نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 8، شماره 1، بهار 1395، ص. 71-57

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 8, No. 1, Spring 2016, p. 57-71

اثر افزودن گیاهان کاکوتی، نعنا و پونه به شیر بر عملکرد، متابولیت‌های شیمیایی خون و جمعیت میکروبی مدفوع گوساله‌های هلشتاین

نرجس قهاری[1]- تقی قورچی[2*]- سید علیرضا وکیلی[3]

تاریخ دریافت: 1393/12/24
تاریخ پذیرش: 1394/06/14

چکیده

به منظور بررسی تاثیر سه گونه از گیاهان خانواده نعنا با نام‌های علمی *Ziziphora clinopodioides* (کاکوتی کوهی)، *Mentha spicata* (نعنا) و *Mentha pulegium* (پونه جوباری) بر شاخص‌های عملکردی، سیستم ایمنی و فراسنجه‌های خون، اسکور مدفوع و تعداد روزهای ابتلا به اسهال گوساله‌های شیرخوار و میزان باکتری‌های *اشریشیا کولای*، *لاکتوباسیلوس* و کل باکتری‌های هوازی مدفوع، 16 رأس گوساله نژاد هلشتاین با میانگین وزن تولد 0/71 ± 42/18 کیلوگرم (با نسبت 50 درصد نر و 50 درصد ماده)، با سن 3±5 روز به تیمارهای 1) شاهد (شیر بدون افزودنی)، 2) شیر حاوی پودر کاکوتی، 3) شیر حاوی پودر نعنا و 4) شیر حاوی پودر پونه اختصاص یافت. مقدار گیاه دارویی افزوده شده به شیر در هر تیمار 20 گرم به طور روزانه بود. طول دوره آزمایش 25 روز بود. اندازه‌گیری مصرف ماده خشک، آب مصرفی و ثبت اسکور مدفوع به صورت روزانه انجام شد. وزن‌کشی گوساله‌ها هر 5 روز و نمونه‌گیری خون دو بار، یک روز قبل از شروع دوره (روز صفر) و یک‌بار روز پایانی تحقیق انجام گرفت. نمونه‌های مورد نیاز برای کشت میکروبی مدفوع نیز در سه مرحله ابتدا، وسط و انتهای دوره تهیه گردید. بر اساس نتایج به دست آمده، افزودن پونه به شیر سبب کاهش مصرف روزانه استارتر شد ولی با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت و کل ماده خشک مصرفی در تیمار کاکوتی به طور معنی داری بیشتر از تیمار شاهد بود. گوساله‌های تغذیه شده با تیمارهای کاکوتی، پونه و نعنا به ترتیب مصرف آب بیشتری نسبت به گروه شاهد داشتند که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود. قابلیت هضم ماده خشک، در تیمارهای کاکوتی و نعنا کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان دادند. افزایش وزن، ضریب تبدیل غذایی، فراسنجه‌های خون و سیستم ایمنی تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. شاخص قوام مدفوع و روزهای ابتلا به اسهال در تیمارهای مختلف، اختلاف معنی‌داری نشان نداد اما در گوساله‌های تغذیه شده با تیمار پونه کاهش نشان داد. تیمارهای کاکوتی، نعنا و پونه در مقایسه با تیمار شاهد به طور معنی‌داری باعث کاهش تعداد *اشریشیاکولای* و *لاکتوباسیل‌ها* در مدفوع گوساله‌ها شدند ولی در تعداد کل باکتری‌های هوازی اثری نداشتند. نتایج این پژوهش نشان داد که افزودن گیاهان فوق به شیر در گوساله‌های شیرخوار، بر استارتر مصرفی، قوام مدفوع و جمعیت میکروبی روده اثر مثبت دارند.

واژه‌های کلیدی: اشریشیاکولای، خانواده نعنا، فراسنجه‌های خون، گوساله شیرخوار، لاکتوباسیل.

مقدمه

امروزه بسیاری از محصولات گیاهان دارویی (گیاه و اسانس) در تغذیه به عنوان مواد افزودنی به شمار می‌آیند. کاکوتی، نعنا و پونه سه مورد از گیاهان خانواده نعنا (Labiatae) می‌باشند. کاکوتی کوهی با نام علمی *Ziziphora clinopodioides* گیاهی چندساله با ماده موثره پولگون[4] (38) می‌باشد که در طب سنتی ایران از اندام‌های هوایی آن برای سرماخوردگی، التهاب و بی‌نظمی‌های گوارشی استفاده می‌شود. نعنا سبز (*Mentha spicata*) گیاهی چندساله و خوراکی از جمله گیاهان دائمی خانواده لابیاته است. ترکیب شیمیایی فعال اکثر گونه‌های نعنا، منتول[5] (16) است ولی اصلی‌ترین تفاوت نعنا سبز با سایر گونه‌ها، عدم وجود منتول و تشکیل ترکیبی به نام کاروون[6] می‌باشد (17). نعنا ترشح معده را زیاد کرده و برای ناراحتی‌های معده و اسهال به کار می‌رود (20). منتا پولگیوم ال[7] یا پونه یکی از گونه‌های جنس منتا از خانواده لابیاته در مناطق مرطوب رشد کرده (23) و ماده موثره آن، پولگون (8) و ماده ضدعفونی کننده آن، منتول (3) بوده و

1-دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه تغذیه دام و طیور دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
2- استاد گروه تغذیه دام و طیور دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
3- دانشیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد.
(*- نویسنده مسئول: Email: ghoorchit@yahoo.com)

4 Pulegon

5 Menthol
6 Carvone
7 Mentha Pulegium L

ترکیبات دیگری همچون پیپریتنون اکساید و سینرول و غیره نیز به وفور در آن یافت می‌شود. روغن‌های ضروری پونه دارای قدرت ضدباکتریایی در برابر میکروارگانیسم‌هایی مانند سالمونلا، کلستریدیوم و اکولای هستند (50). این دسته از گیاهان جزء مواد افزودنی حسی (چشایی) در نظر گرفته می‌شوند که اغلب برای افزایش مصرف خوراک مورد توجه قرار می‌گیرند (19). اسانس‌های گیاهی می‌توانند اثرات مفیدی بر وضعیت عملکرد و سلامت حیوان داشته باشند و دلیل آن فراتر از ویژگی‌های حسی و طعم‌دهندگی این ترکیبات می‌باشد که خواص ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی، انگل‌کشی و توانایی تحریک ترشحات دستگاه گوارش را می‌توان ذکر نمود (54). بیشتر تحقیقات انجام شده سودمندی بعضی از گونه‌های گیاهی و عصاره استخراجی از آن‌ها را در کاهش کلسترول خون، افزایش خوش‌خوراکی و تحریک سیستم‌ایمنی در طیور گزارش کرده‌اند (3)، در نشخوارکنندگان با توجه به اثری که این ترکیبات بر جمعیت میکروبی شکمبه، شرایط تخمیر شکمبه‌ای و غلظت نیتروژن آمونیاکی (43) می‌گذارند، نتایج متفاوتی مشاهده شده است. کانگ و همکاران (29) در یکی از آزمایشات خود مصرف ماده خشک بالاتری را برای گاوهای شیرده مشاهده کردند زمانی‌که به میزان 1 گرم در روز MEO[1] به جیره افزوده شده بود؛ استفاده دو سطح 4 و 8 کیلوگرم در تن برگ پونه کوهی (حاوی ترکیبات فعال کارواکرول و تیمول) در مقابل گروه شاهد تاثیری بر مصرف ماده خشک، وزن نهایی، افزایش وزن روزانه و ضریب تبدیل خوراک در بره‌های پرواری نداشت (5). تحقیقات نشان داده است که استفاده از مقادیر زیاد آنتی‌بیوتیک در خوراک حیوانات، سبب ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌شود (14)، همچنین آنتی‌بیوتیک‌ها سبب حذف فلور میکروبی مفید روده شده و سیستم ایمنی ذاتی را تحریک و یا پشتیبانی نمی‌کنند (24) و از طرفی احتمال انتقال باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها از طریق مصرف محصولات دامی، به انسان نیز وجود دارد (11). لذا امروزه محدودیت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان محرک رشد یا عامل درمانی باعث شده است که جایگزین‌های طبیعی همانند گیاهان دارویی بالاخص گیاهان دارویی خانواده نعنا که دارای خاصیت ضدمیکروبی بالایی هستند، مورد توجه قرار گیرند (31). از جمله مزایای استفاده از گیاهان دارویی می‌توان به کاربرد ساده، عدم اثرات سوء در اکثر آن‌ها بر عملکرد حیوانات، عدم باقی‌ماندن بقایای مضر در فراورده‌های دام و طیور (2)و هزینه کمتر نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها اشاره کرد. آنتی‌بیوتیک‌ها نیز برای مقابله و درمان اسهال در گوساله‌ها استفاده می‌شوند. *اشریشیا کولای* در بخش انتهایی دستگاه گوارش ساکن است و وارد مدفوع می‌شود (34، 53) و ایجادکننده اسهال در گوساله‌های جوان می‌باشد. مدفوع گاو یک منبع آلودگی مستقیم یا غیرمستقیم (ورود به آب و غذای مصرفی انسان) برای انسان محسوب می‌شود (40). میزان *اشریشیاکولای* موجود در مدفوع تحت تاثیر یکسری عوامل از جمله جیره غذایی قرار می‌گیرد (10). در آخرین بررسی انجام شده توسط اداره ملی کنترل سلامت دام (2001) اسهال، عامل 60 درصد تلفات گوساله‌های شیرخوار گزارش شده است (21) و دو هفته اول تولد بیشترین میزان اسهال در گوساله‌های شیرخوار دیده می‌شود (33). مهمترین عامل شناخته شده مسبب اسهال، نوع غذائی، ویروسی و میکروبی می‌باشند (39). عوامل عفونی شناخته شده مسبب اسهال گوساله‌ها عبارت از سویه‌های روده‌ای روتاویروس و کروناویروس، اشریشیاکولای و سالمونلا می‌باشند. ازعوامل غیرعفونی مسبب اسهال، شرایط محیطی (رطوبت، سرما، جایگاه غیربهداشتی، استرس) و عوامل تغذیه‌ای (خوراندن بیش از حد شیر وکیفیت پایین جایگزین شیر) را می‌توان نام برد (32). بامپیدایس و همکاران (6)، 30 گوساله که درگیر اسهال شدید بودند را انتخاب و به دو تیمار شامل درمان آنتی‌بیوتیکی (10 میلی‌گرم نئومایسین سولفات به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در هر 24 ساعت) و یا پونه کوهی (فراهم کننده 10 میلی‌گرم روغن اسانسی به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در هر 24 ساعت)، اختصاص دادند و در نهایت برابری تاثیر اسانس و نئومایسین سولفات را بر درمان اسهال مشاهده کردند. واکنش‌های بیوشیمیایی بدن برای انجام شدن نیاز به آب دارند و آب در تنظیم دمای بدن و فشار اسمزی نقش حیاتی ایفا می‌نماید. نورمند و همکاران (36) در اضافه کردن طعم‌دهنده‌ها به آب در تغذیه حیوانات، انسان را در نظر گرفتند که بعد از نوشیدن آب طعم‌دار، مقداری از طعم و مزه آن در گلو باقی مانده و انسان را به مصرف خوراک ترغیب می‌کند؛ در این‌جا نیز فرضیه این است که شیر طعم‌دار شده با پودر گیاهان دارویی سبب بالا رفتن ماده خشک مصرفی و متعاقبا افزایش مصرف آب در گوساله می‌شود و بر رشد اثرات مثبتی دارد وخاصیت ضدمیکروبی این گیاهان سبب جایگزینی کلونی‌های مطلوب و ثبات میکروبی در دستگاه گوارش خواهد شد.

هدف از انجام این پژوهش، بررسی تاثیر گیاهان کاکوتی، نعنا و پونه بر عملکرد گوساله‌های شیرخوار، قابلیت هضم ماده خشک، فراسنجه‌های خون و سیستم ایمنی، میزان ابتلا به اسهال و جمعیت *اشریشیاکولای*، *لاکتوباسیل‌ها* و کل باکتری‌های هوازی مدفوع بوده است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در بازه زمانی مرداد تا شهریورماه سال 1393 انجام شد. در آن از 16 رأس گوساله شیرخوار هلشتاین (با نسبت 50 درصد نر و 50 درصد ماده) با میانگین سن 3± 5 روز و میانگین وزن 0/71± 42/18 کیلوگرم استفاده گردید. گوساله‌ها 48 ساعت بعد از تولد و پس از دریافت آغوز کافی به قفس‌های انفرادی منتقل شدند.

1 Mixed essential oil

این پژوهش به صورت طرح کاملا تصادفی با 4 تیمار و 4 تکرار و در یک دوره 25 روزه به اجرا درآمد. تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از: 1) شاهد (شیر بدون افزودنی)، 2) شیر حاوی پودر کاکوتی، 3) شیر حاوی پودر نعنا و 4) شیر حاوی پودر پونه. میزان گیاه دارویی افزوده شده به شیر در هر تیمار 20 گرم به طور روزانه بود. روزانه 5 کیلوگرم (12درصد وزن بدن) شیر در دو زمان 7 صبح و 7 بعدازظهر با سطل به گوساله‌ها خورانده شد. حدود 90 دقیقه بعد از خوراندن شیر، 200 میلی‌لیتر آب در اختیار گوساله‌ها قرار داده و 2 ساعت بعد نیز آب در اختیار گوساله‌ها قرار داده شد. هریک از گیاهان دارویی به صورت پودر مخلوط با شیر برای حیوانات فراهم شد. استارتر از روز اول پژوهش در اختیار گوساله‌ها قرار گرفت. ترکیب شیمیایی و مواد تشکیل‌دهنده استارتر مصرفی در جدول 1 نشان داده شده است. در ابتدا ماده خشک، چربی خام و پروتئین خام هر یک از گیاهان با روش‌های معمول آزمایشگاهی تعیین شد (4). مقدار خوراک مصرفی هر گوساله در هر روز با توزین مقدار خوراک در دسترس قرار داده شده گوساله و باقی مانده خوراک در ظرف بعد از گذشت 24 ساعت تعیین شد.

جدول 1- اجزاء و ترکیب شیمیایی کنسانتره مصرفی در گوساله‌های شیرخوار هلشتاین

Table 1- Ingredient and chemical composition of concentrate of neonatal Holstein calves

مواد خوراکی Feeds	درصد ماده خشک Percentage of Dry matter
ذرت Corn Grain	25
کنجاله سویا Soybean Meal	17
جو Barley Grain	35
سبوس Wheat Bran	15
تفاله چغندرقند Beet Sugar Pulp	6
مکمل مواد ویتامینی و معدنی[1] Vitamins and Minerals supplement [1]	1
سنگ آهک Limestone	0.8
نمک Salt	0.2
ترکیب شیمیایی (بر اساس ماده خشک) Chemical composition (Basis Dry matter)	
ماده خشک Dry matter (%)	89.69
انرژی خالص برای نگهداری (مگاکالری بر کیلوگرم) Net Energy for maintenance (Mcal/Kg)	2.01
انرژی خالص برای رشد (مگاکالری بر کیلوگرم) Net Energy for growth (Mcal/Kg)	1.53
پروتئین خام Crude protein (%)	18.2
چربی خام Ether extract (%)	2.8

[1] ترکیب مکمل ویتامینی و معدنی: 500000 واحد بین‌المللی در کیلوگرم ویتامین A، 100000 واحد بین‌المللی در کیلوگرم ویتامین D_3، 100 واحد بین‌المللی در کیلوگرم ویتامین E، 400 میلی‌گرم در کیلوگرم آنتی‌اکسیدان، 196000 میلی‌گرم در کیلوگرم کلسیم، 96000 میلی‌گرم در کیلوگرم فسفر، 71000 میلی‌گرم در کیلوگرم سدیم، 19000 میلی‌گرم در کیلوگرم منیزیم، 3000 میلی‌گرم در کیلوگرم آهن، 3000 میلی‌گرم در کیلوگرم روی، 2000 میلی‌گرم در کیلوگرم منگنز، 300 میلی‌گرم در کیلوگرم مس، 100 میلی‌گرم در کیلوگرم ید، 100 میلی‌گرم در کیلوگرم کبالت و 1 میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیوم.

[1]The combination of vitamin and mineral supplements: 500,000 IU per kg of vitamin A, 100000 IU per kg of vitamin D3, 100 IU per kg of vitamin E, 400 mg per kg of antioxidants, 196 000 mg per kg of Calcium, 96000 mg per kg of phosphorus, 71,000 mg per kg of sodium, 19,000 mg per kg of magnesium, 3000 mg per kg iron, 3000 mg per kg zinc, 2000 mg per kg of manganese, 300 mg per kg copper, 100 mg per kg iodine, 100 mg per kg cobalt and 1 mg per kg selenium.

آب مصرفی نیز به کمک یک ظرف مدرج در هر بار آبدهی به طور روزانه تعیین شد. وضعیت اسهال گوساله‌ها هر روز به صورت چشمی بررسی گردید و تعداد روزهای ابتلا به اسهال هر گوساله ثبت گردید. نمره قوام مدفوع نیز با توجه به سیستم پیشهادی خان و همکاران (28) که یک سیستم چهار امتیازی می‌باشد، به طور روزانه ثبت شد. نمره یک مدفوع سفت و لوله‌ای، نمره دو مدفوع کمی شل و کپه‌ای، نمره سه مدفوع شل و جاری بر روی زمین و نمره چهار به مدفوع آبکی و مایع‌مانند اختصاص یافت. برای تعیین افزایش وزن و عملکرد گوساله‌ها در روزهای صفر (روز قبل از شروع پژوهش)، 5، 10، 15، 20 و 25 (پایان تحقیق)، وزن‌کشی انجام شد. قابلیت هضم ماده خشک نیز با روش استفاده از مارکر (خاکستر نامحلول در اسید[1]) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، سه روز انتهایی تحقیق (روزهای 23، 24 و 25) نمونه‌های مدفوع تیمارها جمع‌آوری و مجزا به صورت هوا خشک، خشک گردیدند و 24 ساعت نیز در آون با دمای 60 درجه سانتی‌گراد برای خشک شدن به طور کامل قرار داده شدند و تا زمان انجام آزمایشات در محیطی سرد نگهداری شدند. برای تعیین قابلیت هضم، از روش ون‌کولن و یانگ (51) استفاده شد.

برای تعیین فراسنجه‌های خونی روز قبل از شروع دوره و روز پایانی 2 ساعت بعد از وعده شیر مصرفی صبح، تقریبا 5 میلی‌لیتر خون از سیاهرگ وداج گرفته شد و 2 میلی‌لیتر آن به لوله‌های حاوی محلول EDTA انتقال داده شد و برای آزمایش‌های هماتولوژی منظور شد و 3 میلی‌لیتر آن داخل لوله‌های فاقد ماده ضد انعقاد جهت تهیه سرم و آزمایش‌های بیوشیمیایی انتقال داده شد و بلافاصله در داخل یخ به آزمایشگاه انتقال یافت. گلوکز، آلبومین، پروتئین کل سرم، تری‌گلیسیرید و کلسترول فاکتورهای بیوشیمیایی مورد اندازه‌گیری بوده و پارامترهای خون‌شناختی از جمله گلبول‌های سفید خون، نوتروفیل، ائوزینوفیل، لمفوسیت و مونوسیت اندازه‌گیری شد و گلبول‌های قرمز خون، هموگلوبین، هماتوکریت، حجم متوسط گلبول‌های قرمز، میانگین هموگلوبین سلولی و میانگین غلظت هموگلوبین سلولی نیز تعیین گردید.

به منظور بررسی میزان باکتری‌های *اشریشیاکولای*، *لاکتوباسیل* و کل باکتری‌های هوازی در مدفوع گوساله‌ها و انجام کشت های باکتریایی تعداد 48 نمونه مدفوع در طی سه مرحله، در روزهای 1، 13 و 25 توسط سواب استریل با تحریک رکتوم از مقعد گوساله تهیه شد و داخل ظروف استریل مخصوص قرار داده شد و در دمای 20- درجه سانتی‌گراد تا زمان کشت نگهداری شدند. قبل از شروع کشت نمونه مدفوع یخ زده به مدت 10 ساعت در دمای 4 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، و سپس 1 گرم از مدفوع را وزن کرده و بعد از انجام رقیق‌سازی‌های لازم (رقت 10^{-1} تا 10^{-8}) بر روی محیط کشت‌های اختصاصی کشت داده شد. کشت کلی‌فرم‌ها و به طور شاخص *اشریشیاکلای* در محیط مکانکی آگار، *لاکتوباسیل‌ها* در محیط MRS آگار و باکتری‌های هوازی کل در محیط Plate Count Agar انجام شد. و بعد از انکوباتورگذاری در دمای 37 درجه سانتی‌گراد برای مدت زمان 24 تا 48 ساعت (بسته به باکتری مورد نظر) کلنی‌ها شمارش شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش از طرح آزمایشی کاملا تصادفی با 4 تیمار آزمایشی و 4 تکرار در هر تیمار استفاده شد. نرم‌افزار مورد استفاده نرم‌افزار SAS(42) ویرایش 9/1 بود. تجزیه و تحلیل داده‌هایی که در طی دوره تکرار شده بودند، مانند فراستجه‌های خونی، کشت‌های میکروبی و مصرف خوراک، مصرف آب، افزایش وزن و اسکور مدفوع با روش اندازه‌گیری مکرر در زمان و رویه MIXED انجام شد و مقایسه میانگین‌های حداقل مربعات نیز با آزمون توکی و در سطح معنی‌داری 5 درصد انجام گرفت. برای بقیه موارد نیز از رویه GLM و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام گرفت. برای یکسان‌سازی داده‌های مربوط به کشت میکروبی نیز از فرمول Log(x+1) استفاده شد (37).

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی گیاهان

ماده خشک سه گیاه به ترتیب 92/70، 93/25 و 94/01 درصد، پروتئین خام 8/57، 20/47 و 17/32 درصد و چربی خام هر گیاه به ترتیب 3/20، 2/15 و 2/50 درصد بود (جدول 2). سلامت (41) میزان ماده خشک گیاه کاکوتی را 1/84± 88/30 درصد و پروتئین خام آن را 3/80± 8/11 درصد گزارش نمود.

ویژگی‌های عملکردی

اثر تیمارهای آزمایشی بر عملکرد در طی دوره آزمایشی در جدول 3 نشان داده شده است. نتایج در مورد مصرف خوراک نشان داد که افزودن پودر گیاهان کاکوتی، نعنا و پونه مصرف استارتر در کل دوره را تحت تاثیر قرار نداد، با این وجود در تیمار کاکوتی مصرف استارتر بیشتر از شاهد، و در تیمار نعنا و پونه مصرف کل استارتر کمتر از گروه شاهد بود ولی اختلاف آن‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. کل ماده خشک مصرفی (ماده خشک شیر+ گیاهان افزودنی+ کنسانتره) تحت تاثیر افزودن تیمارهای آزمایشی در سطح آماری 5 درصد قرار گرفت.

1-AIA: Acid insoluble ash

جدول 2- ترکیبات شیمیایی گیاهان کاکوتی، نعنا و پونه

Table2- Chemical composition of *Ziziphora clinopodioides*, Mentha spicata and Mentha pulegium

ترکیب شیمیایی (%) Chemical compound (%)	Medicinal Herbs گیاهان دارویی		
	کاکوتی *Ziziphora clinopodioides*	نعنا *Mentha spicata*	پونه *Mentha pulegium*
ماده خشک Dry Matter	92.70	93.25	94.01
پروتئین خام Crude protein	8.94	20.66	17.73
چربی خام Ether Extract	3.20	2.15	2.50

کل ماده خشک مصرفی در تیمار کاکوتی بیشتر از سایر تیمارها بوده و تفاوت بین مصرف کل ماده خشک در تیمار کاکوتی با شاهد معنی‌دار بود (P<0/05)؛ و در تیمارهای نعنا و پونه با وجود افزایش، تفاوت معنی‌داری با تیمارهای شاهد و کاکوتی نداشتند. تاکنون گزارشی مبنی بر استفاده از پودر گیاهان کاکوتی، نعنا و پونه در شیر مصرفی گوساله‌های شیرخوار منتشر نشده است با این حال مطالعاتی در زمینه استفاده از اسانس و ترکیب روغن‌های ضروری برخی از گیاهان دارویی از جمله خانواده نعنا انجام شده است. کانگ و همکاران (29) بیان کردند که افزودن اسانس‌های گیاهی به جیره گاوهای شیری، سبب بالا رفتن میزان ماده خشک مصرفی نسبت به گروه شاهد می‌گردد. بنچار و همکاران (7) با افزودن مخلوط اسانسی به جیره گاوهای شیری هیچ تغییری در مصرف ماده خشک روزانه مشاهده ننمودند. ابابکری و همکاران (1) در مطالعه‌ای اثر استفاده از گیاه نعنا در کنسانتره گوساله‌های شیرخوار بررسی کردند، آن‌ها گزارش کردند میزان ماده خشک مصرفی تحت تاثیر قرار نگرفت که با نتایج این مطالعه همخوانی دارد. هم‌چنین در تحقیقی دیگر افزودن گیاه نعنا فلفلی به مقدار 110 میلی‌گرم در کیلوگرم میزان ماده خشک مصرفی روزانه را نسبت به تیمار آزمایشی شاهد کاهش داده است (26) که مشاهدات پژوهش حاضر در مورد مصرف خوراک تیمارهای نعنا و پونه، نتایج تحقیق قبل را تایید می‌کند (اگرچه این کاهش بین تیمارهای نعنا و پونه با شاهد معنی‌دار نیست). سلطان (47) گزارش کرد که استفاده از مخلوط روغن‌های اسانس‌دار در سطوح بالا در جایگزین شیر گوساله‌ها، اندکی اشتهای آن‌ها را نسبت به سطوح پایین افزایش می‌دهد و کارلوتو و همکاران (12) علت تاثیر اسانس‌ها را بر تحریک اشتهای گوساله‌ها به میزان زیادی به رایحه‌ی تولیدی آن‌ها و تمایل دام به این رایحه می‌دانند؛ علت افزایش مصرف استارتر در تیمار کاکوتی را می‌توان به عطر و رایحه بیشتر این گیاه نسبت به سایر تیمارها ارتباط داد. و کاهش مصرف در تیمارهای نعنا و پونه با وجود عدم معنی‌داری نسبت به شاهد را در ماهیت ماده طعم‌دهنده‌ی آن‌ها دانست.

گیاه کاکوتی، نعنا و پونه تیمارهای آزمایشی بر میزان افزایش وزن روزانه، ضریب تبدیل در گوساله‌ها اثر معنی‌داری نداشته و اختلافی بین تیمارها مشاهده نشد. چاوز و همکارانش (14، 15) نیز اثر معنی‌داری بر افزایش وزن و ضریب‌تبدیل بره‌های پرواری تغذیه‌شده با اسانس‌های گیاهی مشاهده نکردند.

قابلیت هضم ماده خشک در گوساله‌های تغذیه شده با تیمار حاوی گیاهان کاکوتی، نعنا و پونه به شیر نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت و بین شاهد با تیمارهای کاکوتی و نعنا اختلاف معنی‌داری (P<0/05) مشاهده شد (قابلیت هضم برای تیمارهای کاکوتی، نعنا، پونه و شاهد به ترتیب 751/2، 769/6، 805/4 و 843/6 گرم بر کیلوگرم است). هوسودا و همکاران (25) گزارش کردند که افزودن نعنا به جیره گاوهای شیرده سبب کاهش قابلیت هضم مواد مغذی شد که نتایج به دست آمده در این مطالعه را تایید می‌کند. بنچار و همکاران (7) با افزودن مخلوط اسانسی به جیره گاوهای شیری هیچ تغییری در قابلیت هضم ظاهری ماده آلی مشاهده ننمودند. سلامت (41) در مطالعه خود که به بررسی تاثیر گیاه کاکوتی بر قابلیت هضم ماده خشک جیره و جمعیت میکروبی شکمبه گوسفند دالاق پرداخته بود، اثر معنی‌داری بر قابلیت هضم ماده خشک مشاهده نکرد.

به طور کل، افزایش وزن روزانه به مقدار کل ماده خشک مصرفی و قابلیت هضم وابسته می‌باشد. در این‌جا با وجود افزایش ماده خشک مصرفی در تیمارهای کاکوتی، نعنا و پونه (که به دلیل ماده خشک گیاهان مورد استفاده بوده است) نسبت به شاهد، اما چون قابلیت هضم کاهش داشته، افزودن گیاهان به شیر تاثیر معنی‌داری بر افزایش وزن گوساله‌ها نداشته است. از طرفی با دریافت مواد ضدمیکروبی موجود در گیاهان، احتمالا علاوه بر میکروب‌های مضر، میکروب‌های مفید نیز کاهش یافته و سبب کاهش هضم و جذب شده است که این امر می‌تواند دلیل کاهش قابلیت هضم و افزایش ضریب تبدیل غذایی باشد.

جدول 3- تاثیر استفاده از گیاهان کاکوتی، نعنا و پونه در شیر بر عملکرد گوساله‌های شیرخوار هلشتاین در یک دوره 25 روزه[1]

Table 3- Effect of *Ziziphora clinopodioides*, *Mentah spicata* and *Mentah pulegium* in milk on neonatal Holstein calves performance in a 25- day period[1]

ویژگی‌های عملکردی Functional characteristics	تیمارهای آزمایشی[2] Treatment[2]				SEM	P-value
	شاهد Control	کاکوتی *Ziziphora clinopodioides*	نعنا *Mentha spicata*	پونه *Mentha pulegium*		
میانگین مصرف روزانه استارتر (گرم ماده خشک) Daily consumption of estarter (g dry matter)	133.95^{ab}	137.26^{a}	127.59^{ab}	124.27^{b}	4.84	0.005
مصرف ماده خشک استارتر در کل دوره (کیلوگرم) Dry matter intake of estarter in the (Kg) period	3.35	3.43	3.19	3.11	0.09	0.31
کل ماده خشک مصرفی (کیلوگرم) Total dry matter intake (Kg)	19.40^{b}	20.04^{a}	19.78^{ab}	19.69^{ab}	0.10	0.008
وزن بدن ابتدای دوره (کیلوگرم) Initial body weight (Kg)	43.05	42.60	42.80	42.95	0.20	0.81
وزن بدن انتهای دوره (کیلوگرم) Final body weight (Kg)	50.25	50.00	49.42	49.82	0.28	0.77
میانگین افزایش وزن روزانه (گرم) Daily weight gain (g)	288	296	265	275	5.47	0.30
ضریب تبدیل Feed conversion ratio	2.69	2.70	2.98	2.86	0.05	0.10
قابلیت هضم (گرم بر کیلوگرم) Digestibility (g/Kg)	843.6^{a}	751.2^{b}	769.6^{b}	805.4^{ab}	13.26	0.04

[1]میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P< 0/05).

[2]تیمارهای آزمایشی عبارتند از: شاهد (شیر بدون افزودنی)، کاکوتی (افزودن 20 گرم پودر کاکوتی به شیر)، نعنا (افزودن 20 گرم پودر نعنا به شیر) و پونه (افزودن 20 گرم پودر پونه به شیر).

[1]Different letters in each row indicate significant differences at (P<0.05).

[2] Treatment trials consist of: Control (milk without additive), *Ziziphora clinopodioides* (add 20 g powder Ziziphora in milk), *Mentha spicata* (add 20 g powder Mint in milk) and *Mentha pulegium* (add 20 g powder Pennyroyal in milk)

مصرف آب

کل آب مصرفی و آب مصرفی روزانه گوساله‌های آزمایشی تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت و هر یک از افزودنی‌ها مصرف کل آب مصرفی را نسبت به شاهد افزایش دادند ولی در مورد تیمار کاکوتی این افزایش معنی‌دار (P<0/05) بود و بقیه گروه‌ها تفاوت چندانی با گروه شاهد نداشتند و به ترتیب در تیمارهای کاکوتی، پونه و نعنا بیشترین میزان مصرف آب نسبت به گروه شاهد مشاهده شد (جدول 4). و مصرف آب روزانه نیز نسبت به گروه شاهد بیشتر و اختلاف معنی‌دار بود (P<0/05). در مطالعه‌ای اثر اسانس شوید بر مصرف آب در گوساله‌های هلشتاین بررسی شد. اسانس شوید آب مصرفی گوساله‌ها را کاهش داد (44). به طور معمول وقتی مصرف خوراک افزایش می‌یابد، تمایل به مصرف آب نیز بیشتر می‌شود که این دلیل برای توجیه افزایش آب مصرفی تیمار کاکوتی قابل قبول است. همانطور که نورمند و همکاران (36) بیان کردند طعمی که این گیاهان در دهان و گلوی حیوان به موقع قورت‌دادن ایجاد می‌کنند می‌تواند سبب بالا رفتن مصرف خوراک و متعاقبا افزایش مصرف آب شود از طرفی با افزودن گیاهان به شیر، ماده خشک شیر بالا می‌رود و با انتقال این ماده خشک بیشتر به روده نیاز به آب در بدن بیشتر احساس می‌شود.

شاخص قوام مدفوع و روزهای ابتلا به اسهال

جدول 5 ابتلا به اسهال را در گوساله‌های هر تیمار نشان می‌دهد. اختلاف آماری معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی از نظر نمره قوام مدفوع و روزهای ابتلا به اسهال در گوساله‌ها مشاهده نشد. میانگین نمره قوام مدفوع در گوساله‌های تیمار پونه، نعنا و کاکوتی به ترتیب کمتر از تیمار شاهد بود (اسکور مدفوع برای تیمارهای پونه، نعنا و کاکوتی به ترتیب 1/18، 1/24، 1/28 و برای شاهد 1/32 اندازه‌گیری شد).

جدول 4- تاثیر استفاده از گیاهان کاکوتی، نعنا و پونه در شیر بر آب مصرفی گوساله‌های شیرخوار هلشتاین در یک دوره 25 روزه (لیتر)[1]

Table 4- Effect of *Ziziphora clinopodioides*, *Mentah spicata* and *Mentah pulegium* in milk on water intake neonatal Holstein calves on 25- day period (L)[1]

آب مصرفی (لیتر) Water intake (L)	تیمارهای آزمایشی[2] Treatment[2]				SEM	P-value
	شاهد Control	کاکوتی *Ziziphora clinopodioides*	نعنا *Mentha spicata*	پونه *Mentha pulegium*		
13 روز اول 13 Days	14.32^{c}	19.15^{a}	15.10^{c}	16.65^{b}	0.029	<0.0001
12 روز دوم 12 Days	23.17^{c}	26.35^{a}	24.52^{b}	24.90^{b}	0.025	<0.0001
مصرف کل Total consumption	37.50^{b}	45.50^{a}	9.62^{b}	41.55^{ab}	0.896	0.017
مصرف روزانه (لیتر در روز) Daily consumption(L/d)	1.50^{d}	1.82^{a}	1.58^{c}	1.66^{b}	0.028	<0.0001

[1]میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P< 0/05).

[2]تیمارهای آزمایشی عبارتند از: شاهد (شیر بدون افزودنی)، کاکوتی (افزودن 20 گرم پودر کاکوتی به شیر)، نعنا (افزودن 20 گرم پودر نعنا به شیر) و پونه (افزودن 20 گرم پودر پونه به شیر).

[1]Different letters in each row indicate significant differences at (P<0.05).

[2]Treatment trials consist of: Control (milk without additive), *Ziziphora clinopodioides* (add 20 g powder Ziziphora in milk), *Mentha spicata* (add 20 g powder Mint in milk) and *Mentha pulegium* (add 20 g powder Pennyroyal in milk)

در مطالعه‌ای ابابکری و همکاران (1) اثر استفاده از اسانس نعنا در تغذیه گوساله‌های شیرخوار را بررسی کردند. آن‌ها گزارش کردند که قوام مدفوع به طرز معنی‌داری افزایش یافت. اغلب اسهال‌هایی (افزایش آبکی شدن مدفوع) که در گوساله‌های شیرخوار رخ می‌دهد به دلیل افزایش مصرف ناگهانی شیر است که موجب تاثیرگذاری و ناپایداری فلورمیکروبی معده‌ای- روده‌ای گوساله شده و افزایش درجه قوام مدفوع را در پی دارد که در مرحله اول با متعادل کردن شیر داده شده به گوساله رفع می‌شود ولی گاه علت رخداد اسهال در گوساله‌های شیرخوار آلودگی میکروبی مانند آلودگی به Entrotoxicogenic E.Coli است که علاوه بر خروج مایعات و الکترولیت‌های بدن سبب تلفات فراوان نیز می‌شود (30). تحقیقات زیادی نشان داده که روغن‌های ضروری پونه دارای قدرت ضدباکتریایی در برابر میکروارگانیسم‌های مانند *اشریشیاکلای* هستند (50) و در علم پزشکی به عنوان دارویی برای درمان اسهال به کار برده می‌شود (36) البته تمامی گیاهان خانواده نعنا، دارای این ویژگی می‌باشند که همین دلایل می‌تواند علت کاهش نمره قوام مدفوع در تیمارهای پونه، نعنا و کاکوتی نسبت به تیمار شاهد باشد. به طورکل در همه تیمارها نمره قوام مدفوع کمتر از 2 می‌باشد که بنا بر بیان توماس و همکاران (51) در محدوده طبیعی تعیین شده برای گوساله‌های در حال رشد می‌باشد و نشان‌دهنده سلامتی و عدم ابتلای گوساله‌ها به اسهال است. تعداد روزهای ابتلا به اسهال در گوساله‌های تیمار پونه کمتر از سایر تیمارها بود. نتیجه گزارش شده توسط سلطان (47) که به بررسی اثر مخلوط اسانس‌های گیاهی در جیره گوساله‌های شیرخوار پرداخته بود نیز کاهش میزان وقوع اسهال و تعداد روزهای ابتلا به اسهال را نشان داد.

اثر تیمارهای آزمایشی بر متابولیت‌های شیمیایی خون

جدول 6، نتایج اندازه‌گیری تغییرات خون‌شناختی گلبول‌های قرمز (هموگلوبین، هماتوکریت، حجم متوسط گلبول‌های قرمز، میانگین هموگلوبین سلولی و میانگین غلظت هموگلوبین سلولی) و گلبول‌های سفید (نوتروفیل، ائوزینوفیل، لمفوسیت و مونوسیت) و تغییرات مقادیر پروتئین تام، آلبومین، گلوکز، تری‌گلیسیرید و کلسترول پلاسما را در ابتدا و انتهای دوره نشان می‌دهند. تیمارهای آزمایشی بر هیچ‌یک از فراسنجه‌های اندازه‌گیری شده تاثیری نداشتند و اختلافات معنی‌دار نبود. میزان هموگلوبین خون گوساله‌های تیمار نعنا نسبت به سایر تیمارها افزایش بیشتری داشت، اما این اختلاف معنی‌دار نبود.

سلامت (41) نشان دادند که مصرف کاکوتی با سطوح مختلف هیچ تاثیری بر فراسنجه‌های خون در گوسفندان نداشته است. در پژوهش تاسول و شاور (49) روی اثر مخلوطی از اسانس‌های گیاهی بر عملکرد گاوهای شیری، اثر معنی‌داری بر گلوکز خون مشاهده نشد. در مطالعه‌ای که بوسیله هوسودا و همکاران (26) روی اثر اسانس‌های گیاهی بر متابولیت‌های خون در گاوهای پرواری صورت گرفت، غلظت متابولیت‌های خون از جمله گلوکز، تری‌گلیسیرید و پروتئین تام تغییر معنی‌داری نشان ندادند ولی کلسترول خون تیمارهای دریافت کننده اسانس‌های گیاهی نسبت به گروه شاهد بیشتر بود. در پژوهش یانگ و همکاران (55) استفاده از اسانس‌های گیاهی (سینمالدهید) در تغذیه گاوهای پرواری بر غلظت گلوکز و تری‌گلیسیرید پلاسما اثر معنی‌داری نداشت.

جدول 5- تاثیر استفاده از گیاهان کاکوتی، نعنا و پونه در شیر بر نمره قوام مدفوع و روزهای ابتلا به اسهال در گوساله‌های شیرخوار هلشتاین در یک دوره 25 روزه[1]

Table 5- Effect of *Ziziphora clinopodioides*, *Mentah spicata* and *Mentah pulegium* in milk fecal consistency score and days of suckling diarrhea in neonatal Holstein calves on 25- day period[1]

وضعیت مدفوع و اسهال Fecal and diarrhea conditions	تیمارهای آزمایشی[2] Treatment[2]				P-value	SEM
	شاهد Control	کاکوتی *Ziziphora clinopodioides*	نعنا *Mentha spicata*	پونه *Mentha pulegium*		
اسکورمدفوع (درجه قوام مدفوع) Fecal score (degrees fecal consistency)	1.32	1.28	1.24	1.18	0.03	0.28
تعداد گوساله‌های مبتلا به اسهال The number of calves with diarrhea	3	4	3	2	NS	NS
میانگین روزهای ابتلا به اسهال Average days of diarrhea	1.00	1.50	1.25	0.75	0.2	0.58

[1] میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P< 0/05).

[2] تیمارهای آزمایشی عبارتند از: شاهد (شیر بدون افزودنی)، کاکوتی(افزودن 20 گرم پودر کاکوتی به شیر)، نعنا(افزودن 20 گرم پودر نعنا به شیر) و پونه(افزودن 20 گرم پودر پونه به شیر).

[1] Different letters in each row indicate significant differences at (P<0.05).

[2] Treatment trials consist of: Control (milk without additive), *Ziziphora clinopodioides* (add 20 g powder Ziziphora in milk), *Mentha spicata* (add 20 g powder Mint in milk) and *Mentha pulegium* (add 20 g powder Pennyroyal in milk)

باکتری‌های مدفوع و کشت‌های میکروبی

افزودن تیمارهای آزمایشی منجر به کاهش (P<0/05) فراوانی *اشریشیاکولای* و *لاکتوباسیل‌ها* در مدفوع گوساله‌ها شد ولی تاثیر معنی‌داری بر فراوانی باکتری‌های هوازی کل نداشت (جدول 7). به جز گوساله‌های تیمار شاهد که با افزایش سن، افزایش میزان *اشریشیاکولای* را نشان دادند بقیه تیمارها سیر کاهشی را نشان دادند که این کاهش می‌تواند به دلیل خاصیت ضدمیکروبی گیاهان استفاده شده باشد. *لاکتوباسیل‌ها* در تیمار شاهد و نعنا ابتدا کاهش و سپس افزایش را نشان می‌دهد و دو تیمار کاکوتی و پونه از ابتدای طرح تا انتها سیر نزولی دارند؛ و جمعیت کل باکتری‌های هوازی برای همه تیمارها در هر سه مرحله نمونه‌برداری تقریبا نزدیک بهم و یکسان بوده است. نتایج نشان می‌دهد که اثر زمان بر جمعیت میکروبی مدفوع معنی‌دار بوده و اثرمتقابل تیمار و زمان فقط در مورد اشریشیاکولای تاثیری معنی‌دار (P<0/05) داشته است.

اشریشیاکولای باکتری گرم‌منفی بوده و *لاکتوباسیل‌ها* گرم‌مثبت هستند؛ بررسی‌های مختلف نشان داده اگرچه روغن‌های ضروری و ترکیبات فرار گیاهان دارویی طیف گسترده‌ای از فعالیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی را دارند (18)، اما باکتری‌های گرم‌مثبت نسبت به باکتری‌های گرم‌منفی حساسیت بیشتری نشان می‌دهند (46) که علت آن، آب‌گریز بودن غشای باکتری‌های گرم‌مثبت است؛ بنابراین دلیل کاهش *لاکتوباسیل‌ها* در تیمار کاکوتی، پونه و نعنا می‌تواند همین امر باشد. از طرفی در مجموع میزان باکتری بیماری‌زای *اشریشیاکلای* در تیمارهای کاکوتی، نعنا و پونه کاهش داشته است که در مورد مکانسیم اسانس های گیاهان دارویی در از بین بردن باکتری‌های بیماری‌زا چنین اظهار شده است که یکی از ویژگی‌های مهم ترکیبات گیاهان دارویی خاصیت آب‌گریزی آن‌ها است که سبب می‌شود در بخش‌های لیپیدی دیواره سلولی و میتوکندریایی باکتری توزیع شده و موجب تغییر و تخریب ساختمان و نفوذپذیری آن‌ها گردد (45). به دنبال آن بخش زیادی از یون‌ها و دیگر محتویات حیاتی سلول به بیرون تراوش کرده و در نهایت موجب مرگ باکتری می‌شود (13). همچنین این ترکیب‌ها قادر به ایجاد اختلال در عملکرد آنزیم‌های متصل به غشای سلولی بوده که نهایتا منجر به ایجاد نقص در سنتز بسیاری از ترکیب‌های پلی‌ساکاریدی دیواره سلولی و ممانعت از رشد سلول و مورفوژنز آن خواهد شد (22). پس با وجود اینکه کپسول خارجی باکتری‌های گرم‌منفی، آن‌ها را در مقابل روغن‌های اسانسی محافظت می‌کند (27)، ولی غشای آن‌ها کاملا نفوذناپذیر نبوده و روغن‌های اسانسی به کمک ناقل‌های ویژه‌ای از غشا می‌گذرند (7). بنابراین فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها را با توجه به گروه‌های متفاوت اجزاء شیمیایی آن‌ها (تیمول، پولگون، کارواکرول، منتول، کاروون، منتون و غیره)، و وجود چندین هدف در سلول، نمی‌توان فقط به یک مکانیسم ویژه نسبت داد (13). نحوه عمل اسانس‌ها مشابه دیگر ترکیبات فنولیک بوده و با مکانیسم‌هایی از جمله، بروز اختلال غشاء سیتوپلاسمی (18)، و افزایش قابلیت نفوذ و تراوش اجزای سیتوپلاسمی (13)، اختلال در جریان الکترون، انعقاد محتویات سلولی (9) و اختلال در انتقال فعال علیه سلول میکروارگانیسم عمل می‌کنند.

جدول ٦- تاثیر تیمارهای آزمایشی بر پارامترهای خون گوساله‌های شیرخوار هلشتاین تغذیه شده با شیر حاوی کاکوتی، نعنا و گونه در یک دوره ۲۵ روزه

Table 6- The effect of treatments on blood parameters in neonatal Holstein calves fed milk containing *Ziziphora clinopodioides*, *Mentha spicata* and *Mentha pulegium* on 25- day period

تیمارهای آزمایشی[1] Treatment	تغییرات پارامترهای خون‌شناختی گلبول‌های قرمز changes in blood parameters of red blood cells					تغییرات پارامترهای خون‌شناختی گلبول‌های سفید changes in blood parameters of white blood cells					تغییرات پروتئین تام، آلبومین، گلوکز، تری‌گلیسیرید و کلسترول خون Changes in total protein, albumin, glucose, triglycerides and cholesterol				
	پارامتر Parameter	ابتدا Initial	انتها Final	SEM	P-value	پارامتر Parameter	ابتدا Initial	انتها Final	SEM	P-value	پارامتر Parameter	ابتدا Initial	انتها Final	SEM	P-value
Control	گلبول قرمز RBC (M/µl)	5.33	6.91	0.30	0.64	گلبول سفید WBC (K/µl)	7.72	9.20	0.42	0.84	پروتئین تام Total protein (g/dl)	7.47	6.65	0.08	0.16
Ziziphora clinopodioides		5.46	5.46				7.82	9.42				7.52	6.72		
Mentha spicata		6.58	7.08				8.60	9.25				7.42	6.47		
Mentha pulegium		5.38	5.62				6.27	9.05				7.47	6.82		
Control	هموگلوبین HGB (g/dl)	8.35	9.15	0.45	0.75	نوتروفیل NEUTROPHILS (%)	29.50	30.00	1.05	0.58	آلبومین Albumin (g/dl)	2.95	3.17	0.03	0.31
Ziziphora clinopodioides		8.52	9.62				29.25	28.00				2.95	3.27		
Mentha spicata		8.75	10.97				34.25	30.75				2.85	3.10		
Mentha pulegium		7.57	8.32				27.25	28.75				2.82	3.07		
Control	هماتوکریت HCT (%)	19.42	18.30	1.25	0.91	ائوزینوفیل EOSINOPHILS (%)	2.25	1.75	0.16	0.82	گلوکز Glucose (mg/dl)	82.75	54.25	2.56	0.38
Ziziphora clinopodioides		20.02	19.87				1.50	2.25				75.50	49.50		
Mentha spicata		23.95	20.30				2.25	1.75				78.00	55.75		
Mentha pulegium		22.10	21.50				2.25	2.25				78.50	51.75		
Control	حجم متوسط گلبول قرمز MCV (fl)	35.25	31.50	0.74	0.08	لمفوسیت LYMPHOCYTES (%)	64.75	58.25	1.31	0.44	تری‌گلیسیرید Triglyceride (mg/dl)	36.75	38.00	1.12	0.45
Ziziphora clinopodioides		35.25	32.75				68.75	59.25				37.50	44.75		
Mentha spicata		40.75	37.00				64.25	56.25				37.25	39.85		
Mentha pulegium		35.00	31.75				61.75	52.75				44.50	42.42		
Control	میانگین هموگلوبین سلولی MCH (Pg)	15.87	17.00	0.27	0.28	مونوسیت MONOCYTES (%)	3.25	11.50	0.70	0.15	کلسترول Cholesterol (mg/dl)	68.75	115.75	4.45	0.52
Ziziphora clinopodioides		14.85	16.32				2.25	8.75				72.50	123.00		
Mentha spicata		14.80	16.17				3.00	9.00				79.50	122.75		
Mentha pulegium		14.25	14.95				3.25	11.00				72.50	118.25		
Control	میانگین غلظت هموگلوبین سلولی MCHC (g/dl)	41.80	49.32	1.67	0.45										
Ziziphora clinopodioides		43.12	48.72												
Mentha spicata		36.32	44.00												
Mentha pulegium		38.42	43.72												

[1] تیمارهای آزمایشی عبارتند از: شاهد (شیر بدون افزودنی)، کاکوتی (افزودن ۲۰ گرم پودر کاکوتی به شیر)، نعنا (افزودن ۲۰ گرم پودر نعنا به شیر) و پونه (افزودن ۲۰ گرم پودر پونه به شیر)

[1] Treatment trials consist of: Control (milk without additive), *Ziziphora clinopodioides* (add 20 g powder Ziziphora in milk), *Mentha spicata* (add 20 g powder Mint in milk) and *Mentha pulegium* (add 20 g powder Pennyroyal in milk)

جدول 7- مقایسه کشت های میکروبی مدفوع گوساله‌های شیرخوار هلشتاین تغذیه شده با شیر حاوی کاکوتی، نعنا و گونه از نظر میزان اشریشیاکولای، لاکتوباسیل‌ها و کل باکتری‌های هوازی در یک دوره 25 روزه[1]

Table 7- Comparison of fecal bacteria cultures in neonatal Holestein calves fed milk containing *Ziziphora clinopodioides*, *Mentha spicata* and *Mentha pulegium* on the amount Escherichia coli, Lactobacillus and total aerobic bacteria on 25- day period[1]

گونه باکتریایی Species of bacteria	تیمارهای آزمایشی2 Treatment[2]				SEM	P-value		
	شاهد Control	کاکوتی *Ziziphora clinopodioides*	نعنا *Mentha spicata*	پونه *Mentha pulegium*		تیمار Treatment	زمان Time	تیمار*زمان Treatment*time
			Escherichia coli	*اشریشیاکولای*				
روز 1 Day 1	3.80^{B}	5.54^{A}	4.59^{A}	4.72^{A}				
روز 13 Day 13	4.46$^{a/AB}$	2.98$^{b/B}$	3.53$^{ab/B}$	3.04$^{ab/B}$	0.21	<.0001	0.01	0.01
روز 25 Day 25	4.86$^{a/A}$	2.03$^{b/B}$	3.75$^{ab/B}$	3.19$^{ab/B}$				
			Lactobacillus	*لاکتوباسیل*				
روز 1 Day 1	6.20	6.42^{A}	5.55	5.51				
روز 13 Day 13	5.64	5.44^{AB}	4.35	4.99	0.15	0.005	0.02	0.35
روز 25 Day 25	6.38^{a}	4.80$^{b/B}$	4.42^{b}	4.29^{b}				
			Total aerobic bacteria	باکتری‌های هوازی کل				
روز 1 Day 1	6.32^{A}	5.82^{A}	6.83^{A}	6.40				
روز 13 Day 13	5.76^{AB}	4.85^{AB}	5.74^{B}	5.97	0.14	0.1	0.01	0.9
روز 25 Day 25	5.50^{B}	4.48^{B}	5.59^{B}	5.35				

[1] حروف متفاوت کوچک در هر سطر نشان‌دهنده تفاوت بین تیمارها و حروف بزرگ در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت اثر زمان در هر تیمار در سطح معنی‌داری 5 درصد می‌باشد.

[2] تیمارهای آزمایشی عبارتند از: شاهد (شیر بدون افزودنی)، کاکوتی(افزودن 20 گرم پودر کاکوتی به شیر)، نعنا(افزودن 20 گرم پودر نعنا به شیر) و پونه(افزودن 20 گرم پودر پونه به شیر).

[1] Different little letters in each row indicate difference between treatments and large letters in each column indicate difference effect time in each treatment ($P<0.05$).

[2] Treatment trials consist of: Control (milk without additive), *Ziziphora clinopodioides* (add 20 g powder Ziziphora in milk), *Mentha spicata* (add 20 g powder Mint in milk) and *Mentha pulegium* (add 20 g powder Pennyroyal in milk)

در مورد نحوه عمل اسانس‌ها بر مرگ باکتری‌ها چنین اظهار شده است که متابولیت‌های فنلی موجود در گیاهانی مانند نعنا، این توانایی را دارند که یک هیدروژن از گروه هیدروکسیل موجود در حلقه آروماتیک خود رها ساخته و سبب اکسیداسیون رادیکال‌های آزاد چربی‌ها و سایر بیومولکول‌های غشای سلولی و تخریب آن شوند و به این نحو، خاصیت ضدمیکروبی خود را اعمال می‌کنند (48). خاصیت ضدمیکروبی روغن‌های ضروری در خانواده نعنا را می‌توان به دلیل وجود گروه‌های پولگون، منتون و نئومنتون دانست، زیرا می‌توانند با تغییر نفوذپذیری غشاء سلولی و تخریب دیواره باکتریایی سبب درهم گسیختن ساختار لایه‌های مختلف پلی‌ساکارید، اسیدهای چرب و فسفولیپیدهای غشای باکتری و مرگ آن شوند (50).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که گیاهان کاکوتی، نعنا و پونه بر مصرف روزانه استارتر، کل ماده خشک مصرفی و مصرف آب گوساله‌های شیرخوار تاثیر داشت، به طوریکه افزودن پونه سبب کاهش مصرف استارتر به طور روزانه شده، و افزودن کاکوتی کل ماده خشک مصرفی را افزایش داد و آب مصرفی نیز در تیمار کاکوتی به طرز معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان داد. افزایش وزن روزانه از نظر عددی در تیمار کاکوتی بیشترین میزان و کمترین مقدار ضریب‌تبدیل به لحاظ عددی به تیمار شاهد اختصاص یافت. اسکور مدفوع، تعداد گوساله‌های مبتلا به اسهال و میانگین روزهای درگیری گوساله‌ها به اسهال در بین تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان ندادند.

تیمارهای کاکوتی و نعنا سبب کاهش قابلیت هضم ماده خشک شدند. اختلاف قابل توجهی بین تیمارها در رابطه با فراسنجه‌های خونی مشاهده نشد. در وسط و انتهای دوره تعداد *اشریشیاکولای* در تیمارهای کاکوتی، نعنا و پونه کمتر از شاهد بود و تعداد *لاکتوباسیل‌ها در انتهای دوره* به طور معنی‌داری در تیمارهای حاوی افزودنی نسبت به گروه شاهد، کاهش نشان دادند.

منابع

1- Ababakri, R., A. Riasi., M. H. Fathi., H. Naeemipoor., S. Khorsandi. 2012. The effect of *spearmint sativum* essence added to starter diet on ruminal fermentation, weaning age and performance of Holstein calves. Iranian Journal of Animal Science Research, 22: 57- 68. (In Persian).
2- Abaza, I. M., M. A. Shehata., M. H. Shoieb., I. I. Hassan. 2008. Evaluation of some natural Feed addetive in growing chicks' diets. Journal of Poultry Science, 7(9): 872-879.
3- Alçiçek, A., M. Bozkurt., M. Çabuk. 2003. The effect of an essential oil combination derived from selected herbs growing wild in Turkey on broiler performance. South African Journal of Animal Science, 33: 89-94.
4- AOAC International. 2000. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th edn. AOAC International, Gaithersburg, Maryland.
5- Bampidis, V. B., V. Christodoulou., P. Florou-Paneri., E. Christaki., A. B. Spais., P. S. Chatzopouiou. 2005. Effect of dietary dried oregano leaves supplementation on performance and carcass characteristics of growing lambs. Journal of Animal Feed Science and Technology, 121: 285- 295.
6- Bampidis, V. B., V. Christodoulou., P. Florou-Paneri., E. Christaki. 2006. Effect of Dried Oregano Leaves versus Neomycin in Treating Newborn Calves. Journal of Veterinary Medicine, 53: 154-156.
7- Benchaar, C., H. V. Petit., R. Berthiaume., D. R. Ouellet., J. Chiquette., P. Y. Chouinard. 2007. Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. Journal of Dairy Science, 90: 886- 897.
8- Boukhebti, H., A. Chaker., H. Belhadj., F. Sahli., M. Ramdhani., H. Laouer., D. Harzallah. 2011. Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata*L. essential oils. Journal Der Pharmacia Lettre. 3: 267-275.
9- Burt, S., 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223–253.
10- Callaway, T. R., M. A. Carr., T. S. Edrington., R. Anderson., D. Nisbet. 2009. Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle: A review after 10 years. Journal of Current Issues in Molecular Biology, 11:67–79.
11- Calsamigilia, S., M. Busquet., P. W. Cardozo., L. Castillejos., A. Ferret. 2007. Invited review: Essential oil as modifiers of rumen microbial fermentation. Journal of Dairy Science, 90: 2580-2595.
12- Carlotto, S. B., C. J. Olive., J. Viegas., D. A. Stiles., A. M. Gabbi., K. D. Brustolin., P. S. Charao., G. Rossarolla., M. Ziech. 2006. Performance and behavior of dairy calves fed diets containing milk and citric flavor agents. Journal of Ciência e Agrotecnologia, 31: (3) 889-895.
13- Carson, C.F., B. J. Mee., T. V. Riley. 2002. Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. International Journal of Antimicrobial Agents, 46:1914-1920.
14- Chaves, A. V., K. Sanford., L. L. Gibson., T. A. McAllister., C. Benchaar. 2008. Effect of carvacrol and cinnamaldehyde on intake, rumen fermentation, growth performance and carcass characteristics of growing lambs. Journal of Animal Feed Science and Technology, 145: 396- 408.
15- Chaves, A. V., M. E. R. Dugan., K. Stanford., L. L. Gibson., J. M. Bystrom., T. A. McAllister., F. Van Herk., C. Benchaar. 2011. A dose-response of cinnamaldehyde supplementation on intake, ruminalfermentation, blood metabolites, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. Journal of Livestock Science and Technologies, 141: 213- 220.
16- Craig, W. J. 1999. Health-promoting properties of common herbs. The American Journal of Clinical Nutrition, 70: 491- 499.
17- De Feo, V., A. I. Ricciardi., D. Biscardi., F. Senatore. 1998. Chemical composition and antimicrobial screening of the essential oil of Minthostachys verticillate (Griseb) Ep1 (Lamiaceae). Journal of Essential Oil Research, 10(1): 61-65.
18- Dorman, H. J. D., and S. G. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Appl. Microbiol, 88: 308- 316.
19- European Parliament and Council. 2003. Regulation (EC) No.1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. Official Journal of the European Union, 268: 29- 43.
20- Tavakoli saberi, M. R., and M. R. Sedaghat. 2000. Medicinal plants. Tehran: rozbehan.

21- Ghorbani, R. 2009. Effect adding calves biogenic anti diarrhea soluble (CBAV) on performance and immune parameters in neonatal Holstein calves. Thesis MSC Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources. (In Persian).
22- Hammer, K. A., C. F. Carson., and T. V. Riley. 2004. Antifungal effects of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil and its components on Candida albicans, Candida glabrata and Saccharomyces cerevisiae. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 53: 1081-1085.
23- Hassanpour, H., R. Khavari-Nejad., V. Niknam., F. Najafi., and K. Razavi. 2012. Effects of penconazole and water deficit stress on physiological and antioxidative responses in pennyroyal (Mentha pulegium L.). Acta Physiologiae Plantarum, 34: 1537-1549.
24- Heinrichs, A. J., C. M. Jones., J. A. Elizonda-Salazar., and S. J. Terrill. 2009. Effects of a prebiotic supplement on health of neonatal dairy calves. Journal of Livestock Science and Technologies, 125: 149- 154.
25- Hosoda, K., T. Nishida., W. Y. Park., and B. Eruden. 2005. Influence of *Mentha×piperita* L. (peppermint) supplementation on nutrient digestibility and energy metabolism in lactating dairy cows. Asian Australasian Journal of Animal Sciences, 18: 1721- 1726.
26- Hosoda, K., K. Kuramoto., B. Eruden., T. Nishida., and S. Shioya. 2006. The Effects of Three Herbs as Feed Supplements on Blood Metabolites, Hormones, Antioxidant Activity, IgG Concentration, and Ruminal Fermentation in Holstein Steers. Journal of Animal Science, 19: 35- 41.
27- Jouany, J. P., and P. Morgavi. 2007. Use of 'natural' products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. Journal of Animal Science, 10: 1443- 1466.
28- Khan, M. A., H. J. Lee., H.S. Lee., H. S. Kim., S. B. Kim., K. S. Ki., S. J. Park., J. K. Ha., and Y. J. Choi. 2007. Starch source evaluation in calf starter: feed consumption, body weight gain, structural growth, and blood metabolites in Holstein calves. Journal of Dairy Science, 90: 5259- 5268.
29- Kung J. L., P. Williams., R. J. Schmidt., and W. Hu. 2008. A Blend of Essential Plant Oils Used as an Additive to Alter Silage Fermentation or Used as a Feed Additive for Lactating Dairy Cows. Journal of Dairy Science, 91: 4793- 4800.
30- Logan, E. F., and R. J. Bywater. 2002: The site and characteristics of intestinal water and electrolyte loss in Escherichia coli Induced diarrhea in calves. Journal of Comparative Pathology, 84: 599-610.
31- Mahboubi, M., and G. Haghi. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of Mentha pulegium L. Essential oil. Journal of Ethnopharmacology, 119: 325- 327.
32- Mohammadi, G. R., M. Mori., F. Hamidi., and M. Ghavami. 2004. Feild trial evaluation of kolbin RC (*Rotavirus,Coronavirus/Escherichia coli*) vaccine for prevention of neonatal calf diarrhea in dairy herd. Page 270-272. 11th international conference of the association of institutions for tropical veterinary medicine and 16th veterinary association malaysia congress, 23-27 August.
33- Naseriyan, A. A., M. Bashtani., B.Saremi., and A. R. Foroghi. 2005. Management, nutrition and breeding calve. Mashhad: ferdowsi.
34- Naylor, S. W., J. C. Low., T. E. Besser., A. Mahajan., G. J. Gunn., M. C. Pearce., I. J. McKendrick., D. G. E. Smith., and D. L. Gally. 2003. Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. Journal of Infection and Immunity, 71:1505–1512.
35- Nobakht, A., J. Norani., and A. Safamehr. 2011. The effects of different amounts of *Mentha pulegium L.* (pennyroyal) on performance, carcass traits, hematological and blood biochemical parameters of broilers. Journal of medicinal plant research, 5: 3763- 3768.
36- Normand, V., S. Avison., and A. Parker. 2004. Modeling the kinetics of flavour release during drinking. Journal of Chemical Senses, 29:235–245.
37- Quezada-Mendoza, V. C., A. J. Heinrichs., and C. M. Jones. 2011. The effects of a prebiotic supplement (Prebio Support) on fecal and salivary. Journal of Livestock Science, 142: 222- 228.
38- Rabah, B., T. Lograda., M. Ramdani., P. Chalard., and G. Feguiredo. 2013. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Ziziphora hispanica* L. Global J Res. Med. Plants and Indigen. Med, 2: 73-80.
39- Radostits, O. M., C. C. Gay., D. C. Blood., and K. W. Hinchcliff. 2000. Veterinary Medicine, 9th Edn. Harcout Publishers Ltd, London. 1417-1420.
40- Rangel, J. M. 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United states, 1982–2002. Emerging Infect. Dis. 11:603–609.
41- Salamat, A. 2014. The effect Ziziphora tenuior of ration dry matter digestibility, microbial population in the rumen and blood parameters Dalaq sheep. Thesis MSC. Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources. (In Persian).
42- SAS. 2003. SAS User's Guide Statistics. Version 9.1.3 Edition. SAS Inst., Inc., Cary NC.
43- Sada, A., T. Nishida., M. Ishida., K. Hosoda., E. Bayaru. 2003. Effect of peppermint feeding on the digestibility, ruminal fermentation and protozoa. International Journal of Livestock Production, 82:245-248.

44- Seyedalmoosavi. S. M. M., A. Riasi., H. Fathi Nasri., and H. Farhangfar. 2012. Effect of water delivery system and dill (*Anethum graveolens*) essence added to starter feed on weaning age, rumen fermentative condition and performance of Holstein calves. Iranian Journal of Animal Science Research, 23: 41- 55. (In Persian).
45- Sikkema, J., J. A. M. de Bont., and B. Poolman. 1995. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. American Society for Microbiology, 59: 201- 222.
46- Smith-Palmer, A., J. Atewart., and L. Fyfe. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Journal of Applied Microbiology, 26: 118- 122.
47- Soltan, M. A. 2009. Effect of essential oils supplementation on growth performance, nutrient digestibility, health condition of Holstein male calves during pre- and post- weaning periods. Pakistan Journal of Nutrition, 8: 642-652.
48- Strycharz, S., and K. Shetty. 2002. Peroxidase activity and phenolic content in elite clonal lines of Mentha pulegium in response to polymeric dye R-478 and Agrobacterium rhizogenes. Journal of Process Biochemistry, 37(8): 805- 812.
49- Tassoul, M. D., and R. D. Shaver. 2009. Effect of a mixture of supplemental dietary plant essential oils on performance of periparturient and early lactation dairy cows. Journal of Dairy Science, 92: 1734- 1740.
50- Teixeira, B., A. Marques., C. Ramos., I. Batista., C. Serrano., O. Matos., N. R. Neng., J. M. F. Nogueira., and J. Alexandre Saraiva., M. Leonor Nunes. 2012. European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. Journal of Industrial Crops and Products, 36: 81-87.
51- Thomas, L. C., T. C. Wright., A. Formusiak. J. P. Cant., and V. R. Osborne. 2007. Use of flavored drinking water in calves and lactating dairy cattle. Journal of Dairy Science, 90: 3831- 3837.
52- Vankeulan, J. V., and B. A. Young. 1977. Evaluation of acid- insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. Journal of Animal Science, 44: 282.
53- Walker, C., X. Shi., M. Sanderson., J. Sargeant., and T. G. Nagaraja. 2010. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in gut contents of beef cattle at slaughter. Journal of Foodborne Pathogens and Disease, 7:249–255.
54- Wenk, C. 2003. Growth promoter alternatives after the ban of antibiotios. Pig News and Information, 24: 11-16.
55- Yang, Z., B. N. Ametaj., C. Benchaar., M. L. He., and K.A. Beauchemin. 2009. Cinnamaldehyde in feedlot cattle diets: Intake, growth performance, carcass characteristics, and blood metabolites. Journal of Animal Science, 88:1082-1092.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 8, No. 1, Spring 2016, p. 57-71

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 8، شماره 1، بهار 1395، ص. 71-57

Effect of adding herbs (*Ziziphora clinopodioides, Mentha spicata and Mentha pulegium)* in milk on performance, blood metabolites and fecal microbial population on Holstein calves

N. Ghahhari[1]**- T. Ghoorchi**[2]***- S. A. Vakili**[3]

Received: 15-03-2015
Accepted: 05-09-2015

Introduction Many herbal products (herbs and essential oils) are currently used as feed additives by the feed industry in the European Union and elsewhere. These phytogenic substances which increase feed aroma or palatability of feeds are classified as sensory additives by European Council. However, several publications show that some essential oils may have beneficial effects on animal performance and health status because of other properties except their sensory characteristics. These claimed properties are stimulation of digestive secretions; antimicrobial, coccidiostat, anthelmintic, and anti-inflammatory activities; and antioxidant properties. Most research revealed that supplementing herbal essential oils to diets resulted in reducing blood cholesterol, increasing palatability of feed and stimulating the immune system in poultry, while different results obtained by ruminants because of rumen microbial population and ruminal fermentation conditions. The use of large and repeated quantities of antibiotics in animal feed may cause to eliminate beneficial intestinal microflora and innate immune system and subsequently cause to antibiotic resistance and remains antibiotics in animal products. Recently, many herbal products because having flavoring and antimicrobial properties as introduced as good alternatives for antibiotics. The aim of the present investigation was to study of effect of *Ziziphora clinopodioies*, *Mentha spicata* and *Mentha pulegium* on the performance of suckling calves, dry matter digestibility, blood parameters and the immune system, the effect on the incidence of diarrhea and fecal microbial population (*Escherichia coli*, lactobacillus and total aerobic bacteria).

Materials and Methods In the present study, extraction of essential oils from three plant species (*Ziziphora clinopodioies*, *Mentha spicata* and *Mentha pulegium*) by means of gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC–MS) were analyzed. In order to determine the chemical composition of plants used for food such as dry matter, crude protein and ether extracts, from conventional laboratory methods AOAC (2005) were used. sixteen Holstein calves with mean of 42.18± 0.71 Kg birth weight, aged 5± 3 day allocated to treats: 1) control (milk without additive), 2) milk contains powder *Ziziphora clinipodioides*, 3) milk contains powder *Mentha spicata*, 4) milk contains powder *Mentha pulegium*. The herbs added to milk in each treatment was 20 g daily. Duration the experimental period was 25 days. Dry matter intake, water intake and fecal score measured daily. Body weight monitored every 5 days, and blood sampling conducted twice, once one day before the start of the period (day zero) and once final day. Samples for culture prepared in three phases beginning, middle and end of the period.

Results and Discussion The major component in *Ziziphora clinopodioies* was pulegone (38.34%), major component in *Mentha spicata* and *Mentha pulegium* was carvone (61.93%) and piperitone oxide (43.09%), respectively. The dry matter of three plant, *Ziziphora clinopodioies*, *Mentha spicata* and *Mentha pulegium* were 92.70, 93.25 and 94.01, crude protein were 8.57, 20.47 and 17.32, and also ether extracts were 3.20, 2.15 and 2.50 percent, respectively. Based on the obtained results, adding of *Mentha pulegium* to milk reduces dry matter intake during starter period and total dry matter intake in treatment *Ziziphora clinopodioides* was significantly higher than treatment control. Calves treated with *Ziziphora clinopodioides*, *Mentha pulegium* and *Mentha spicata* consumed statistically more water than control group. Dry matter digestibility significantly decreased in treatments *Ziziphora clinopodioides* and *Menthe spicata* compared to control. Daily gain, feed conversion ratio, blood parameter and immune respones were not affected by treatment trials. There were no significant differences between treatments for fecal score and day of diarrhea. *Ziziphora clinopodioies*, *Mentha spicata* and *Mentha pulegium* significantly decreased *Escherichia coli* and *Lactobacillus* count in fecal compare to control,

1- MSc graduated of Animal and Poultry Nutrition of Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources,
2- Professor of Animal and Poultry Nutrition of Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources,
3- Associate Professor, Department of Animal Science, faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad.
(*-Corresponding author email: ghoorchit@yahoo.com)

but they had no significantly effect on total number of aerobic bacteria. The result showed that adding herbal to milk in neonatal calves have positive effect because of affecting on starter intake, consume water, fecal consistency score and intestinal microbial population.

Conclusion Plant-derived essential oil may be a useful means to improve efficiency of nutrient utilization in ruminants and reduce the impact of their production on the environment. This study showed that the inclusion of *Ziziphora clinopodioies, Mentha spicata* and *Mentha pulegium* calves diet significantly improved the water intake and *Mentha spicata* and *Mentha pulegium* decreased dry matter intake. Escherichia coli and Lactobacillus reduction microbial population fecal calves represent the three species of the plant is antibacterial. However, further and more complete evaluations are required to establish the effect of herbal products in diets on the performance of animals.

Keywords: Blood parameters, *Escherichia coli*, Labiatae family, *lactobacillus*, Neonatal calve.