اثر تزریق درون تخم مرغی نانوذرات مس بر شاخص های تولیدی و پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی

حیدری میاندوآب، س.[۱]، نویدشاد، ب.*[۲]، هدایت ایوریق، ن.[۲]، میرزائی آقجه قشلاق، ف.[۲]، مهدوی، ع.[۳].

دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۱۸ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۱

خلاصه

آزمایش حاضر، با هدف بررسی اثر تزریق درون تخم مرغی نانو ذرات مس بر صفات تولیدی و پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی انجام گرفت. تخم مرغهای بارور از گله مرغ مادر سویه گوشتی راس ۳۰۸ تهیه شدند. تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از تیمار شاهد شامل تزریق یک میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک و تیمارهای تزریق سطوح ۵۰، ۷۵ یا ۱۰۰ ppm محلول نانو ذرات مس در محل اتاقک هوایی تخم مرغ در روز اول دوره جوجه‌کشی. مصرف خوراک روزانه و افزایش وزن روزانه در کل دوره در گروه ۱۰۰ppm بالاتر بود (P<۰/۰۵). ضریب تبدیل غذایی در بین تیمارهای مختلف در کل دوره تفاوتی نشان نداد. عیار پادتن علیه ویروس آنفولانزا و نیوکاسل توسط تیمارهای آزمایشی تحت تاثیر قرار نگرفت (P>۰/۰۵). کل گلبول‌های سفید و هتروفیل‌ها در جوجه‌های گوشتی در سن ۱۰ روزگی در گروه ۵۰ ppm نانو مس کاهش نشان داد (P<۰/۰۵)، در صورتی‌که در لنفوسیت‌های همین گروه (۵۰ ppm) افزایش معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵). کاهش خطی در سطح تری‌گلیسرید سرم با مصرف سطوح ۷۵ و ۵۰ ppm نانو ذرات مس در مقایسه با گروه شاهد مشاهده گردید (P< ۰/۰۵). سطح کلسترول و HDL سرم در گروه ۵۰ ppm نانو ذرات مس کمتر از گروه ۷۵ ppm نانو ذرات مس و نیز گروه شاهد بود (P< ۰/۰۵). سطح LDL سرم تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. نتایج تحقیق حاضر نشان دهنده اثر مثبت تزریق درون تخم مرغی نانو ذرات مس به ویژه در سطح ۵۰ ppm بر صفات تولیدی، سطح کلسترول و تری گلیسرید جوجه‌های تفریخ شده بود.

واژه های کلیدی: بازدهی تولیدی، تزریق درون تخم مرغی، جوجه گوشتی، سیستم ایمنی، نانو ذرات مس

۱،۲. گروه علوم دامی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

۳.گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

*نویسنده مسؤول: **bnavidshad@uma.ac.ir**

مقدمه

برخلاف جنین پستانداران، جنین پرندگان مقدار معینی از انرژی و مواد مغذی (به صورت ذخیره شده در تخم مرغ) برای رشد و تکامل در اختیار دارند (Henry، ۱۹۹۱). چند روز قبل و بعد از تفریخ یک دوره‌ی حیاتی برای رشد، توسعه و ماندگاری جوجه‌های گوشتی است. طی این دوره جوجه‌ها با تغییر شرایط متابولیکی و فیزیولوژیکی مواجه بوده به نحوی که از وضعیت وابستگی به مواد مغذی با منشأ داخلی، به حالت استفاده مستقل از مواد مغذی با منشأ خارجی منتقل می‌شوند. در انتهای مرحله جنینی، بیشتر ذخایر جوجه طی فرایند تفریخ مصرف می‌شود. حفظ حالت پایدار و بهینه تأمین مواد مغذی برای مراحل پایانی تکامل جنین، فرایند تفریخ و رشد پس از آن تا آغاز مصرف غذا در طیور اهمیت زیادی دارد (Uni و همکاران، ۲۰۰۵).

مس در ساخت هموگلوبین نقشی اساسی داشته و همچنین بخشی از پروتئین دیگر خون بنام اریتروکوپرین است که در اریتروسیت‌ها وجود دارد و برای سوخت و ساز اکسیژن مهم است. این عنصر همچنین در برخی سیستم‌های آنزیمی نظیر سیتوکروم اکسیداز که در فسفوریلاسیون اکسیداتیو مهم است، نقش دارد. مس همچنین در رنگیزه‌های خاص، مخصوصاً توراسین که یکی از رنگیزه های پر است، وجود دارد. مس در اغلب سلول‌های بدن وجود دارد و در کبد بیشتر متراکم است، به‌طوری‌که کبد محل اصلی ذخیره آن در بدن است (Leeson و Summers، ۲۰۰۱). آهن به شکل Fe^{++} جذب و به شکل Fe^{3+} منتقل می‌شود که این تبدیل آهن دو به سه ظرفیتی، به آنزیم فروکسیداز نیاز دارد که مس جزئی از این آنزیم است. مس همچنین برای تشکیل طبیعی استخوان و مخصوصاً تشکیل غضروف مهم است (Leeson و Summers، ۲۰۰۱). تغذیه جوجه‌های جوان با جیره با کمبود مس پس از دو تا چهار هفته باعث لنگش آنها می‌شود، همچنین استخوان‌ها ترد و به آسانی شکسته می‌شوند (Leeson و Summers، ۲۰۰۱). جوجه‌هایی که از مادرهای با کمبود مس متولد می‌شوند فاقد آنزیم آمین اکسیداز در آئورت و کبد هستند و اگر با جیره‌های با کمبود مس تغذیه شوند پس از چهار هفته این آنزیم در آنها یافت می‌گردد، اما جوجه‌هایی که مس کافی دریافت می‌کنند در سن سه روزگی وجود آنزیم آمین اکسیداز را به مقدار زیاد نشان می‌دهند (Leeson و Summers، ۲۰۰۱).

خصوصیات ضد باکتریایی و نیز تحریک کننده رشد نیز برای مس ذکر شده است (Pesti و Bakalli، ۱۹۹۶). مس اغلب در قالب سولفات مس به پیش مخلوط معدنی مورد استفاده جوجه‌های گوشتی اضافه می‌گردد و به دلیل دارا بودن خواص ضد باکتریایی، می‌تواند به عنوان جایگزینی برای آنتی بیوتیک‌ها نیز مطرح گردد و از اینرو، توجهات زیادی را در صنعت پرورش طیور معطوف به خود نموده است (Leeson و Summers، ۲۰۰۱). در مطالعه‌ای، مکمل نانوذرات کیتوزان حاوی مس عملکرد رشد و سیستم ایمنی را بهبود بخشید و همچنین سنتز پروتئین‌ها را افزایش داد و بر میکروفلور روده کور جوجه‌های گوشتی تاثیر مفیدی داشت (Wang و همکاران، ۲۰۱۱). اندازه کوچک، نسبت سطح به جرم بالا و واکنش پذیری زیاد از ویژگی‌های مهم ذرات نانو است که کاربردهای جدیدی برای آن‌ها ایجاد می‌کند. کاهش اندازه در مقایسه با ذرات بزرگتر، سطح واکنش نانو ذرات را به ازای واحد حجم افزایش می‌دهد و به مقدار زیادی تاثیر سدها را برای نفوذ ذرات به بدن و حرکت در بدن کاهش می‌دهد (Barlow و همکاران، ۲۰۰۹). بنابراین، به نظر می‌رسد که بتوان جذب مس را با استفاده از فناوری نانو افزایش داد. استفاده از ذرات نانو مس باعث افزایش سطح هتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها و بازوفیل‌ها شده و علاوه بر آن باعث کاهش غلظت گلوکز، کلسترول و افزایش سطح میکرومینرال‌هایی همچون کلسیم، فسفر و آهن خون شد (Mroczek-Sosnowska و همکاران، ۲۰۱۴).

اصطلاح تغذیه‌ی داخل تخم مرغی (*in ovo*) یا تغذیه‌ی جنینی به تأمین مواد مغذی مورد نیاز جنین‌های در حال رشد جوجه‌ها قبل از تفریخ اطلاق می‌گردد (Ferket و همکاران، ۲۰۰۵). در تحقیقی، اثرات نانو ذرات مس و سولفات مس به صورت تزریق داخل تخم مرغی بر ابقاء مس در عضله سینه، کبد و طحال جوجه‌های گوشتی مطالعه شد، که در کبد بیشترین ابقاء و در عضله سینه کمترین ابقاء مس ثبت گردید (Mroczek-Sosnowska و همکاران، ۲۰۱۴). اگرچه پیش از این گزارشاتی در مورد استفاده از ترکیبات نانو ذرات مس در جیره جوجه‌های گوشتی وجود دارد، اما موارد تزریق این ترکیبات در تخم مرغ معدود هستند. مطمئناً افزایش اطلاعات علمی در زمینه استفاده از نانو ذرات در تغذیه جنینی طیور می‌تواند مسیری جدید در زمینه بهبود بازدهی تولید صنعت طیور مهیا نماید. هدف از این آزمایش تعیین اثر نانو ذرات مس در حالت تزریق *in ovo* بر صفات تولیدی، پارامترهای بیوشیمیایی سرم و نیز سیستم ایمنی جوجه های گوشتی بود.

مواد و روش‌ها

در شروع آزمایش، تخم مرغهای بارور از گله مرغ مادر سویه گوشتی راس ۳۰۸ در سن ۴۶ هفتگی، با میانگین وزنی ۱/۷±۶۲/۹ گرم، تهیه شدند. تیمارها به چهار گروه شامل گروه با تزریق یک میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک و گروه‌های با تزریق محلول نانو ذرات مس در

دزهای ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ ppm تقسیم شدند. برای تهیه محلول‌های نانوذرات مس به ترتیب ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم نانوذرات مس در یک لیتر آب مقطر حل شد و محلول‌های مورد نظر با دزهای مشخص به دست آمد. نانو ذرات مس مورد استفاده در آزمایش از شرکت توسعه شیمی آریا، رشت، ایران، تهیه گردید. محلول حاوی نانو ذرات مس توسط سرنگ انسولین با سوزن شماره ۲۲ (۲۰ میلی‌متر طول) در روز اول جوجه‌کشی پس از تفکیک تخم مرغ‌های شکسته و ناهمگون از محل اتاقک هوایی تزریق شد.

قبل از تزریق، در محیط کاملاً استریل انتهای پهن تخم‌مرغ‌ها به وسیله الکل اتیلیک ۹۶ درصد ضدعفونی شد. سپس در پوسته تخم مرغ سوراخ ریزی با استفاده از ابزار تیز مخصوص دندان پزشکی ایجاد شد و محلول‌های مورد نظر در اتاقک هوایی تزریق شدند. هنگام تزریق، دمای دستگاه جوجه‌کشی حدود ۳۷/۵ درجه سانتی‌گراد بود. پس از اتمام تزریق، محل با الکل ضدعفونی و با استفاده از پارافین مایع مسدود گردید و سپس تخم‌مرغ‌های تزریق شده به سینی‌های دستگاه جوجه‌کشی (شرکت صنایع اسکندری، ارومیه، ایران) منتقل شدند. در روز ۱۹، تخم مرغ‌های تزریق شده طبق برنامه جوجه‌کشی از ستر به هچری منتقل و بعد از ۵۰ ساعت، جوجه‌های تفریخ شده از دستگاه خارج و پس از شمارش و وزن‌کشی، به سالن پرورش منتقل شدند.

جوجه‌ها در قالب یک طرح کاملا تصادفی با چهار تیمار تقسیم بندی شده در دستگاه جوجه کشی، چهار تکرار و ۱۴ قطعه جوجه در هر تکرار، در سالن پرورش توزیع شدند. دمای هفته اول پرورش۳۳ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد و با افزایش سن به ازای هر هفته دو درجه سانتی‌گراد کاهش داده شد. رطوبت در هفته اول۶۰ درصد و بعد از آن تا آخر دوره به میزان۵۰ تا ۶۰درصد ثابت شد. برنامه نوردهی سالن در کل دوره ۲۳ ساعت روشنایی و یک ساعت تاریکی در نظر گرفته شد. جیره استاندارد مورد استفاده بر اساس کاتالوگ سویه تجاری راس ۳۰۸ در سه دوره آغازین، رشد و پایانی تنظیم گردید (جدول ۱). پرنده‌ها در کل دوره آزمایش دسترسی آزاد به غذاو آب داشتند. در انتهای دوره‌های آغازین (۱۰ روزگی)، رشد (۲۲ روزگی) و پایانی (۴۲ روزگی) وزن بدن و میزان مصرف خوراک هر تکرار اندازه گیری شد.

در طی دوره پرورش مقادیر خوراک مصرفی روزانه، افزایش وزن روزانه و ضریب تبدیل خوراک با انجام تصحیح برای تلفات هر گروه محاسبه شدند. نمونه‌های خونی در روز دهم دوره پرورش از ورید گردن چهار پرنده از هر تکرار گرفته شد. نمونه خونی در دو نوع لوله بدون ماده ضد انعقاد و یا حاوی EDTA جمع‌آوری شد. نمونه‌های خونی فاقد EDTA[1] در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای معمولی(دمای اتاق) برای جمع‌آوری نمونه‌های سرم سانتریفیوژ(Hettich, Rotofix 32A, Germny) شدند. نمونه‌های سرم تا زمان آنالیز در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگه داشته شدند. نمونه‌های خونی حاوی ماده ضد انعقاد نیز جهت تعیین گسترش خونی و شمارش گلبول‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند. وجود گلبول‌های قرمز هسته‌دار در خون پرندگان، از کاربرد روش لکوسیت‌ها همان‌گونه که در مورد خون پستانداران بکار می‌رود جلوگیری می‌کند.

روش‌های متداول شمارش لکوسیت‌ها که در مورد خون پستانداران استفاده می‌شود، به متلاشی کردن گلبول‌های قرمز و خارج کردن لکوسیت‌ها یا هسته‌ی سالم آن‌ها بستگی دارد. این ساختمان‌ها در یک هموسیتومتر (HemoCue WBC DIFF System, Sweden) شمارش می‌شوند. با توجه به اینکه در خون پرندگان هم گلبول قرمز و هم گلبول سفید هسته‌دار هستند، روش‌های مختلف برای شمارش لکوسیت‌ها ابداع شده و بکار رفته است (Campbell، ۱۹۸۸). برای شمارش گلبول‌های سفید دو روش مستقیم و غیر مستقیم وجود دارد. در این تحقیق برای شمارش از روش مستقیم استفاده شد. یکی از رایج‌ترین روش‌های اندازه‌گیری تعداد کل لکوسیت‌های خون پرندگان روش نات و هریک است. محلول نات و هریک محلولی است که عموما برای شمارش لکوسیت‌های پرندگان استفاده می‌شود و از مواد کلرو سدیم ۳/۸۸ گرم، سولفات سدیم ۲/۵۰گرم، فسفات دی سدیک آبدار ۲/۹۱ گرم، فسفات منوپتاسیک ۰/۲۵ گرم، فرمالین (۳۷٪) ۷/۵ گرم، متیل ویوله ۰/۱۰ گرم ساخته می‌شود.برای ساخت محلول نات و هریک، ترکیب‌های بالا را در آب مقطر حل کرده و حجم ان با آب مقطر به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد، محلول حاصل به مدت یک شب در آزمایشگاه قرار داده شد تا کاملاً حل شود، سپس محلول با کاغذ صافی صاف صاف شد و مورد استفاده قرار گرفت. در این روش همه لکوسیت‌ها رنگ آمیزی می‌شوند. خون به نسبت یک به ۲۰۰ در پی‌پت ویژه شمارش گلبول‌های قرمز رقیق شد تا عدد نیم میکرولیتر آن را خون و بقیه را تا عدد ۱۰۱ از محلول نات و هریک پر شد. جایگاه‌های پرشده‌ی هماسیتومتر برای ۵ دقیقه با لامل پوشانده شدند تا سلول‌ها ته نشین شوند و رنگ بگیرند. سپس با عدسی شیئی ۴۰ همه‌ی سلول‌هایی را که رنگ تیره به خود گرفته‌اند در نه مربع بزرگ هر دو محفظه شمارش شد. برای محاسبه‌ی تعداد کل لکوسیت‌ها ۱۰ درصد به تعداد کل افزوده شد و سپس در عدد ۱۰۰ ضرب گردید (Fox، ۲۰۰۳).

1.Ethylenediaminetetraacetic acid

تهیه‌ی گسترش خونی برای شمارش تفریقی لکوسیت‌ها در پرندگان همانند پستانداران است و نیاز به گسترش خونی خوب و پراکنش مناسب سلول‌های خون دارد. برای این کار یک قطره خون که در لوله حاوی EDTA قرار داشت روی لام شیشه‌ای ریخته شد و توسط لام دیگری قطره خون به جلو رانده شد و گسترش خون تهیه گردید. بعد از کشیدن قطره خون روی لام، روی هر نمونه یک قطره متانول خالص ریخته شد و بعد از خشک شدن با محلول گیمسا رنگ آمیزی شد و ۲۰ دقیقه پس از رنگ‌آمیزی لام‌ها با آب مقطر شست و شو و بعد از خشک شدن زیر میکروسکوپ نوری (Olympus, CX31, Japan) مورد بررسی قرار گرفتند. فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم مانند تری‌گلیسرید، کلسترول، کلسترول HDL[2]، کلسترول LDL[3] و کلسترول VLDL[4] با دستگاه اتوآنالایزر(Hitachi autoanalyzer 902, Japan) اندازه‌گیری شد. بعد از جمع‌آوری اطلاعات، تجزیه آماری آن‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از رویه مدل خطی عمومی (GLM[5]) بسته نرم افزاری SAS (نسخه ۹/۲) انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها برای صفات مورد بررسی با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال آماری ۰/۰۵ انجام شد.

اجزای جیره	مقادیر (درصد)		
	آغازین (۰ تا ۱۰ روزگی)	رشد (۱۱تا ۲٤ روزگی)	پایانی (۲۵ تا ٤۲ روزگی)
ذرت	۴۸/۴۳	۵۰/۹۶	۵۴/۲۱
کنجاله سویا	۴۲/۵۲	۳۹/۳۴	۳۵/۳۱
روغن سویا	۴/۶۷	۵/۷۱	۶/۶۴
دی کلسیم فسفات	۱/۸۷	۱/۷۲	۱/۶۵
کربنات کلسیم	۱/۱	۱	۰/۹۳
مکمل معدنی[1]	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
مکمل ویتامینه[2]	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
متیونین	۰/۲۷	۰/۲۱	۰/۲
لیزین	۰/۲۳	۰/۱۵	۰/۱۵
نمک	۰/۳۶	۰/۳۶	۰/۳۶
سالینومایسن ۱۲٪	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵
تجزیه شیمیایی			
انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری در کیلوگرم)	۳۰۰۰	۳۱۰۰	۳۲۰۰
پروتئین خام (٪)	۲۳	۲۱/۵	۲۰
کلسیم (٪)	۰/۹۸	۰/۹	۰/۸۵
فسفر قابل دسترس (٪)	۰/۴۹	۰/۴۵	۰/۴۳
سدیم (٪)	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶
لیزین (٪)	۱/۴۴	۱/۳	۱/۲
متیونین (٪)	۰/۷۱	۰/۶	۰/۶۱
متیونین + سیستین (٪)	۱/۰۸	۰/۹۹	۰/۹۴

جدول ۱. ترکیب جیره غذایی و تجزیه شیمیایی آن

در هر کیلوگرم جیره مقادیر زیر تامین می‌شود:

۱-ویتامین A: ۱۸۰۰۰ واحد بین المللی، ویتامین D۳: ۴۰۰۰ واحد بین المللی، ویتامین E: ۷۲ میلی‌گرم، ویتامین K۳ : ۴ میلی‌گرم، ویتامین B۱: ۳/۵۵ میلی‌گرم، ویتامین B۱۲: ۰/۰۳ میلی‌گرم، پانتوتنات کلسیم: ۱۹/۶ میلی‌گرم، نیاسین: ۵۹/۴ میلی‌گرم، ویتامین B۶: ۵/۸۸ میلی‌گرم، ویتامین B۹: ۲میلی‌گرم، ویتامین B۱۲: ۰/۰۳ میلی‌گرم، کولین کلراید: ۱گرم.۲- Mn ۱۹۸/۴ میلی‌گرم، Zn: ۱۶۹/۴ میلی‌گرم، Fe: ۱۰۰ میلی‌گرم، Cu: ۲۰ میلی‌گرم، I: ۱/۹۸۵ میلی‌گرم و Se: ۰/۴ میلی‌گرم

نتایج و بحث

اثر تزریق درون تخم مرغی نانو ذرات مس بر صفات تولیدی جوجه‌های گوشتی در جدول ۲ نشان داده شده است. در دوره آغازین (۱ تا ۱۰ روزگی) هر سه گروه جوجه‌های گوشتی تفریخ شده از تخم مرغهای تزریق شده با نانوذرات مس، دارای مصرف خوراک بیشتری در مقایسه با گروه شاهد بودند (P< ۰/۰۵) و بین سه تیمار با تزریق نانوذرات مس تفاوتی از لحاظ میزان مصرف خوراک در دوره آغازین

2.High-density lipoprotein
3.Low-density lipoprotein
4.Very low-density lipoprotein
5.General linear model

مشاهده نشد. میزان افزایش وزن روزانه جوجه در دوره آغازین نیز تحت تاثیر تزریق درون تخم مرغی نانو ذرات مس قرار گرفت به طوری که جوجه‌های حاصله از تخم مرغ‌های تزریق شده با سطوح ۷۵ و ۱۰۰ ppm نانو ذرات مس سرعت رشد بالاتری در مقایسه با گروه تزریق شده با سطح ۵۰ ppm نانو ذرات مس و همچنین گروه شاهد داشتند (P< ۰/۰۵). ضریب تبدیل دوره آغازین در گروه ۵۰ ppm نانو ذرات مس به طور معنی داری بالاتر از سه گروه دیگر بود (P< ۰/۰۵). در دوره رشد (۱۱ تا ۲۴ روزگی)، بیشترین مصرف خوراک و افزایش وزن روزانه مربوط به گروه ۱۰۰ ppm نانو ذرات مس بود به طوری که تفاوت مشاهده شده با گروه شاهد و نیز گروه ۵۰ ppm نانو ذرات مس از لحاظ آماری معنی‌دار بود (P< ۰/۰۵). گروه ۷۵ ppm نانو ذرات مس نیز در مقایسه با گروه شاهد مصرف خوراک و نیز افزایش وزن روزانه بیشتری را نشان داد (P< ۰/۰۵). ضریب تبدیل غذایی در دوره رشد تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. در مرحله پایانی دوره پرورش نیز بالاترین میزان مصرف خوراک روزانه و همچنین افزایش وزن روزانه در جوجه‌های تفریخ شده از تخم مرغهای تزریق شده با ۱۰۰ ppm نانو ذرات مس مشاهده شد و تفاوتهای مشاهده شده با گروه تزریق شده با ۷۵ ppm نانوذرات مس معنی‌دار بود (P< ۰/۰۵). همچنین در این دوره گروه ۵۰ ppm نانو ذرات مس نیز افزایش وزن بالاتری در مقایسه با گروه ۷۵ ppm داشت (P< ۰/۰۵). در کل دوره پرورش جوجه‌های حاصل از تزریق ۱۰۰ ppm نانو ذرات مس بیشترین مصرف خوراک و افزایش وزن روزانه را نشان دادند و تفاوت مشاهده شده با گروه شاهد و نیز گروه ۷۵ ppm نانو ذرات مس معنی‌دار بود (P< ۰/۰۵). در کل دوره پرورش تفاوت معنی‌داری در ضریب تبدیل غذایی تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد.

استفاده از نانو ذرات مس اخیرا مورد توجه بیشتری قرار گرفته است که یکی از دلایل آن قابلیت زیست فراهمی بالاتر آن است (Tamilvanan و همکاران، ۲۰۱۴). اندازه کوچک‌تر نانو ذرات مس باعث افزایش جذب آن از مجرای گوارش و در نتیجه اثربخشی بیشتر آن در سطوح مصرف پایین‌تر می‌شود (Civardi و همکاران، ۲۰۱۵). به نظر می‌رسد که استفاده از سطوح کافی مکمل نانو ذرات مس در جیره جوجه‌های گوشتی به کاهش دفع مس از مدفوع جوجه کمک کرده و اثرات مطلوب زیست محیطی خواهد داشت (Mroczek-Sosnowska و همکاران، ۲۰۱۵).

اگر چه تحقیقات زیادی در زمینه تزریق درون تخم مرغی نانوذرات مس انجام نگرفته است. در یکی از معدود گزارشات موجود، Joshua و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که تزریق درون تخم مرغی سطوح ۴ تا ۱۶ گرم نانو ذرات مس اثر نامطلوبی بر رشد جنین ایجاد ننمود. در تحقیقی دیگر تزریق درون تخم مرغی ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم، نانو ذرات مس باعث افزایش نرخ متابولیکی جنین از طریق افزایش میزان مصرف اکسیژن و تولید حرارت شد که عواملی مهم در مراحل تکاملی جنین مرغ محسوب می‌شوند (Scott و همکاران، ۲۰۱۶). همچنین پیشنهاد شده است که تزریق درون تخم مرغی سطح ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نانو ذرات مس باعث تحریک تکامل عروق خونی طی دوره جنین می‌شود و در نتیجه بهبود افزایش وزن بدن، بهبود ضریب تبدیل غذایی و افزایش وزن عضلات سینه و ران جوجه‌های گوشتی را در پی خواهد داشت (Mroczek-Sosnowska و همکاران، ۲۰۱۵a، ۲۰۱۵b).

گزارشات بیشتری در زمینه اثر مصرف مکمل مس بر صفات تولیدی جوجه‌های گوشتی وجود دارد. گزارش شده است که با افزودن ۵۰۰ میلی‌گرم سولفات مس به جیره جوجه‌های گوشتی، مصرف خوراک به طور معنی‌داری افزایش یافت، اما در ضریب تبدیل خوراک و افزایش وزن بدن تغییر معنی داری مشاهده نشد و حتی زمانی که مصرف سولفات مس تا ۱ یا ۲ گرم در کیلوگرم جیره افزایش یافت، کاهش در وزن پرندگان مشاهده شد (اقبال و همکاران، ۲۰۱۲). در تحقیقی در مورد اثر افزودن سطوح مختلف مس (۰ و ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی گرم در کیلوگرم) به فرم سولفات مس در سن یک تا ۲۱ روزگی به جیره جوجه های گوشتی نر، گزارش شد که سطح ۲۵۰ میلی گرم در کیلوگرم از مس، اثر منفی بر وزن بدن، افزایش وزن و مصرف خوراک در روزهای ابتدایی دوره آغازین داشت، اما میزان ۱۲۵میلی گرم در کیلوگرم ضریب تبدیل غذایی را از ۱ تا ۴۲ روزگی بهبود داد. همچنین آثار منفی مکمل شدن جیره با سطوح بالای مس بر وزن بدن، بعد از ۱۴ روزگی از بین رفت، اما اثرات ان بر مصرف خوراک تا ۲۸ روزگی ادامه داشت (Karimi و همکاران، ۲۰۱۱).

در گزارشی دیگر پیشنهاد شد که مکمل‌سازی ۴ میلی‌گرم در کیلوگرم مس به صورت کلات اسید آمینه‌ای مس ممکن است برای رشد جوجه‌های گوشتی تا سن ۲۹ روزگی کافی باشد (Bao و همکاران، ۲۰۰۷) .حال آنکه Jegede و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که افزایش وزن جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با پروتئینات مس در مقایسه با مکمل سولفات مس به طور معنی‌داری بهبود یافت. همچنین مکمل‌سازی جیره با ۴ تا ۸ میلی‌گرم در کیلوگرم کلات گلایسین–مس اثری بر غلظت مس در کبد نداشت، اما باعث کاهش غلظت مس در مدفوع جوجه‌ها در مقایسه با حالت مصرف سولفات مس شد (Kwiecień و همکاران، ۲۰۱۵).

اثر تزریق درون تخم مرغی نانو ذرات مس بر پاسخ ایمنی خون

جوجه‌های گوشتی در جدول ۳ نشان داده شده است. عیار پادتن علیه ویروس‌های نیوکاسل و آنفولانزا توسط تیمارهای آزمایشی تحت تاثیر قرار نگرفتند. متاسفانه در آزمایش حاضر نمونه‌های خون گرفته شده از تیمار ppm ۱۰۰ نانو ذرات مس لخته شد و در نتیجه در آنالیز آماری حذف گردید. تعداد کل گلبول‌های سفید و درصد هتروفیل‌ها، در تیمار ۵۰ ppm نانوذرات مس پایین‌تر از گروه شاهد و نیز گروه ۷۵ ppm نانو ذرات مس بود (P< ۰/۰۵). در رابطه با تعداد لنفوسیت‌های شمارش شده، روند عکس مشاهده شد، به طوری که در تیمار ۵۰ ppm نانو ذرات مس بالاتر از گروه شاهد و نیز گروه ppm ۷۵ بود (P< ۰/۰۵). تعداد منوسیت‌های شمارش شده تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی نداشتند.

محققین پیشنهاد می نمایند که قابلیت هضم بهتر انرژی و چربی در اثر مصرف نانو ذرات مس ممکن است دلیل اصلی اثرات مشاهده شده باشد. (Gonzales-Eguia و همکاران، ۲۰۰۹؛ Scott و همکاران، ۲۰۱۶).

در یکی از معدود آزمایش‌های انجام گرفته در زمینه تزریق درون تخم مرغی مکمل مس، نشان داده شد که تزریق داخل تخم مرغی نانو ذرات سولفات مس باعث افزایش گلبول‌های سفید، لنفوسیت‌ها و ائوزونوفیل‌ها را در مقایسه با سایر گروه‌ها شد (Mroczek-Sosnowska و همکاران، ۲۰۱۴) که نتیجه مشاهده شده در مورد لنفوسیت‌ها با نتایج تیمار ۵۰ ppm نانوذرات مس در آزمایش حاضر مطابقت دارد، ولی در مورد گلبول های سفید نتایج مغایریت داشتند به طوری که مقدار کل گلبول‌های سفید در گروه تزریقی ۵۰ ppm نانوذرات مس کاهش نشان داد. در این تحقیق مقدار هتروفیل‌ها در گروه ۵۰ ppm تزریق نانو ذرات مس کاهش معنی‌داری از خود نشان داد که با نتایج یک تحقیق پیشین که در آن افزایش در تعداد هتروفیل ها، مونوسایت‌ها و بازوفیل‌ها مشاهده شد (Mroczek-Sosnowska و همکاران، ۲۰۱۴)، مغایرت دارد. نقش عنصر مس در جذب آهن در بدن و الحاق آن به هموگلوبین کاملاً شناخته شده است (Foye و همکاران، ۲۰۰۵؛ Mullally و همکاران، ۲۰۰۴). کاهش درصد مونوسیت‌ها در گروه تزریقی نانوذرات سولفات مس مشاهده شده است (Mroczek-Sosnowska و همکاران، ۲۰۱۴)، که با نتایج این آزمایش که هیچ تغییر معنی داری در مونوسایت ها دیده نشد، مغایر بود.

سطح لیپوپروتئین‌های سرم خون جوجه‌های گوشتی در جدول ۴ نشان داده شده است. به دلیل لخته شدن نمونه‌های تیمار ۱۰۰ ppmنانو مس، تیمار مذکور در مقایسه‌ها لحاظ نگردید. کاهش خطی در سطح تری‌گلیسرید سرم با مصرف سطوح ۷۵ و ۵۰ ppm نانومس در مقایسه با گروه شاهد مشاهده گردید (P< ۰/۰۵). سطح کلسترول و HDL سرم در گروه ۵۰ ppm نانومس کمتر از گروه ۷۵ ppm نانو مس و نیز گروه شاهد بود (P< ۰/۰۵). سطح LDL سرم تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. در تحقیق پیشین نیز تزریق داخل تخم مرغی نانوذرات مس باعث کاهش سطح کلسترول خون شد (Mroczek-Sosnowska و همکاران، ۲۰۱۴) که با نتایج تیمار ۵۰ ppm نانو ذرات مس در این آزمایش تطابق داشت. همچنین گزارش شده است که مس موجب کاهش سطح تری گلیسیرید و کاهش ساخت کلسترول در پلاسمای خون و بافت حیوانات می‌شود (Bakalli و همکاران، ۱۹۹۵؛ Turnlund، ۱۹۸۸) که تا حد زیادی با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

در آزمایش Jegede و همکاران، ۲۰۱۲مکمل سازی جیره با سطوح ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم د رکیلوگرم پروپیونات مس یا سولفات مس اثر معنی‌داری بر رشد نداشت، اما پروپیونات مس غلظت کلسترول، LDL و تری گلیسرید را در مقایسه با گروه مصرف کننده سولفات مس کاهش داد .در آزمایش Rahman و همکاران (۲۰۰۱) سطح کلسترول تام در سرم جوجه ها تحت تاثیر منبع مس جیره قرار نگرفت. همچنین مکمل سازی مس در جیره باعث افزایش سطح هموگلوبین، کاهش معنی دار کلسترول و تری گلیسرید ، کاهش پروتئین های خون شد. نتایج تحقیق حاضر نشان دهنده اثر مثبت تزریق درون تخم مرغی نانو ذرات مس بر میزان مصرف خوراک، سرعت رشد و ضریب تبدیل غذایی جوجه‌های تفریخ شده است و در این میان سطح تزریق ۵۰ ppm نانوذرات مس منجر به بیشترین اثرات مثبت گردید. همچنین، همین سطح تزریق اثرات مثبتی بر کاهش سطح کلسترول و تری گلیسرید سرم خون جوجه‌های گوشتی داشت.

سطح نانو ذرات مس تزریق شده	آغازین			رشد			پایانی			کل دوره		
	مصرف خوراک روزانه (گرم)	افزایش وزن روزانه (گرم)	ضریب تبدیل غذایی	مصرف خوراک روزانه (گرم)	افزایش وزن روزانه (گرم)	ضریب تبدیل غذایی	مصرف خوراک روزانه (گرم)	افزایش وزن روزانه (گرم)	ضریب تبدیل غذایی	مصرف خوراک روزانه (گرم)	افزایش وزن روزانه (گرم)	ضریب تبدیل غذایی
شاهد	۱۷/۵۵^{b}	۱۳/۹۵^{b}	۱/۲۵^{b}	۶۰/۶۳^{c}	۳۶/۲۰^{c}	۱/۶۷	۱۶۵/۸۲^{ab}	۸۷/۲۷^{ab}	۱/۹۰	۹۵/۴۵^{b}	۵۲/۷۸^{b}	۱/۸۰
ppm ۵۰	۲۲/۰۵^{a}	۱۳/۴۳^{b}	۱/۶۴^{a}	۶۸/۷۰^{bc}	۴۱/۴۶^{bc}	۱/۶۵	۱۷۰/۰۹^{ab}	۹۹/۴۶^{a}	۱/۷۱	۱۰۱/۰۴^{ab}	۵۹/۶۴^{ab}	۱/۶۹
ppm ۷۵	۲۲/۶۵^{a}	۱۷/۳۲^{a}	۱/۳۰^{b}	۷۳/۸۵^{ab}	۴۷/۹۷^{ab}	۱/۵۳	۱۵۵/۷۳^{b}	۸۱/۱۰^{b}	۱/۹۲	۹۶/۷۵^{b}	۵۴/۸۷^{b}	۱/۷۶
ppm ۱۰۰	۲۱/۲۱^{a}	۱۶/۵۶^{a}	۱/۲۸^{b}	۷۹/۳۳^{a}	۵۳/۷۹^{a}	۱/۴۷	۱۹۴/۴۰^{a}	۱۰۸/۴۸^{a}	۱/۸۰	۱۱۴/۸۰^{a}	۶۹/۴۷^{a}	۱/۶۵
SEM	۰/۸۰	۰/۶۱	۰/۰۳۷	۳/۰۲	۲/۹۵	۰/۰۷	۱۲/۲۰	۸/۵۷	۰/۰۶	۵/۱۱	۴/۲۳	۰/۰۶
P value	۰/۰۰۳	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۶	۰/۰۰۶	۰/۱۸	۰/۰۲	۰/۰۳	۰/۳۰	۰/۰۲	۰/۰۳	۰/۴۸

جدول۲. اثر سطوح مختلف تزریق درون تخم مرغی نانوذرات مس بر صفات تولیدی جوجه‌های گوشتی در دوره های مختلف پرورش

c,b,a : در هر ستون میانگین‌های با حروف لاتین متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P≤0/50).

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها می‌باشد.

سطح نانو ذرات مس تزریق شده	عیار پادتن علیه ویروس نیوکاسل	عیار پادتن علیه ویروس آنفولانزا	کل گلبول‌های سفید (میکرولیتر/ سلول ۳۰×)	هتروفیل (درصد)	لنفوسیت (درصد)	مونوسیت (درصد)
شاهد	۶/۷۵	۳/۲۵	۲۳/۳۳^{a}	۴۳/۰۰^{a}	۵۵/۳۳^{b}	۱/۶۶
ppm ۵۰	۶/۵۰	۲/۵۰	۱۸/۵۰^{b}	۳۱/۵۰^{b}	۶۷/۵۰^{a}	۱/۰۰
ppm ۷۵	۵/۷۵	۲/۲۵	۲۳/۰۰^{a}	۴۷/۵۰^{a}	۵۱/۰۰^{b}	۱/۵۰
ppm ۱۰۰	۷/۲۵	۲/۷۵	-	-	-	-
SEM	۰/۳۸	۰/۴۴	۱/۱۱	۲/۲۱	۲/۳۳	۰/۳۸
P value	۰/۱۰	۰/۴۰	۰/۰۴	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۴۶

جدول۳. اثر سطوح مخالف تزریق درون تخم مرغی نانوذرات مس بر گلبول‌های سفید و پاسخ های ایمنی جوجه‌های گوشتی در سن ۱۰ روزگی

b,a, : در هر ستون میانگین‌های با حروف لاتین متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P≤0/50).

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها.

سطح نانو ذرات مس تزریق شده	تری گلیسیرید	کلسترول	[1]LDL	[2]HDL
شاهد	۱۲۵/۰^{a}	۱۹۱/۷^{a}	۱۹/۶	۱۶۶/۳^{a}
ppm ۵۰	۱۱۷/۲^{b}	۱۶۶/۷^{b}	۱۶/۵	۱۳۷/۳^{b}
ppm ۷۵	۱۰۲/۴^{c}	۱۸۵/۱^{a}	۱۸/۰	۱۶۰/۸^{a}
ppm ۱۰۰	-	-	-	-
[3]SEM	۲/۷	۵/۹	۱/۹	۵/۵
P value	۰/۰۱	۰/۰۳	۰/۱۲	۰/۰۴

جدول ۴. اثر سطوح مخالف تزریق درون تخم مرغی نانوذرات مس بر سرم های خونی جوجه های گوشتی در سن ۱۰ روزگی (میلی گرم در دسی لیتر)

۱. لیپوپروتئین‌ها با چگالی پایین، ۲. لیپوپروتئین‌های با چگالی بالا، ۳. میانگین خطای استاندارد می‌باشد.

c,b,a : در هر ستون میانگین‌های با حروف لاتین متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P≤0/50).

Journal of Veterinary Laboratory Research 12 (2020-21) 219-229

Effect of *in ovo* injection of copper nano particles on the performance and immune system parameters of broiler chickens

Received: 09.08.2019 Accepted: 09.02.2021

Heidari Miandoab[1], S., Navidshad, B.[2], Hedayat Evrigh, N.[2], Mirzaei Aghjegheshlag, F.[2], Mahdavi, A.[3].

Abstract

This study was carried out to evaluate the effects of *in ovo* injection of copper nanoparticles on the performance and immune system of broilers. Fertile eggs from Ross 308 breeder broiler flock were divided into 4 groups as follows. The group was injected with one mL of physiologic serum and the groups injected with copper nanoparticle solutions at doses of 50, 75 and 100 ppm in the air cell, at the first day of incubation. The daily feed intake and average daily gain at the rearing period was higher in 100 ppm group (P <0.05), while there was no diference in feed conversion ratio. There was no diference in antibody titers against the influenza virus. The higher and lower antibody titer against Newcastle virus were observed in the group injected with 75 ppm and 100 ppm nano-Cu injected group, respectively (P <0.05). Total white blood cells and heterophils in broilers at 10 days of age were decreased in 50 ppm nano copper group (p <0.05), however, the lymphocytes of the same group (50 ppm) was significantly increased (P <0.05). The hematocrit percentage of blood samples at 10 days of age in broiler chickens in 100 ppm nao copper group decreased (P <0/05). A linear decrease in serum triglyceride levels was observed with the *in ovo* injection of 75 and 50 ppm copper nanoparticles compared to the control group (P <0.05). Serum cholesterol and HDL levels in the 50 ppm copper nanoparticles groups were lower than the group of 75 ppm copper nanoparticles and the control group (P <0.05). Serum LDL levels were not affected by experimental treatments. The results of this study showed the positive effect of *in ovo* injection of copper nanoparticles, especially at 50 ppm level on feed intake, growth rate, and feed conversion ratio and serum cholesterol and triglyceride levels.

Key words:broiler chiken, Cu nano particles, immune system, *in ovo* injection, performance

1,2. Department of Animal Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

3. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

*Corresponding author: **bnavidshad@uma.ac.ir**

منابع

Arias, V.J., Koutsos, E.A. 2006. Effects of copper source and level on intestinal physiology and growth of broiler chickens. Poultry Science. **85,** 999–1007.

Bakalli, R.I., Pesti, G.M., Ragland, W.L., Konjufca, V. 1995. Dietary Copper in Excess of Nutritional Requirement Reduces Plasma and Breast Muscle Cholesterol of Chickens. Poultry Science. **74,** 360–365.

Barlow, S., Chesson, A.J.D. , Collins, J.D. , Flynn, A., Hardy, A., Jany, K.D., Knaap, A., Kuiper, H., Larsen, J.C., Neindre, P.L., Schans, J., Schlatter, J., Silano, ,V., Skerfving, S., Vannier, P. 2009. The potential risks arising from nanoscience andnanotechnologies on food and feed safety. EFSA Jourbal. **958,** 1-39.

Bao, Y.M., Choct, M., Iji, P.A., Bruerton, K. 2007. Effect of organically complexed copper, iron, manganese, and zinc on broiler performance, mineral excretion, and accumulation in tissues. Journal of Applied Poultry Research. **16,** 448–455.

Campbell, T. 1988. Avian Hematology and Cytology, Iowa State University Press, Ames. U.S.A.

Civardi, C., Schubert, M., Fey, A., Wick, P., Schwarze, F.W. 2015. Micronized copper wood preservatives: efficacy of ion, nano, and bulk copper against the brown rot fungus Rhodonia placenta. PLoS One. **10,** e0142578.

Ferket, P.R., Uni, Z., Tako, E., Foye, O.T., Oliveira, J.E. 2005. *In ovo* feeding nutrition: impact on gene expression, gut development, and growth performance. In: The Annual Nutrition Conference. University of Arkansas. 160-172.

Fox, P.L. 2003. The copper-iron chronicles. The story of an intimaterelationship. Bio Metals. **16,** 9–40.

Foye, O., Ferket, P. Uni, Z. 2005. The effects of *in ovo* feeding of arginine and/or beta-hydroxy-beta-metylbutyrate (HMB) on glycogen metabolism and growth in turkey poults. Poultry Science. **84,** (Supplement1):9.

Gonzales-Eguia, A., Fu, C.M., Lu, F.Y., Lien, T.F.2009. Effects of nanocopper on copper availability and nutrients digestibility, growth performance and serum traits of piglets. Livestoch Science. **126,** 122–129.

Henry, J.B. 1991. Clinical diagnosis and management by laboratory methods, 1-2. 18th ed. W.B. Saunders Co, Phiadelphila.

Iqbal, R., Malik, F., Aziz, T. 2012. The study of histopathological changes upon exposure to vinegerized copper sulphate in liver and kidney of broiler chick. Middle East Journal of Scientific Research. **12,** 36-41.

Jegede, A.V., Oduguwa, O.O., Bamgbose, A.M., Fanimo, A.O., Nollet, L. 2011. Growth response, blood characteristics and copper accumulation in organs of broilers fed on diets

supplemented with organic and inorganic dietary copper sources. British Poultry Science **52,** 133–139.

Jegede, A.V., Oduguwa, O.O., Oso, A.O., Fafiolu, A.O., Idowu, O.M.O., Nollet, L. 2012. Growth performance, blood characteristics and plasma lipids of growing pullet fed dietary concentrations of organic and inorganic copper sources. Livestoch Science. **145,** 298–302.

Joshua, P.P., Valli, C., Balakrishnan, V. 2016. Effect of *in ovo* supplementation of nano forms of zinc, copper, and selenium on post-hatch performance of broiler chicken. Veterinary World. **9,** 287–294.

Karimi, A., Sadeghi, G., Vaziry, A. 2011. The effect of copper in excess of the requirement during the starter period on subsequent performance of broiler chicks. Journal of Applied Poultry Researh. **20,** 203-209.

Kwiecień, M., Winiarska-Mieczan, A., Piedra, J.V., Bujanowicz-Haraś, B., Chałabis-Mazurek, A. 2015. Effects of copper glycine chelate on liver and faecal mineral concentrations, and blood parameters in broilers. Agriculture and Food Sciences. **24,** 92–103.

Leeson, S. Scott's Nutrition of the Chicken - 4th Edition. University Books, Guelph, ON.

Mroczek-Sosnowska, M., Łukasiewicz, M., Wnuk, A., Sawosz, E. Niemiec, J. 2014. Effect of copper nanoparticles and copper sulfate administered *in ovo* on copper content in breast muscle, liver and spleen of broiler chickens. Annals of Warsaw University of Life Sciences - Animal Science. **53,** 135–142.

Mroczek-Sosnowska, N., Sawosz, E., Vadalasetty**,** K., Łukasiewicz, M., Niemiec, J., Wierzbicki, M., Kutwin**,** M., Jaworski, S., Chwalibog, A. 2015a. Nanoparticles of copper stimulate angiogenesis at systemic and molecular level. International Journal of Molecular Sciences **16,** 4838–4849.

Mroczek-Sosnowska, N., Łukasiewicz, M., Wnuk, A., Sawosz, E., Niemiec, J., Skot, A., Jaworski, S., Chwalibog, A. 2015b. *In ovo* administration of copper nanoparticles and copper sulfate positively influences chicken performance: effect of Cu on chicken performance. Journal of the Science of Food and Agriculture. **96,** 3058–3062.

Mullally, A.M., Vogelsang, G.B., Moliterno, A.R. 2004. Warted sheep and premature infants the role of trace metals in hematopoiesis. Blood Reviews. **18,** 227–234.

Pesti, G.M, Bakalli, R.I. 1996. Studies on the feeding of cupric sulfate pentahydrate and cupric citrate to broiler chickens. Poultry Science. **75,** 1086–1091.

Rahman, Z.U., Besbasi, F., Afan, A.M., Bengali, E.A., Zendah, M.I., Hilmy, M., Mukhtar, M.R., Jaspal, S.A.S., Aslam, N. 2001. Effects of copper supplement on haematological profiles and broiler meat composition. International Journal of Agriculture and Biology. **1560,** 203–205.

SAS Institute . 2004. Statistical Analysis Systems User's Guide (9.2th. Ed.). SAS Institute Inc, Cary, NC.

Scott, A., Vadalasetty, K.P., Sawosz, E., Łukasiewicz, M., Vadalasetty, R.K.P., Jaworski, S., Chwalibog, A. 2016. Effect of copper nanoparticles and copper sulphate on metabolic rate and

development of broiler embryos. Animal Feed Science and Technology. **220,** 151–158.

Tamilvanan, A., Balamurugan, K., Ponappa, K., Madhan Kumar, B. 2014. Copper nanoparticles: synthetic strategies, properties and multifunctional application. International Journal of Nanoscience **13,** 1430001.

Turnlund, J.R. 1988. Copper nutritive bioavailability and the influence of dietary factors. Journal of the American Dietetic Association. **88,** 303–310.

Uni, Z., Ferket, P.R., Tako, E., Kedar. O. 2005. *In ovo* feeding improves energy status of late-term chicken embryos. Poultry Science. **84,** 764-770.

Wang, C., Wang, M.Q., Ye, S.S., Tao, W.J., Du, Y.J. 2011. Effects of copper-loaded on growth and immunity in broilers. Poultry Science. **90,** 2223-2228.