

DOR: 20.1001.1.20080026.1400.15.3.6.0

تأثیر سطوح مختلف محرك ايمونوژن بر رشد و بازماندگی (*Rutilus rutilus caspicus*) بچه‌ماهیان کلمه

آزاده نصرت‌پور^{۱*} و فرحناز لکزایی^۲^۱ نظام مهندسی کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، گرگان، ایران^۲ موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۲/۲۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۷/۲۰

چکیده

این بررسی بهمنظور ارزیابی کارایی محرك ايمونوژن در ۴ سطح ۰، ۰/۵، ۱/۵ و ۱/۰ درصد ايمونوژن به جیره غذایی بچه‌ماهیان کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*), با میانگین وزنی $1/21 \pm 0/36$ به مدت ۸ هفته صورت گرفت. بچه‌ماهیان روزانه با غذای دستی در ۳ وعده تغذیه شدند. در انتهای دوره پرورش، میزان رشد و بازماندگی بچه‌ماهیان کلمه مقایسه شد. نتایج نشان داد که اختلاف در افزایش وزن، درصد افزایش وزن بدن، نرخ رشد و وزن و تولید خالص ماهی در ماهیانی که با جیره غذایی حاوی ۱/۵ درصد ايمونوژن تغذیه شدند، بالاتر از گروه شاهد بود. اما این تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود. درصد غذایی خورده شده روزانه در ماهیانی که با جیره غذایی حاوی ۱/۵ درصد محرك ايمونوژن تغذیه شدند بطور معنی داری بالاتر از گروه شاهد بود. میزان بازماندگی در ماهیانی که با جیره غذایی حاوی ۰/۵ درصد محرك ايمونوژن تغذیه شدند بالاتر از گروه شاهد بود، ولی از نظر آماری تفاوت معنی دار نبود. در مجموع، افزودن محرك ايمونوژن موجب افزایش کارآیی رشد و بازماندگی بچه‌ماهیان کلمه نمی‌گردد.

واژه‌های کلیدی: ايمونوژن، رشد، بازماندگی، ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*)

تحمیریزی به رودخانه گرگان رود و قبل از آن به تالاب گمیشان و همچنین به خلیج گرگان و رودخانه اترک مهاجرت می‌نمایند. کلمه آذری‌ایجانی با نام علمی *Rutilus rutilus caspicus nation kurensis* در قسمت‌های غربی و جنوب غربی دریای Berg خزر زیست کرده و برای تولید مثل به رودخانه‌های متنه به تالاب انزلی، کورا، شلمان رود مهاجرت می‌کنند. در سال‌های اخیر صید بی‌رویه، آلوگی‌های زیست‌محیطی، صید غیرمجاز، احداث سدها باعث شده است که ماهی کلمه در لیست گونه‌های در حال انقراض قرار گیرد. ماهی کلمه بر اساس طبقه‌بندی

مقدمه

ماهی کلمه، متعلق به تیره کپور ماهیان یک ماهی نیمه مهاجر محسوب گردیده و دارای سه گروه مستقل شمالی، ترکمنی و آذری‌ایجانی (کورا) در دریای خزر می‌باشد. کلمه ترکمنی با نام علمی *Rutilus rutilus caspicus natio parradin kniipowistschi* در جنوب شرقی دریای خزر زیست نموده و بیشترین تراکم را در مصب رودخانه اترک دارد (قلی‌بف، ۱۹۹۷). کلمه ترکمنی در تالاب‌های آلمانکل و لپو زاغمرز نیز مشاهده شده است. این نژاد هر سال برای

*مسئول مکاتبه: nousratpour@yahoo.com

فلور میکروبی روده را بهبود می‌بخشند. محرك ایمنی ایمونوژن شامل $3\pm 3\%$ و $1-3\%$ و 6% بتاگلوكان، $18\pm 3\%$ مانان الیگوساکارید، $\frac{32}{\%}$ پروتئین، 8% خاکستر، 8% رطوبت و $1/4\%$ فیبر می‌باشد. بتاگلوكان‌ها و مانان الیگوساکاریدها پلی‌ساکاریدهایی متشكل از واحدهای گلوکز هستند که از دیواره سلولی مخمرها، قارچ‌ها و جلبک‌های بزرگ بدست می‌آیند (Salze و همکاران، ۲۰۰۸) و Skjermo و همکاران، (۲۰۰۶). به عنوان مثال؛ Li Gatlin در سال‌های ۲۰۰۴ و ۲۰۰۵ تأثیر پریوپوتیک تجاری، GroBiotic-A را در تغذیه هیبرید ماهیان Morone جوان باس مخطط (chrysops \times M.saxatilis) ارزیابی نمودند و به این نتیجه رسیدند که بتاگلوكان‌ها و مانان الیگوساکاریدها رشد و بازماندگی را در گونه‌های متفاوت ماهیان افزایش می‌دهند (Li و Gatlin، ۲۰۰۴ و ۲۰۰۵). همچنین جافر و همکاران (۱۳۸۹) اثر مکمل ایمونوژن را بر رشد و بازماندگی بچه ماهیان تاس‌ماهی ایرانی (Acipenser persicus) بررسی کردند و نتایج نشان داد که شاخص‌های رشد و تغذیه بچه ماهی قره‌برون، نرخ رشد ویژه (SGR)، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، کارایی غذا، درصد افزایش وزن بدن و تولید خالص در بین تیمارهای مورد مطالعه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$) و تیمار ۲ درصد ایمونوژن بیشترین کارایی را داشت. از این رو مطالعه حاضر برای مشخص کردن اثر پریوپوتیک ایمونوژن بر رشد و بازماندگی بچه ماهیان کلمه انجام شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به مدت ۸ هفته در تابستان ۱۳۹۰ در مرکز تکثیر و پرورش ماهیان استخوانی سیچوال (بندر ترکمن، گلستان) اجرا شد. در ابتدا و قبل از انجام آزمایش اصلی تعداد ۳۶۰۰ قطعه بچه ماهی کلمه به

(IUCN)^۱ از گونه‌های در معرض تهدید محسوب شده است (Kiabi، ۱۹۹۹). لذا با توجه به اهمیت ماهی کلمه و ارزش شیلاتی آن برای مردمان منطقه شمال کشور، مقاله حاضر با هدف بررسی اثر مکمل غذایی ایمونوژن، بر رشد و بازماندگی این نوع از ماهیان تدوین شده است. با توجه به اینکه در پرورش آبزیان 50% هزینه‌های پرورش مربوط به تغذیه می‌باشد، لذا جهت سودمند کردن امر پرورش ماهیان، نیاز به دقت جدی در مراحل غذادهی و استفاده از غذاهای مصنوعی با کیفیت و کارایی مناسب می‌باشد (سوداگر و همکاران، ۱۳۸۶). برای تولید تجاری و کارآمد ماهیان، مدیریت قوی، شرایط مناسب پرورش، غذادهی با جیره‌های مناسب که حاوی ترکیبات ارزان‌تر و در عین حال مؤثر که رشد بهینه و کمترین مقدار ضریب تبدیل غذایی را داشته باشد، ضروری بنظر می‌رسد (Hung و Lutes، ۱۹۸۷). در حال حاضر مسئله عملده در آبزی پروری تجاری، بهبود جیره‌های غذایی فرموله شده برای افزایش رشد و ارتقاء سلامت ماهیان می‌باشد (Billard و Chebanov، ۲۰۰۱).

محرك‌های ایمنی و پریوپوتیک‌ها باکتری‌های زنده‌ای هستند که ممکن است در جیره غذایی آبزیان برای بهبود بخشیدن تعادل میکروبی روده به کار روند که در صنعت آبزی پروری مورد استقبال قرار گرفته‌اند (Gatlin و Li، ۲۰۰۴).

اثبات تأثیر مفید محرك‌های ایمنی و پریوپوتیک‌ها پیدایش مفهوم جدید پریوپوتیک‌ها است که بوسیله Teitelbaum و Gibson (۱۹۹۵) و Roberfroid (۱۹۹۵) تعریف شده، به عنوان ترکیبات غذایی غیرقابل هضم که از طریق فعال کردن یا تحریک باکتری‌های مفیدی که در روده وجود دارند، باعث بهبود سلامتی می‌شوند. بنابراین تعادل

شد. جهت اتصال ایمونوژن به غذای ماهیان (شرکت خوراک دام و آبریان شمال)، از روغن ماهی ۳۰ (سی سی یه ازای هر کیلوگرم غذا) استفاده شد. در ضمن جهت اینکه تمام تیمارها دارای شرایط یکسان باشند به جیره تیمار شاهد نیز روغن ماهی اضافه شد. هر دو هفته یکبار تمام ماهیان با ترازویی با دقت ۰/۰۱ گرم توزین شده و توسط خطکش با دقت یک میلی‌متر طول کل آنها اندازه‌گیری شد.

وزن حدود $1/21 \pm 0/36$ گرم از استخراهای خاکی به وان‌ها منتقل شدند. آزمایش اصلی در ۱۲ وان ۳۰ لیتری که با حدود ۲۰ لیتر آب پر شده بود، انجام شد. که در هر وان تعداد ۳۰ قطعه بچه‌ماهی با بیومس $30/63 \pm 0/36$ ذخیره‌سازی شد. ماهیان کلمه در ۳ وعده در ساعت ۹ و ۱۷ به میزان ۱۰ درصد وزن توده زنده غذاده شدند. با شروع آزمایش اصلی، محرك ایمنی ایمونوژن در سطوح مختلف $0/5$ ، 1 و $1/5$ درصد به جیره غذایی بچه ماهیان کلمه اضافه

جدول ۱- آنالیز جیره غذایی مصرفی بچه ماهیان کلمه

عنصر غذایی	پروتئین	کربو هیدرات	چربی	خاکستر	رطوبت	فیبر
درصد	۴۹/۱۷	۱۵/۷	۶/۷۹	۸/۹۵	۸/۳۸	۱/۱۳

ماهیان، انواع شاخص‌های رشد شامل درصد میانگین رشد روزانه، درصد افزایش وزن بدن، شاخص رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی، ضریب چاقی، شاخص بازماندگی محاسبه شد (Hung و همکاران، ۱۹۹۳).

زیست‌سنجه در صبح اول وقت، زمانی که ماهیان تغذیه نشده بودند، انجام گردید و بعد از زیست‌سنجه به منظور کاهش استرس تحملی بچه ماهیان به مدت ۲-۳ ساعت غذاده قطع گردید (سوداگر و همکاران، ۱۳۸۴). با استفاده از اطلاعات وزن و طول

- افزایش وزن بدن: ^۱(BWI)

BWI= وزن اولیه (گرم)- وزن ثانویه (گرم)

- درصد افزایش وزن بدن: ^۲(PBWI)

$$PBWI(\%) = \frac{\text{وزن اولیه (گرم)} - \text{وزن ثانویه (گرم)}}{\text{وزن اولیه (گرم)}}$$

- ضریب (سرعت) رشد ویژه: ^۳(SGR)

$$SGR = \frac{\text{لگاریتم طبیعی وزن اولیه} - \text{لگاریتم طبیعی وزن ثانویه}}{\text{طول دوره پرورش}}$$

- ضریب تبدیل غذایی: ^۴(FCR)

$$FCR = \frac{\text{مقدار غذای خورده شده (گرم)}}{\text{افزایش وزن (گرم)}}$$

$$\text{درصد بازماندگی} = \frac{\text{تعداد ماهیان باقیمانده انتهای دوره}}{\text{تعداد ماهیان ابتدای دوره آزمایش}} \times 100$$

$$\frac{\text{وزن}}{\text{طول}} \times 100$$

۱. Body weight Increase
۲. Percent Body weight Increase
۳. Specific Growth Rate
۴. Food Conversion Ratio

$$\times 100 = \text{ضریب چاقی}$$

بالاتر بود ولی از نظر آماری تفاوت معنی دار نبود ($P > 0.05$) (جدول ۲). همچنین ضریب تبدیل غذا در ماهیانی که با جیره غذایی حاوی ۱ درصد محرك ایمنی ایمونوژن تغذیه شده بودند نسبت به گروه شاهد و گروهی که با 0.5% درصد محرك ایمنی ایمونوژن تغذیه شدند، پایین تر بود ($P < 0.05$) (جدول ۲). میزان بازماندگی در ماهیانی که با سطوح مختلف محرك ایمنی ایمونوژن تغذیه شده بودند، نسبت به گروه شاهد بالاتر بود ولی معنی دار نبود ($P > 0.05$) (جدول ۲). همچنین درصد غذای خورده شده روزانه در ماهیانی که با $1/5$ درصد محرك ایمنی ایمونوژن تغذیه شدند نسبت سایر گروههای آزمایشی به طور معنی داری بیشتر بود (جدول ۲).

این تحقیق در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه انجام شد. ابتدا جهت بررسی نرمال بودن داده ها از تست کلوموگروف اسمیرنوف و سپس برای مقایسه میانگین بین تیمارها از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ($\alpha = 0.05$) استفاده شد.

نتایج

نتایج بدست آمده نشان داد که افزایش وزن بدن، درصد افزایش وزن بدن و نرخ رشد ویژه و تولید خالص ماهی در ماهیانی که با جیره غذایی حاوی $1/5$ درصد محرك ایمنی ایمونوژن تغذیه شدند در مقایسه با ماهیانی که با جیره غذایی پایه (شاهد) تغذیه شدند

جدول ۲- تأثیر سطوح مختلف پریوتویک ایمونوژن روی شاخص های رشد بچه ماهیان کلمه در کل دوره پرورش

شاخص های رشد/ ایمونوژن (درصد)	۰	۰/۵	۱	$1/5$
وزن اولیه (گرم)	$1/24 \pm 0/24^a$	$1/27 \pm 0/24^a$	$1/19 \pm 0/42^a$	$1/13 \pm 0/47^a$
وزن نهایی (گرم)	$2/86 \pm 0/15^a$	$2/97 \pm 0/60^a$	$3/21 \pm 0/14^a$	$3/20 \pm 0/15^a$
درصد افزایش وزن بدن (%)	$128/05 \pm 6/85^a$	$119/60 \pm 12/30^a$	$150/83 \pm 32/78^a$	$161/46 \pm 28/04^a$
نرخ رشد ویژه (%)	$1/41 \pm 0/08^a$	$1/29 \pm 0/17^a$	$1/65 \pm 0/38^a$	$1/78 \pm 0/33^a$
ضریب تبدیل غذایی	$3/67 \pm 0/63^a$	$2/78 \pm 0/38^a$	$1/90 \pm 1/04^a$	$2/21 \pm 0/80^a$
بازماندگی (%)	$93/3 \pm 9/40^a$	$98/3 \pm 2/33^a$	$90 \pm 9/47^a$	$97/8 \pm 1/90^a$
غذای خورده شده روزانه	$3/16 \pm 0/31^a$	$3/79 \pm 0/4^a$	$3/23 \pm 0/34^a$	$4/72 \pm 0/11^b$
تولید خالص ماهی	$80/3 \pm 12/42^a$	$87/5 \pm 15/62^a$	$71/5 \pm 26/7^a$	$93/8 \pm 2/98^a$

(mean \pm S.D)، اعداد در یک ردیف با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار هستند ($P < 0.05$).

جوان پرورشی بررسی کردند. نتایج (*Huso huso*) آنها نیز نشان داد که افزایش وزن بدن، درصد افزایش وزن بدن و نرخ رشد ویژه در ماهیان در تیمار $0/5$ درصد ایمونوژن بالاترین مقدار را در مقایسه با تیمارهای دیگر داشته است که این تفاوت از نظر آماری معنی دار بوده است ($P < 0.05$). همچنین جافر و همکاران (۱۳۸۹) اثر مکمل ایمونوژن را بر رشد و بازماندگی بچه ماهیان تاس ماهی ایرانی (*Acipenser*

بحث

مطالعه حاضر نشان می دهد که افزایش وزن بدن و درصد افزایش وزن و نرخ رشد ویژه و تولید ناخالص ماهی در ماهیانی که با جیره غذایی حاوی $1/5$ درصد محرك ایمنی ایمونوژن تغذیه شدند در مقایسه با سایر تیمارها بالاتر بود ولی از نظر آماری تفاوت معنی دار نبود ($P > 0.05$). در تحقیق مشابه مهاجر و همکاران (۱۳۸۹) اثر پریوتویک ایمونوژن را بر روی فیل ماهیان

در مطالعه مهاجر و همکاران (۱۳۸۹) نیز ضریب تبدیل غذایی در تیمار $0/5$ درصد ایمونوژن در مقایسه با سایر تیمارها پایین‌ترین مقدار بود که این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<0.05$). در تحقیق جافر و همکاران (۱۳۸۹) نیز ضریب تیدیل غذایی در تیمار $0/2$ درصد ایمونوژن به طور معنی‌داری پایین‌تر از سایر تیمارها بود ($P<0.05$). همچنان میزان بازماندگی در تیمارهای ایمونوژن نسبت به گروه شاهد بالاتر بود ($P>0.05$) و درصد غذای خورده شده روزانه در تیمار $1/5$ درصد ایمونوژن به طور معنی‌داری بالاتر از تیمارهای دیگر بود. در مطالعه مهاجر و همکاران (۱۳۸۹) نیز میزان بازماندگی در تیمار $0/5$ درصد ایمونوژن نسبت به سایر تیمارها بالاتر بود ولی این تفاوت معنی‌دار نبود ($P>0.05$). در مجموع چنین نتیجه‌گیری می‌شود که محرک اینمی ایمونوژن نمی‌تواند به عنوان یک ماده غذایی مکمل در جیره غذایی بچه ماهیان کلمه برای افزایش رشد و بازماندگی بکار رود.

(*persicus*) بررسی کردند و نتایج نشان داد که شاخص‌های رشد و تغذیه بچه ماهی قره‌برون، نرخ رشد ویژه و درصد افزایش وزن بدن در تیمار $0/2$ درصد ایمونوژن به صورت معنی‌داری بالاتر از سایر تیمارها بود ($P<0.05$). Li و Gatlin (۲۰۰۵) نیز در تحقیق دیگری از پریوپتیک تجاری *Grobioptic™ AE* در جیره غذایی هیبرید نابالغ باس مختلط (*Morone chrysops* × *M.saxatilis*) استفاده نمودند. پس از ۲۱ هفته، ماهی‌های تغذیه شده با جیره‌های غذایی آزمایشی (۲٪ پریوپتیک) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این بررسی نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار عملکرد رشد و افزایش وزن در ماهیان تغذیه شده با این پریوپتیک نسبت به گروه شاهد بود که نتایج آن مخالف نتایج تحقیق حاضر است.

در تحقیق حاضر، ضریب تبدیل غذایی در ماهیانی که با جیره غذایی حاوی ۱ درصد ایمونوژن تغذیه شده بودند نسبت به گروه شاهد و سایر تیمارها پایین‌تر بود ولی این تفاوت معنی‌دار نبود ($P>0.05$).

منابع

- جافرنووده، ع. ۱۳۸۹. تأثیر پریوپتیک ایمونوژن بر شاخص‌های رشد، بقاء، برخی شاخص‌های خونی و فلور باکتریایی روده بچه ماهی قره‌برون (*Acipenser persicus*). پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ۹۴ ص.
- سوداگر، م، ایمانپور، م و حسینی‌فر، س. ۱۳۸۶. استفاده از پریوپتیک اپتیم (آسکوژن یا واناثن) در جیره غذایی بچه فیل ماهیان پرورشی و تأثیر آن روی فاکتورهای رشد و میزان بقاء. مجله علوم دریایی نور، ۳(۳)، ۴۱-۴۶.
- سوداگر، م، آذری تاکامی، ق، آلکسویچ پانوماریف، س، محمدزاده، ه، عابدیان، ع و حسینی، ع. ۱۳۸۴. بررسی مقایسه‌ای تأثیر افزایش برخی از مواد جاذب (بتائین، متیونین و مخلوط بتائین + متیونین) در جیره غذایی فیل ماهیان پرورشی به منظور افزایش تحریک غذاگیری و بالا بردن میزان رشد و بازماندگی. رساله دکتری شیلات (Ph.D)، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ۷۹ ص.
- مهاجر استرآبادی، م، وهاب‌زاده، ح، زمینی، ع، سوداگر، م و قربانی، ر. ۱۳۸۹. تأثیر پریوپتیک ایمونوژن در جیره غذایی بر شاخص‌های رشد و بازماندگی فیل ماهیان. مجله علمی- پژوهشی شیلات، ۴(۳)، ۶۱-۷۲.
- Chebanov, M., Billard, R., 2001. The culture of sturgeons in Russia: production of juveniles for stocking and meat for human consumption. Aquatic Living Resources 14, 375-381.
- Gibson, G.R., Roberfroid, M.B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition 125, 1401-1412.

- Hung, S.S.O., Lutes, P.B., 1987. Optimum feeding rate of hatchery-produced juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) at 20°C. Aquaculture 65, 307-317.
- Hung, S.S.O., Lutes, P.B., Shqueir, A.A., Conte, F.S., 1993. Effect of feeding rate and water temperature on growth of juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). Aquaculture 115, 297-303.
- Li, P., Gatlin, D.M., 2004. Dietary brewer's yeast and the prebiotic probiotic TM AE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops*×*M.saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. Aquaculture 231, 445-456.
- Li, P., Gatlin, D.M., 2005. Evaluation of the prebiotic probiotic TM AE and brewer's yeast as dietary supplements for sub-adult hybrid striped bass (*Morone chrysops*×*M. saxatilis*) challenged in situ with *Mycobacterium marinum*. Aquaculture 248, 197-205.
- Salze, G., Mclean, E., Schwarz, M.H., Craig, S.R., 2008. Dietary Mannan Oligo Saccharide enhances Salinity tolerance and gut development of larval Cobia. Aquaculture 274, 148-152.
- Skjermo, J., Storseth, T.R., Hansen, K., Handa, A., Oie, G., 2006. Evaluation of (1→3, 1→6) β -glucans and High-M alginate used as immunostimulatory dietary supplement during first feeding and weaning of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). Aquaculture, 261, 1088-1101.
- Teitelbaum, J.E., Walker, W.A., 2002. Nutritional impact of pre-and probiotics as protective gastrointestinal organisms. Annual Review of Nutrition 22, 107-138.

The Effect of Different Levels of Immunogen Stimulant on Growth and Survival of Common roach, *Rutilus rutilus caspicus*

A. Nousratpour^{1*}, F. Lakzaei²

¹ Agricultural and Natural Resources Engineering Organization of Golestan Province, Gorgan, Iran

² Iran Fisheries Research Organization, Tehran, Iran

Abstract

This research carried out to evaluate efficiency of immune stimulant (immunogen) in four treatments (0, 0.5%, 1%, 1.5%) to the diet of young Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) with average body weight of 1.21 ± 0.36 gr. for eight weeks. Fish were fed 3 times a day. At the end of cultivation period, the amount of growth and survival rate of common roach was compared. The results showed that, body weight increase, the percentage of body weight increase, specific growth rate and net production of fish in 1.5% treatment of immunogen was higher than control group but it didn't reveal a significant difference. Moreover, the percentage of daily consumed food in 1.5% treatment of immunogen showed a higher significantly than control group. The survival rate in 0.5 treatment of immunogen was higher than control group but it didn't show significant differences. In general, immunogen stimulant can't be used as a food supplementation for growth and survival in common roach cultivation.

Keywords: Immunogen, Growth, Survival, *Rutilus rutilus caspicus*.

*Corresponding authors; nousratpour@yahoo.com