

بررسی اثرات سطوح مختلف ویتامین C بر فاکتورهای خونی و ایمنی بچه تاس ماهی سیبری (*Acipenser baerii*)

یعقوب پورغلام¹، حسین خارا²، محمود محسنی³

- 1- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات گیلان، دانشجوی دوره کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، رشت، ایران.
 - 2- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، استادیار گروه شیلات، لاهیجان، ایران. hossein.khara1974@gmail.com
 - 3- موسسه تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت، ایران.
- تاریخ دریافت: 92/11/1 تاریخ پذیرش: 93/2/27

چکیده

زمینه وهدف: ویتامین ها مهم ترین مواد مغذی هستند که سیستم ایمنی ماهی را تحریک می کنند و ویتامین C به عنوان یک ماده مغذی ضروری در آبی پروری مطرح است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات سطوح مختلف ویتامین C بر فاکتورهای خونی و ایمنی بچه تاس ماهی سیبری (*Acipenser baerii*) است.

روش کار: در این بررسی سطوح مختلف ویتامین C از نوع ال - آسکوربیل -2- پلی فسفات شامل: فاقد ویتامین C (تیمار 1)، 100 میلی گرم در کیلوگرم ویتامین C (تیمار 2)، 200 میلی گرم در کیلوگرم ویتامین C (تیمار 3)، 400 میلی گرم در کیلوگرم ویتامین C (تیمار 4)، 800 میلی گرم در کیلوگرم ویتامین C (تیمار 5)، 1600 میلی گرم در کیلوگرم ویتامین C (تیمار 6) در سه تکرار و به مدت 8 هفته جهت پرورش تاسماهی سیبری در نظر گرفته شد.

یافته ها: نتایج حاصل از تحقیق بر روی شاخص های خونی و فاکتورهای ایمنی تاسماهی سیبری پرورشی نشان داد بالاترین تعداد گلبول قرمز (RBC) در تیمار 200 میلی گرم در کیلوگرم ویتامین C مشاهده گردید که با سایر تیمارها اختلاف معنی داری را نشان داد. در حالی که اختلاف معنی داری در تعداد گلبول سفید (WBC)، هماتوکریت و هموگلوبین مشاهده نشد، اما بیشترین مقدار آن ها در تیمار 200 میلی گرم در کیلوگرم ویتامین C مشترک بود. در سایر اندیس های خونی MCH و MCHC اختلاف معنی دار آماری را در بین تیمارها نشان دادند، اما در میزان MCV اختلاف آماری مشاهده نگردید و بیشترین مقدار آن ها در تیمار 1600 میلی گرم در کیلوگرم ویتامین C مشترک بود. مطالعات بر روی فاکتورهای ایمنی خون تاسماهی سیبری نشان داد که اختلاف معنی داری در مقدار لیوزیم، IgM در بین تیمارها وجود دارد اما اختلاف معنی داری در ایمنوگلوبین کل در بین تیمارها وجود ندارد و میزان لیوزیم و ایمنوگلوبین کل در تیمار 800 میلیگرم بیشتر از سایر تیمارها بود. عدم حضور ویتامین C در جیره غذایی میزان فاکتورهای ایمنی را کاهش می دهد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که فاکتورهای ایمنی در تیمارهای بالای ویتامین C تاثیر بهتری را نشان داد.

واژه های کلیدی: ویتامین C، شاخص های خونی، فاکتورهای ایمنی، تاس ماهی سیبری، *Acipenser baerii*

مقدمه

بالا بودن تراکم پرورش اثر معکوسی بر وضع سلامت و بهداشتی ماهی خواهد گذاشت و این وضعیت سبب ایجاد شرایط نامناسب و استرسزا و هم چنین افزایش حساسیت ماهی به عوامل بیماریزا می شود. بنابراین با اتخاذ شیوه هایی بقاء و رشد مناسب ماهیان را در چنین شرایطی حفظ کرد و استفاده از مواد محرک ایمنی در جیره غذایی می تواند مقاومت در برابر بیماری های عفونی

صنعت آبی پروری از صنایع مهم در حال توسعه بوده و هرساله بر میزان تولیدات آبی پروری در دنیا افزوده می شود. به طور معمول آبزیان در محیط های بسته هم - چون استخرهای خاکی، سیمانی، قفس ها و یا تانک ها پرورش داده می شوند و سعی تلاش در بالا بردن تراکم آبزیان در واحد سطح در واحد سطح، یکی از مهم ترین علل پیشرفت و افزایش تولید این صنعت است. بی شک

تهیه گردید. تعداد 360 قطعه بچه تاس ماهی سیبری با وزن متوسط $29/8 \pm 1/66$ گرم و متوسط طول $33/08 \pm 8/8$ سانتی متر انتخاب و به 18 عدد تانک با حجم آبی 500 لیتر منتقل شدند. در هر وان 20 عدد ماهی رهاسازی گردید. ماهیان جهت سازگاری با شرایط جدید محیطی (اکسیژن، دما و pH) به مدت 15 روز با غذای کنسانتره متداول مورد استفاده برای تغذیه ماهیان خاویاری تغذیه شدند. این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی (Completely Randomized Design) انجام گرفت. برای تعیین توده زنده هر یک از وان ها هر 15 روز یکبار 100 درصد ماهیان هر وان با ترازوی دیجیتال با دقت 0/1 گرم توزین و با دقت میلی متر طول آن ها در فرم های مخصوص ثبت شدند. 24 قبل از زیست سنجی تغذیه قطع می گردید. برای ساخت غذا ابتدا ترکیبات غذا به صورت کاملاً آرد درآمده و به مدت 20 دقیقه توسط دستگاه با یکدیگر مخلوط شدند. سپس به مخلوط حاصل نمک، مخلوط ویتامینی، مکمل ویتامینی و ویتامین C از نوع ال - اسکوریل -2- پلی فسفات (ساخت شرکت Science) با خلوص 96 درصد اضافه شده و به مدت 15 دقیقه با یک دیگر مخلوط شدند. با استفاده از دستگاه چرخ گوشت به صورت پلت هایی با طول 8 میلی متر و قطر 6 تهیه شدند. غذا دهی به میزان 2 درصد وزن توده زنده، به صورت دستی و در سه نوبت در ساعات 10، 18، 24 انجام شد. غذا با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت 0/01 گرم توزین شده و در سطح وان ها توزیع گردید. آب تانک ها روزانه بعد از غذادهی سیفون گردیده تا غذای احتمالی مصرف نشده و سایر فضولات از محیط پرورش خارج گردند. در پایان هفته هشتم آزمایش جهت بررسی شاخص های خونی هموگلوبین، هماتوکریت، WBC، RBC، MCV، MCH، MCHC و فاکتورهای ایمنی شامل لایوزیم، IgM و ایمنوگلوبین

را با تقویت سیستم ایمنی غیر اختصاصی ماهی افزایش دهد (11). ویتامین ها مهم ترین مواد مغذی هستند که سیستم ایمنی ماهی را تحریک می کنند و ویتامین C به عنوان یک ماده مغذی ضروری در آبی پروری مطرح است که برای حفظ فیزیولوژی از قبیل رشد نرمال، ایمنی بدن و تکثیر جانوران مختلف از قبیل ماهی مورد نیاز است (8، 10). این ویتامین محلول در آب است و به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل می کند. اغلب ماهیان به دلیل فقدان آنزیم ال-گلوکونلاکتون قادر به بیوسنتز این ویتامین نیستند، بنابراین به مقدار کافی باید در جیره غذایی وجود داشته باشد (6). مطالعات نشان داده است که ویتامین C از تاثیرات منفی استرس جلوگیری می کند و نقش حفاظتی این ویتامین در برابر استرس می تواند به دلیل جلوگیری از تبدیل اسیدهای چرب غیر اشباع به استرهای کلسترول باشد که ترکیب مهمی در ساخت کورتیزول هستند و به این طریق از افزایش کورتیزول در بدن جلوگیری می کند (9). مطالعات نشان داده است که ویتامین C می تواند باعث افزایش مقاومت ماهی در برابر تنش های محیطی گردد. تحقیقات هم چنین نشان داده است که ویتامین C بر روی پارامترهای خونی موثر است (3، 12، 13). هدف از این مطالعه بررسی اثرات سطوح مختلف ویتامین C بر روی پارامترهای خون و فاکتورهای ایمنی می باشد.

مواد و روش ها

این تحقیق به مدت 8 هفته در موسسه تحقیقات ماهیان خاویاری دریای خزر انجام شد. فاکتورهای فیزیوشیمیایی آب مانند اکسیژن محلول و دما (دوبار در روز) و pH (یکبار در روز) به دقت اندازه گیری شدند (جدول 1). در این تحقیق 6 جیره آزمایشی با سطوح انرژی و پروتئین یکسان (جدول 2) ولی حاوی سطوح مختلف ویتامین C، 0mg/kg (تیمار 1= شاهد)، 100mg/kg (تیمار 2)، 200mg/kg (تیمار 3)، 400mg/kg (تیمار 4)، 800mg/kg (تیمار 5)، 1600 mg/kg (تیمار 6)

IgM با آنتی بادی های پلی کلونال موجود در محلول های تامپون تشکیل کمپلکس داده و باعث کدر شدن محلول می شوند. شدت کدورت ایجاد شده با مقدار IgM رابطه مستقیم داشته و توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل VIS-2100 ساخت شرکت Unico آمریکا) در طول موج 340 نانومتر با بلانک (آب مقطر) خوانده شد (1). برای اندازه گیری سطوح لیزوزیم در سرم خون، 1/75 میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری *Micrococcus lysodeikticus* (سیگما) (معادل مقدار 0/375 میلی گرم در میلی لیتر از بافر فسفات سدیم 0/05 مولار با pH برابر 6/2) با 250 میکرولیتر از نمونه های سرم مخلوط و جذب نوری پس از 15 و 180 ثانیه به روش طیف سنجی وبا استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج 670 نانومتر قرائت شد. بافر فسفات سدیم به عنوان بلانک استفاده شد. غلظت ایمنوگلوبولین کل مطابق با روش شرح داده شده توسط Siwicki و Anderson در سال 1993 و Okamoto، Satoh، Kiron، Amar و Watanabe در سال 2000 اندازه گیری شد. به اختصار، نمونه سرم مطابق با روش Biuret اندازه گیری شد: 0/1 میلی لیتر از هر نمونه سرم با 0/1 میلی لیتر از محلول پلی اتیلن گلیکول 32٪ مخلوط شد (PEG, 10000 MW, Sigma chemical, St Louis, Mo, USA) و مخلوط برای مدت 2 ساعت برای پایین آوردن مولکول ایمنوگلوبولین انکوباسیون شد. رسوب ایمنوگلوبولین توسط سانتریفیوژ (Eppendorf Centrifuge 5415R, EppendorfAG, Hamburg, Germany) در 5000 دور در 4 درجه سانتی گراد برداشته شد.

کل از ماهیان خونگیری بعمل آمد. عملیات خونگیری از سیاهرگ دمی (Caudal vein) واقع در پشت باله مخرجی تاس ماهی سیبری پرورشی صورت گرفت (7). جهت انجام مطالعات خون شناسی از سرنگ هایی با حجم 2 cc استفاده گردید. بعد از گرفتن 2 cc خون توسط سرنگ از ساقه دمی این ماهیان، 0/5cc خون به داخل تیوب های اپندروف آغشته به ماده ضد انعقاد خون (هپارین) شماره گذاری شده جهت انجام مطالعات فاکتورهای خونی ریخته و 1/5 cc باقی مانده به داخل تیوب های اپندروف غیر هپارینه شماره گذاری شده جهت انجام مطالعات فاکتورهای ایمنی به آزمایشگاه هماتولوژی انتقال گردید. در هنگام خونگیری از مواد بیهوش کننده به علت احتمال تاثیر بر روی سطوح شاخص های خونی استفاده نگردید. فاکتورهای خونی شامل WBC و RBC با لام مخصوص هموسیئومتر ثوبار و محلول رقیق کننده گاور و تورک شمارش گردیدند (3). هموگلوبین بوسیله کیت مخصوص شرکت پارس آزمون به روش کلرومتریك با طول موج 540nm در دستگاه اسپکتوفوتومتر اندازه گیری شد. اندازه گیری هماتوکریت با استفاده از سانتریفوژ انجام شد (7). هموگلوبین متوسط (MCH)، متوسط حجم گلبول قرمز (MCV) و غلظت متوسط گلبول قرمز (MCHC) از طریق روابط زیر محاسبه گردید (7).

$$\text{Hematocrit} = \frac{\text{RBC (million/mm}^3)}{\text{RBC (million/mm}^3)} \times 100$$

$$\text{MCHC} = \frac{\text{Hemoglobin (g/dcl)}}{\text{Hematocrit}} \times 100$$

$$\text{MCH} = \frac{\text{Hemoglobin (g/dcl)}}{\text{RBC (Million/mm}^3)} \times 100$$

فاکتورهای ایمنی شامل IgM از روش ایمنوتوربیدی متری Immuno turbidimetric است. در این روش

جدول 1- فاکتورهای فیزیوشیمیایی اندازه گیری شده

pH	اکسیژن محلول	دما	ماه
7/1 ± 0/1	6/9 ± 0/5	20/3 ± 0/2	خرداد
7/2 ± 0/1	6/7 ± 0/3	21/2 ± 0/1	تیر

جدول 2- اجزاء جیره و آنالیز تقریبی جیره

درصد	اجزاء جیره
0/54	آرد ماهی (%)
0/18	آرد گندم (%)
0/5	شیر خشک (%)
8	کنجاله سویا (%)
4	روغن ماهی (%)
5	گلوتن ذرت (%)
3	مخمر (%)
1/3	مخلوط مواد معدنی (%)
1/7	مخلوط مواد ویتامینی (%)
1/5	B9 (میلی گرم در کیلوگرم)
تجزیه تقریبی جیره	
14/2 ± 0/2	رطوبت
20/7 ± 10/0	خاکستر
49/0 ± 0/8	پروتئین
14/1 ± 0/2	چربی
2/0 ± 0/1	فیبر

نتایج

با اندازه گیری پارامترهای خونی در طول دوره 8 هفته‌ای پرورش در تحقیق حاضر، مشخص گردید که در برخی شاخص‌ها، اثر ویتامین C بر این پارامترها معنی‌دار بوده اما بر برخی پارامترهای دیگر اثر پیش‌بینی شده ویتامین C ملاحظه نگردید (جدول 3). در پایان هفته هشتم پرورش بالاترین تعداد گلبول قرمز (RBC) در تیمار 200 میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C مشاهده گردید که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان داد. در حالی که اختلاف معنی‌داری در تعداد گلبول سفید (WBC)، هماتوکریت و هموگلوبین مشاهده نشد، اما بیشترین مقدار آن‌ها در تیمار 200 میلی‌گرم در

کیلوگرم ویتامین C مشترک بود. در سایر اندیس‌های خونی MCH و MCHC اختلاف معنی‌دار آماری را در بین تیمارها نشان دادند اما در میزان MCV اختلاف آماری مشاهده نگردید و بیشترین مقدار آن‌ها در تیمار 1600 میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C مشترک بود با توجه به نتایج کسب شده (جدول 4) در مطالعه حاضر مشخص گردید که اختلاف معنی‌داری در مقدار لیزوزیم، IgM در بین تیمارها وجود دارد اما اختلاف معنی‌داری در ایمونوگلوبین کل در بین تیمارها وجود ندارد و میزان لیزوزیم و ایمونوگلوبین کل در تیمار 800 میلی‌گرم بیشتر از سایر تیمارها بود. عدم حضور ویتامین C در جیره غذایی میزان فاکتورهای ایمنی را

کاهش می دهد، نتایج نشان داد که فاکتورهای ایمنی

در تیمارهای بالای ویتامین C تاثیر بهتری را نشان داد..

جدول 3- شاخص های هماتولوژیک تاسماهی سبیری تغذیه شده با جیره های حاوی سطوح مختلف ویتامین C

تیمار	مقدار ویتامین C الحاق شده به جیره (mg/kg)	WBC (mm ³)	RBC (mm ³)	Hb (gr/dl)	Hct (%)	MCV (fI)	MCH (Pg)	MCHC (gr/dl)
1	0	6500±2121/ 2 ^a	485000±120208/2 ^{ab}	5/5±1/06 ^a	24/50±4/9 ^a	508/00±24/04 ^a	11/55±0/ 63 ^{ab}	22/75±0/21 ^b
2	100	5000±707/16 ^a	505000/85±35355/34 ^{ab}	7/00±2/12 ^a	25/0±2/02 ^a	503/00±8/48 ^a	11/22±0/42 ^b	22/71±1/83 ^b
3	200	8520±2474/87 ^a	545000/0±69497/47 ^a	7/00±0/98 ^a	29/00±1/41 ^a	533/00±22/6 ^a	12/85±0/63 ^{ab}	24/15±2/19 ^{ab}
4	400	6250±1767/76 ^a	510000/5±14142/14 ^{ab}	5/45±0/49 ^a	24/95±4/31 ^a	488/00±70/7 ^a	10/7±0/707 ^b	22/00±1/69 ^b
5	800	9000±1767/76 ^a	475000±77781/75 ^{ab}	5/7±0/98 ^a	23/0±1/4 ^a	493/00±110/3 ^a	12/3±4/11 ^{ab}	24/00±1/85 ^{ab}
6	1600	7850±1202/81 ^a	375000±707/67 ^b	6/00±0/00 ^a	22/00±0/00 ^a	586/5±10/6 ^a	16/00±0/28 ^a	27/25±0/077 ^a

جدول 4- فاکتورهای ایمنی خون تاسماهی سبیری تغذیه شده با جیره های حاوی سطوح مختلف ویتامین C

تیمار	مقدار ویتامین C الحاق شده به جیره (mg/kg)	IgM (mg/dl)	لیزوزیم (u/ml/mon)	ایمونوگلوبین کل (mg/ml)
1	0	3/7±1/55 ^a	38/4±22/00 ^a	6/4±0/28 ^a
2	100	4/3±3/25 ^a	8/8±4/8 ^b	7/55±0/77 ^a
3	200	3/05±2/33 ^{ab}	14/45±4/03 ^b	7/65±2/05 ^a
4	400	1/9±1/14 ^b	9/1±7/9 ^b	8/00±1/41 ^a
5	800	1/9±0/84 ^b	44/05±24/53 ^a	8/35±1/2 ^a
6	1600	1/9±1/69 ^b	12/1±13/45 ^b	7/65±1/34 ^a

بحث و نتیجه گیری

از کبد جهت استفاده آهن در فرآیند اریتروپویزیس ضروری است (4). ویتامین C جذب آهن فروس را افزایش می دهد در حالی که در مطالعه ای باعث بهبود جذب این شکل آهن نگردیده است (5). نقش فقدان ویتامین C در بروز آنمی هنوز نامشخص است. در هر حال در برخی گونه ها، این امر می تواند هم به دلیل همراهی کاهش جذب جیره و با نقش این ویتامین در متابولیسم آهن باشد. فقدان ویتامین C، فریک هموگلوبین را به فروس تبدیل کرده و بنابراین با

یکی از اهداف اولیه آبی پروری تولید گونه های مختلف آبی برای تولید و هم چنین بازسازی ذخایر است (2). فقدان روش های استاندارد و تفاوت گونه ای، اثرات سن، جنسیت، کیفیت آب، دمای آب و روش های صید باعث تغییرات شده و تفسیر را مشکل می نماید. بدین سبب نتایج مطالعات دیگر و تعیین دامنه نرمال به سادگی امکان پذیر نبوده و پیشنهاد شده مطالعات دامنه دار و پشت سر هم جهت تنظیم شرایط پرورش انجام گیرد. ویتامین C جهت رهاسازی آهن متصل شده فریتین

حامل پلاسما و جذب سلولی آهن همراه است. این ویتامین هم چنین می تواند به عنوان تسهیل کننده جذب آهن در جیره عمل کند. فقدان ویتامین C می تواند باعث آسیب آهن رها شده از ذخایر رتیگو- اندوتلیال شده و بنابراین جلوی سنتز اریتروسیت ها را گرفته و باعث توسعه آنمی گردد (10). مطالعات نشان می دهد سطح فعالیت لیزوزیم در ماهیان خویاری به نسبت ماهیان استخوانی کمتر به نظر می رسد. Kolman و همکاران (1998) مقدرا لیزوزیم را در تاسماهیان سبیری 40 گرمی $54 \pm 5/1 \mu\text{g/ml}$ و در ماهیان 471 گرمی $9/1 \pm 4/4$ نمودند. مقدرا لیزوزیم در تاسماهی روسی پرورش یافته در قفس به نسبت ماهیان پرورش یافته در سیستم مدار بسته بیشتر گزارش گردیده است. آن ها علت این امر را دمای بالا و شرایط زیست محیطی موجود در قفس دانستند. Verlhac و همکاران (1998) مقدار فعالیت لیزوزیم را با مصرف ویتامین C در ماهی مرتبط دانستند. Jeney و همکاران (2002) با بررسی اثر دوزهای مختلف ویتامین C در تاس ماهی هیبرید (*A. ruthenus* × *A. baeri*) با وزن متوسط 10-12 g و در دمای 22-23 درجه سانتی گراد به این نتیجه رسیدند که میزان فعالیت لیزوزیم در ماهیان تغذیه شده با سطح 100 و 1000mg/kg ویتامین C به مقدار $10/89 \pm 2/05 \mu\text{g/ml}$ و

11/24±2/33 بوده که با دوزهای 10 و صفر که به ترتیب $1/4 \pm 0/6$ و $1/3 \pm 0/2 \mu\text{g/ml}$ بودند اختلاف معنی داری را نشان می دهند. بدین دلیل آن ها پیشنهاد نمودند که ویتامین C بطور خارجی (تغذیه) ممکن است (13). برخی موارد مثبت را در مراحل اولیه رشد ماهیان خویاری بوجود آورد. فلاحتکار در سال 1384، در مطالعه ای که به منظور پرورش فیل ماهیان جوان با سطوح مختلف از ویتامین C در طی 16 هفته انجام داد. حداقل مقدار لیزوزیم اندازه گیری شده را در هفته شانزدهم در تیمار صفر با $85/6 \pm 24/7$ و حداکثر آن را در تیمار 800mg/kg به میزان $101/2 \pm 28/4 \mu\text{g/ml}$ مشاهده کرد. با توجه به این که اختلاف معنی دار نیست، میزان افزایش فعالیت لیزوزیم موجود در سرم خون فیل ماهیان با افزایش ویتامین C افزایش می یابد. بنابراین ویتامین C تاثیر مثبتی بر فعالیت لیزوزیم سرم خون هر چند کم فیل ماهیان می گذارد (2).

تشکر و قدردانی

لازم می دانیم مراتب قدردانی و سپاس خود را از آقایان دکتر مسعود فرخ روز، مهندس میرعماد میراسخیان و مهندس عباس ابراهیمی و سایر عزیزانی که نقشی در این تحقیق داشته اند ابراز داریم چرا که بدون یاری آن ها امکان انجام این تحقیق میسر نبود.

منابع

4. Fabiana Garcia, F., Pilarski, E.M., Onaka, F.R.D., Moraes, M.L., Martins, M.L. (2007). Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 271; 39-46.
5. Fracalossi, D.M., Allen, M.E., Nichols, D.K., Oftedal, O.T. (1998). Oscars, *Astronotus ocellatus*, have a dietary requirement for vitamin C. *J. Nutr.* 128; 1745-1751.

- 1- عامری مهابادی، م. 1378. روش های آزمایشگاهی هماتولوژی دامپزشکی. انتشارات دانشگاه تهران. 126 صفحه.
- 2- نادری، م. 1391. اثر ویتامین C و اسید فولیک بر فاکتورهای رشد، ایمنی و شاخص های خونی بچه ماهی شیپ، پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، 80 صفحه.
3. Blaxhall, P.C., Daisley, K.W. (1973). Routine hematological methods for use with fish blood. *J.mFish. Biol.* 5; 771-781.

6. Fracalossi, D.M., Allen, M.E., Nichols, D.K., Oftedal, O.T. (1998). Oscars, *Astronotus ocellatus*, have a dietary requirement for vitamin C. *J. Nutr.*, 128; 1745-1751.
7. Haghghi, M. (2009). Laboratory methods of fish hematology. Iranian Fisheries Research Organization Publication, Tehran, Iran.
8. Menezes, G.C., Tavares-Dias, M., Ono, E.A., Andrade, J.I.A., Brasil, E.M., Roubach, R. (2006). The influence of dietary vitamin C and E supplementation on the physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 145; 274-279.
9. Montero, D.M., Marrero, M.S. Izquierdo, L., Robaina, J., Vergara, M., Tort, L. (1999). Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture*, 171; 269-278.
10. Nsonga, A. (2009). Effect of varying levels of dietary vitamin C (ascorbic acid) on growth, survival and hematology of juvenile tilapia, *Oreochromis karongae* reared in aquaria. *Braz. J. Aquat. Sci. Technol.*, 13; 17-23.
11. Soltani, M. (2008). Fish and shellfish immunology. Tehran University Publication. Tehran, Iran.
12. Trenzado, C.E., Morales, A.E., Higuera, M.L. (2006). Physiological effects of crowding in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, selected for low and high stress responsiveness. *Aquaculture*, 258; 583-593.
13. Trenzado, C.E., Morales, A.E., Higuera, M.L. (2008). Physiological changes in rainbow trout held under crowding condition and fed diets with different levels of vitamin E and C and highly unsaturated fatty acids (HUFA). *Aquaculture*, 277; 293-302.



Archive of SID