مقایسه غذاهای گیاهی (یونجه، عدسک آبی و آزولا) و پلت بر شاخص‌های رشد، بازماندگی و برخی فاکتورهای خونی در ماهی کپور علفخوار *(Ctenopharyngodon idella)*

- **حامد نکوبین***: گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۳۸٦
- **محمد سوداگر**: دانشیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۳۸٦

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۱

چکیده

ماهی آمور یکی از ماهیان با ارزش در پرورش توام ماهیان گرم آبی می‌باشد که بیش‌تر از غذای گیاهی در استخر تغذیه می‌کند. به‌منظور بررسی مقایسه‌ای تاثیر غذاهای گیاهی مختلف و پلت بر شاخص‌های رشد ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*)، آزمایشی به‌مدت ۹۰ روز در مرکز تحقیقات آبزی‌پروی شهید فضلی برآبادی، دانشکده شیلات و محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. در این تحقیق از سه نوع غذای گیاهی یونجه، عدسک آبی و آزولا (روزانه به‌میزان ۲۰ درصد وزن بدن) و دو نوع پلت (با میزان پروتئین ۲۵ و ۳۵ درصد) به‌میزان ۵ درصد وزن بدن با سه تکرار و در هر تکرار ۱۵ قطعه بچه ماهی (با میانگین وزن ۰/۵۱±۱۵/٤۱ گرم) استفاده گردید. نتایج آزمایش پس از دوره آزمایش نشان داد که بهترین شاخص‌های رشد مربوط به تیمار تغذیه شده با گیاه یونجه بود و با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت ($P<0/05$)، سپس تیمار عدسک بیش‌ترین رشد را نشان داد و با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P<0/05$). حداقل میزان رشد در پلت حاوی ۲۵ درصد پروتئین مشاهده گردید که اختلاف آن باسایر تیمارها معنی‌دار بود ($P<0/05$)، هم‌چنین از نظر شاخص‌های رشد اختلاف معنی‌داری بین آزولا و غذای پلت حاوی ۳۵ درصد پروتئین مشاهده نگردید ($P>0/05$). در فاکتورهای خونی در شاخص درصد غلظت هموگلوبین (MCHC) اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد ($P>0/05$)، هم‌چنین بیش‌ترین مقدار میانگین گلبول قرمز (RBC)، در تیمارهای عدسک، آزولا، یونجه و پلت حاوی ۳۵ درصد پروتئین مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ($P>0/05$). طبق نتایج آزمایش در این مقایسه، تغذیه ماهی آمور با غذای پلت حاوی ۳۵ درصد پروتئین نتایج قابل قبولی را در فاکتورهای رشد و بقاء نشان داد و این غذا با توجه به محدودیت و ضریب تبدیل غذایی بالای غذاهای گیاهی، توانایی جایگزینی به‌جای غذاهای گیاهی را در پرورش این ماهی دارد.

کلمات کلیدی: کپور علفخوار، *Ctenopharyngodon idella*، غذاهای گیاهی، غذای پلت، شاخص رشد، فاکتورهای خونی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: nekoubin.hs@gmail.com

مقدمه

ماهی آمور یا کپور علفخوار یکی از کپور ماهیان چینی است که به‌صورت کشت توام به همراه سایر کپور ماهیان از جمله کپور معمولی در استخر خاکی پرورش داده می‌شود (۱۹). ماهی آمور به‌دلیل مرغوبیت گوشت، رشد سریع، قیمت مناسب و امکان تکثیر مصنوعی از جمله ماهیان پرورشی با ارزش اقتصادی بالا محسوب می‌شود، به‌علاوه توانایی این ماهی در استفاده از گیاهان و تبدیل آن‌ها به پروتئین با کیفیت بالا، این ماهی را به یکی از گونه‌های مهم پرورشی جهان تبدیل کرده است (۲۶،۲۷، ۲۸ و ۱۰) به‌گونه‌ای که، از کل پرورش ۱۱/۳ میلیون تن کپور ماهیان دنیا، ۳/۹ میلیون تن آن اختصاص به ماهی آمور داشت (۱۴). تغذیه مطلوب به لحاظ تولید اقتصادی، تولید محصول با کیفیت بالا و نهایتاً بازار پسند بودن محصول تولید شده، در امر پرورش بسیار ضروری است (۹).

با توجه به این‌که بچه ماهی آمور با طول بیش از ۱۵ سانتی‌متر روده‌ای کاملاً توسعه یافته داشته و طول آن به ۲۶۰ ـ ۲۳۰ درصد طول بدن ماهی می‌رسد، به‌راحتی از گیاهان مناسب تغذیه می‌نماید. تغذیه روزانه این ماهی در سال دوم زندگی از گیاهان آبزی به ۴۰ درصد وزن بدن ماهی می‌رسد. چرا که ماهی آمور در شرایط محیطی مناسب می‌تواند ۷۰ــ۴۰ درصد وزن بدن خود علوفه مصرف نماید. طبق آزمایش‌های انجام شده، ماهی آمور با مصرف حدود ۳۰ کیلوگرم علوفه یک کیلوگرم افزایش رشد خواهد داشت (۳۰). ضریب تبدیل بالا و محدودیت علوفه مورد تغذیه ماهی در استخرهای خاکی سبب شده تا این ماهی از غذای پلت تهیه شده برای کپور معمولی استفاده نماید.

با توجه به این‌که ۷۰-۵۰ درصد هزینه در آبزی‌پروری مربوط به تولید غذا و تهیه بچه ماهی می‌باشد که در این میان بخش تامین پروتئین جیره مناسب برای ماهی از همه اجزای آن مهم‌تر می‌باشد (۱۳ و ۳۲). استفاده مناسب از سطح پروتئین جیره می‌تواند یکی از مهم‌ترین علت‌های اقتصادی تولید باشد و استفاده بیش از حد و غیر بالانس از پروتئین سبب کاهش رشد می‌گردد (۱۳ و ۳۲). در واقع با شناخت پروتئین مورد نیاز ماهی می‌توان حداکثر رشد، حداکثر سود اقتصادی و حداقل هدر رفت پروتئین را داشت (۱، ۲۱ و ۲۴)، در سال‌های اخیر توسعه و پیشرفت علم تغذیه سبب شده تا با تهیه غذای فرموله شده مناسب بتوان رشد و سلامت ماهی را برای تولید محصولات مقرون به صرفه همراه با کیفیت بالا فراهم نمود (۹). تحقیقات پیشین نشان داده که این ماهی توانایی تغذیه از طیف وسیعی از گیاهان، بسته به خوش خوراکی و نوع بافت شان را دارد (۱۲، ۱۵، ۲۹ و ۳۵) اما، در زمینه تغذیه با غذای پلت با درصد پروتئین متفاوت تحقیقات کمی صورت گرفته است هم‌چنین طی گزارشات پیشین مبنی بر استفاده از غذای پلت با میزان پروتئین مطلوب و متناسب، محققین اتفاق نظر ندارند. Gao و همکاران (۲۰۰۹a) طی تحقیقی تاثیر افزایش پروتئین جیره از ۲۵ درصد به ۳۹ درصد را در رشد ماهی آمور مناسب و معنی‌دار گزارش کردند اما طی گزارش دیگر (۱۸) غذای پلت حاوی ۳۸ پروتئین را مناسب گزارش کردند. در واقع استفاده از غذاهای پلت با درصدهای مختلف پروتئین و به‌دست آوردن درصد پروتئین مطلوب و متعادل نقطه قوتی در برطرف کردن محدودیت‌های غذاهای گیاهی باشد تا شاید بدین طریق بتوان سهم پرورش ماهی آمور را در سیستم پرورش توام افزایش داد. با توجه به بررسی‌های انجام شده در داخل کشور، اطلاعات قابل استنادی حاصل نگردید که به آن‌ها اشاره شود. هدف از تحقیق حاضر مقایسه بین شاخص‌های رشد و فاکتورهای خونی در ماهی آمور تغذیه شده با غذاهای گیاهی و پلت با درصدهای مختلف پروتئین بوده است.

مواد و روش‌ها

آماده سازی مراحل اجرای آزمایش

این پژوهش در بهار سال ۱۳۹۰ درمرکز تحقیقات آبزی شهید فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به‌مدت ۹۰ روز انجام شد. به‌منظور اجرای این پروژه، از ۲۳ حوضچه فایبرگلاسی حاوی ۴۵۰ لیتر آب که ۸ عدد آن جهت مخزن ذخیره آب و کلرزنی و ۱۵ عدد آن که جهت معرفی بچه‌ماهی بود استفاده گردید. جهت جلوگیری از آلودگی، قبل از شروع آزمایش حوضچه‌ها به‌وسیله‌ی ماده ضدعفونی کننده هیپوکلرید سدیم ضدعفونی شدند. آب مورد نیاز از مخزن ذخیره سالن حوضچه با ۷۲ ساعت تاخیر جهت کلر زدایی، تامین می‌شد. ماهی‌های مورد استفاده در این آزمایش از استخر پرورش ماهیان گرمابی (گلوگاه، استان مازندران) تهیه و به سالن حوضچه انتقال داده شد. ماهی‌ها قبل از شروع آزمایش به منظور تطبیق با شرایط جدید به‌مدت دو هفته نگه‌داری و با غذای پلت حاوی ۲۵ درصد پروتئین تغذیه شدند. در این پروژه، با توجه به هدف آزمایش، پنج تیمار انتخاب و برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. برای تیمار اول گیاه عدسک آبی از شالیزارهای برنج اطراف گرگان هر سه روز یک بار تهیه می‌گردید (جدول ۱). برای تیمار دوم گیاه آزولا از برکه‌های آب اطراف کردکوی جمع‌آوری می‌گردید که ترکیب تقریبی آن در

جدول ۲ آمده است. عدسک‌ها و آزولاها پس از جمع‌آوری در تشت‌های حاوی آب، جداگانه نگه‌داری می‌شدند. برای تیمار سوم گیاه یونجه از زمین‌های کشاورزی اطراف گرگان تهیه می‌گردید. برای تیمار چهارم و پنجم غذای کنسانتره تجاری ماهی کپور(SFK) از مرکز تکثیر ماهیان گرمابی سیجوال تهیه گردید و نسبت به آماده‌سازی آن (جهت بالانس دو سطح پروتئین) اقدام گردید. غذاهای آردی توسط چرخ گوشت به صورت پلت در می‌آمد و مورد تغذیه ماهی‌ها قرار می‌گرفت.

جدول ۱: ترکیب مواد مغذی پنج نوع غذای مورد استفاده برای پرورش بچه ماهی آمور براساس ماده خشک

آنالیز غذا	عدسک آبی	یونجه	آزولا	پلت ۱	پلت ۲
پروتئین ٪	۲۸	۵۰/۸	۳۱	۲۵	۳۵
چربی ٪	۱۱/۴	۱۰/۲	۹/۹	۱۴	۱۳
فیبر ٪	۲/۷	۱۴/۴	۲/۸	۱۸	۱۸
خاکستر ٪	۶	۸	۴/۱	۱۱	۱۱

زیست‌سنجی ماهیان

در روز اول آزمایش ماهی‌ها به‌صورت انفرادی با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم و با خط کش با دقت ۱ میلی‌متر زیست‌سنجی شده و به‌صورت تصادفی، تعداد ۱۵ قطعه بچه ماهی آمور به وزن متوسط ۰/۵۱±۱۵/۴۱ گرم و طول متوسط ۰/۳۵ ± ۱۱/۳۴ سانتی‌متر در هر حوضچه ریخته شدند و عملیات زیست‌سنجی هر ۱۵ روز یک‌بار برای تمام ماهی‌های هر تیمار انجام می‌گرفت. هنگام زیست‌سنجی ماهیان ۱۲ ساعت قبل و بعد از زیست‌سنجی غذادهی قطع می‌گردید.

تغذیه بچه‌ماهی‌ها

غذادهی بچه‌ماهیان در طول دوره ۹۰ روزه هر روز در سه نوبت صبح، ظهر و شب در ساعات ۶، ۱۴ و ۲۲ با توجه به نوع غذای مصرفی با دست انجام می‌گرفت (جدول ۲) هم‌چنین میزان تغذیه بچه‌ماهیان بر اساس وزن اولیه تعیین گردید (۲۰).

جدول ۲ : میزان غذای داده شده به هر تیمار، طی هر زیست‌سنجی

تیمار	تکرار	درصد غذادهی
عدسک آبی	۳	۲۰ درصد وزن بدن ماهی
آزولا	۳	۲۰ درصد وزن بدن ماهی
یونجه	۳	۲۰ درصد وزن بدن ماهی
غذای کنسانتره (با ۳۵ درصد پروتئین)	۳	۵ درصد وزن بدن ماهی
غذای کنسانتره (با ۲۵ درصد پروتئین)	۳	۵ درصد وزن بدن ماهی

میزان غذا مصرفی با توجه به افزایش وزن هر تیمار (طی عمل زیست‌سنجی که هر ۱۵ روز یک‌بار انجام می‌شد) به صورت جداگانه براساس فرمول زیر محاسبه می‌شد.

میزان غذای مورد نیاز = تعداد کل ماهی موجود در هر تیمار× متوسط وزن (گرم) به‌دست آمده از زیست‌سنجی× (۵) ٪۲۰ × فاصله (روز) بین هر دو زیست‌سنجی

غذاهای گیاهی قبل از ریخته شدن به حوضچه‌ها به‌دقت توزین می‌شد و به‌منظور استفاده بهینه یونجه توسط ماهی، یونجه‌ها به قطعات ریزتر خرد می‌شد و در اختیار ماهیان قرار می‌گرفت. جهت حفظ شرایط بهینه آب، هر روز قبل از غذادهی ٪۲۵ از حجم آب حوضچه‌ها با آب تازه تعویض می‌شد. هوادهی به‌منظور تامین اکسیژن مورد نیاز بچه‌ماهی‌ها در طول ده آزمایش با استفاده از پمپ هوای مرکزی جریان داشت و درجه حرارت آب حوضچه‌ها در طول آزمایش ۲±۲۶ درجه سانتی‌گراد، مقدار pH آب، ۰/۳ ± ۷/۵ و مقدار سختی آب ۲ ± ۲۷۵ بود.

بررسی شاخص‌های رشد و بقاء

جهت بررسی تعیین درصد بقاء بچه ماهیان در انتهای آزمایش، اقدام به شمارش بچه‌ماهیان گردید. هم‌چنین جهت مقایسه تفاوت وزنی نمونه‌ها، در هر زیست‌سنجی و در انتهای آزمایش، اقدام به اندازه‌گیری انفرادی بچه‌ماهیان در هر حوضچه گردید. بعضی پارامترهای رشد مانند رشد مطلق، درصد افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه، شاخص وضعیت، و درصد تلفات بر اساس فرمول‌های زیر محاسبه گردید (۳۴).

جهت اندازه‌گیری درصد افزایش وزن بدن[1] از فرمول زیر استفاده شد:

$$PBWI(\%) = 100 * \frac{W_{(t)} - W_{(i)}}{Wi}$$

که در آن PBWI(%): درصد افزایش وزن بدن $W_{(t)}$: وزن نهایی برحسب گرم، $W_{(i)}$: وزن اولیه برحسب گرم می‌باشد.

جهت اندازه‌گیری نرخ رشد ویژه[2] از فرمول زیر استفاده شد:

$SGR = (\ln Wt_2 - \ln Wt_1)/(t_2 - t_1) * 100$

که در این فرمول $\ln Wt_1$ لگاریتم طبیعی وزن اولیه ماهی، $\ln Wt_2$ لگاریتم طبیعی وزن نهایی ماهی و t_2-t_1 طول دوره آزمایش می‌باشد.

برای اندازه‌گیری شاخص وضعیت[3] از فرمول زیر استفاده شد:

CF =[(وزن ماهی (گرم) / طول ماهی(سانتی‌متر)[3])*۱۰۰]

برای اندازه‌گیری درصد بقاء[4] از فرمول زیر استفاده شد:

نرخ بقاء = (تعداد اولیه / (تعداد تلفات- تعداد اولیه))*۱۰۰

بررسی شاخص‌های خونی

در پایان دوره آزمایش جهت بررسی اثر جیره‌های غذایی بر پارامترهای خونی ماهیان، با استفاده از روش قطع ساقه دمی، خون‌گیری از ماهیان صورت پذیرفت. نمونه خون‌هایی که توسط لوله‌های هپارینه گرفته شد بلافاصله جهت اندازه‌گیری هماتوکریت مورد استفاده قرار گرفت.

تعداد کل گلبول‌های سفید و قرمز

برای شمارش یاخته‌های قرمز و سفید، پس از همگن و رقیق‌سازی خون با پیپت ملانژور و محلول رقیق‌کننده رنگی ریس، با استفاده از هموسیتومتر نئوبار دو حجره‌ای، تعداد کل گلبول‌های قرمز و سفید خون محاسبه گردید.

شمارش افتراقی گلبول‌های سفید

گسترش خونی جهت شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون به روش دو لامی تهیه و با گیمسای ۱۰ درصد رنگ‌آمیزی شد. برای محاسبه درصد فراوانی هر گروه از یاخته‌ها (یاخته‌های نوتروفیل، ائوزینوفیل، لنفوسیت) از خون هر ماهی دو اسلاید و از هر اسلاید ۲۰۰ یاخته به روش زیگزاگ شمارش گردید (۱۶).

درصد هماتوکریت و غلظت هموگلوبین خون

برای محاسبه درصد هماتوکریت خون از میکروهماتوکریت (مدل Tuttlingen D-78532. شرکت Hettich آلمان) با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۷ دقیقه و محاسبه غلظت هموگلوبین خون از روش کالریمتریک سیانو هموگلوبین و به‌وسیله محلول معرف با طول موج ۵۴۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UV/VIS – ۶۵۰۵، شرکت Jenway، ساخت انگلیس) و کیت پارس آزمون ساخت ایران، استفاده شد.

شاخص‌های گلبول قرمز

برای تعیین شاخص‌های گلبول‌های قرمز خون (MCV، MCH و MCHC) به‌ترتیب روابط ریاضی

$$MCV = \frac{Hct \times 10}{RBC}, \quad MCH = \frac{Hb \times 10}{RBC}$$ و

$$MCHC = \frac{Hb \times 100}{Hct}$$ مورد استفاده قرار گرفت (۳).

به‌منظور تجزیه و تحلیل آماری یافته‌ها و مقایسه مقادیر فاکتورهای هماتولوژی از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۴ و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون T-Test ۲۰۰۳ استفاده شد. کلیه داده‌ها بر اساس SE± میانگین ارائه شده‌اند.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

برای تعیین توزیع نرمال داده‌ها از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف استفاده گردید سپس تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد و وجود یا نبود اختلاف معنی‌دار در سطح اعتماد ۹۵ درصد تعیین گردید. برای انجام محاسبات فوق از نرم‌افزار آماری SPSS18 و EXCEL استفاده گردید.

نتایج

اثرات نوع غذا بر پارامترهای رشد در جدول۳ و پارامترهای مربوط به خون در جدول ۴ نشان داده شده است. نتایج حاصل از بررسی نشان داد که بیش‌ترین افزایش وزن بدن، در تیمار تغذیه شده با گیاه یونجه (۰/۷۵±۲۹/۸۳گرم) و کم‌ترین آن در تیمار تغذیه شده با پلت حاوی ۲۵ درصد پروتئین (۰/۴۴±۱/۹۲ گرم) مشاهده گردید که اختلاف بین تیمار یونجه با سایر تیمارها معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵)، پس از تیمار تغذیه شده با گیاه یونجه، تیمار تغذیه شده با گیاه

1. PBWI, Percent of Body Weight Increased
2. SGR, Specific Growth Rate
3. CF, Condition Factor
4. Survival rate

عدسک بیش‌ترین افزایش وزن بدن را داشت (۰/۱±۹/۹۶ گرم). تیمارهای تغذیه شده با گیاه آزولا و پلت حاوی ۳۵ درصد پروتئین در شاخص‌های رشد اختلاف معنی‌داری نداشتند (P>۰/۰۵) اما، با سایر تیمارها این اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). بیش‌ترین ضریب تبدیل غذا در تیمار تغذیه شده با پلت حاوی ۲۵ درصد پروتئین بود (۴/۲۹±۶۲/۱۸)، که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). بعد از آن، بیش‌ترین ضریب تبدیل غذا مربوط به تیمارهای تغذیه شده با آزولا (۲/۷۸±۳۷/۲) و عدسک (۰/۵۹±۳۵/۲۹) بود که اختلاف معنی‌داری بین این دو تیمار مشاهده نشد (P>۰/۰۵)، اما با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۵). کم‌ترین میزان ضریب تبدیل غذا در تیمارهای تغذیه شده با غذای پلت حاوی ۳۵ درصد پروتئین (۰/۰۹±۱۵/۳ گرم) و یونجه (۰/۲۵±۱۵/۶۱ گرم) مشاهده شد که با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند (P>۰/۰۵) اما، با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۵).

جدول ۳ : مقایسه داده‌های (میانگین ± انحراف معیار) شاخص‌های رشد در ماهی آمور در تیمارهای مختلف

تیمار / شاخص	عدسک	آزولا	یونجه	پلت حاوی ۳۵٪ پروتئین	پلت حاوی ۲۵٪ پروتئین
وزن اولیه (گرم)	۱۵/۳۵±۰/۲۷^{a}	۱۵/۸۱±۰/۳۳^{a}	۱۵/۷۷±۰/۲۳^{a}	۱۵/۳۱±۰/۶۲^{a}	۱۴/۷۹±۰/۴۳^{a}
وزن نهایی (گرم)	۲۵/۳۱±۰/۳۷^{b}	۲۰/۸۵±۰/۸۴^{c}	۴۵/۶۱±۰/۹۵^{a}	۲۰/۶۸±۰/۴۵^{c}	۱۶/۷۱±۰/۲۷^{d}
رشد مطلق (گرم)	۹/۹۶±۰/۱^{b}	۵/۰۴±۰/۵۳^{c}	۲۹/۸۳±۰/۷۵^{a}	۵/۳۷±۰/۸۳^{c}	۱/۹۲±۰/۴۴^{d}
درصد میانگین وزن (گرم)	۶۴/۸۸±۰/۵۱^{b}	۳۱/۸۷±۲/۷۱^{c}	۱۸۹/۱۲±۲/۸۷^{a}	۳۵/۲۶±۶/۷۹^{c}	۱۳/۰۴±۳/۳۸^{d}
طول اولیه (سانتی‌متر)	۱۱/۵۳±۰/۲۱^{a}	۱۱/۳±۰/۱۱^{a}	۱۱/۴±۰/۱^{a}	۱۱/۲±۰/۲^{a}	۱۱/۳±۰/۳۶^{a}
طول نهایی (سانتی‌متر)	۱۵/۷±۰/۱۱^{b}	۱۴/۴±۰/۰^{c}	۱۷/۲±۰/۴۴^{a}	۱۴/۴۳±۰/۵۸^{c}	۱۲/۷±۰/۱۷^{d}
نرخ رشد ویژه (درصد)	۰/۵۵±۰/۰^{b}	۰/۳۱±۰/۰۲^{c}	۱/۱۸±۰/۰۱^{a}	۰/۳۳±۰/۰۵^{c}	۰/۱۴±۰/۰۳^{d}
فاکتور وضعیت (گرم)	۰/۶۵±۰/۰۱^{b}	۰/۷±۰/۰۳^{c}	۰/۹±۰/۰۶^{a}	۰/۶۹±۰/۰۱^{b}	۰/۸۲±۰/۰۲^{d}
ضریب تبدیل غذا (درصد)	۳۵/۲۹±۰/۵۹^{b}	۳۷/۲±۲/۷۸^{b}	۱۵/۶۱±۰/۲۵^{c}	۱۵/۳±۰/۰۹^{c}	۶۲/۱۸±۴/۲۹^{a}.
نرخ بازماندگی (درصد)	۹۴/۲۸±۴/۲۸^{a}	۹۴/۲۸±۴/۲۸^{a}	۹۸/۰۹±۲/۱۸^{a}	۹۴/۲۸±۴/۲۸^{a}	۷۹/۹۹±۵/۷۱^{b}

* اعداد در یک ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵)

بیش‌ترین درصد بقاء در تیمار یونجه مشاهده شد (۲/۱۸±۹۸/۰۹) هرچند که اختلاف معنی‌داری با تیمارهای عدسک، آزولا و پلت حاوی ۳۵ درصد پروتئین نداشت (P>۰/۰۵) و برای این تیمارها درصد بازماندگی یکسان بود (۴/۲۸±۹۴/۲۸). کم‌ترین درصد بقاء در تیمار پلت حاوی ۲۵ درصد پروتئین مشاهده شد و با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵).

بررسی برخی از شاخص‌های خونی در جدول ۴ نشان داده شده است، که در تیمار یونجه بیش‌ترین مقدار هموگلوبین مشاهده شد (۰/۱۷g/dl±۸/۸) و با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). پس از آن تیمار عدسک (۰/۳g/dl±۸/۴۶) با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت. سپس به‌ترتیب تیمار آزولا (۰/۲۱g/dl±۸/۱) و پلت حاوی ۳۵ درصد پروتئین (۰/۳g/dl±۷/۸) بیش‌ترین مقدار هموگلوبین را نشان دادند که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵). کم‌ترین مقدار هموگلوبین در تیمار پلت حاوی ۲۵ درصد پروتئین (۰/۱۷g/dl±۷/۵) مشاهده شد که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). هم‌چنین بیش‌ترین مقدار حجم گلبول قرمز (MCV) و غلظت گلبول قرمز (MCH) در تیمارهای یونجه و عدسک مشاهده شد که با یکدیگر و با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵). در فاکتور حجم گلبول قرمز و غلظت گلبول قرمز اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزولا، پلت حاوی ۳۵ درصد و ۲۵ درصد پروتئین مشاهده نشد (P>۰/۰۵). بیش‌ترین مقدار میانگین گلبول قرمز (RBC)، در تیمار یونجه مشاهده شد (۰/۰۳ g/dl±۱/۸۶) هر چند که با تیمارهای عدسک (g/dl ۰/۰۶±۱/۸۴)، آزولا (۰/۱۲ g/dl±۱/۸۳) و پلت حاوی ۳۵ درصد پروتئین (۰/۲g/dl±۱/۸۱) اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵) و کم‌ترین مقدار میانگین گلبول قرمز در تیمار پلت حاوی ۲۵ درصد پروتئین مشاهده شد (۰/۰۱g/dl±۱/۷۴) که اختلاف معنی‌داری با تیمار پلت حاوی ۳۵ درصد پروتئین نداشت اما با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). هم‌چنین بیش‌ترین درصد هماتوکریت در تیمار یونجه مشاهده شد. (۰/۱۵±۲۶/۸۲) ولی اختلاف معنی‌داری با تیمارهای عدسک، آزولا و پلت حاوی ۳۵ درصد پروتئین نداشت (P>۰/۰۵).کم‌ترین درصد هماتوکریت در تیمار پلت

حاوی ۲۵ درصد پروتئین مشاهده گشت (۱/۲۳±۲۳/۱۱) هر چند که اختلاف معنی‌داری با تیمارهای عدسک، آزولا و پلت حاوی ۳۵ درصد پروتئین نداشت (P>۰/۰۵). هم‌چنین در شاخص درصد غلظت هموگلوبین (MCHC) اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

جدول ۴ : مقایسه داده‌های (میانگین ± انحراف معیار) بعضی شاخص‌های خونی اندازه‌گیری شده در تیمارهای مختلف در ماهی آمور

تیمار / شاخص	عدسک	آزولا	یونجه	پلت حاوی ۳۵٪ پروتئین	پلت حاوی ۲۵٪ پروتئین
W.B.C[1] (×۱۰^۴ /ul)	۷/۵±۰/۰[a]	۷/۴±۸۰/۸۳[ab]	۷/۲±۱۷۳/۲[bc]	۷/۰۵±۲۶۴/ ۵[c]	۷/۳±۳۰۰/۰[ab]
R.B.C[2] (×۱۰^۶ /ul)	۱/۸۴±۰/۰۶[a]	۱/۸۳±۰/۱۲[a]	۱/۸۶±۰/۰۳[a]	۱/۸۱±۰/۲[ab]	۱/۷۴±۰/۰۱[b]
هموگلوبین(g/dl)	۸/۴۶±۰/۳[b]	۸/۱±۰/۲۱[c]	۸/۸±۰/۱۷[a]	۷/۸±۰/۳[d]	۷/۵±۰/۱۷[e]
هماتوکریت (درصد)	۲۵/۷±۱/۵۶[ab]	۲۵/۲±۱/۰۱[ab]	۲۶/۸۲±۰/۱۵[a]	۲۴/۹±۲/۲۹[ab]	۲۳/۱۱±۱/۲۳[b]
M.C.V[3]	۱۴۲/۲۱±۸/۸۸[b]	۱۳۷/۳۱±۷/۴[c]	۱۴۶/۴۷±۵/۰۹[a]	۱۳۷/۵۳±۶/۴۲[c]	۱۳۷/۳۳±۱۵/۶۱[c]
M.C.H[4]	۴۵/۸۹±۰/۱۵[b]	۴۲/۸۵±۲/۴۴[c]	۴۷/۷۷±۱/۲۱[a]	۴۲/۷۱±۱/۶۴[c]	۴۲/۵۱±۰/۸[c]
M.C.H.C[5]	۳۲/۲۴±۰/۶۵[a]	۳۱/۷۱±۰/۵۲[a]	۳۱/۹۸±۱/۴۸[a]	۳۱/۱۱±۰/۲۱[a]	۳۰/۷۴±۰/۴۶[a]

میانگین گلبول سفید۲.میانگین گلبول قرمز۳.حجم گلبول قرمز۴.غلظت گلبول قرمز ۵.درصد غلظت هموگلوبین

بحث

میزان و نوع تغذیه ماهی آمور و در پی آن رشد وابسته به ترکیب شیمیایی یا ارزش غذایی جیره می‌باشد و ترکیب شیمیایی گیاهان نیز روی انتخاب گیاه مصرفی تاثیر می‌گذارد (۷). طبق نتایج به‌دست آمده بهترین رشد و بیش‌ترین میزان هموگلوبین، هماتوکریت و حجم گلبول قرمز در تیمار تغذیه شده با گیاه یونجه مشاهده شد هرچند که استفاده از غذای پلت حاوی پروتئین بالا، رشد و عملکرد قابل قبولی داشت. آزمایش‌های دیگر توسط (۲، ۸ و ۳۰) در ماهی آمور از غذای کنسانتره نتایج مشابه‌ای را نشان دادند که به‌نظر می‌رسد غذای کنسانتره حاوی پروتئین بالا می‌تواند به‌راحتی مواد مغذی لازم را در اختیار ماهی قرار داده و موجب رشد این ماهی در مقایسه با بعضی از غذاهای گیاهی گردد؛ زیرا مقدار ماندگاری غذای پلت در روده ماهی آمور حدود سه برابر بیش‌تر از غذای گیاهی است (۳۷) که تاثیر آن نشان‌دهنده توانایی ماهی آمور در هضم و جذب بهینه غذای پلت و رشد قابل قبول است که با نتایج به‌دست آمده مشابهت دارد. بنابراین مسئله ساختن جیره‌ای با فرمول مناسب به‌منظور بهبود کارایی هضم و جذب ضروری است، که این مسئله باعث به‌دست آوردن میزان کافی انرژی و پروتئین می‌شود. تیمار تغذیه شده با گیاه آزولا اختلاف معنی‌داری با تیمار تغذیه شده با پلت حاوی ۳۵ درصد پروتئین نداشت. به‌علاوه طی گزارش Amirkolaie و همکاران (۲۰۱۰) نسبت وزن روده در ماهیان تغذیه شده از غذای گیاهی به وزن بدن در مقایسه با ماهی‌هایی که غذای پلت مصرف کرده بودند بیش‌تر بود که علت آن‌را ارتباط مستقیم با حجم غذای مصرفی گزارش کردند زیرا مصرف میزان بالاتری از غذا فعالیت بیش‌تر دستگاه گوارش را موجب شده و به‌دنبال آن باعث افزایش وزن روده می‌گردد (Khara و همکاران، ۲۰۰۲). در مقایسه با ماهیان گوشت‌خوار و همه‌چیزخوار، از طرفی غذای طبیعی ماهی آمور حاوی انرژی و پروتئین کم‌تری است و از طرف دیگر مقدار ماندگاری غذا در روده ماهی آمور، کم‌تر از ماهیان گوشت‌خوار و همه‌چیزخوار است (۳۷) که علت آن قابلیت هضم پذیری کم‌تر غذاهای گیاهی به‌واسطه کربوهیدرات‌های با قابلیت هضم کم مانند فیبر است (۴) که مشاهده نشدن اختلاف معنی‌دار در فاکتورهای رشد، بین تیمار تغذیه شده از گیاه آزولا با تیمار تغذیه شده از پلت حاوی ۳۵ درصد پروتئین با توجه به‌میزان متفاوت درصد غذادهی روزانه که برای آزولا ۲۰ درصد وزن بدن ماهی‌ها و برای پلت حاوی ۳۵ درصد پروتئین، ۵ درصد وزن بدن ماهی‌ها بود با یافته‌های Yudu و همکاران (۲۰۰۹) مشابهت داشت.

Fillizadeh و همکاران (۱۹۹۰) گزارش نمودند که گیاه عدسک آبی خیلی بیش‌تر از گیاه آزولا توسط ماهی آمور مصرف می‌شود که با نتایج به‌دست آمده در این تحقیق مشابهت داشت. هم‌چنین با گزارشات Catrino و همکاران (۱۹۹۷) مبنی بر این که گیاهان آزولا و عدسک آبی با رغبت توسط ماهی آمور مصرف می‌شوند و به‌عنوان یکی از غذاهای گیاهی ترجیهی ماهی آمور شناخته می‌شوند، با نتایج به‌دست آمده در این تحقیق مشابهت داشت. طی این تحقیق بهترین رشد در تیمار تغذیه شده با گیاه یونجه مشاهده شد و عدسک آبی نسبت به آزولا با رغبت تر و بیش‌تر مصرف شد.

نتایج به‌دست آمده در این آزمایش نشان‌دهنده توانایی ماهی آمور برای تغذیه از غذای پلت می‌باشد. بروز چنین شرایطی می‌تواند یک چالش جدی برای تصورات پیشین باشد که دستگاه گوارش ماهی آمور تنها توانایی هضم و جذب غذای علفی را داشته و در مقابل غذای پلت ناتوان است. با توجه به تغذیه زیاد و ضریب تبدیل غذایی بالای ماهی آمور و محدودیت و در دسترس نبودن گیاهان مورد تغذیه این ماهی در ایران که موجب گسترش استفاده از ضایعات کشاورزی در صنعت پرورش دام شده است (۴، ۳۱) استفاده انحصاری از علوفه برای پرورش ماهی آمور می‌تواند کاهش تراکم این ماهی باارزش و بازارپسند در استخرهای خاکی را به‌دنبال داشته باشد؛ بنابراین تهیه غذای کنسانتره مناسب این ماهی باعث گسترش پرورش این گونه شده و سهم آن را در پرورش توام کپور ماهیان افزایش می‌دهد و یا امکان پرورش تک گونه‌ای این ماهی را فراهم کند. تهیه غذای کنسانتره متناسب با نیازمندی ماهی آمور علاوه بر این که می‌تواند باعث افزایش عملکرد شاخص‌های رشد در ماهی آمور شده بلکه کاهش تلفات این ماهی در استخرهای پرورش گردد که به نوبه خود یک چالش در پرورش ماهی آمور می‌باشد.

منابع

1- **Ajiboye, O.O. and Yakuba, A.F., 2009.** Some aspects of biology and aquaculture potentials of *Tilapia guineensis (*dumeril*)* in Nigeria. Rev. Fish Biol. Fish. DOI 10.1007/s11160-009-9152-z

2- **Amirkolaie, A.k.; Lashkarboloky, M. and Abdoli, S., 2010.** Effects of pellet and grass diets on growth and morphology of gastro-intestinal tract in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). J. of Aquaculture. Vol. 63, No. 3, pp.: 209-207.

3- **Anderson, D. and Klontz, G.W., 1965.** Basic haematology for the fish culturist. Annual Northwestern Fish Culture Conference. 16: 38-41.

4- **Bahmanpour, S.A.; Baiat, A. and Dadpasand, M., 2010.** The effects of replacing alfalfa with apple pomace ensiled with urea, on Ghezel male lambs. The 4 th Congress on Animal Science, Karaj, Iran. pp.: 159.

5- **Cai, X.; Luo, L.; Xue, M.; Wu, X. and Zhan, W., 2005.** Growth performance, body composition and phosphorus availability of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) as affected by diet processing and replacement of fishmeal by detoxified castor bean meal. Aquaculture Nutrition. 11: 293–299.

6- **Carter, C.G. and Brafield, A.R., 1991.** The bioenergetics of grass carp *Ctenopharyngodon idella* (Val.): energy allocation at different planes of nutrition. J Fish Biol. 39: 873-87.

7- **Catrino, L.; Ferreira, M. and Moreira. M., 1997.** Preferences of Grass Carp for Macrophytes in Iberian Drainage Channels. Aquat Plant Manage. 36: 79-83.

8- **Chan, J.C.K.; Manu, J.; Skura, B.J.; Rowshandeli, M.; Rowshandeli, N. and Higgs, D.A., 2002**. Effects of feeding diets containing various dietary protein and lipid ratios on the growth performance and pigmentation of post juvenile Coho salmon *Oncorhynchus kisutch* reared in sea water. Aquaculture Research. 33: 1137-1156.

9- **Craig, S., 2002.** Understanding Fish Nutrition, Feeds and Feeding. Cooperative Extension Service publication 420-256. Virginia State University, USA.

10- **Cross, D.G., 1969.** Aquatic weed control using grass carp. J. Fish Biol. 1: 27-30.

11- **Du, Z.Y.; Liu, Y.; Tian, J.; WANG, J.T. and Liang, G.Y., 2005.** Effect of dietary lipid level on growth, feed utilization and body composition by juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Aquaculture Nutrition. 11: 139–146.

12- **Essa, M.; Mabrouk, H. and Zaki, M., 2004**. Growth Performance of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) and Hybrid Grass Carp Fingerlings Fed on Different Types of Aquatic Plants and Artificial Diet in Concrete Basins. Aquatic Research. 30: 341-348.

13- **Erondu, E.S.; Bekibela, D. and Gbulubo, A.T., 2006**. Optimum crude protein requirement of cat fish, *Chrysichthys nigrodigitatus*. J. Fish Int. Vol. 1, No.1-2, pp.: 40-43.

14- **FAO, 2005**. The state of world fisheries and aquaculture. FAO, Rome, Italy. Pp.: 58.

15- **Filizadeh, Y.; Ahmadi, H. and Zolfinejad, K., 2007.** The Feeding Preferences of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella* Val.) For Ten Aquatic Plants. Iran & Russia Conference. 23-55.

16- **Gao, J.S.; Sasaki, N.; Kanegae, H.; Konagaya, K.; Takizawa, K.; Hayashi, N.; Okano, Y.; Kasahara, M.; Matsushita, Y. and Nyunoya, H., 2007.** The TIR-NBS but not LRR domains of two novel N-like proteins are functionally competent to induce the elicitor p50-dependenthypersensitive response. Physiol. Mol. Plant Pathol. 71: 78-87.

17- **Gao, W.; Liu, Y.J.; Tian, L.X.; Mai, K.S.; Liang, G.Y.; Yang, H.J.; Huai, M.Y. and Luo, Y.J., 2009** a. Effect of dietary carbohydrates to lipid ratios on growth performance, body composition, nutrient

utilization and hepatic enzymes activities of herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Aqualt. Nutr. Doi: 10.1111/j.1365-2095.00668.

18- **Gao, W.; Liu, Y.J.; Tian, L.X.; Mai, K.S.; Liang, G.Y.; Yang, H.J.; Huai, M.Y. and Luo, Y.J., 2009** b. Protein sparing capability of dietary lipids in herbivorous and omnivorous freshwater finfish: a comparative case study on grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*). Aqualt. Nutr. Doi: 10.1111/j.1365-2095.00698.

19- **Ghavami, N., 2001**. Chinese carp cultivation in the earthen ponds. Naghesh meher press.Tehran, Iran. pp.: 18.

20- **Ghazala, R.; Tabinda, A.B. and Yaser, A., 2011**. Growth response of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed isocaloric diets with variable protein levels. The journal of Animal & Plant Sciences. Vol. 21, No. 4, pp.: 850-856.

21- **Kalla, A. and Garg, S.K., 2004.** Use of plant proteins in supplementary diets for sustainable aquaculture. Workshop Rational Use Water Resources Aquacult. CCS, HAU, Hisar, India, pp.: 31– 47.

22- **Khara, H.; Keyvan, A.; Nezami, S.; Mehdinejad, K. and Mohammadjani, T., 2002**. Diet of *Rutilus Frisii Kultum* X *Ctenopharyngodon idella* hybrid. Iranian Journal of Fisheries. 11: 31-42.

23- **Lin, D., 1991.** Grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. Handbook of Nutrient Requirement of Finfish, CRC Press. pp.: 89-96.

24- **Lovell, R.T., 1972**. Nutrition and Feeding of Fish. Van Nostrand-Reinhold: New York.

25- **Opuszynski, K., 1989.** Use of phytophagous fish to control aquatic plants. Aquaeult. 1, 61.

26- **Prinsloo, J.F. and Schoonbi, H.J., 1985**. Fish polyculture in Transkie. Fish farmer. Newsletter on Aquaculture in southern Africa. 9-12.

27- **Prinsloo, J.F. and Schoonbi, H.J., 1986**. Comparison of the early larval growth rates of the Chinese grass carp *Ctenopharyngodon idella* and the Chinese silver carp *Hypothalmiehthys molitrix* using live and artificial feed. Water SA. 12, 229.

28- **Prinsloo, J.F. and Schoonbi, H.J., 1987**. Growth of Chinese grass carp *Ctenopharyngodon idella* fed on cabbage wastes and kikuyu grass. Water SA. 13, 125.

29- **Prinsloo, J. and Schoonbee, H., 2000.** Comparison of the early larval growth rates of the Chinese grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and the Chinese silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) using live and artificial feed. Republic of South Africa. 66: 7013-7051.

30- **Safari, O. and Boldaji, F., 2006**. Effect of dietary lipid level on growth, feed utilization and body composition by juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Pajouhesh and Sazandegi. 76: 109-117.

31- **Shadnoush, G.H., 2010.** Use of almond waste in nutrition of growing lambs. The 4th Congress on Animal Science, Karaj, Iran. pp.: 174.

32- **Sheunn, D.Y.; Tain, S.L. Chyng, H.L. and Hung, K.P., 2003**. Influence of dietary protein levels on growth performance, carcass composition and liver lipid classes of juvenile *Spinibarbus hollandi (Oshima).* Aquacult. Res. 34: 661-666.

33- **Shireman, J.V. and Smith, C.R., 1983**. Synopsis of biological data on the grass carp. FAO press. pp.: 23-24.

34- **Tacon, A.G.J., 1990**. Standard methods for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. Washington DC, Argent Laboratories Press. pp.: 454.

35- **Tuan, N.; Steinbronn, S.; Brice, D.; Dung, B.; Focken, U. and Becker, K., 2007**. Growth and Feed Conversion of the Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) Fed on Fresh Plant Material under Laboratory Conditions in Viet Nam. Tropentag. 44: 9-11.

36- **Vossoughi, G.H. and Mostajeer, B., 2006**. Fresh water fishes. Tehran University Press, Tehran. pp.: 123.

37- **Yudu, Z.; Tian, L.; Liang, G.; Lan, H. and Liu, Y., 2009.** The Intestinal Evacuation and Maximum Daily Consumption of Purified Formulated Diets by Juvenile Grass Carp (*Ctenopharyngdon idella*). Fish Science. 2: 1-5.

The comparative of plant diets (*Alfalfa*, *Lemna* sp and *Azolla filiculoides)* and pelleted food on growth performance, survival rate and some blood factor in Grass Carp *(Ctenopharyngodon idella)*

- **Hamed Nekoubin*:** Department of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, P.O.Box: 49138-15739 Gorgan, Iran
- **Mohammad Sudagar:** Department of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, P.O.Box: 49138-15739 Gorgan, Iran

Received: October 2012 Accepted: December 2012

Keyword: Grass carp, *Ctenopharyngodon idella*, Plant food**,** Pellet food, Growth rate, Blood factors

Abstract

Grass carp is one of the valuable fishes in the poly culture system that, it mostly use from aquatic plants in pond. In order to investigate the impact of different vegetative nutrients and pellet on the growth indices of *Ctenopharyngodon idella*, an experiment (90 days) was conducted at the aquatic research center of Shahid Fazli Barabadi Fisheries Faculty in Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. In this research, three types of vegetative nutrients: *Alfalfa*, *Lemna* sp and *Azolla filiculoides* have been used with the 20 percent body weight and two types of pellets food containing 25 and 35 percent of protein, with 5 percent of body weight whit three replicates per treatment for a total of fishes, and in each treatments had 15 small fishes with the average weight of 15.41± 0.51g have been applied. The experiment results after the research period indicated that the most rate of the growth performance is related to treatment fed alfalfa plant and it had significantly different to other treatments ($P<0.05$), followed by *Lemna* sp. and had significant difference from other treatments ($P<0.05$). The lowest growth performance observed in the pellets containing 25 percent protein that it had significantly different to other treatments ($P<0.05$). And also in growth parameters, *A. filiculoides* and formulated feed with 35% protein was not significantly different from each other ($P>0.05$) in growth performance. In blood factors, there was not observed any significantly different in mean corpuscular hemoglobin Corpuscular (MCHC) index ($P>0.05$) in treatments. Also the maximum of red blood corpuscular (RBC) was observed in *Lemna* sp., *Azolla filiculoides*, *Alfalfa* and pelleted diet with 35% protein, than they had not significantly different to each other ($P>0.05$).

* Corresponding Author's email: nekoubin.hs@gmail.com