DOI: 10.22055/IVJ.2022.357647.2491

بررسی اثرات لسیتین سویا بر پارامترهای رشد و خصوصیات بیوشیمیایی در ماهی باس دریایی آسیایی (*Lates calcarifer*)

سمیه نیک‌نژاد[۱]، آناهیتا رضایی[۲*]، رحیم پیغان[۳]، محمد راضی‌جلالی[۴] و منصور طرفی‌موزان‌زاده[۵]

[۱] دانش‌آموخته دکتری تخصصی پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۲] دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۳] استاد گروه علوم بهداشت دام، طیور و آبزیان و عضو قطب بیماری‌های ماهیان گرمابی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۴] استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۴] استادیار گروه آبزی‌پروری، پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور، مؤسسه تحقیقاتی علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران

دریافت: ۱۴۰۱/۶/۲ پذیرش: ۱۴۰۱/۷/۱۹

چکیده

اثر تغذیه‌ای لسیتین سویا بر عملکرد رشد و شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون ماهی باس دریایی آسیایی (Lates calcarifer) با میانگین وزن اولیه ۷/۹۶ ± ۵۰/۳۶ گرم در یک دوره ۶۰ روزه بررسی شد. در مطالعه حاضر ۶ جیره با سطوح پروتئین و انرژی تقریباً یکسان (۴۵ درصد پروتئین و ۱۵ کیلو ژول بر گرم انرژی) از ترکیب ۲ منبع روغن شامل روغن ماهی و مخلوط روغن‌های گیاهی با سه سطح صفر، ۲ و ۴ درصد لسیتین سویا ساخته شد. برای این منظور جیره‌های آزمایشی به صورت جیره ۱ (روغن ماهی)، جیره ۲ (روغن ماهی + ۲٪ لسیتین)، جیره ۳ (روغن ماهی + ۴٪ لسیتین)، جیره ۴ (مخلوط روغن‌های گیاهی شامل سویا و کانولا به نسبت برابر)، جیره ۵ (مخلوط روغن‌های گیاهی + ۲٪ لسیتین) و جیره ۶ (مخلوط روغن‌های گیاهی + ۴٪ لسیتین) فرموله شد. بررسی و مقایسه مقادیر اسیدهای چرب جیره‌ها بیان‌گر افزایش اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیره سری ان-۳ متعاقب افزودن لسیتین سویا به جیره بود. بر اساس داده‌های به دست آمده به طور کلی جایگزینی روغن ماهی با روغن‌های گیاهی سبب کاهش رشد در ماهی باس دریایی آسیایی شده است. با این وجود افزودن لسیتین سویا در سطح ۴ درصد سبب بهبود شاخص‌های رشد و تغذیه در ماهیان تغذیه شده با روغن‌های گیاهی گردید. از میان شاخص‌های بیوشیمیایی سرم، افزودن لسیتین سویا به جیره باعث افزایش کلسترول و آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز در پلاسمای خون ماهی شد اما بر میزان آنزیم کبدی آلکالین فسفاتاز تأثیر معنی‌داری نداشت. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از لسیتین سویا در سطح ۴ درصد در ترکیب جیره غذایی بچه ماهیان سی باس آسیایی جهت بهبود شاخص‌های رشد این گونه مناسب است.

کلمات کلیدی: لیستین سویا، سی‌باس آسیایی، شاخص‌های رشد، شاخص‌های بیوشیمیایی

مقدمه

آبزی‌پروری به عنوان یک بخش مهم امنیت غذایی برای جمعیت در حال رشد، در جهان محسوب می‌شود و به دلیل تراکم بالا در روش‌های پرورش به سرعت توسعه یافته است. به دلیل محدودیت صید جهانی و همچنین توسعه آبزی‌پروری، فشار فزاینده‌ای بر عرضه پودر و روغن ماهیان دریایی در جهان وجود دارد (Robin and Skalli, 2007).

*نویسنده مسئول : آناهیتا رضایی، دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

E-mail: a.rezaie@scu.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

در این راستا، تولید و توسعه پایدار زیست‌محیطی و آبزی‌پروری و صرفه‌جویی در منابع دریایی محدود، حاکی از تدوین جیره‌های غذایی ماهی شامل مواد خوراکی مغذی و سازگار با محیط زیست به عنوان جایگزین استفاده از مقادیر زیاد پروتئین‌ها و چربی‌هایی که به طور مستقیم حاصل از صید دریایی هستند، می‌شوند (FAO, 2016). پروتئین‌ها و روغن‌های گیاهی مکمل‌های نسبتاً فراوان و با قیمت پایین‌تر هستند که به عنوان منابع پروتئین و چربی جایگزین‌های مناسب برای پودر ماهی و روغن ماهی به حساب می‌آیند. این مکمل‌ها به صورت جداگانه یا در ترکیب متناسب با یکدیگر در جیره‌های غذایی ماهی در نظر گرفته می‌شوند (Messina et al, 2013). چنانچه توجه مناسبی در رعایت الزامات موجود در میزان مواد مغذی ضروری و پرهیز از حضور عوامل ضدتغذیه‌ای صورت گیرد، پتانسیل بیش‌تری برای تولید جیره با پودرماهی یا روغن ماهی کم‌تر برای بیش‌تر گونه‌ها وجود دارد (NRC, 2011). با این حال، استفاده از جیره‌های حاوی مقادیر کم روغن یا پودر ماهی می‌تواند در تولید اسیدهای چرب غیر اشباع زنجیره طولانی با چند باند دوگانه (LCPUFAs) n-3 مانند اسید دکوزاهگزائوییک و اسید ایکوزاپنتائنوییک ناکارآمد باشد. در صورت عدم گنجاندن این اسیدهای چرب در جیره غذایی کاهش آن‌ها را در بافت ماهیان پرورشی خواهیم داشت که دو پیامد اصلی را به همراه دارد: کاهش احتمالی رشد ماهی مرتبط با نیازهای گونه‌های پرورشی و دیگری کاهش محتوای اسیدهای چرب ضروری در عضلات و کبد ماهی (Connor, 2000). با توجه به مطالب ذکر شده، استفاده از روغن‌های گیاهی در جیره ماهیان گوشت‌خوار موجب تغییر در ترکیب لاشه، کاهش انتقال چربی و در نتیجه افزایش رسوب چربی در انتروسیت‌های روده و آسیب‌های بافتی می‌گردد (Caballero et al, 2003). این مشکل می‌تواند به علت کمبود فسفولیپیدها در روغن‌های گیاهی باشد، زیرا فسفولیپیدها به عنوان امولسیفایردر روده عمل می‌کنند و جذب اسیدهای چرب بلند زنجیره را بهبود می‌بخشند (Koven et al, 1993). مکمل لسیتین سویا به عنوان منبع ارزان و در دسترس از فسفولیپید در جیره غذایی آبزیان محسوب می‌شود (ADM Specialty Ingredients, 2003). به عنوان یک جاذب غذایی شیمیایی، لسیتین می‌تواند نیاز به پودر ماهی و روغن ماهی را به عنوان منابع چربی در جیره کاهش دهد و یا از بین ببرد. لسیتین نقش تعاملی در جذب روده‌ای کلسترول دارد که رشد و بقای گونه‌های مختلف آبزیان را بهبود می‌بخشد (ADM Specialty Ingredients, 2003). همچنین نقش مهمی در متابولیسم چربی و کربوهیدرات در کبد ماهی دارد. ماهی باس‌دریایی آسیایی (*Lates Calcarifer*) متعلق به خانواده لتیده (Latidae)، یکی از ماهیان دریایی پرورشی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری به شمار می‌رود و بسیار سازگار است. این ماهی کاتادروموس بوده و قابلیت سازگاری در هر دو محیط آب شور و شیرین را دارد (Paterson et al, 2003). مانند بسیاری از گونه‌های ماهی دریایی، ماهی باس دریایی گوشتخوار است و در محیط طبیعی از شکار طعمه‌های غنی از چربی تغذیه می‌کند. اگر چه جیره‌های تجاری برای حمایت از رشد سودآور رضایت‌بخش هستند، اما تغییرات ساختاری و متابولیکی جدی را در کبد باس دریایی ایجاد می‌کنند که معمولاً منجر به تجمع قابل توجه چربی‌ها در کبد و حفره شکمی می‌شود (Lemaire et al, 1991). با توجه به این که متابولیسم انرژی و عوامل تغذیه‌ای بر مدیریت و نگهداری ماهیان پرورشی تأثیر می‌گذارند، هدف از این مطالعه بررسی اثر مقادیر مختلف لسیتین سویا جهت بهبود جایگزینی روغن ماهی با ترکیب روغن‌های گیاهی (سویا و کانولا) و تأثیر این جیره‌ها بر عملکرد رشد و شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون ماهی باس دریایی آسیایی است.

مواد و روش کار

تحقیق حاضر در سوله متعلق به بخش خصوصی در مجاورت ایستگاه تحقیقاتی بندر امام خمینی واقع در استان خوزستان به مدت دو ماه و از شهریور تا آبان ماه ۱۴۰۰

صورت گرفت. بچه ماهیان باس دریایی از کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان دریایی راموز تهیه شدند. زیست‌سنجی ماهیان انجام شد و تعداد ۲۷۰ قطعه بچه ماهی باس‌دریایی پرورشی قبل از شروع آزمایش به مدت دو هفته با شرایط آزمایشگاهی و جیره غذای تجاری سازگار شدند. پس از طی مرحله سازگاری، ماهیان به طور تصادفی انتخاب و در ۱۸ مخزن فایبرگلاس (هر مخزن حاوی ۱۵ قطعه ماهی با متوسط وزن اولیه ۷/۹۶ ± ۵۰/۳۶ گرم به ۶ تیمار (هر تیمار ۱۵ ماهی در۳ تکرار) تقسیم شدند و به مدت دو ماه با جیره‌های غذایی ساخته شده، تغذیه شدند. آزمایش در یک سالن سرپوشیده با دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی انجام شد. به منظور تأمین اکسیژن مورد نیاز ماهیان، درون هر تانک یک عدد سنگ هوا متصل به هواده مرکزی قرار داده شد. اندازه‌گیری عوامل کیفی آب شامل دمای آب، میزان شوری و اکسیژن محلول روزانه و pH به صورت هفتگی انجام شد. ماهی‌ها در شرایط استاندارد با دمای آب بین ۲۷–۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط کیفی pH در محدوده ۸– ۷/۸، میانگین اکسیژن محلول در آب ۶/۵– ۵/۸ میلی‌گرم بر لیتر، آب تصفیه شده دریا با شوری ppt ۴۵ نگهداری شدند. غذادهی در طول دوره سازگاری و پرورش به روش سیری و به صورت دستی و ۲ بار در روز (در ساعات ۰۹:۰۰ و ۱۷:۰۰) صورت پذیرفت، در این مدت ماهی‌ها، مورد بررسی روزانه قرار گرفتند.

جیره‌های غذایی این مطالعه با نرم افزار UFFDA با در نظر گرفتن نیازهای تغذیه‌ای ماهی باس دریایی‌آسیایی فرموله شدند. برای این مطالعه ۶ جیره با ۲ روغن گیاهی (شامل روغن سویا و روغن کانولا) و روغن ماهی و ۲ سطح لسیتین سویا (صفر، ۲ و ۴ درصد جیره) با ۳ تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته شد. ترکیب جیره‌ها شامل: جیره ۱ = روغن ماهی، جیره ۲ = روغن ماهی+ ۲ درصد لسیتین سویا، جیره ۳ = روغن ماهی+ ۴ درصد لسیتین سویا، جیره ۴ = ترکیب روغن‌های گیاهی (روغن سویا و روغن کانولا)، جیره ۵ = ترکیب روغن‌های گیاهی+ ۲ درصد لسیتین سویا، جیره ۶ = ترکیب روغن‌های گیاهی+ ۴ درصد لسیتین سویا

جیره‌های غذایی با سطح پروتئین و انرژی یکسان (۴۵ درصد پروتئین و ۱۵ kj/g انرژی) تهیه و پس از خشک شدن در اندازه مناسب ریز گردیدند. از روش‌های AOAC (۱۹۹۵)، برای ارزیابی ماده خشک، پروتئین خام، چربی خام و خاکستر جیره‌ها استفاده شد. برای تعیین میزان رطوبت، جیره مورد نظر توزین شده در داخل پتری‌دیش قرار داده شده، سپس در داخل آون (D-63450, Heraeus, Hanau Germany)، در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت پتری‌دیش‌ها از آون خارج شده و دوباره وزن شدند. با محاسبه اختلاف وزن به دست آمده درصد رطوبت مشخص شد. میزان خاکستر جیره با سوزاندن نمونه در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت اندازه‌گیری شد. پروتئین کل با استفاده از دستگاه کلدال اتوماتیک (Kjeltec^{TM}2300, Foss, Sweden) با ضرب میزان نیتروژن به دست آمده در عدد ۶/۲۵ محاسبه شد. همچنین چربی کل جیره‌های آزمایشی نیز با استفاده از دستگاه سوکسله (Soxtec system) اندازه‌گیری شد. مواد اولیه و ترکیب تقریبی جیره‌های تهیه شده در Table 1 آمده است.

برای آنالیز و شناسایی پروفایل اسیدهای چرب جیره‌ها، مقدار چهار گرم از هر تیمار را توزین کرده و در میکروتیوب استریل قرار داده و درکنار یخ خشک به آزمایشگاه آرتیمیای ارومیه ارسال شد. بعد از انجام آنالیزها توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی، با توجه به کروماتوگرام خروجی از دستگاه، وزن متیل استر استخراج شده از مقدار مشخصی از نمونه، درصد اسیدهای چرب محاسبه نهایی گردید. مشخصات اسیدهای چرب رژیم غذایی مورد استفاده در این مطالعه در Table 2 نشان داده است.

Table 1: Ingredients of the experimental diets (g/kg)

Ingredient	Treatments					
	1	2	3	4	5	6
Fish meal	455	455	455	455	455	455
Soybean meal	80	80	80	80	80	80
Corn gluten	80	80	80	80	80	80
Wheat gluten	80	80	80	80	80	80
Poultry meal	145	145	145	145	145	145
Wheat middling	42	42	42	42	42	42
Beef gelatin	10	10	10	10	10	10
DL-methionine	1	1	1	1	1	1
L-lysine	2	2	2	2	2	2
Fish oil	70	50	30	-	-	-
Soybean oil	-	-	-	35	25	15
Canola oil	-	-	-	35	25	15
Soy lecithin	-	20	40	-	20	40
Butyric acid	5	5	5	5	5	5
Premixes[f] Vitamin and Mineral	20	20	20	20	20	20
Vitamin C	5	5	5	5	5	5
Dicalcium phosphate	5	5	5	5	5	5
Proximate composition						
Dry matter	93.9	93.8	92.6	92.7	92.7	92.9
Crude protein	45.8	45.2	44.9	44.7	45.2	45.6
Crude lipid	14.6	14.5	15.2	14.9	15.4	14.6
Ash	14.0	13.8	14.7	14.3	14.2	14.3

Table 2: Fatty acid profile of the experimental diets

Fatty acids	Treatments					
	1	2	3	4	5	6
14:0	2.5	2.0	0.6	1.5	1.3	1.2
16:0	28.3	26.0	22.5	22.6	22.1	21.7
18:0	9.6	8.8	11.7	8.5	7.5	7.5
20:0	0.1	0.5	0.8	0.8	0.7	0.7
22:0	0.5	0.5	0.8	0.6	0.6	0.5
Total SFA	41.0	37.8	36.4	34	32.2	31.6
14:1n-5	0.3	0.4	0.4	0.3	0.7	0.5
16:1n-7	3.5	2.5	1.5	1.9	1.7	1.8
18:1n-7	2.0	2.1	2.8	2.0	1.6	1.4
18:1n-9	26.8	19.4	17.8	42.0	32.1	29.3
20:1n-9	0.1	0.2	0.3	1.8	0.6	0.3
Total MUFA	32.7	24.6	22.8	48.0	36.7	33.3
18:2n-6	11.1	23.3	26.3	8.4	21.2	26.2
20:2n-6	0.1	0.4	1.0	0.1	0.1	0.1
20:4n-6	1.2	1.5	1.8	0.2	0.6	0.3
Total n-6 PUFA	12.4	25.4	29.1	8.7	21.9	26.6
18:3n-3	0.6	2.0	2.4	0.4	1.8	2.8
20:5n-3	2.4	2.9	2.7	0.3	0.6	0.4
22:6n-3	5.1	6.2	6.0	1.0	1.0	1.4
Total n-3 PUFA	8.1	11.1	11.1	1.7	3.4	4.6
Total LC-PUFA	8.8	11.0	11.5	1.6	2.3	2.2
n-3/n-6	0.7	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2

SFA: saturated fatty acids
MUFA: Monounsaturated fatty acids
PUFA: polyunsaturated fatty acids
LCPUFA: long chain polyunsaturated fatty acids

جهت بررسی اثرات سطوح مختلف لسیتین سویا و دو نوع روغن ماهی و روغن گیاهی جیره غذایی بر شاخص‌های رشد و تغذیه در جیره غذایی باس دریایی آسیایی، شاخص‌های رشد شامل وزن انتهائی بدن (FBW (g، افزایش طول بدن (FL (cm، ضریب رشد ویژه (SGR)، درصد افزایش وزن بدن (WG٪)، مصرف غذا به ازای هر ماهی (FI(g/fish، ضریب تبدیل غذایی (FCR) و درصد بازماندگی (SR٪) بر اساس فرمول‌های ذیل محاسبه گردید (Marcouli et al, 2006).

معادله شماره ۱- ضریب رشد ویژه (Specific growth rate):

(SGR) = (Ln W1 - Ln W2) / دوره پرورش به روز ×۱۰۰

معادله شماره ۲- درصد افزایش وزن بدن:

(WG٪) = وزن نهایی – وزن اولیه / وزن اولیه ×۱۰۰

معادله شماره ۳-ضریب تبدیل غذایی(Feed conversion ratio)

(FCR)= وزن/ افزایش شده غذای مصرف

معادله شماره ۴- درصد بازماندگی (Survival rate):

(SR)= تعداد ماهیان باقی مانده/ تعداد ماهیان ×۱۰۰

جهت بررسی وضعیت فیزیولوژیک ماهیان پس از دو ماه تغذیه، ماهی‌ها با ۲-فنوکسی اتانول به میزان ۲۰۰ پی پی ام بیهوش شدند. از سیاهرگ دمی تمام ماهیان با سرنگ ۲ میلی‌لیتری آغشته به هپارین سدیم خون‌گیری به عمل آمد. سپس نمونه‌های خون در میکروتیوپ استریل دارای ماده ضد انعقاد اتیلن دی آمین ترا استیک اسید (EDTA) ۱۰ درصد جهت آزمایش‌های بیوشیمیایی جمع‌آوری شده و تا قبل از سانتریفیوژ در کنار یخ خشک با دمای حدود چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای جداسازی پلاسما، نمونه‌های خون به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. نمونه‌های پلاسما جدا گردیده تا زمان انجام آنالیز بیوشیمیایی در فریزر ۸۰- نگهداری شدند. پارامترهای بیوشیمیایی مورد مطالعه شامل کلسترول به روش آنزیمی کلسترول اکسیداز و تری‌گلیسرید به روش آنزیمی گلیسروفسفات دی هیدروژناز به وسیله دستگاه بیوشیمی اتوآنالایزر با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی پارس آزمون ساخت ایران مورد سنجش قرار گرفتند. تعیین مقادیر فعالیت آنزیمی آنزیم-های آلکالین فسفاتاز (ALP) و آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) به وسیله دستگاه اتوآنالایزر و با استفاده از کیت‌های تشخیصی شرکت پارس آزمون مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری آنزیم‌ها از روش اسپکتروفتومتری استفاده گردید و در نهایت مقدار آنزیم‌ها برحسب U/L در آزمایشگاه کلینیکال پاتولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز مورد سنجش قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به دست آمده با نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۹ انجام شد. ابتدا نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون Kolmogorov-Simirnov آزموده شد. سپس برای بررسی اثرات مستقل سطح چربی و لسیتین در جیره‌ی غذایی و برهم‌کنش آن‌ها از آزمون واریانس دو طرفه (ANOVA) و از آزمون دانکن برای تعیین سطح معنی‌داری بین تیمارها در سطح اطمینان ۹۵ درصد (P<۰/۰۵) استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین گزارش شدند.

نتایج

شاخص‌های رشد و تغذیه

نتایج مربوط به داده‌های زیست‌سنجی در پایان دوره آزمایش شامل وزن انتهایی بدن، افزایش طول بدن، ضریب رشد ویژه، درصد افزایش وزن بدن، مصرف غذا به ازای هر ماهی، ضریب تبدیل غذایی و درصد بازماندگی در Table 3 ارایه شده است. بر اساس داده‌های به دست آمده شاخص‌های رشد افزایش طول بدن، ضریب رشد ویژه، درصد افزایش وزن بدن، مصرف غذا به ازای هر ماهی، ضریب تبدیل غذایی و درصد بازماندگی ماهیان تغذیه شده با جیره ۲ (جایگزینی و ترکیب ۲ درصد لسیتین سویا با روغن ماهی) با نتایج بهتری همراه بود. همچنین جایگزینی روغن ماهی با روغن‌های گیاهی سبب کاهش رشد در ماهی

باس دریایی آسیایی شده است. با این وجود افزودن لسیتین سویا در سطح ۴ درصد سبب بهبود شاخص‌های رشد و تغذیه در ماهیان تغذیه شده با ترکیب روغن‌های گیاهی (جیره‌ی شماره‌ی ۶) شد.

Table 3: Growth performance and feed utilization in L. calcarifer juveniles fed different diets

Parameters	Treatments					
	1	2	3	4	5	6
FBW (g)	91.6±10.5^{ab}	98.9 ± 9.7^{a}	99.6 ± 10.2^{a}	65.6 ± 8.5^{b}	76.0±10.7^{ab}	94.2 ± 7.8^{ab}
FL (cm)	19.6 ± 0.8^{ab}	19.9 ± 0.6^{a}	19.9 ± 0.7^{a}	17.6 ± 0.7^{b}	18.4 ±0.7^{ab}	19.6 ± 0.6^{ab}
SGR (% IBW/day)	1.24 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.3 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.72 ± 0.3	1.22 ± 0.2
WG (%)	97.2±15.3^{ab}	123.5±18.3^{a}	101.0±19.0^{a}	39.5±16.8^{c}	60.2±21.2^{b}	96.3±15.4^{ab}
FI (g/fish)	28.4 ± 0.1^{a}	27.3 ±0.0^{ab}	26.3 ± 0.3^{b}	27.4 ±0.1^{ab}	27.8 ±0.5^{ab}	27.4±0.2^{ab}
FCR	1.3 ± 0.2^{a}	1.4 ± 0.1^{a}	0.7 ± 0.2^{c}	2.7 ± 0.1^{c}	1.5 ± 0.1^{b}	0.8 ± 0.1^{c}
Survival (%)	100	100	100	100	100	100

Values expressed in mean ± SD. Values within a row with unlike superscript letters were significantly different. P< 0·05. Two-way ANOVA, P<0.05.

شاخص‌های بیوشیمیایی

نتایج مربوط به برخی از شاخص‌های بیوشیمیایی پلاسما ماهی باس دریایی در Table 4 نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، در بین شاخص‌های بیوشیمیایی مذکور به غیر از شاخص آلکالین فسفاتاز، جیره ۴ (ترکیب روغن‌های گیاهی سویا و کانولا) کارآمدترین جیره مورد استفاده بوده است. نتایج به دست آمده نشان داد کم‌ترین میزان کلسترول، تری‌گلیسرید و آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) متعلق به ماهیان تغذیه شده با جیره ۴ و در مرحله بعد ماهیان تغذیه شده با جیره یک (روغن ماهی) بود. در بقیه جیره‌ها نظم خاصی بین مقادیر به دست آمده برای شاخص‌های مد نظر مشاهده نشد. در واقع افزودن لسیتین سویا به دو جیره ۴ و یک تأثیر مثبتی بر میزان شاخص‌های بیوشیمیایی سرم نداشت.

Table 4: Plasma biochemical parameters in *L. calcarifer* juveniles fed different diets

	1	2	3	4	5	6
Cholesterol (mg/dL)	89.3±14.3^{c}	164.0±5.7^{a}	134.0±7.8^{b}	69.3±6.9^{d}	108.5±12.4^{b}	126.8±26.4^{b}
Triglycerides (mg/dL)	81.3±10.5^{c}	104.8±1.5^{b}	80.3 ± 4.5^{c}	68.3±0.5^{d}	81.8 ±13.4^{c}	160.5±37.5^{a}
ALP (U/L)	70.0±17.8^{b}	77.0 ± 8.5^{b}	85.5±27.9^{a}	85.3±6.2^{a}	60.0 ±16.8^{c}	61.3 ±14.2^{c}
ALT (U/L)	3.3 ± 1.4^{d}	12.5 ± 1.2^{b}	17.8±7.6^{a}	2.0 ± 0.9^{d}	15.0±19.5^{a}	7.8 ± 3.8^{c}

Values expressed in mean ± SD. Values within a row with unlike superscript letters were significantly different. P< 0.05. Two-way ANOVA, P<0.05.

بحث

مکمل لسیتین به عنوان منبعی از فسفولیپید، کولین و اینوزیتول، اثر مثبتی روی رشد و بازماندگی ماهیانی از قبیل ماهیان *خاویاری*، *سیم*، *آزاد ماهیان* و *قزل آلا* دارد (Pourali Fashtami et al, 2012). در اغلب بررسی‌ها نشان داده شده نیاز به فسفولیپیدها در جیره در مرحله لاروی، به دلیل محدودیت در سنتز فسفولیپیدها و در ماهیان جوان برای عملکرد بهینه رشد ضروری است (Cahu et al, 2009). بر اساس نتایج به دست آمده در بررسی حاضر بهترین عملکرد تمامی شاخص‌های رشد مربوط به جیره‌های حاوی لسیتین بود. بالاترین میزان وزن نهائی (۱۰/۲±۹۹/۶ گرم) و بهترین عملکرد شاخص ضریب تبدیل غذایی به ترتیب متعلق به جیره ۳ (تیمار روغن ماهی و ۴ درصد لسیتین سویا)، جیره ۶ (تیمار روغن گیاهی و ۴ درصد لسیتین سویا) بود. مکمل شدن لسیتین با روغن ماهی در جیره غذایی بچه *تاس‌ماهیان*

ایرانی (*Acipenser persicus*) با وزن اولیه ۰/۱ ± ۱/۹ گرم، به صورت افزودن ۴ درصد مختلف لسیتین سویا (صفر، ۱، ۲ و ۳ درصد) نشان داد بهترین عملکرد برای افزایش شاخص وزن نهائی و کاهش ضریب تبدیل غذایی، جیره حاوی ۳ درصد لسیتین سویا بوده است (Pourali Fashtami et al, 2017). همچنین نتایج مطالعه دیگری بر اساس ۳ جیره شامل جیره پایه، جیره پایه (جیره ساخته شده در مرکز تکثیر و پرورش ماهیان سردابی تنکابن) + ۱۲ درصد روغن سویا و جیره پایه + ۶ درصد روغن سویا و ۶ درصد لسیتین سویا بر روی ماهی *آزاد دریای خزر* (*Salmo trutta caspius*) با وزن اولیه ۱۰ ± ۳۵۰ گرم نشان از تأثیر مثبت و برتری جیره حاوی ۶ درصد لسیتین سویا بر دو شاخص وزن نهایی و ضریب تبدیل داشته است (Jenabi Haghparast et al, 2017). در مطالعه دیگری که روی بچه ماهیان *صبیتی* (*Sparidentex hasta*) دارای وزن اولیه ۰/۱۶ ± ۳۷/۹۰ گرم با ۴ جیره شامل درصدهای مختلف لسیتین سویا (صفر، ۳، ۶ و ۹ درصد) انجام شده، نتایج نشان داده بیش‌ترین مقادیر در شاخص‌های میانگین وزن نهایی و شاخص ضریب تبدیل غذایی در ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی ۶ درصد لسیتین به دست آمده، اما جیره‌های حاوی درصدهای مختلف لسیتین سویا اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (Pagheh et al, 2019). پروفیل اسید چرب کبد ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۹ درصد لسیتین سویا (جایگزین روغن ماهی در جیره) بسیار متفاوت از پروفیل اسید چرب کبد ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی روغن ماهی بوده است که ممکن است مسبب تغییر در متابولیسم چربی و افزایش انباشت چربی در کبد ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۹ درصد لسیتین سویا و به طبع آن افزایش شاخص کبدی شده باشد (Pagheh et al, 2019). از طرفی وجود لسیتین سویا در جیره باعث شکل‌گیری لیپوپروتئین‌ها و بهبود انتقال چربی از لوله گوارش شده که ممکن است سطح آستانه انباشت چربی در کبد را افزایش دهد (Tocher et al, 2008). سطح ۶ درصد لسیتین سویا در جیره غذایی بچه ماهیان *خاویاری ستاره‌ای* (*Acipenser stellatus*) با وزن اولیه ۰/۰۵ ± ۱۱/۳ گرم به طور قابل توجهی وزن نهایی بدن را نسبت به ۵ جیره دیگر با درصدهای صفر، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ درصد بهبود بخشیده است (Jafari et al, 2018). نتایج بررسی روی عملکرد تولید *گربه ماهی‌های* نوجوان، (*Ictalurus punctatus*) دارای وزن اولیه ۰/۰ ± ۵/۸ گرم، که با جیره‌های حاوی درصدهای صفر، ۲ و ۴ درصد تغذیه شده بودند، حاکی از تأثیر گنجاندن لسیتین سویا در جیره بر افزایش وزن نهایی و کاهش ضریب تبدیل خوراک، در ماهیان تغذیه شده با دو جیره حاوی لسیتین نسبت به جیره کنترل بوده است (Sink, 2014). بر اساس مطالعات انجام شده می‌توان یکی از علل نتیجه به دست آمده در خصوص افزایش وزن نهایی و کاهش ضریب تبدیل غذایی را به اثر لسیتین به عنوان یک ماده شیمیایی جذاب و مورد قبول ماهی در جیره، بهبود بخشیدن به هضم و جذب چربی‌های جیره، افزایش مطبوع شدن پلت‌های غذایی و کاهش تراوش مواد غذایی در آب مربوط دانست (Tocher et al, 2008). لسیتین سویا با کیفیت‌ترین و کارآمدترین منبع گیاهی فسفولیپیدهای طبیعی با بهترین مشخصات اسیدهای چرب اشباع نشده است و با اضافه کردن فسفولیپید به جیره غذایی ماهیان از طریق کاهش مصرف انرژی مورد نیاز برای ساخت فسفولیپیدها می‌توان باعث بهبود عملکرد رشد شد. لسیتین سویا در جیره منبع غنی از فسفاتیدیل کولین است که قابلیت هیدرولیز به بخش مهم پیش‌ماده فسفولیپیدها یعنی جزء قابل هضم لیزوفسفاتیدیل کولین را دارد و ممکن است مقداری انرژی برای بیوسنتز آن‌ها ذخیره کند (Tocher et al, 2008). از سوی دیگر ممکن است به دلیل عملکرد فسفاتیدیل کولین جهت افزایش انتقال چربی‌های خنثی از انتروسیت‌های روده‌ای به جریان خون و تأمین انرژی زیادتر برای رشد سریعتر (Seiliez et al, 2006) یا تکامل دستگاه گوارش باشد (Morais et al, 2007). علاوه بر این، خاصیت امولسیون کنندگی لسیتین سویا در جیره، هضم غذاها را افزایش داده، ساخت و ترشح لیپوپروتئین‌های با تراکم بسیار کم را تحریک می‌کند تا انتقال، جذب و استفاده

از چربی‌های جیره را بهبود دهد. این دو مورد یعنی انرژی حاصل از بیوسنتز لیزوفسفاتیدیل کولین، جذب و استفاده بیش‌تر از چربی‌های جیره می‌تواند موجب تحریک بیش‌تر روندهای متابولیک دیگر مانند افزایش رشد شود (Tocher et al, 2008). تفاوت در نتیجه برخی مطالعات نیز می‌تواند ناشی از عملکرد متفاوت جیره‌ها بر گونه‌های مختلف، ترکیب جیره غذایی، استراتژی تغذیه یا عوامل دیگر باشد. در این بررسی با افزایش لسیتین به جیره‌های حاوی روغن ماهی و روغن گیاهی مقدار اسیدهای چرب اشباع کاهش یافته و مقادیر اسیدهای چرب غیر اشباع زنجیره طولانی با چند باند دوگانه (LC-PUFA)، نسبت به جیره‌های مربوط به تیمارهای حاوی روغن ماهی (تیمار ۱) و روغن گیاهی (تیمار ۴) افزایش داشته است. در یک بررسی نشان داده شد جایگزینی روغن ماهی توسط روغن گیاهی سنتز LC-PUFA را در باس دریایی اروپایی فعال کرد، اگر چه این فعالیت برای پوشش نیازهای اسید چرب ضروری در ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی عاری از پودر ماهی و روغن ماهی کافی نبوده است (Torrecillas et al, 2017). اما افزودن مکمل حاوی LC-PUFA، به جیره حاوی روغن‌های گیاهی (کلزا، کتان، پالم)، باعث بهبود شاخص رشد روزانه شده است. به طور خاص، سطح بالاتر قابل توجهی از کلسترول و تری‌گلیسیرید در ماهی‌های تغذیه شده با درصدهای افزایشی لسیتین سویا و جیره غذایی بدون اسید دوکوزاهگزانوئیک مشاهده شده است (Jafari et al, 2018; Lemairea et al, 1991). در بررسی روی گربه ماهی، عدم تأثیر درصدهای مختلف لسیتین سویا در جیره بر کلسترول پلاسما و غلظت تری‌گلیسیرید گزارش شده است (Sink, 2014). تری‌گلیسیریدها کلاس اصلی لیپیدهای خنثی هستند. همچنین میزان لیپید (منبع انرژی) ذخیره شده در سلول‌های چربی را تشکیل می‌دهند. به عنوان یک شاخص سلامت در وضعیت فیزیولوژیک ماهی محسوب می‌شود. افزایش کلسترول و تری‌گلیسرید پلاسما ممکن است به این دلیل باشد که افزایش سطوح کولین رژیم غذایی می‌تواند سنتز کلسترول و تری‌گلیسرید را در کبد تسهیل کند و انتقال آن‌ها را تسریع کند و در نتیجه محتوای آن‌ها در سرم افزایش یابد (Jafari et al, 2018). از طرفی افزایش آماری سطوح تری‌گلیسیرید و کلسترول ممکن است به دلیل انطباق ضعیف منابع غذایی با نیازهای ماهی مورد مطالعه باشد (Lemairea et al, 1991). مدیریت نادرست تغذیه و نوع گونه ماهی، شرایط استرس‌زا و آسیب‌های سلولی کبد ممکن است بر فعالیت ALT سرم تأثیر بگذارد. نتایج یک مطالعه نشان داد جیره غذایی بدون روغن ماهی و یا با روغن ماهی محدود، اثرات قابل توجهی روی شاخص آنزیمی نداشته و ALT تحت تأثیر ترکیب لیپیدی جیره‌ها قرار نگرفته است (Salini et al, 2015). افزایش غلظت ALT در پلاسمای ماهی‌های باس دریایی ژاپنی تغذیه شده با جیره حاوی پودر ماهی در مقایسه با ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی پودر پروتئین گیاهی مشاهده شد (Zhanga et al, 2015). در مطالعه‌ای نشان داده شده که در ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی بدون اسید دوکوزاهگزانوئیک فعالیت‌های آنزیمی مقادیر قابل توجه بالاتری برای آلکالین فسفاتاز نشان داده است. آلکالین فسفاتاز یک آنزیم غشایی است. افزایش سطح ALP سرم در ماهی باس دریایی با واکنش التهابی مجاری صفراوی مطابقت داشته است (Lemairea et al, 1991).

در مجموع بر اساس نتایج حاصل از این بررسی، مکمل شدن جیره‌های غذایی ماهی باس دریایی آسیایی با لستین سویا می‌تواند منجر به بهبود برخی از شاخص‌های رشد گردد. از سوی دیگر با افزایش لسیتین سویا، کیفیت جیره‌های غذایی از نظر وجود اسیدهای چرب ضروری بهبود یافته و در نهایت تغذیه ماهیان با سطح ۴ درصد لستین سویا در جیره‌ها منجر به عملکرد بهتر شاخص‌های رشد در ماهی باس دریایی آسیایی شد. در مطالعه حاضر نتایج به دست آمده نشان داد، افزودن لسیتین به جیره‌های غذایی حاوی روغن‌های گیاهی سبب بهبود عملکرد رشد و تغذیه در ماهی باس دریایی آسیایی می‌گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از جناب آقای مهندس ثابت‌زنگنه که در انجام این تحقیق کمک کردند قدردانی می‌گردد. نویسندگان این مقاله بدین وسیله مراتب سپاس خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که هزینه این تحقیق را در قالب پژوهانه از طریق هزینه‌کرد پایان‌نامه‌های دانشجویان (پایان‌نامه دکترای PhD دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران اهواز) فراهم نموده‌اند، اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع مالی

این پژوهش به وسیله حمایت مالی دانشگاه شهید چمران اهواز (پژوهانه ۱۴۰۰) انجام شده است.

منابع

ADM Specialty Ingredients. (2003). Lecithin in Aquaculture. P.O. Box 2, 1540 AA Koog aan de Zaan, Netherlands, feedingredients@ admworld.com.

Caballero, M.J., Izquierdo, M.S., Kjorsvik, E., Montero, D., Socorro, J., Fernández, A.J., et al., (2003). Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquaculture*, 225, 325–340.

Connor, W.E. (2000). Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *The American Journal* of *Clinical Nutrition*, 71, 171S–175S (Suppl).

FAO, 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. *Contributing to food security and nutrition for all. FAO, Rome, Italy, 200p.*

Jafari, F., Agh, N., Noori, F., Tokmechi, A., & Gisbert, E. (2018). Effects of dietary soybean lecithin on growth performance, blood chemistry and immunity in juvenile stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*). *Fish and Shellfish Immunology* (2018). DOI: 10.1016/j.fsi.2018.06.023

Jenabi Haghparast, R., Sarvi Moghanlou, K., Mohseni, M., & Imani A. (2017). Effect of soybean lecithin on growth indices, body composition, digestive enzymes activities and intestinal histo- morphometery of Caspian Salmon (*Salmo trutta caspius*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 27, No.5.

Kaushik, S.J., Coves, D., Dutto, G., & Blanc, D. (2004). Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, *230* (1), 391–404.

Koven, W.M., Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, G.W., & Sklan, D. (1993). The effect of dietary lecithin and lipase, as a function of age, on n-9. *Fish Physiology and Biochemistry*, *10*(5), 357-364.

Lemaire, P., Drai, P., Mathieu, A., Lemaire, L., Carriere, S., Giudicelli, J., et al, (1991). Changes with different diets in plasma enzymes (GOT, GPT, LDH, ALP) and plasma lipids (cholesterol, triglycerides) of sea bass (*Dicentrarchus labrax).* *Aquaculture*. 93, 63-75.

Messina, M., Piccolo, G., Tulli, F., Messina, C.M., Cardinaletti, G., & Tibaldi, E. (2013). Lipid composition and metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) fed diets containing wheat gluten and legume meals as subsitutes for fish meal. *Aquaculture*, 33, 169-175.

Morais S., Conceiçao, L.E.C., Rønnestad, I., Koven W., Cahu, C., Zambonino-Infante, J.L., et al., (2007). Dietary neutral lipid level and source in marine fish larvae: Effects on digestive physiology and food intake. *Aquaculture*, 268,106–122.

NRC. (2011). Nutrient requirements of fish and shrimp. National Academy of Sciences, *Washington, DC, USA*, 360p.

Pagheh E., Ghafleh Marammazi J., Agh N., Noori F., Sepahdari A., & Torfi Mozanzadeh M. (2019). Effects of dietary soybean lecithin on growth performance, feed utilization and hematological parameters of juvenile sobaity seabream (*Sparidentex hasta*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, *28*, No.1.

Paterson, B., Rimmer, M. A., Meikle, G. M., & Semmens, G. L. (2003). Physiological responses of the Asian sea bass, *Lates calcarifer* to water quality deterioration during simulated live transport: Acidosis, red-cell swelling, and levels of ions and ammonia in the plasma. *Aquaculture*, *218*(1), 717 -728.

Pourali Fashtami, H., Sohail Nakhshi, S., Yazdani, M. A., Pazhand, Z. E., & Piecaran Mana, N. (2012). Investigating the effect of soy lecithin on growth indicators, survival percentage and chemical composition of carcasses of young Iranian tadpoles (*Acipenser persicus*). *Aquaculture Development Journal*, *7*(1), 9-22.

Robin a, J.H., & Skalli, A. (2007). Incorporation of dietary fatty acid in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) A methodological approach evidencing losses of highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture*, 263, 227–237.

Seiliez, I., Bruant, J.S., Zambonino Infante, J.L., Kaushik, S.J. & Bergot, P. (2006). Effect of dietary phospholipid level on the development of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae fed a compound diet. *Aquaculture Nutrition*, 12, 372-378.

Sink, T.D. (2014). The Effects of Soybean Lecithin Supplementation to a Practical Diet Formulation on Juvenile Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*: Growth, Survival, Hematology, Innate Immune Activity, and Lipid Biochemistry. *Journal of the world Aquaculture society*. *45*, No. 2.

Tocher, D.R., Bendiksen, E.A., Campbell, P.J., & Bell, J.G. (2008). The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture*, 280, 21–34.

Torrecillas, S., Robaina, L., Caballero, M.J., Montero, D., Calandra, G., Mompel, D., et al., (2017). Combined replacement of fishmeal and fish oil in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Production performance, tissue composition and liver morphology. *Aquaculture.* Doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.03.031

Zhanga, Y., Chenb, P., Liangb, X.F., Hanc, J., Wub, X.F., Yanga, Y.H., et al., (2019). Metabolic disorder induces fatty liver in Japanese seabass (*Lateolabrax japonicas*) fed a full plant protein diet and regulated by cAMP-JNK/NF-k Bcaspase signal pathway. *Fish and Shellfish Immunology*, 90, 223–234.

Received: 24.08.2022
Accepted: 11.10.2022

Vol. 19, No. 4, Winter, 2024 **Original Article**
DOI: 10.22055/IVJ.2022.357647.2491

Investigating the effects of soy lecithin on growth parameters and biochemical parameters in Asian seabass (*Lates calcarifer*)

Somayeh Niknejad[1], Annahita Rezaie[2*], Rahim Peyghan[3], Mohammad Razi Jalali[4] and Mansour Torfi Mozanzadeh[5]

[1] PhD Graduated from Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[2] Associated Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[3] Professor, Department Livestock Animal, Poultry and Fish Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[4] Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[5] Assistant Professor, Department of Aquaculture, South Aquaculture Research Institute, Iran Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Ahvaz, Iran

Received: 24.08.2022 Accepted: 11.10.2022

Abstract

Effects of dietary soy lecithin on the growth performance and serum biochemistry parameters of Asian Sea bass Lates calcarifer with initial fish weight of 50.36±7.69 g were investigated in a 60 days experiment. 6 diets in the present study in the almost isoproteic and isoenergitic (45% protein and 15 kj/g) were made from a combination of 2 oil sources including fish oil and a mixture of vegetable oils with three levels of zero, 2 and 4% soy lecithin. For this purpose, experimental diets were formulated in the form of diet 1 (fish oil), diet 2 (fish oil + 2% lecithin), diet 3 (fish oil + 4% lecithin), diet 4 (mixture of vegetable oils (soybean oil and Canola oil in equal proportion)), diet 5 (mixture of vegetable oils) + 2% lecithin) and diet 6 (mixture of vegetable oils + 4% lecithin). Checking and comparing the amounts of fatty acids in the diets showed the positive effect of adding soy lecithin to the diet on the increase of n-3 LCPUFA fatty acids. The results showed that growth performance increased with increasing dietary lecithin ($P<0.05$). Among the biochemical parameters, adding soy lecithin to the diet increased cholesterol and ALT enzyme but has no effect on ALP level. The results of this research showed that, inclusion of 4 % of soybean lecithin in diet for Asian sea bass is optimum for improving growth performance parameters in this species.

Key words: Soy lecithin, Asian seabass, Growth parameters, Biochemical parameters

[*] **Corresponding Author**: Annahita Rezaie, Associated Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
E-mail: a.rezaie@scu.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).