Erhard et al., 2000; Stefańska et al., 2021; Jahani-Azizabadi et al., 2022). However, feed additives can also be introduced in the diet later in the life of calves, especially when MR feeding begins after 7 to 14 days, following the administration of surplus colostrum or transition milk for an extended period of time (Górka et al., 2021; 2023). The feeding of colostrum or transition milk during the first days of calves' life can significantly impact the efficacy of feed additive supplementation. Prolonged colostrum feeding has known effects on the development of the calves' GIT and immune system development, and thus their growth and health (Van Soest et al., 2022). Among the many factors influencing calf body development, colostrum intake was also shown to affect the development of the intestinal microbiota (Fischer et al., 2018).

The aim of the study was to determine the effect of supplementing calf milk replacer containing probiotic bacteria with sodium butyrate, phyto-genic compounds and egg yolk antibodies on selected bacteria counts in faeces. The study focused on calves that were fed surplus colostrum and transition milk for the initial 9 days of their lives. The hypothesis was that the combination of various feed additives with probiotic bacteria in MR might not necessarily have a beneficial effect on the intestinal microbiota of calves fed colostrum and transition milk for an extended period of time.

Material and methods

The study was carried out on a dairy farm located in the northwestern Poland (Gospodarstwo Rolno-Hodowlane Żydowo Sp. z o. o., Żydowo; Farm B). The experimental procedures were in accordance with Polish legislation, which is in line with EU Directive 2010/63/EU concerning the protection of animals used for scientific purposes.

A detailed description of the experimental design, housing and feeding of calves can be found in a companion paper (Górka et al., 2023), specifically in the description of Study 1B. Briefly, 96 Holstein calves (48 females and 48 males; average body weight of 45.3 ± 4.1 kg and a total serum protein level of 5.71 ± 0.73 g/l) were blocked by date of birth and sex at 10 days of age and then allocated to one of four treatments within each block: 1) MR containing probiotic bacteria but no other feed additives (control treatment; CTRL); 2) MR with sodium butyrate (SB; 3.4 kg/t, resulting in an intake of 3.1 g/calf/day; Adimix Easy, Nutriad, Belgium); 3) MR with phytogetic compounds (PC; 0.5 kg/t, resulting in an intake of 0.45 g/calf/day; Digestarom, Biomin, Austria) consisting mainly of caraway, liquorice extract, oak bark and vanilla flavour; and 4) MR with egg yolk antibodies (EY; egg yolk powder containing specific antibodies; 3 kg/tonne, resulting in an intake of 2.7 g/calf/day; Globigen Life Start, EW Nutrition, Germany). The MR (21% crude protein and 18% fat) used in the study contained *Bacillus licheniformis* and *B. subtilis* (1.3×10^6 CFU/g), and *Enterococcus faecium* (1.2×10^6 CFU/g). The addition of each feed additive to the MR followed the recommendations provided by the respective manufacturers. However, it is important to note that the manufacturers were not directly consulted, and their representatives were not involved in the preparation of study protocols.

Prior to the study, the calves were separated from their dams immediately after birth. The calves were then individually housed in straw-bedded hutches, which measured $150 \times 120 \times 125$ cm (length \times width \times high) and included an additional outside area of 150×120 cm. Within the first two hours of life, each calf received 4 litres of maternal colostrum via a stomach tube. Thereafter, a mixture of surplus colostrum, transition milk, and if necessary to obtain sufficient volume, whole milk (tank milk) was offered (3×2 l) until day 10 of life. From that day onwards, the calves were fed 6 l of MR three times a day (2 l/feeding; 150 g of MR powder in 1 l of water). The MR (Polmass Red Full, Polmass S.A., Bydgoszcz, Poland) contained 21% crude protein and 18% fat and was fed from a nipple bucket. Starting from the first day of the study, the calves had also free access to a texturised starter feed (Chrupka, Lira Wytwórnia Pasz, Krzywiń, Poland). The calves remained in the study until 60 days of age, thus the study lasted 50 days (from 10 to 60 days of age). Prior to the enrolment to the study, the intake of colostrum, transition milk, and whole milk by the calves during the first 9 days of life was not monitored.

Calves were weighed on the first day of the study and every 10 days thereafter. Milk replacer intake was monitored daily and the faecal score was assessed also daily using the scoring system proposed by Larson et al. (1977). Starter intake was determined by recording the amount of starter fed throughout the study period, and feed efficiency was calculated by dividing body weight gain by dry matter intake (Górka et al., 2023).

On days 14 (± 2 days) and 28 (± 2 days) of the study, faecal samples were collected from 8 randomly selected calves/treatment (4 females and 4 males) and analysed for the total number of bacteria, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *E. coli*, and *Clostridium perfringens* counts. The deviation in faecal sampling days (± 2 days) was due to the fact that faecal samples were collected two times a week (Tuesday and Friday) and the number of samples collected each day had to be limited due to laboratory logistics. Therefore, the actual days of faecal sample collection were days 14.0 and 27.8 of the study.

The procedure of faecal sampling and bacterial analysis can be found elsewhere (Górka et al., 2021). Briefly, faecal samples were collected by manually stimulating the rectum of the calves, and collecting faeces into sterile containers (120 ml). For analysis of anaerobic bacterial counts, the containers were also placed in a foil bag with AnaeroGen Compact (Thermo Fisher Scientific Oxoid Ltd., Basingstoke, UK). Subsequently, the samples were transported to the laboratory of the Department of Biology and Animal Environment at the Bydgoszcz University of Science and Technology in a portable refrigerator. Ten grams of fresh faecal sample was diluted with 90 ml of 1% peptone water with 0.85% salt (Thermo Fisher Scientific Oxoid Ltd. Basingstoke, UK) and shaken for 3 min using a laboratory blender (BagMixer[®] 400CC, Interscience, Saint Nom la Brétèche, France). Subsequently, serial dilutions were made in saline peptone water and cultured onto selective media. Tryptic Soy Agar (TSA; Merck, Darmstadt, Germany) was used to determine the total number of bacteria. The obtained inoculations were incubated for 24 h at a temperature of 37 °C. Chromogenic Tryptone Bile X-glucuronide (TBX-Agar; Merck, Darmstadt, Germany) medium was used for the determination of β -glucuronidase-positive *E. coli*. The plates were incubated for 24 h at 44 °C. *Lactobacillus* spp. was cultured on De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar (Lactobacillus Agar; Merck, Darmstadt, Germany). MRS agar contains polysorbate, acetate and manganese in its composition, which act as growth-promoting agents for lactobacilli. Incubation was carried out at the

temperature of 30 °C for 72 h. The culture plates were placed in 2.5-l AnaeroJar (Thermo Fisher Scientific Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) containers with Anaerogen (Oxoid) sachets to ensure appropriate anaerobic conditions. *Bifidobacterium* spp. was cultured on Bifidus Selective Medium (BSM-Agar; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Incubation was carried out at a temperature of 37 °C for 36–48 h in anaerobic conditions. *C. perfringens* was grown on medium Tryptose Sulphite Cycloserine (TSC-Agar; Merck, Darmstadt, Germany). Incubation was carried out at a temperature of 37 °C for 36–48 h in anaerobic conditions. As a result of the reaction of sodium disulphite with iron (III) ammonium citrate, *C. perfringens* forms black colonies on medium surface, and the addition of cycloserine helps to inhibit the growth of accompanying bacteria. Bacterial species identification was performed on the basis of characteristic morphology of the colonies, Gram staining, and the biochemical analytical profile index tests API 20 A and API 20 E (BioMérieux Polska Sp z.o.o., Warsaw, Poland). The analysis was performed in triplicate. Only plates with colony-forming units (CFU) ranging from 15 to 300 were used for calculations.

The results are expressed in CFU/g fresh faeces and calculated as:

$$L = \frac{C}{[n_1 + (0.1 \times n_2)] \times d},$$

where: L – total number of bacteria (CFU/g of faeces); C – sum of all colonies grown on plates used for calculation; n_1 – number of plates from the first calculated dilution; n_2 – number of plates from the next calculated dilution; d – dilution index corresponding to the first calculated dilution.

Data were analysed using the MIXED procedure of SAS software (ver. 9.4, SAS Institute, Inc.). Faecal bacteria count data were log-transformed before the analysis and the results were analysed separately for each sampling point. Prior to data analysis, data normality and homogeneity of variance were tested using PROC UNIVARIATE of SAS. The statistical model included the fixed effects of treatment, sex of the calves, and the interaction between sex and treatment. The age of the calves on the day of sampling was initially included in the model as a covariate to account for initial age variation. However, it was found to be non-significant ($P > 0.10$) for all analysed parameters and was removed from the model. Furthermore, the passive immunity of calves was included as a covariate in the statistical model. Since this effect tended to ($P \leq 0.10$) be significant for some

analysed parameters, it was left in the model. The analysis of other variables such as body weight, feed intake, and feed efficiency was conducted according to the same statistical model described above. Initial body weight was included in the model as a covariate for analysis of final body weight and feed efficiency. Faecal score data were analysed using PROC GLIMMIX of SAS and Poisson distribution. The statistical model included the effect of time (day of the study). When a significant interaction effect of treatment and sex of the calves was observed, means were separated using a Tukey adjustment in SAS. Significance was declared when $P \leq 0.05$, and trends were declared at $0.05 < P \leq 0.10$.

Results

Passive immune status (total serum protein concentration), initial and final body weight, MR and starter intake, feed efficiency, and faecal score of calves selected for faecal sampling are presented in Table 1. Total serum protein, initial body weight, MR intake, starter intake and the faecal score did not differ between treatments ($P \geq 0.18$), while final body weight tended to or was significantly higher in SB and EY calves compared to CTRL calves ($P \leq 0.10$). Furthermore, feed efficiency was significantly higher for PC and EY calves compared to CTRL calves ($P \leq 0.05$). However, it is important to interpret these differences with caution as they are based on a sample size of 8 calves/treatment and are not consistent with the results presented in the companion paper, which presents the effect of investigated factors on growth performance of calves on a larger number of animals (Górka et al., 2023). Regarding the interaction between effect of treatment and sex of the calves, only a few interactions were observed. Specifically, total bacteria counts on day 14 of the study tended to ($P = 0.06$) be affected by the interaction between effect of treatment and sex of the calves. The highest counts were observed for PC and EY bull calves, while the lowest for SB heifers. The total bacteria count on day 28 of the study was also affected by the interaction between effect of treatment and sex of the calves ($P = 0.05$), with the highest counts observed for EY heifers and the lowest for PC heifers. Moreover, *C. perfringens* counts were affected by the interaction between treatment and sex of the calves ($P = 0.05$), with the highest counts recorded for EY heifer calves and the lowest for PC heifers calves. However, the Tukey post-hoc mean separation did not detect differences between

Table 1. Passive immune status at the start of the study (serum total protein concentration), body weight, feed intake, feed efficiency, and faecal score of calves

	Group				SE	Contrasts ¹		
	CTRL	SB	PC	EY		1	2	3
N	8	8	8	8				
Total serum protein, g/l	5.88	5.83	5.69	5.51	0.327	0.93	0.69	0.44
Initial body weight, kg	45.0	42.9	45.5	45.1	1.35	0.30	0.80	0.97
Final body weight, kg	84.2	87.5	86.3	88.7	1.32	0.10	0.26	0.03
Milk replacer intake, kg DM ²	43.9	44.1	44.1	44.1	0.06	0.25	0.18	0.19
Starter intake, kg DM	13.9	14.1	11.5	13.6	1.32	0.94	0.21	0.85
Feed efficiency, g gain/kg DM	684	737	750	768	23.1	0.13	0.05	0.02
Faecal score ³	1.07	1.03	1.04	1.08	0.031	0.43	0.49	0.75

CTRL – animals fed a milk replacer with probiotic bacteria only, SB – animals fed a milk replacer containing probiotic bacteria and sodium butyrate (3.4 kg/t, 3.1 g/day/calf; Adimix Easy, Nutriad, Belgium), PC – animals fed a milk replacer containing probiotic bacteria and phytogetic compounds (0.5 kg/t, 0.45 g/day/calf; Digestarom, Biomin, Austria), EY – animals fed a milk replacer containing probiotic bacteria and egg yolk antibodies (egg yolk powder containing specific antibodies; 3 kg/t, 2.7 g/day/calf; Globigen Life Start, EW Nutrition, Germany), SE – standard error, DM – dry matter; ¹ 1 – CTRL vs. SB, 2 – CTRL vs. PC, 3 – CTRL vs. EY; ² cumulative intake throughout the study; ³ tendency to significant time effect ($P = 0.09$); $P < 0.05$ indicates significant differences

treatments for any of the listed parameters. Thus, the results concerning sex within each treatment are not presented and discussed further in the manuscript. This decision is additionally justified by the relatively small sample size (4 bulls and 4 heifers/treatment), which does not allow to accurately determine (i.e. sufficiently limit the statistical error) significant interactions between these effects.

On day 14 of the study, total bacteria counts were higher for EY calves compared to CTRL calves

($P = 0.02$; Table 2). Furthermore, *Lactobacillus* spp. counts were higher for PC and EY calves compared to CTRL calves ($P < 0.01$), whereas *Bifidobacterium* spp. counts were higher for SB, PC and EY calves compared to CTRL calves ($P \leq 0.02$). On the other hand, *E. coli* counts were higher for EY calves ($P = 0.02$) and tended to ($P = 0.06$) be higher for SB calves compared to CTRL. In consequence, the *Lactobacillus*-to-*Escherichia* ratio tended to ($P = 0.09$) be lower for SB compared to CTRL

Table 2. Bacterial counts in faeces on day 14 and 28 of the study (\log_{10} CFU/g of fresh faeces)

	Group				SE	Contrasts ¹		
	CTRL	SB	PC	EY		1	2	3
N	8	8	8	8				
Day 14 of the study								
total bacteria	9.31	9.35	9.80	10.14	0.239	0.89	0.16	0.02
<i>Lactobacillus</i> spp.	7.38	7.37	8.12	8.22	0.125	0.95	<0.01	<0.01
<i>Bifidobacterium</i> spp.	7.26	7.78	8.33	8.37	0.148	0.02	<0.01	<0.01
<i>E. coli</i>	6.28	6.78	6.29	6.92	0.177	0.06	0.98	0.02
<i>C. perfringens</i>	3.88	3.76	3.70	3.82	0.138	0.55	0.34	0.75
<i>Lactobacillus: Escherichia</i>	1.18	1.09	1.30	1.20	0.036	0.09	0.03	0.77
<i>Bifidobacterium: Escherichia</i>	1.17	1.15	1.26	1.21	0.036	0.76	0.08	0.25
Day 28 of the study								
total bacteria	9.48	8.99	9.04	9.36	0.192	0.09	0.13	0.68
<i>Lactobacillus</i> spp.	7.01	7.24	7.23	7.56	0.148	0.28	0.29	0.02
<i>Bifidobacterium</i> spp.	7.06	7.44	7.35	6.84	0.189	0.18	0.30	0.40
<i>E. coli</i>	6.23	6.44	6.07	6.55	0.199	0.45	0.59	0.26
<i>C. perfringens</i>	3.87	3.58	3.60	2.97	0.140	0.16	0.20	<0.01
<i>Lactobacillus: Escherichia</i>	1.14	1.14	1.20	1.16	0.046	0.99	0.36	0.74
<i>Bifidobacterium: Escherichia</i>	1.14	1.17	1.22	1.04	0.044	0.67	0.24	0.14

CTRL – animals fed a milk replacer with probiotic bacteria only, SB – animals fed a milk replacer containing probiotic bacteria and sodium butyrate (3.4 kg/t, 3.1 g/day/calf; Adimix Easy, Nutriad, Belgium), PC – animals fed a milk replacer containing probiotic bacteria and phytogetic compounds (0.5 kg/t, 0.45 g/day/calf; Digestarom, Biomin, Austria), EY – animals fed a milk replacer containing probiotic bacteria and egg yolk antibodies (egg yolk powder containing specific antibodies; 3 kg/t, 2.7 g/day/calf; Globigen Life Start, EW Nutrition, Germany), SE – standard error, CFU – colony forming unit; ¹ 1 – CTRL vs. SB, 2 – CTRL vs. PC, 3 – CTRL vs. EY; $P < 0.05$ indicates significant differences

calves, but was higher ($P = 0.03$) for PC calves compared to CTRL calves. The ratio of *Bifidobacterium*-to-*Escherichia* also tended to ($P = 0.08$) be higher for PC compared to CTRL.

On day 28 of the study, total bacteria counts tended to ($P = 0.09$) be lower for SB calves compared to CTRL calves. *Lactobacillus* spp. counts were higher ($P = 0.02$), whereas that of *C. perfringens* counts were lower ($P < 0.01$) for EY calves compared to CTRL calves.

Additionally, several differences between bull and heifer calves were detected. On day 14 of the study, bull calves had higher *Lactobacillus* spp. counts (7.96 vs. 7.59; $P < 0.01$) but lower *E. coli* counts (6.38 vs. 6.75; $P = 0.05$) compared to heifer calves. Consequently, the *Lactobacillus*-to-*Escherichia* ratio was higher for bull calves compared to heifer calves (1.27 vs. 1.13; $P < 0.01$). Moreover, the ratio of *Bifidobacterium*-to-*Escherichia* was higher for bulls compared to heifers on day 14 of the study (1.24 vs. 1.17; $P = 0.03$). However, as the study did not primarily focus on sex differences, these findings are not presented in detail and will only be briefly discussed in the later parts of the manuscript.

Discussion

Before discussing the result in more detail, it should be mentioned that faecal bacteria counts were used in the current study as an indicator of the effect of the investigated feed additives on intestinal bacteria. It should be noted that there can be differences between faecal bacteria counts and actual intestinal colonisation (Malmuthuge et al., 2015). Nevertheless, the presence and counts of specific bacteria such as *E. coli* or *C. perfringens* in faeces can be used as markers of GIT colonisation by these undesirable bacteria, whereas the *Lactobacillus*-to-*Escherichia* ratio can serve as an indicator of intestinal microbiome dysbiosis (Kehoe et al., 2008; Malmuthuge et al., 2015; Górká et al., 2021). Furthermore, it is important to mention once again that the current study utilised a relatively small sample size of 8 calves per treatment. Therefore, caution should be made when interpreting the results pertaining to the growth performance of the calves. The findings presented in this work are part of a larger project (Górká et al., 2023) that investigated the impact of SB, PC, and EY supplementation in MR on the growth performance of calves in a series of studies involving a larger number of animals. Consequently, when appropriate, references to the companion paper will be made, and the growth performance of calves described and dis-

cussed briefly in order to provide better context for interpreting the results of faecal bacteria presented in the current study.

Among the investigated feed additives, SB supplementation in MR has a well-established positive impact on GIT development and function in calves (Górká et al., 2011). Moreover, the dietary supplementation of SB has shown positive effects on intestinal microbiota in calves. For example, the colonisation of *Mogibacterium*, which can adversely affect GIT health, was reduced in the colon of calves fed MR with SB (O'Hara et al., 2018). This effect was accompanied by a tendency towards higher average daily gain (ADG) and feed efficiency of calves. Dietary SB supplementation was also shown to reduce GIT colonisation by *E. coli* in piglets (Xiong et al., 2016). However, it should be noted that not all studies have consistently observed the beneficial effects of SB supplementation in calf MR. Wolfswinkel (2017) reported an increased incidence of diarrhoea in calves fed MR with SB. In the study of Wood et al. (2019), SB supplementation in MR was associated with a higher risk of calf mortality, but it was supplemented with *B. subtilis*, as in the current study. Partly consistent with studies showing not only positive effects of SB supplementation in calf MR, in the current study SB supplementation resulted in higher *E. coli* counts in faeces and a lower *Lactobacillus*-to-*Escherichia* ratio on day 14 of the study, indicating a negative impact on the intestinal bacterial community. Furthermore, the growth performance of the calves was negatively affected, as described in detail in the companion paper (Górká et al., 2023). Similar negative effects of SB supplementation have also been observed in broiler chickens, where it led to a reduction in *Lactobacillus* counts in the intestinal chyme (Hu and Guo, 2007). These findings suggest that SB supplementation in combination with probiotic bacteria, as in the case of *B. subtilis* and *E. faecium* in this study, may not always yield positive results. It is possible that the combination of SB with probiotic bacteria overstimulates the immune system, as suggested by Wood et al. (2019), leading to a negative impact on GIT function and calf performance.

Numerous studies have demonstrated the positive impact of PC on growth performance and health issues prevention in calves (Froehlich et al., 2017; Stefańska et al., 2021; Jahani-Azizabadi et al., 2022). When supplemented in feed, PC action is not limited to their antimicrobial effects, which are particularly desired in newborn calves that are susceptible to various infections. PC are also known to affect digestive enzyme secretion and exhibit antioxidant and

anti-inflammatory properties (Froehlich et al., 2017; Upadhaya and Kim, 2017). Importantly, a combination of phytogenic feed additive with probiotic bacteria in MR was shown to have a synergistic impact on the growth performance of calves (Stefańska et al., 2021). Among the investigated feed additives, the combination of probiotics and PC had the most positive influence on calf performance. It increased feed efficiency and decreased the likelihood of diarrhoea in calves, as described in detail in the companion paper (Górka et al., 2023). These benefits of PC supplementation in MR were accompanied by higher *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. counts in faeces on day 14 of the study, and consequently higher *Lactobacillus*-to-*Escherichia* and *Bifidobacterium*-to-*Escherichia* ratios. Thus, the positive effect of PC supplementation in the current study can be at least partly attributed to their impact on the development of gastrointestinal microbiota. In other studies, supplementation with herbal extracts or essential oils also reduced the occurrence or intensity of diarrhoea in calves (Froehlich et al., 2017; Jahani-Azizabadi et al., 2022). In addition, essential oil supplementation reduced the counts of *E. coli* in the rectum in piglets (Zeng et al., 2015).

These findings collectively support the notion that PC supplementation in calf MR can yield positive outcomes, even when combined with probiotic bacteria and when calves are fed colostrum and transition milk for an extended period of time. Further studies are needed to fully understand the mechanisms behind these positive effects and to elucidate the specific pathways through which PC supplementation influences the gut microbiota and promotes calf health.

Supplementing EY in MR exerted a similar effect on faecal bacteria on day 14 of the study as with PC supplementation. Both *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. counts in faeces were increased; however, simultaneously *E. coli* counts were increased. Moreover, the ADG of calves was reduced in the first 20 days of the study when EY were supplemented in MR (see companion paper of Górka et al. (2023)), which is difficult to explain. EY supplementation in MR aims to bind and 'neutralise' pathogens that enter GIT and can adversely affect its function (Diraviyam et al., 2014). However, based on a meta-analysis of available studies, EY supplementation did not consistently reduce GIT-related diseases in newborn animals, as some studies reported no effect of EY addition in feeds (Diraviyam et al., 2014). Considering that the calves in the current study were fed colostrum and transition

milk for the first 9 days of life, which indisputably affected the development of the intestinal bacteria community (Fischer et al., 2018), it is possible that the supplementation of EY had both positive (increased *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. counts in faeces) and negative effects on this community shortly after calves were transitioned to MR feeding. However, it should be noted that in piglets, EY supplementation directly after weaning was shown to prevent GIT colonisation by *E. coli* (Marquardt et al., 1999). Similarly, in calves, dietary EY supplementation was consistently demonstrated to prevent diarrhoea of various aetiology (Özpinar et al., 1996; Ikemori et al., 1997). Alternatively, a negative interaction between probiotic bacteria present in the experimental MR and EY can be considered. However, a study by Von Erhard et al. (2000) reported a synergistic impact on the growth parameters of calves when a combination of probiotic bacteria and EY was added to MR. On the other hand, EY supplementation increased *Lactobacillus* spp. counts and decreased *C. perfringens* counts in faeces on day 28 of the current study, which was accompanied by an increase in ADG of calves (Górka et al., 2023). Therefore, when considering prophylactic measures for the entire rearing period, the incorporation of EY into MR may be beneficial, also for calves initially fed colostrum and transition milk during the first several days of life.

At least several studies have shown differences in ADG and feed intake between bull and heifer calves (Greenwood et al., 1997; Hohmann et al., 2021). These differences can be attributed to physiological differences between males and females. The results of the current study show that faecal bacteria counts may differ between bull and heifer calves, with higher counts of *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. expected in bull calves. This may partially explain the reported differences between bull and heifer calves in terms of the probability of GIT-related diseases (Al Mawly et al., 2015). Future studies focusing on the specific differences in the development of intestinal bacteria between bull and heifer calves would contribute to a better understanding of their unique nutritional requirements and help optimizing feed additive usage in calf MR.

Conclusions

Of the investigated feed additives, PC supplementation had the most positive impact on faecal bacteria composition in calves fed MR containing probiotic bacteria, as well as colostrum

and transition milk in the first 9 days of life. This was indicated by increased counts of *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. and higher ratios of *Lactobacillus*-to-*Escherichia* and *Bifidobacterium*-to-*Escherichia* in faeces. In contrast, SB supplementation showed less favourable effects on faecal bacteria counts. It tended to increase *E. coli* counts in faeces and lower the *Lactobacillus*-to-*Escherichia* ratio, which indicated a rather negative impact on the investigated faecal bacteria composition in calves. EY supplementation was found to reduce *C. perfringens* counts in faeces, suggesting potential benefits of this supplement.

Funding

This study was partially funded by the Smart Growth Operational Programme 2014-2020 Submeasure 2.3.2, Innovation Vouchers for SMEs, and partly supported by Polmass S.A. (Bydgoszcz, Poland), which provided experimental milk replacers.

Acknowledgments

The authors wish to thank the staff of Gospodarstwo Rolno-Hodowlane Żydowo Sp. z o.o. (Żydowo, Poland) for their assistance with animal care, sample and data collection, and Polmass S.A. for providing experimental milk replacers.

Conflict of interest

The Authors declare that there is no conflict of interest.

References

- Al Mawly J., Grinberg A., Prattley D., Moffat J., Marshall J., French N., 2015. Risk factors for neonatal calf diarrhoea and enteropathogen shedding in New Zealand dairy farms. *Wet. J.* 203, 155–160, <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.01.010>
- Brand T., Hünerberg M., McAllister T.A., He M., Saleem A.M., Shen Y., Miller B., Yang W. 2019. Impact of a phytogetic feed additive on growth performance, feed intake, and carcass traits of finishing steers. *Transl. Anim. Sci.* 3, 1162–1172, <https://doi.org/10.1093/tas/txz109>
- Cangiano L.R., Yohe T.T., Steele M.A., Renaud D.L., 2020. Invited review: Strategic use of microbial-based probiotics and prebiotics in dairy calf rearing. *Appl. Anim. Sci.* 36, 630–651, <https://doi.org/10.15232/aas.2020-02049>
- Cook S.R., Bach S.J., Stevenson S.M.L., DeVinney R., Frohlich A.A., Fang L., McAllister T.A., 2005. Orally administered anti-*Escherichia coli* O157:H7 chicken egg yolk antibodies reduce fecal shedding of the pathogen by ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* 85, 291–299, <https://doi.org/10.4141/a04-076>
- Diraviyam T., Zhao B., Wang Y., Schade R., Michael A., Zhang X., 2014. Effect of chicken egg yolk antibodies (IgY) against diarrhea in domesticated animals: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 9, e97716, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097716>
- Fischer A.J., Song Y., He Z., Haines D.M., Guan L.L., Steele M.A., 2018. Effect of delaying colostrum feeding on passive transfer and intestinal bacterial colonization in neonatal male Holstein calves. *J. Dairy Sci.* 101, 3099–3109, <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13397>
- Frieten D., Gerbert C., Koch C., Dusel G., Eder K., Kanitz E., Weitzel J.M., Hammon H.M., 2017. Ad libitum milk replacer feeding, but not butyrate supplementation, affects growth performance as well as metabolic and endocrine traits in Holstein calves. *J. Dairy Sci.* 100, 6648–6661, <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12722>
- Froehlich K.A., Abdelsalam K.W., Chase C., Koppien-Fox J., Casper D.P., 2017. Evaluation of essential oils and prebiotics for newborn dairy calves. *J. Anim. Sci.* 95, 3772–3782, <https://doi.org/10.2527/jas.2017.1601>
- Górka P., Budzińska K., Budziński W., Jankowiak T., Kehoe S., Kański J., 2021. Effect of probiotic and nucleotide supplementation in milk replacer on growth performance and fecal bacteria in calves. *Livest. Sci.* 250, 104556, <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104556>
- Górka P., Kowalski Z.M., Pietrzak P., Kotunia A., Jagusiak W., Zabielski R., 2011. Is rumen development in newborn calves affected by different liquid feeds and small intestine development? *J. Dairy Sci.* 94, 3002–3013, <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3499>
- Górka P., Milik J., Budziński W., Przybyło M., Jankowiak T., Budzińska K., 2023. Effect of sodium butyrate, phytogetic compounds and egg yolk antibodies supplementation in calf milk replacer containing probiotic bacteria on farms feeding a mixture of surplus colostrum and transition milk to calves in their first days of life. *Anim. Feed Sci. Technol.* 302, 115675, <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115675>
- Greenwood R.H., Morrill J.L., Titgemeyer E.C., 1997. Using dry feed intake as a percentage of initial body weight as a weaning criterion. *J. Dairy Sci.* 80, 2542–2546, [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76208-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76208-8)
- Hohmann L.G., Yin T., Schweizer H., Giambra I.J., König S., Scholz A.M., 2021. Comparative effects of milk containing A1 versus A2 beta-casein on health, growth and beta-casomorphin-7 level in plasma of neonatal dairy calves. *Animals* 11, 55, <https://doi.org/10.3390/ani11010055>
- Hu Z., Guo Y., 2007. Effects of dietary sodium butyrate supplementation on the intestinal morphological structure, absorptive function and gut flora in chickens. *Anim. Feed Sci. Technol.* 132, 240–249, <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.03.017>
- Ikemori I., Ohta M., Umeda K., Icatlo F.C., Kuroki M., Yokoyama H., Kodama Y., 1997. Passive protection of neonatal calves against bovine coronavirus-induced diarrhea by administration of egg yolk or colostrum antibody powder. *Vet. Microbiol.* 58, 105–111, [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(97\)00144-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(97)00144-2)
- Jahani-Azizabadi H., Baraz H., Bagheri N., Ghaffari M.H., 2022. Effects of a mixture of phytothetic-rich herbal extracts on growth performance, blood metabolites, rumen fermentation, and bacterial population of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 105, 5062–5073, <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20687>
- Kehoe S.I., Heinrichs A.J., Baumrucker C.R., Greger D.L., 2008. Effects of nucleotide supplementation in milk replacer on small intestinal absorptive capacity in dairy calves. *J. Dairy Sci.* 91, 2759–2770, <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0751>

- Kholif A.E., Hassan A.A., El Ashry G.M., Bakr M.H., El-Zaiat H.M., Olafadehan O.A., Matloup O.H., Sallam S.M.A., 2021. Phytogetic feed additives mixture enhances the lactational performance, feed utilization and ruminal fermentation of Friesian cows. *Anim. Biotechnol.* 32, 708–718, <https://doi.org/10.1080/10495398.2020.1746322>
- Larson L.L., Owen F.G., Albright J.L., Appleman R.D., Lamb R.C., Muller L.D., 1977. Guidelines toward more uniformity in measuring and reporting calf experimental data. *J. Dairy Sci.* 60, 989–991, [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(77\)83975-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(77)83975-1)
- Malmuthuge N., Griebel P.J., Guan L.L., 2015. The gut microbiome and its potential role in the development and function of newborn calf gastrointestinal tract. *Front. Vet. Sci.* 2, 36, <https://doi.org/10.3389/fvets.2015.00036>
- Marquardt R.R., Jin L.Z., Kim J.-W., Fang L., Frohlich A.A., Baidoo S.K., 1999. Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88⁺ infection in neonatal and early-weaned piglets. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 23, 283–288, <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1999.tb01249.x>
- O'Hara E., Kelly A., McCabe M.S., Kenny D.A., Guan L.L., Waters S.M., 2018. Effect of a butyrate-fortified milk replacer on gastrointestinal microbiota and products of fermentation in artificially reared dairy calves at weaning. *Sci. Rep.* 8, 14901, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33122-6>
- Özpinar H., Erhard M.H., Aytug N., Özpinar A., Baklaci C., Karamüptüoğlu S., Hofmann A., Lösch U., 1996. Dose-dependent effects of specific egg-yolk antibodies on diarrhea of newborn calves. *Prev. Vet. Med.* 27, 67–73, [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(95\)00561-7](https://doi.org/10.1016/0167-5877(95)00561-7)
- Plaza-Diaz J., Ruiz-Ojeda F.J., Gil-Campos M., Gil A., 2019. Mechanisms of action of probiotics. *Adv. Nutr.* 10, S49–S66, <https://doi.org/10.1093/advances/nmy063>
- Roodposhti P.M., Dabiri N., 2012. Effects of probiotic and prebiotic on average daily gain, fecal shedding of *Escherichia coli*, and immune system status in newborn female calves. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 25, 1255–1261, <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.11312>
- Signorini M.L., Soto L.P., Zbrun M.V., Sequeira G.J., Rosmini M.R., Frizzo L.S., 2012. Impact of probiotic administration on the health and fecal microbiota of young calves: a meta-analysis of randomized controlled trials of lactic acid bacteria. *Res. Vet. Sci.* 93, 250–258, <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.05.001>
- Stefańska B., Sroka J., Katzer F., Goliński P., Nowak W., 2021. The effect of probiotics, phytobiotics and their combination as feed additives in the diet of dairy calves on performance, rumen fermentation and blood metabolites during the preweaning period. *Anim. Feed Sci. Technol.* 272, 114738, <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114738>
- Upadhaya S.D., Kim I.H., 2017. Efficacy of phytogetic feed additive on performance, production and health status of monogastric animals – a review. *Ann. Anim. Sci.* 17, 929–948, <https://doi.org/10.1515/aoas-2016-0079>
- Van Soest B., Weber Nielsen M., Moeser A.J., Abuelo A., VandeHaar M.J., 2022. Transition milk stimulates intestinal development of neonatal Holstein calves. *J. Dairy Sci.* 105, 7011–7022, <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21723>
- Von Erhard M.H., Leuzinger K., Stangassinger M., 2000. Studies on the prophylactic effect of feeding probiotics, pathogen-specific colostrum antibodies or egg yolk antibodies in newborn calves. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 84, 85–94, <https://doi.org/10.1046/j.1439-0396.2000.00284.x>
- Wolfswinkel T.L., 2017. The effects of feeding prebiotics, antibiotics, and alternative proteins during the preweaning period to dairy calves on growth, health, and the gastrointestinal microbiota, PhD. Iowa State University. Ames, IA (USA), <https://doi.org/10.31274/etd-180810-5082>
- Wood D.R., Blome R.M., Keunen A.J., Keunen B.W., Crenshaw J.D., Campbell J.M., Renaud D.L., 2019. Short communication: effects of porcine plasma or combined sodium butyrate and *Bacillus subtilis* on growth and health of grain-fed veal calves. *J. Dairy Sci.* 102, 7183–7188, <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16672>
- Xiong H., Guo B., Gan Z., Song D., Lu Z., Yi H., Wu Y., Wang Y., Du H.S., 2016. Butyrate upregulates endogenous host defense peptides to enhance disease resistance in piglets via histone deacetylase inhibition. *Sci. Rep.* 6, 27070, <https://doi.org/10.1038/srep27070>
- Zeng Z., Xu X., Zhang Q., Li P., Zhao P., Li Q., Liu J., Piao X.S., 2015. Effects of essential oil supplementation of a low-energy diet on performance, intestinal morphology and microflora, immune properties and antioxidant activities in weaned pigs. *Anim. Sci. J.* 86, 279–285, <https://doi.org/10.1111/asj.12277>

11.2. Oświadczenie Autora rozprawy doktorskiej

OŚWIADCZENIE AUTORA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr. inż. Julita Milik

Katedra Biologii i Środowiska Zwierząt, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt

Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy,

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionych artykułach naukowych był następujący:

1. Górka P., Milik J., Budziński W., Przybyło M., Kański J., Jankowiak T., Budzińska K.: Effect of sodium butyrate, phytogenic compounds and egg yolk antibodies supplementation in calf milk replacer containing probiotic bacteria on farms feeding a mixture of surplus colostrum and transition milk to calves in their first days of life. *Journal of Animal Feed Science and Technology*, 2023; 302: 115675-115679, DOI 10.1016/j.anifeedsci.2023.115675, MNiSW = 200, Impact Factor 3.2.

Wykonane zadania przez Doktoranta w ramach artykułu:

Współdział w opracowaniu koncepcji badań, współdział w opracowaniu metodologii, analiza danych, współdział w opracowaniu wyników badań, współdział w sformułowaniu wniosków, współredakcja pracy - indywidualny udział Doktoranta w realizację artukułu wynosi 35%.

2. Milik J., Górka P., Budzińska K., Kański J., Jankowiak T.: Effect of supplementing sodium butyrate, phytogenic compounds and egg yolk antibodies supplementation in calf milk replacer containing probiotic bacteria on selected fecal bacteria in calves. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 2023; 32(4):438-446, DOI: 10.22358/jafs/166154/2023, MNiSW = 100, Impact Factor 1.0.

Wykonane zadania przez Doktoranta w ramach artykułu:

Współdział w koncepcji badań, udział w przeprowadzeniu testów terenowych, przeprowadzenie wszystkich analiz mikrobiologicznych kału, współdział w analizie danych zgromadzonych w trakcie badań, wiodący udział w zebraniu literatury naukowej do przeglądu piśmiennictwa i dyskusji wyników, współdział w opracowaniu wyników badań i sformułowaniu wniosków, współredakcja pracy, udział w przeprowadzeniu korekty manuskryptu - indywidualny udział Doktoranta w przygotowaniu artukułu wynosi 70%.

Bydgoszcz, 20.06.2024r.

Bydgoszcz, data

Julita Milik

.....
podpis Autora rozprawy doktorskiej

***** W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

11.3. Oświadczenia Współautorów artykułów naukowych

Oświadczenie Współautora

dr hab. inż. Jarosław Kański, prof. URK

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Katedra Żywienia, Biotechnologii Zwierząt i Rybactwa, al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionych artykułach naukowych był następujący*:

1. Górka P., Milik J., Budziński W., Przybyło M., Kański J., Jankowiak T., Budzińska K.: Effect of sodium butyrate, phytogenic compounds and egg yolk antibodies supplementation in calf milk replacer containing probiotic bacteria on farms feeding a mixture of surplus colostrum and transition milk to calves in their first days of life. *Journal of Animal Feed Science and Technology*, 2023; 302:115675, DOI 10.1016/j.anifeedsci.2023.115675, MNiSW = 200, Impact Factor 3.2.

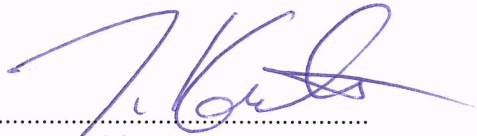
Współdział w analizie danych zgromadzonych w trakcie badań oraz współdział w korekcie manuskryptu – łącznie mój wkład w realizację pracy wynosił 5%.

2. Milik J., Górka P., Budzińska K., Kański J., Jankowiak T.: Effect of supplementing sodium butyrate, phytogenic compounds and egg yolk antibodies supplementation in calf milk replacer containing probiotic bacteria on selected fecal bacteria in calves. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 2023; 32(4):438-446, DOI: 10.22358/jafs/166154/2023, MNiSW = 100, Impact Factor 1.0.

Współdział w analizie danych zgromadzonych w trakcie badań, udział w opracowaniu statystycznym wyników badań, współdział w przygotowaniu manuskryptu – łącznie mój wkład w realizację pracy wynosił 5%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionych prac przez mgr inż. Julitę Milik jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

6.06.2024 m. Kolos
.....
miejsowość, data


.....
podpis Współautora

***** W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

Oświadczenie Współautora

dr hab. inż. Paweł Górka, prof. URK

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Katedra Żywienia, Biotechnologii Zwierząt i Rybactwa, al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionych artykułach naukowych był następujący*:

1. Górka P., Milik J., Budziński W., Przybyło M., Kański J., Jankowiak T., Budzińska K.: Effect of sodium butyrate, phytogenic compounds and egg yolk antibodies supplementation in calf milk replacer containing probiotic bacteria on farms feeding a mixture of surplus colostrum and transition milk to calves in their first days of life. *Journal of Animal Feed Science and Technology*, 2023; 302:115675, DOI 10.1016/j.anifeedsci.2023.115675, MNiSW = 200, Impact Factor 3.2.

Współudział w opracowaniu koncepcji badań, współudział w opracowaniu metodologii doświadczenia, współudział w realizacji doświadczenia na zwierzętach, współudział w opracowaniu wyników badań i sformułowaniu wniosków, koordynacja realizacji doświadczeń, współredakcja publikacji – łącznie mój wkład w powstanie pracy wynosi 40%.

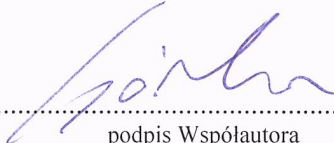
2. Milik J., Górka P., Budzińska K., Kański J., Jankowiak T.: Effect of supplementing sodium butyrate, phytogenic compounds and egg yolk antibodies supplementation in calf milk replacer containing probiotic bacteria on selected fecal bacteria in calves. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 2023; 32(4):438-446, DOI: 10.22358/jafs/166154/2023, MNiSW = 100, Impact Factor 1.0.

Współudział w opracowaniu koncepcji badań, współudział w opracowaniu metodyki badań, współudział w opracowaniu wyników statystycznych badań, współredakcja publikacji – łącznie mój wkład w powstanie pracy wynosi 15%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionych prac przez mgr inż. Julitę Milik jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Kraków, 5/6/2024

miejsce, data


.....
podpis Współautora

***** W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

Oświadczenie Współautora

dr. inż. Marcin Przybyło

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Katedra Żywienia, Biotechnologii Zwierząt i Rybactwa, al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionym artykule naukowym był następujący*:

1. Górka P., Milik J., Budziński W., Przybyło M., Kański J., Jankowiak T., Budzińska K.: Effect of sodium butyrate, phytogenic compounds and egg yolk antibodies supplementation in calf milk replacer containing probiotic bacteria on farms feeding a mixture of surplus colostrum and transition milk to calves in their first days of life. Journal of Animal Feed Science and Technology, 2023; 302:115675, DOI 10.1016/j.anifeedsci.2023.115675, MNiSW = 200, Impact Factor 3.2.

Współdział w opracowaniu statystycznych wyników badań, współdział w opracowaniu przeglądu piśmiennictwa i współredakcja publikacji – łącznie mój wkład w realizację pracy wynosił 5%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej pracy przez mgr inż. Julitę Milik jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Krośnice, 7.06.2024

miejsowość, data

Marcin Przybyło

podpis Współautora

***** W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

Oświadczenie Współautora

dr hab. inż. Katarzyna Budzińska, prof. PBS
Katedra Biologii i Środowiska Zwierząt, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,
Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy,

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionych artykułach naukowych był następujący*:

1. Górka P., Milik J., Budziński W., Przybyło M., Kański J., Jankowiak T., Budzińska K.: Effect of sodium butyrate, phytogetic compounds and egg yolk antibodies supplementation in calf milk replacer containing probiotic bacteria on farms feeding a mixture of surplus colostrum and transition milk to calves in their first days of life. Journal of Animal Feed Science and Technology, 2023; 302:115675, DOI 10.1016/j.anifeedsci.2023.115675, MNiSW = 200, Impact Factor 3.2.

Współudział w opracowaniu metodyki badań, korekta przygotowanej publikacji – łącznie mój wkład w realizację pracy wynosił 5%.

2. Milik J., Górka P., Budzińska K., Kański J., Jankowiak T.: Effect of supplementing sodium butyrate, phytogetic compounds and egg yolk antibodies supplementation in calf milk replacer containing probiotic bacteria on selected fecal bacteria in calves. Journal of Animal and Feed Sciences, 2023; 32(4):438-446, DOI: 10.22358/jafs/166154/2023, MNiSW = 100, Impact Factor 1.0.

Współudział w opracowaniu koncepcji badań, współudział w opracowaniu w metodologii badań, analiza uzyskanych danych, współudział w sformułowaniu wniosków, współredakcja publikacji – łącznie mój wkład w realizację pracy 5%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionych prac przez mgr inż. Julitę Milik jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Bydgoszcz 18.06.2024

miejsceowość, data

Katarzyna Budzińska

podpis Współautora

***** W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

Oświadczenie Współautora

dr. inż. Waldemar Budziński,

Polmass S. A. ul. Fordońska 40, 85-719 Bydgoszcz

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionym artykule naukowym był następujący*:

1. Górka P., Milik J., Budziński W., Przybyło M., Kański J., Jankowiak T., Budzińska K.: Effect of sodium butyrate, phytogetic compounds and egg yolk antibodies supplementation in calf milk replacer containing probiotic bacteria on farms feeding a mixture of surplus colostrum and transition milk to calves in their first days of life. *Journal of Animal Feed Science and Technology*, 2023; 302:115675, DOI 10.1016/j.anifeedsci.2023.115675, MNiSW = 200, Impact Factor 3.2.

Współudział w opracowaniu metodyki badań i współredakcja publikacji – łącznie mój wkład w realizację pracy wynosił 5 %.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej pracy przez mgr inż. Julitę Milik jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Bydgoszcz 17.06.2025
.....
miejsowość, data

Waldemar Budziński
.....
podpis Współautora

***** W przypadku prac dwu- lub wieloautorских wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

lek. wet. Tomasz Jankowiak
Vetbovis,
62-241 Żydowo

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionych artykułach naukowych był następujący*:

1. Górka P., Milik J., Budziński W., Przybyło M., Kański J., Jankowiak T., Budzińska K.: Effect of sodium butyrate, phytogenic compounds and egg yolk antibodies supplementation in calf milk replacer containing probiotic bacteria on farms feeding a mixture of surplus colostrum and transition milk to calves in their first days of life. Journal of Animal Feed Science and Technology, 2023; 302:115675, DOI 10.1016/j.anifeedsci.2023.115675, MNiSW = 200, Impact Factor 3.2.

Współdział w przeprowadzeniu doświadczeń terenowych i przygotowaniu publikacji – łącznie mój wkład w realizację pracy wynosił 5%.

2. Milik J., Górka P., Budzińska K., Kański J., Jankowiak T.: Effect of supplementing sodium butyrate, phytogenic compounds and egg yolk antibodies supplementation in calf milk replacer containing probiotic bacteria on selected fecal bacteria in calves. Journal of Animal and Feed Sciences, 2023; 32(4):438-446, DOI: 10.22358/jafs/166154/2023, MNiSW = 100, Impact Factor 1.0.

Współdział w opracowaniu metodologii badań, wykonanie części doświadczeń terenowych – łącznie mój wkład w realizację pracy wynosił 5%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionych prac przez mgr inż. Julity Milik jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

7 06 2024 LJD:sk

miejsowość, data

TJank

podpis Współautora

***** W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

WYKAZ SKRÓTÓW

ADF, acid detergent fiber; włókno kwaśno detergentowe;
ADG, average daily gain; średni dzienny przyrost;
aNDF, neutral detergent fiber; neutralne włókna detergentowe;
BW, body weight; masa ciała;
CFU, colony-forming unit, jednostka tworząca kolonie;
CTRL, control group; grupa kontrolna;
CP, crude protein; białko surowe;
DM, dry matter; sucha masa;
EY, egg yolk antibodies; przeciwciała żółtka jaja kurzego;
FE, feed efficiency; efektywność wykorzystania paszy;
FS, fecal score, punktacja kału;
MR, milk replacer; preparat mlekozastępczy;
PC, phytogetic compounds; związki fitogeniczne;
PCEY, phytogetic compounds and egg yolk antibodies; związki fitogeniczne i przeciwciała żółtka jaja kurzego;
SB, sodium butyrate. maślan sodu;