نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۰۸، پاییز ۱۳۹٤
ص‌ص: ۹۵~۱۰۰

تزریق ریز ذرات نقره و عصاره‌های آویشن و مرزه در تخم مرغ مادران گوشتی و تأثیر آن بر برخی فراسنجه‌های ایمنی در جوجه‌های تفریخ شده

مقاله کوتاه

- **جلال سالاری**(نویسنده مسئول)
  دانش‌آموخته کارشناسی ارشد تغذیه دام و طیور دانشگاه بوعلی سینا همدان، ایران.
- **علی اصغر ساکی**
  استاد، گروه علوم دامی دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.
- **معصومه عباسی نژاد**
  دانش‌آموخته دکتری تغذیه طیور دانشگاه بوعلی سینا همدان، ایران.
- **میلاد منافی**
  گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر.

تاریخ دریافت : دی ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش : خرداد ۱۳۹۳

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۳۵۵۳۵۸۳۵
Email: jalal.salary@yahoo.com

چکیده

به منظور بررسی اثر تزریق کلوئید ریز ذرات نقره و عصاره‌های آویشن و مرزه در تخم مرغ مادران گوشتی و تأثیر آن بر برخی فراسنجه‌های بعد از تفریخ، آزمایشی با ٤۹۵ تخم مرغ بارور در ۱۱ تیمار، ۳ تکرار و ۱۵ نمونه در هر تکرار انجام شد. تیمارها شامل: دو تیمار شاهد (۱- بدون تزریق و ۲- تزریق ۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژی)، تیمارهای ۳ تا ۱۱: تزریق ۳۰، ٤۵ و ٦۰ میلی گرم بر کیلوگرم ریز ذرات نقره، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۱۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آویشن و همین مقدار از عصاره مرزه، بودند. تزریق در روز ۱۷ دوره انکوباسیون انجام گرفت. نتایج حاصل از آزمایش نشان دادند که تنها IgA **و** IgM **تحت تأثیر تیمارها قرار گرفته به طوری که در تمام تیمارهای آزمایشی،** IgA **نسبت به شاهد بالاتر بود و** IgM **نیز در تیمار ۱۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم آویشن به طور معنی‌داری بالاتر از تیمار ٦۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ریز ذرات نقره بود. همچنین در ۱٤ و ۲۱ روزگی واکنش پوست به دی‌نیتروکلروبنزن، وزن بورس و طحال معنی‌دار نبودند. نتایج این آزمایش نشان دادند که** IgM **و** IgA **، پاسخ بهتری به تزریق آویشن و مرزه در مقایسه با ریز ذرات نقره نشان دادند.**

واژه‌های کلیدی: جوجه‌گوشتی، تزریق داخل تخم‌مرغ، عصاره آویشن و مرزه، ریز ذرات نقره.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 108 pp: 95-100

In ovo injection of nano silver, thyme and savory extracts to broiler breeders eggs and their effect on post-hatch immunological parameters

Jalal Salary[*1], Ali Asghar Saki[2], Masoumeh Abbasinezhad[3], Milad Manafi[4]
1-Graduate MSc Student, Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran, Email:jalal.salary@yahoo.com Tel: 09135535835
2-Professor Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
3-Graduate Ph.D Student, Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
4-Faculty member, Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Malayer University, Malayer, Iran
Received: December 2013 **Accepted: June 2014**

This experiment was conducted to examine the effects of in ovo injection of Nano silver, Thyme and Savory extracts to broiler breeder's eggs and their effect on immunologic parameters. A total of 495 fertilized eggs were used in the pre-Experiment with 11 treatments by both 3 replications and 15 eggs in each. Treatments including: two controls (1- with injection and 2- without injection), treatment 3-11 injected with: 30, 45 and 60 ppm of Nano silver, 100, 150, 175 ppm of Thyme and Savory extracts. The eggs injected at 17th day of incubation. Result indicated that IgA and IgM were affected by treatment so that the IgA levels were significantly higher in all of the treatment rather than the control and the IgM levels were significant higher in 175 ppm thyme extract in comparison to 60 ppm Nano silver. Also in 14 and 21 days, response of the skin to Di-nitrocholorobanzen (DNCB), bursa and spleen of weights were not significant. The results showed that IgM and IgA, had better response to injection of Thyme and Savory extracts than Nano silver.

Key words: broiler chicken, in ovo injection, thyme extract, savory extract and Nano silver.

مقدمه

جهت دستیابی به حداکثر عملکرد پس از تفریخ بایستی توجه زیادی به رشد و نمو جنین صورت پذیرد. همچنین افزایش روز افزون مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و عوارض جانبی آن‌ها، توجه به عصاره و داروهای گیاهی و مواد ضدمیکروبی طبیعی را بیشتر نموده است و علاقه برای استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی افزایش یافته است (Jukic و Molis، ۲۰۰۵).

استفاده از محرک‌های سیستم ایمنی می‌تواند یکی از راه حل‌های بهبود ایمنی و کاهش ابتلاء به بیماری‌های عفونی در حیوانات باشد (Liu و Yin، ۱۹۹۹). گیاهان دارویی و فراورده‌های آن می-توانند باعث افزایش سیستم ایمنی و بهبود رشد در دام و طیور شوند. آویشن به خاطر داشتن ویتامین C و همچنین اثرات ضد باکتریایی، باعث بهبود سیستم ایمنی می‌شود (Cook و Samman، ۱۹۹۹؛ Joven، ۱۹۹۴). ریز ذرات فلزاتی مانند نقره و آلیاژهای آن، ویژگی‌های منحصر به فردی را نشان داده‌اند که آن‌ها را به نوع جدیدی از محرک‌های رشد غیر آنتی‌بیوتیکی تبدیل کرده است (Studnicka و همکاران، ۲۰۰۹). ریز ذرات نقره که به عنوان یک فلز طبیعی و با استفاده از فناوری نانو تولید می‌شوند، علاوه بر این که دارای خواص ضد میکروبی می باشند، باعث افزایش اثر بخشی و کاهش عوارض جانبی و میزان سمیت نیز می‌شوند (zhang و همکاران، ۲۰۰۹). این ماده می‌تواند نرخ متابولیسم را در جنین افزایش دهد و به عنوان یک ماده ضد فساد و عامل پیش ایمنی در جنین عمل کند، ضمن این‌که اثرات سمی روی ژن‌ها نیز ندارد. همچنین ریز ذرات نقره اثرات ضد التهاب داشته که سیستم هموستاز بدن را به‌هم نمی‌زنند.

مواد و روش‌ها

آزمایش اصلی با تعداد ۴۹۵ عدد تخم‌مرغ بارور سویه راس ۳۰۸ در ۱۱ تیمار، ۳ تکرار و ۱۵ نمونه در هر تکرار انجام شد. تیمارها شامل: دو تیمار شاهد (۱- بدون تزریق و ۲- تزریق ۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژی)، ۳ تا ۱۱: تزریق ۳۰، ۴۵ و ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ریز ذرات نقره، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۱۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم

عصاره آویشن و همین مقدار از عصاره مرزه، بودند. در روز هفدهم انکوباسیون، ابتدا محل کیسه هوایی تخم‌مرغ‌ها با استفاده از روش نوربینی مشخص و سپس یک میلی‌لیتر از محلول تزریق به وسیله سرنگ با سوزن شماره ۲۱ به تخم مرغ‌های بارور تزریق شد. اندازه‌گیری ایمنی هومورال: برای تهیه گلبول قرمز گوسفندی (SRBC[1]) ابتدا با سرنگ آغشته به هپارین، خون گوسفند را گرفته و سپس سه بار با محلول بافر فسفات سالین استریل (PBS) با سانتریفیوژ rpm ۲۵۰۰ شستشو داده شد، سپس SRBC ۰/۵درصد در PBS تهیه شد. جهت ارزیابی سیستم ایمنی در روز ۱۷ به سه قطعه از هر واحد آزمایشی مقدار ۰/۱ میلی لیتر سوسپانسیون SRBC ۰/۵ درصد در PBS، به عضله سینه تزریق شد. سپس ۵ روز بعد از تزریق (روز ۲۲)، از همان پرنده‌ها از طریق ورید بال خون‌گیری شد. برای تعیین عیار پادتن تولید شده علیه گلبول قرمز گوسفند از روش هماگلوتیناسیون میکروتیتر استفاده شد (Peterson و همکاران، ۱۹۹۹). نمونه‌های سرم به طور اختصاصی و با استفاده از تکنیک ۲- مرکاپتواتانول (Moran و Reinhart، ۱۹۸۰) برای IgA، IgG و IgM مورد آزمایش قرار گرفتند(Cheema و همکاران، ۲۰۰۳).

ارزیابی پاسخ ایمنی سلولی

برای ارزیابی پاسخ ایمنی سلولی از دو آزمون افزایش ضخامت پوست پس از چالش با دی‌نیترو کلروبنزن طبق شرح ورما و همکاران (۲۰۰۴) با اندکی تغییر (Verma و همکاران، ۲۰۰۴) و نیز افزایش ضخامت پرده پا پس از تزریق فیتوهماگلوتنین طبق شرح پترسون و همکاران (۱۹۹۹) انجام شد (Peterson و همکاران، ۱۹۹۹). به منظور بررسی میزان تکثیر سلول‌های T در ۲۱ روزگی، ۱۲ و ۴۲ ساعت پس از تزریق فیتوهماگلوتنین به پرده انگشت سوم پای راست، میزان افزایش در قطر محل تزریق اندازه-گیری و به عنوان معیاری برای سنجش ایمنی سلولی منظور شد.

1-Sheep Red Blood Cells

(لازم به ذکر است که جوجه‌های حاصل از تیمار ۱۷۵ میلی‌گرم مرزه تزریق شده در روز هفدهم جنینی بعد از تفریخ دارای ضایعات حرکتی بودند و لذا حذف گردیدند). جهت تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SAS و رویه‌های مدل خطی عمومی (GLM) استفاده شد.

نتایج

بر اساس نتایج در جدول۱ مشخص شد که در هیچ یک از فراسنجه‌های ایمنی در سن ۱۴ و ۲۱ روزگی تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($p>0/05$).

نتایج حاصل از اندازه‌گیری فراسنجه‌های ایمنی جوجه‌ها در نتیجه تزریق سطوح مختلف کلوئید ریز ذرات نقره، آویشن و مرزه در سن ۲۲ روزگی در جدول ۲ ارائه شده است. در تمامی فراسنجه‌ها به جز IgA و IgM هیچ تفاوت معنی‌داری بین تیمارها وجود نداشت. میزان IgA در تیمارهای شاهد به طور معنی‌داری پایین‌تر از سایر تیمارها بود ($p<0/05$)، همچنین میزان IgM در تیمار ۱۷۵ میلی‌گرم آویشن به طور معنی‌داری بالاتر از تیمار ۶۰ میلی‌گرم ریز ذرات نقره بود ($p<0/05$).

جدول۱- اثر تزریق سطوح مختلف ریز ذرات نقره، آویشن و مرزه در روز هفدهم جنینی بر فراسنجه‌های ایمنی

تیمار	سطح	واکنش پوست به دی‌نیتروکلرو بنزن		واکنش به فیتوهماگلوتنین ۱۲ ساعت بعد از تزریق	واکنش به فیتوهماگلوتنین ۲۴ ساعت بعد از تزریق	وزن بورس (درصد)		وزن طحال (درصد)	
		۱۴	۲۱	۲۱	۲۱	۱۴	۲۱	۱۴	۲۱
شاهد	۱	۰/۴۸	۰/۶۱	۰/۲۸	۰/۴۳	۰/۴۷۶	۰/۴۷۷	۰/۰۹۵	۰/۰۹۱
	۲	۰/۴۶	۰/۵۶	۰/۲۶	۰/۴۱	۰/۴۴۹	۰/۴۷۴	۰/۱۱۳	۰/۰۹۴
ریزذرات نقره	۳۰	۰/۴۴	۰/۵۰	۰/۳۱	۰/۴۶	۰/۴۵۹	۰/۴۳۱	۰/۱۲۶	۰/۰۹۰
	۴۵	۰/۳۹	۰/۴۵	۰/۳۲	۰/۴۷	۰/۴۵۲	۰/۴۲۰	۰/۱۳۴	۰/۰۹۴
	۶۰	۰/۳۷	۰/۴۲	۰/۳۶	۰/۵۱	۰/۴۳۱	۰/۴۱۹	۰/۱۳۵	۰/۰۹۷
آویشن	۱۰۰	۰/۴۹	۰/۶۷	۰/۲۹	۰/۴۴	۰/۴۵۵	۰/۴۲۲	۰/۱۶۲	۰/۹۸
	۱۵۰	۰/۵۲	۰/۷۲	۰/۳۱	۰/۴۶	۰/۴۳۹	۰/۴۳۴	۰/۱۳۴	۰/۱۱۱
	۱۷۵	۰/۵۹	۰/۷۶	۰/۳۲	۰/۴۷	۰/۴۳۰	۰/۴۶۹	۰/۱۴۷	۰/۱۲۴
مرزه	۱۰۰	۰/۵۱	۰/۶۸	۰/۳	۰/۴۵	۰/۴۶۲	۰/۴۸۷	۰/۱۶۸	۰/۱۱۹
	۱۵۰	۰/۵۸	۰/۷۴	۰/۳۱	۰/۴۶	۰/۴۴۵	۰/۵۶۰	۰/۱۶۸	۰/۱۴۵
SEM		۰/۰۶۰	۰/۰۹۷	۰/۰۲۵	۰/۰۱۸	۰/۰۲۱	۰/۰۶۴	۰/۰۲۱	۰/۰۱۸
P		۰/۲۸	۰/۱۴	۰/۴۳	۰/۱۱	۰/۸۸	۰/۸۸	۰/۳۰	۰/۴۹
C.V		۲۱/۹۷	۲۷/۶۳	۱۳/۹۷	۷/۰۲	۸/۲۲	۲۴/۲۶	۲۶/۲۵	۲۹/۹۱

حروف مشابه درهر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۰/۰۵ می باشند.

جدول۲- اثر تزریق سطوح مختلف ریز ذرات نقره، آویشن و مرزه بر فراسنجه‌های ایمنی در سن ۲۲ روزگی

تیمار	سطح	IgA	IgM	IgG
شاهد	۱	۲۹/۸۴^{b}	۱۲۲/۱۵^{abcd}	۴۲۴/۱۵
	۲	۲۸/۷۵^{b}	۱۲۰/۶۱^{abcd}	۴۲۲/۴۹
ریز ذرات نقره	۳۰	۴۰/۷۱^{a}	۱۱۵/۷۱^{bcd}	۴۳۴/۷۴
	۴۵	۴۲/۳^{a}	۱۱۱/۳۰^{cd}	۴۴۲/۱۵
	۶۰	۴۳/۴۳^{a}	۱۰۵/۲۹^{c}	۴۷۵/۰۸
آویشن	۱۰۰	۴۱/۸۱^{a}	۱۳۵/۶۴^{abcd}	۴۷۳/۳۲
	۱۵۰	۴۳/۵^{a}	۱۴۲/۱^{abcd}	۴۷۴/۵۵
	۱۷۵	۴۴/۸^{a}	۱۵۳/۹۵^{a}	۴۷۷/۲۲
مرزه	۱۰۰	۴۳/۸۴^{a}	۱۴۵/۸۷^{abc}	۴۷۰/۵۳
	۱۵۰	۴۳/۷۷^{a}	۱۵۰/۸۸^{ab}	۴۷۵/۹۰
SEM		۳/۲۴۳	۱۱/۲۴۳	۱۸/۶۳۸
P		۰/۰۴۳	۰/۰۴۷	۰/۲
C.V		۱۳/۹۷	۱۴/۹۴	۷/۰۶

حروف مشابه درهر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح خطای ۰/۰۵ می باشند.

بحث

عوامل مختلفی مثل شکست واکسیناسیون، آلودگی با عوامل سرکوب کننده سیستم ایمنی و سوء استفاده از آنتی بیوتیک‌ها می‌تواند باعث القا نقص ایمنی شود. استفاده از محرک‌های ایمنی راه حلی برای بهبود ایمنی و کاهش حساسیت آن‌ها به بیماری‌های عفونی می‌باشد (Liu و Yin، ۱۹۹۹). علاوه بر فعالیت‌های آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی مرزه و آویشن که تأثیرات مثبتی بر پاسخ ایمنی جوجه‌ها دارند، ایمنی بالاتر جوجه‌های تغذیه شده با آویشن و مرزه ممکن است با محتوای ویتامینی آن توضیح داده شود. سطوح بالاتر ویتامین‌ها به ویژه A و E نقش مثبتی را در تولید آنتی بادی، بهبود تیتر آنتی‌بادی و فعالیت فاگوسیتی سلول-های ایمنی جوجه‌ها دارد (Tampieri و همکاران، ۲۰۰۵؛ Elwinger و همکاران، ۱۹۹۸). نتایج این تحقیق با گور و کورشی(۱۹۹۷) مطابقت و با گرودزیک و ساوز (۲۰۰۶) مغایرت داشت (Grodzik و Sawosz ، ۲۰۰۶؛ Gore و Qureshi، ۱۹۹۷). در مطالعه وادالاستی (۲۰۱۲)، کاهش معنی‌داری در سطح IgG و IgM در حضور ریز ذرات نقره مشاهده شد، اما IgA تحت تأثیر قرار نگرفت (Vadalasetty، ۲۰۱۲). این کاهش، به تعداد توده میکروبی متفاوت و یا مقدار ریز ذرات نقره متفاوت در آب نسبت داده شد. میکروب‌های روده نقش مهمی در عملکرد تغذیه‌ای و ایمنی حیوان میزبان دارند (Rehman و همکاران، ۲۰۰۸). ریز ذرات ممکن است فعالیت روده‌ها را در انتقال قندها، اسیدهای آمینه، عناصر کمیاب و ویتامین‌ها تغییر دهند که این عامل ممکن است تشکیل آنتی‌بادی را کاهش دهد (Pineda و همکاران، ۲۰۱۲). مطالعه بیشتر اثرات متقابل پروتئین‌ها و ریز ذرات می‌تواند دلیل کاهش سطح IgG و IgM را آشکار کند. در مطالعه حاضر ارگان‌های لنفوئیدی تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند اما از نظر عددی وزن بورس با افزایش ریز ذرات نقره و آویشن کاهش یافت. احمدی و کردستانی (۲۰۱۰) گزارش کردند که وزن بورس به طور معنی‌داری با افزایش سطوح ریز ذرات نقره در جیره کاهش یافت (Ahmadi و Kurdestany، ۲۰۱۰). گرودزیک و همکاران (۲۰۰۶)، مشاهده کردند که اندازه و تعداد فولیکول‌های لنفاوی با ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از ریز ذرات نقره در جیره کاهش یافت (Grodzik و Sawosz، ۲۰۰۶). وزن کمتر ارگان‌های لنفوئیدی را می‌توان به ویژگی‌های ضد میکروبی این عوامل نسبت داد.

ریز ذرات نقره به عنوان حامل اکسیژن عمل کرده و باعث کاهش میکروب‌های بی‌هوازی و در نتیجه کاهش رشد اندام‌های لنفاوی می‌شود (Ahmadi و Kurdestany، ۲۰۱۰).

اعمال اصلی سیستم ایمنی به وسیله سلول‌های تخصص یافته یعنی لنفوسیت‌ها که به وسیله سیستم رتیکولواندوتلیال حمایت می‌شوند، انجام می‌شود (Erf، ۲۰۰۷). سیستم ایمنی با سلول‌های دودمان لنفوسیت‌ها که در خلال اولین هفته انکوباسیون کیسه زرده جنین منشأ می‌گیرند آغاز می‌گردد. سپس سلول‌های دودمان به تیموس و بورس فابریسیوس مهاجرت می‌کنند. این سلول‌ها در تیموس به صورت سلول‌های T و در بورس فابریسیوس به صورت سلول‌های B بالغ می‌گردند (Richard و همکاران، ۲۰۰۱). بنابراین، دلیل احتمالی برای عدم تأثیر تزریق ریز ذرات نقره و عصاره‌های آویشن و مرزه بر سیستم ایمنی، تزریق دیر هنگام این مواد بوده است.

نتیجه‌گیری

نتایج این آزمایش نشان دادند که تزریق ریز ذرات نقره، آویشن و مرزه فراسنجه‌های مورد مطالعه را تحت تأثیر قرار نداد، به جز در مورد IgM و IgA ،که پاسخ بهتری به تزریق آویشن و مرزه در مقایسه با ریز ذرات نقره نشان دادند.

منابع

Ahmadi, F. and HafsiKurdestany, A. (2010). The impact of silver nano particles on growth performance lymphoid organs and oxidative stress indicators in broiler chicks. *Global Veteterinary*. 5: 366-370.

Cheema, M.A., Qureshi, M.A., and Havenstein, G.B. (2003). A comparison of the immune response of a 2001commercial broiler with a 1957 randombred broiler strain when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poultry Science*. 82: 1519-1529.

Cook, N.C. and Samman, S. (1999). Flavonoids-Chemistry Metabolism, cardio protective effects and dietary sources. *TheJournal of Nutritional Biochemistry*. 7: 66-76.

Elwinger, K., Berndtson, E., Engstrom, B. and Waldenstedt, L. (1998). Effect of antibiotic growth promoters and anticoccidials on growth of clostridium perfringeus in the caeca and on performance of broiler chickens. *ActaVeterinariaScandinavica*. 19, pp: 433-441

Erf, G.f. (2007). Avian immune system. In. Infectious bursal disease and its role in immunosuppression. *Watt Poultry us A webinar*. Jan. 11.

Gore, A.B., and Qureshi, M.A. (1997). Enhancement of humoral and cellular immunity by vitamin E after embryonic exposure. *Poultry Science*. 76: 984-991.

Grodzik, M. and Sawosz, E. (2006). The influence of silver nanoparticles on chick embryo development and bursa Fabricius morphology. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 15: 111-115.

Joven, B.J. (1994). Factors that intract with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *The Journal of applied bacteriology*. 76: 626-631.

Jukic, M., and Molis, M. (2005). Catalytic oxidation and antioxidant properties of thyme essential oil (thymus valgarae L). Croatica. *Chemica Acta Ccacaa*. 78(1): 105-110.

Liu, X.Y. and Yin, T.B. (1999). Stress and immunity.chia agriculture press,Beijing, china. *Poultry Immune*. 24: 230-252.

Moran, E.T. Jr. and Reinhart, B.S. (1980). Yolk sac amount and composition upon placement: effect of breeder age, egg weight, sex and subsequent change with feeding or fasting. *Poultry Science*. 59: 1521-8.

Peterson, A.L., Qureshi, M.A., Ferket, P.R. and Fuller, J.C.Jr. (1999). Enhancement of cellular and humoral immunity in young broilers by the dietary supplementation of β-hydroxy-β-methylbutyrate.*ImmunopharmacolImmunotoxicol*. 21: 307-330

Pineda, L., Sawosz, E., Lauridsen, C., Engberg, R M., Elnif, J., Hotowy, A. and et. al. (2012). Influence of in ovo injection and subsequent provision of silver nanoparticles on growth performance, microbial profile, and immune status of broiler chickens.*Open Access Animal Physiology*. 4:1-8.

Rehman, A., Shakoori, F.R. and Shakoori, A.R. (2008). Heavy metal resistant freshwater ciliate, Euplotesmutabilis, isolated from industrial effluents has potential to decontaminate wastewater of toxic metals. *Bioresource Technology*. 99: 3890-3895.

Richard, R., Hayakawa H. and Hayakawa, K. (2001) B cell development pathways.*Annual Review of Immunology*. 19: 595-621.

SAS Institute. (2004). SOAS/STAT User guide: statistics. Version 9.1. SAS Institute INC. Cary NC.

Studnicka, A., Grodzik, E.M. and Ander, M.B. (2009). Influence of nanoparticles of silver/palladium alloy on chicken embryos' development chwaliboc. *Annals of Warszaw Agricultural University – SGGW Animal Science*. 63:1-7.

Tampieri, MP.,Galuppi, R., Macchioni, F., Carelle, MS., Falcioni, L., Cioni, PL., Morelli, I. (2005) The inhibition of Candida albicans by selected essential oils and their major components. *Mycopathol*. 159, pp: 339- 345.

Vadalasetty, K. (2012). Influence of silver nanoparticles on infection with Campylobacter jejuni in broiler chickens. Master Thesis.

Verma, J. Johri, T.S. Swain, B.K. and Ameena, S. (2004). Effect of graded levels of aflatoxin, ochratoxin and their combinations on the performance and immune response of broilers. *British Poultry Science*. 45: 512-518.

Zhang, H. Kong, B. Xiong, Y. and Sun, X. (2009). Antimicrobial activity of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vaccum packaged ham slices stored at 4oC. *Meat science. 81: 686-692.*