

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 و هدف: ویتامین‌ها مهم‌ترین مواد مغذی هستند که سیستم ایمنی ماهی را تحریک می‌کنند و ویتامین C به عنوان یک ماده مغذی ضروری در آبی پروری مطرح شناخته شده است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات سطوح مختلف ویتامین C بر فاکتورهای خونی و ایمنی بچه تاس ماهی سیبری (*Acipenser baerii*) می‌باشد.

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 ناسماهی سیبری در نظر گرفته شد.

یافته ها: نتایج حاصل از تحقیق بر روی شاخص‌های خونی و فاکتورهای ایمنی ناسماهی سیبری پرورشی نشان داد که بالاترین تعداد گلبول قرمز (RBC) در تیمار 200 میلی گرم در کیلوگرم ویتامین C است 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 آن‌ها در تیمار 200 میلی گرم در کیلوگرم ویتامین C مشترک بود. سایر اندیس‌های 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 آن‌ها در تیمار 1600 میلی گرم در کیلوگرم ویتامین C مشترک بود. مطالعات بر روی فاکتورهای ایمنی خون ناسماهی سیبری نشان داد که اختلاف معنی داری در مقدار لیوزیم، IgM در بین تیمارها وجود دارد اما اختلاف معنی داری در ایمونوگلوبین کل در بین تیمارها وجود ندارد و میزان لیوزیم و ایمونوگلوبین کل در تیمار 800 میلی گرم بیشتر از سایر تیمارها بود. عدم حضور ویتامین C در جیره غذایی میزان فاکتورهای ایمنی را کاهش می‌دهد. نتیجه گیری: نتایج نشان داد که فاکتورهای ایمنی در تیمارهای بالای ویتامین C تاثیر بهتری دارند.

واژه‌های کلیدی: ویتامین C، شاخص‌های خونی، فاکتورهای ایمنی، تاس ماهی سیبری.

مقدمه

پرورش اثر معکوسی بر وضع سلامت و بهداشتی ماهی خواهد گذاشت و این وضعیت سبب ایجاد شرایط نامناسب و استرس‌زا و همچنین افزایش حساسیت ماهی به عوامل بیماری‌زا می‌شود. بنابراین با اتخاذ شیوه‌هایی بقاء و رشد مناسب ماهیان را در چنین شرایطی حفظ کرد و استفاده از مواد محرک ایمنی در جیره غذایی می‌تواند مقاومت در برابر بیماری‌های عفونی را با تقویت سیستم

صنعت آبی پروری از صنایع مهم در حال توسعه بوده و هر ساله بر میزان تولیدات آبی پروری در دنیا افزوده می‌شود. به طور معمول آبزیان در محیط‌های بسته هم- چون استخرهای خاکی، سیمانی، قفس‌ها و یا تانک‌ها پرورش داده می‌شوند و سعی تلاش در بالا بردن تراکم آبزیان در واحد سطح، یکی از مهم‌ترین علل پیشرفت و افزایش تولید این صنعت است. بی شک بالا بودن تراکم

ایمنی غیر اختصاصی ماهی افزایش دهد (11). ویتامین‌ها مهم‌ترین مواد مغذی هستند که سیستم ایمنی ماهی را تحریک می‌کنند و ویتامین C به عنوان یک ماده مغذی ضروری در آبرزی پروری مطرح است که برای حفظ فیزیولوژی از قبیل رشد نرمال، ایمنی بدن و تکثیر جانوران مختلف از قبیل ماهی مورد نیاز است (۸،۱۰). این ویتامین محلول در آب است و به عنوان یک آنتی-اکسیدان عمل می‌کند. اغلب ماهیان به دلیل فقدان آنزیم ال-گلوکونولاکتون 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 می‌کند و نقش حفاظتی این ویتامین در برابر استرس می‌تواند به دلیل جلوگیری از تبدیل اسیدهای چرب غیر اشباع به استرهای کلاسترول باشد که ترکیب مهمی در ساخت کورتیزول هستند و به این طریق از افزایش کورتیزول در بدن جلوگیری می‌کند (9). مطالعات نشان داده است که ویتامین C می‌تواند باعث افزایش مقاومت ماهی در برابر تنش‌های محیطی گردد. تحقیقات هم‌چنین نشان داده است که ویتامین C بر روی پارامترهای خونی موثر است (۳،۱۲،۱۳). هدف از این مطالعه بررسی اثرات سطوح مختلف ویتامین C بر روی پارامترهای خون و فاکتورهای ایمنی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به مدت 8 هفته در موسسه تحقیقات ماهیان خاویاری دریای خزر انجام شد. فاکتورهای فیزیکی-شیمیایی آب مانند اکسیژن محلول و دما (دو بار در روز) و pH (یک بار در روز) به دقت اندازه‌گیری شدند (جدول 1). در این تحقیق 6 جیره آزمایشی با سطوح اثرژی 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)

تهیه گردید. تعداد 360 قطعه بچه تاسماهی سیبری با وزن متوسط $29/8 \pm 1/66$ گرم و متوسط طول $33/08 \pm 8/8$ سانتی‌متر 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 وان‌ها هر 15 روز یکبار 100 درصد ماهیان هر وان با ترازوی دیجیتال با دقت 0/1 گرم توزین و با دقت میلی‌متر طول آن‌ها در فرم‌های مخصوص ثبت شدند. 24 ساعت قبل از زیست سنجی تغذیه قطع می‌گردید. 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 یک‌دیگر مخلوط شدند. با استفاده از دستگاه چرخ گوشت به صورت پلت‌هایی با طول 8 میلی‌متر 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 وان‌ها توزیع گردید. آب تانک‌ها 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 شاخص‌های خونی هموگلوبین، هماتوکریت، WBC، RBC، MCV، MCH، MCHC و فاکتورهای ایمنی شامل لیروزیم، IgM و ایمونوگلوبولین

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 اسپکتروفتومتر (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 ویا استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 670 نانومتر قرائت شد. بافر فسفات سدیم به عنوان بلانک استفاده شد. غلظت ایمونوگلوبین کل مطابق با روش شرح داده شده توسط Anderson و Siwicki 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 ایمونوگلوبین انکوباسیون شد. رسوب ایمونوگلوبین توسط سانتریفیوژ (Eppendorf Centrifuge 5415R, EppendorfAG, Hamburg, Germany) در 5000 دور در 4 درجه سانتی گراد برداشته شد.

کل از ماهیان خونگیری به عمل آمد. عملیات خونگیری از سیاهرگ دمی (Caudal vein) واقع در پشت باله مخرجی تاس ماهی سبیری 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 خون گیری 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 هموسیتمتر نئوبار و محلول رقیق کننده گاور و تورک شمارش گردیدند (3). هموگلوبین به وسیله کیت مخصوص شرکت پارس آزمون به روش کلرومتریک با طول موج 540nm در دستگاه اسپکتروفتومتر 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).

$$MCV = \frac{\text{Hematocrit}}{\text{RBC (million/mm}^3)} \times 10$$

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

$$MCH = \frac{\text{Hemoglobin (g/dcl)}}{\text{RBC (Million/mm}^3)} \times 10$$

فاکتورهای ایمنی شامل IgM از روش ایمونوتوربیدی متری است. در این روش IgM با آنتی بادی های پلی-

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)
نجزیه 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 ۸ 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 ۳). 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 می‌دهد، نتایج نشان داد که فاکتورهای ایمنی

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

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

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

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

بحث و نتیجه گیری

هم جهت تنظیم شرایط پرورش انجام گیرد. ویتامین C جهت رهاسازی آهن متصل شده فریتین از کبد جهت استفاده آهن در فرآیند اریثروپوئیزیس ضروری است. Dabrowski و Kock (۱۸۹۸) گزارش نمودند، ویتامین C جذب آهن فروس را افزایش می‌دهد در حالی که در مطالعه Lanno و همکاران (۱۹۸۵) باعث بهبود جذب این شکل آهن نگردیده است. نقش فقدان ویتامین C در بروز آنمی هنوز نامشخص

یکی از اهداف اولیه آبی پروری تولید گونه‌های مختلف آبی برای تولید و هم‌چنین بازسازی ذخایر است (2). فقدان روش‌های استاندارد و تفاوت گونه‌ای، اثرات سن، جنسیت، کیفیت آب، دمای آب و روش‌های صید باعث تغییرات شده و تفسیر را مشکل می‌نماید. بدین سبب نتایج مطالعات دیگر و تعیین دامنه نرمال به سادگی امکان‌پذیر نبوده و پیشنهاد شده مطالعات دامنه‌دار و پشت‌سر

لیزوزیم در ماهیان تغذیه شده با سطح 100 و 1000mg/kg ویتامین C به مقدار $10/89 \pm 2/05$ و $11/24 \pm 2/33$ $\mu\text{g/ml}$ 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 آن‌ها پیشنهاد نمودند که ویتامین C به طور خارجی (تغذیه) ممکن است. برخی موارد مثبت را در مراحل اولیه رشد ماهیان خاویاری به وجود آورد. فلاحتکار در سال 1384، در مطالعه‌ای که به منظور پرورش فیل ماهیان جوان با سطوح مختلف از ویتامین C در طی 16 هفته انجام داد. حداقل مقدار لیزوزیم اندازه‌گیری 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 می‌یابد. بنابراین ویتامین C تاثیر مثبتی بر فعالیت لیزوزیم سرم خون هر چند کم بر فیل ماهیان می‌گذارد.

تشکر و قدردانی

لازم می‌دانیم 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 داشته‌اند ابراز داریم چرا که بدون یاری آن‌ها امکان انجام این تحقیق میسر نبود.

است. در هر حال در برخی گونه‌ها، این امر می‌تواند 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 حمل پلاسما و جذب سلولی آهن همراه است. این ویتامین هم‌چنین می‌تواند به عنوان تسهیل کننده جذب آهن در جیره عمل کند. فقدان ویتامین C می‌تواند باعث آسیب آهن رها شده از ذخایر رتیگو- اندوتلیال شده و بنابراین جلوی سنتز اریتروسیت‌ها را گرفته و باعث توسعه آمی گردد. مطالعات نشان می‌دهد سطح فعالیت لیزوزیم در ماهیان خاویاری به نسبت ماهیان استخوانی کمتر به نظر می‌رسد. Kolman و همکاران (1998) مقدار لیزوزیم را در تاس ماهیان سیبری 40 گرمی $9/1 \pm 4/4$ $\mu\text{g/ml}$ و در ماهیان 471 گرمی $54 \pm 5/1$ اعلام نمودند. مقدار لیزوزیم در تاسماهی روسی پرورش یافته در قفس به نسبت ماهیان پرورش یافته در سیستم مدار بسته بیشتر گزارش گردیده است. آن‌ها 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 سانتی‌گراد به این نتیجه رسیدند که میزان فعالیت

منابع

- 1- عامری مهابادی، م. 1378. روش‌های آزمایشگاهی هماتولوژی دامپزشکی. انتشارات دانشگاه تهران. 126 صفحه.
- 2- نادری، م. 1391. اثر ویتامین C و اسیدفولیک بر فاکتورهای رشد، ایمنی و شاخص‌های 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.
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.
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.

