فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی 25، جلد 7، شماره 2، بهار 93، صفحه 79تا 85

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

یعقوب پورغلام[1]، حسین خارا[2]، محمود محسنی[3]
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، استادیارگروه 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 می کنند و ویتامین C به عنوان یک ماده مغذی ضروری در آبزی 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 ویتامینC از نوع ال- آسکوربیل -2- پلی فسفات شامل: فاقد ویتامین C (تیمار1)، 100 میلی گرم در کیلوگرم ویتامین C (تیمار2)، 200 میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C (تیمار3)، 400 میلی گرم در کیلوگرم ویتامین C (تیمار4)، 800 میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C (تیمار5)، 1600 میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C (تیمار6) در سه تکرار و به مدت 8 هفته جهت پرورش تاسماهی سیبری در نظر گرفته شد.

یافته ها: نتایج حاصل از تحقیق بر روی شاخص‌های خونی و فاکتورهای ایمنی تاسماهی سیبری پرورشی نشان داد که بالاترین تعداد گلبول قرمز(RBC) در تیمار 200 میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C است که با سایر تیمارها اختلاف معنی داری را نشان داد. در حالی که اختلاف معنی‌داری در تعداد گلبول سفید(WBC)، هماتوکریت و هموگلوبین مشاهده نشد، اما بیشترین مقدار آن ها در تیمار 200 میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C مشترک بود. 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 آن ها در تیمار 1600 میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین-C مشترک بود. مطالعات بر روی فاکتورهای ایمنی خون تاسماهی سیبری نشان داد که اختلاف معنی داری در مقدار لیزوزیم، IgM در بین تیمارها وجود دارد اما اختلاف معنی داری 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 ویتامینC در جیره غذایی میزان فاکتورهای ایمنی را کاهش می‌دهد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که فاکتورهای ایمنی در تیمارهای بالای ویتامینC تاثیر بهتری دارند.

واژه‌های کلیدی: ویتامینC، شاخص های خونی، فاکتورهای ایمنی، تاس ماهی سیبری.

مقدمه

صنعت آبزی پروری از صنایع مهم در حال توسعه بوده و هرساله بر میزان تولیدات آبزی پروری در دنیا افزوده می‌شود. به طور معمول آبزیان در محیط های 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 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

ایمنی غیر اختصاصی ماهی افزایش دهد(11). ویتامین‌ها مهم‌ترین مواد مغذی هستند که سیستم ایمنی ماهی را تحریک می‌کنند و ویتامینC به عنوان یک ماده مغذی ضروری در آبزی 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-گلونولاکتون قادر به بیوسنتز این ویتامین نیستند، بنابراین به مقدار کافی باید در جیره غذایی وجود داشته باشد(6). مطالعات نشان داده است که ویتامینC 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 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 ویتامینC می‌تواند باعث افزایش مقاومت ماهی در برابر تنش های محیطی گردد. تحقیقات هم‌چنین نشان داده است که ویتامینC بر روی پارامترهای خونی موثر است(۳،۱۲،۱۳). هدف از این مطالعه بررسی اثرات سطوح مختلف ویتامینC 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 فیزیکو-شیمیایی آب مانند اکسیژن محلول و دما (دوبار در روز) و pH (یک‌بار در روز) به دقت اندازه‌گیری شدند (جدول1). در این تحقیق 6 جیره آزمایشی با سطوح انرژی و پروتئین یکسان (جدول2) ولی حاوی سطوح مختلف ویتامینC، 0mg/kg (تیمار1= شاهد)، 100mg/kg (تیمار2)، 200mg/kg (تیمار3)، 400mg/kg (تیمار4)، 800mg/kg (تیمار5)، 1600 mg/kg (تیمار6) تهیه گردید. تعداد 360 قطعه بچه تاسماهی سیبری با وزن متوسط 1/66±29/8 گرم و متوسط طول8/8 ±33/08 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 هریک 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 آن ها 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 ویتامینC از نوع ال- اسکوربیل-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 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 وان‌ها 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 شاخص‌های خونی هموگلوبین، هماتوکریت، WBC، RBC، MCV، MCH، MCHC و فاکتورهای ایمنی شامل لیزوزیم، IgM و ایمونوگلوبین

کل از ماهیان خونگیری به‌عمل آمد. عملیات خونگیری از سیاهرگ دمی (Caudal vein) واقع در پشت باله مخرجی تاس ماهی سیبری پرورشی صورت گرفت(7). جهت انجام مطالعات خون‌شناسی از سرنگ‌هایی با حجم 2 cc استفاده گردید. بعد از گرفتن 2 cc خون توسط سرنگ از ساقه دمی این ماهیان، 0/5cc خون به داخل تیوب‌های اپندروف آغشته به ماده ضد انعقاد خون (هپارین) شماره‌گذاری شده جهت انجام مطالعات فاکتورهای خونی ریخته و 1/5 cc باقی‌مانده به داخل تیوب‌های اپندروف غیر هپارینه شماره‌گذاری 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 شاخص‌های خونی استفاده نگردید. فاکتورهای خونی شامل WBC و RBC با لام مخصوص هموسیتومتر نئوبار و محلول رقیق‌کننده گاور و تورک شمارش گردیدند(3). هموگلوبین به‌وسیله کیت مخصوص شرکت پارس آزمون به روش کلرومتریک با طول موج 540nm در دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری هماتوکریت با استفاده از سانتریفوژ انجام شد(7). هموگلوبین متوسط(MCH)، متوسط حجم گلبول قرمز(MCV) وغلظت متوسط گلبول قرمز(MCHC) از طریق روابط زیر محاسبه گردید(7).

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

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

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

فاکتورهای ایمنی شامل IgM از روش ایمونوتوربیدی متری است. در این روش IgM با آنتی بادی های پلی-کلونال موجود در محلول های تامپون تشکیل کمپلکس داده و باعث کدر شدن محلول می‌شوند. شدت کدورت ایجاد شده با مقدار IgM رابطه مستقیم داشته و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل 2100-VIS ساخت شرکت Unico آمریکا) در طول موج 340 نانومتر با بلانک (آب مقطر) خوانده شد(1). برای اندازه‌گیری سطوح لیزوزیم در سرم خون، 1/75 میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری *Micrococcus lysodeikticus* (سیگما) (معادل مقدار 0/375 میلی‌گرم در میلی‌لیتر از بافر فسفات سدیم 0/05 مولار با pH برابر 6/2) با 250 میکرولیتر از نمونه‌های سرم مخلوط و جذب نوری پس از 15 و 180 ثانیه به روش طیف‌سنجی وبا 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 Siwicki و Anderson در سال 1993 و Amar، Kiron، Satoh، Okamoto و Watanabe در سال 2000 اندازه‌گیری شد. به اختصار، نمونه سرم مطابق با روش Biuret اندازه‌گیری 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.

جدول 1- فاکتورهای فیزیکوشیمیایی اندازه گیری شده

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

جدول2- اجزاء جیره و آنالیز تقریبی جیره

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

نتایج

با اندازه‌گیری پارامترهای خونی در طول دوره ۸ هفته‌ای پرورش در تحقیق حاضر، مشخص گردید که در برخی شاخص‌ها، اثر ویتامینC بر این پارامترها معنی‌دار بوده اما بر برخی پارامترهای دیگر اثر پیش‌بینی شده ویتامینC ملاحظه نگردید(جدول۳). 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 معنی داری را نشان داد. در حالی که اختلاف معنی‌داری در تعداد گلبول سفید(WBC)، هماتوکریت و هموگلوبین مشاهده نشد، اما بیشترین مقدار آن ها در تیمار 200 میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C مشترک بود. در سایر اندیس‌های خونی MCH و MCHC اختلاف معنی‌دار آماری‌را در بین تیمارها نشان دادند اما در میزان MCV اختلاف آماری مشاهده نگردید و بیشترین مقدار آن‌ها در تیمار 1600 میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامینC مشترک بود با توجه به نتایج کسب شده(جدول4) در مطالعه حاضر مشخص گردید که اختلاف معنی‌داری در مقدار لیزوزیم، IgM در بین تیمارها وجود دارد اما اختلاف معنی داری 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

ویتامینC در جیره غذایی میزان فاکتورهای ایمنی را کاهش می‌دهد، نتایج نشان داد که فاکتورهای ایمنی در تیمارهای بالای ویتامینC تاثیر بهتری را دارند.

جدول3- شاخص های هماتولوژیک تاسماهی سیبری تغذیه شده با جیره های حاوی سطوح مختلف ویتامینC

تیمار	مقدار ویتامین C الحاق شده به جیره(mg/kg)	WBC (mm3)	RBC (mm3)	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]

جدول4- فاکتورهای ایمنی خون تاسماهی سیبری تغذیه شده با جیره های حاوی سطوح مختلف ویتامینC

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

یکی از اهداف اولیه آبزی پروری تولید گونه‌های مختلف آبزی 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 هم جهت تنظیم شرایط پرورش انجام گیرد. ویتامینC جهت رهاسازی آهن متصل شده فریتین از کبد جهت استفاده آهن در فرآیند اریتروپویزیس 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

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 ویتامینC می‌تواند باعث آسیب آهن رها شده از ذخایر رتیگو- اندوتلیال شده و بنابراین جلوی سنتز اریتروسیت‌ها را گرفته و باعث توسعه آنمی 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 µg/ml 9/1±4/4 و در ماهیان 471 گرمی µg/ml 54±5/1 اعلام نمودند. مقدار لیزوزیم در تاسماهی روسی پرورش یافته در قفس به نسبت ماهیان پرروش 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 g 12-10 و در دمای 23-22 درجه سانتی‌گراد به این نتیجه رسیدند که میزان فعالیت لیزوزیم در ماهیان تغذیه شده با سطح 100 و 1000mg/kg ویتامینC به مقدار 10/89±2/05 و µg/ml 11/24±2/33 بوده که با دوزهای 10 و صفر که به ترتیب 1/4±0/6 و µg/ml 1/3±0/2 بودند اختلاف معنی‌داری را نشان می دهند. بدین دلیل آن‌ها پیشنهاد نمودند که ویتامین C به‌طور خارجی (تغذیه) ممکن است. برخی موارد مثبت را در مراحل اولیه رشد ماهیان خاویاری به‌وجود آورد. فلاحتکار در سال 1384، در مطالعه‌ای که به منظور پرورش فیل ماهیان جوان با سطوح مختلف از ویتامینC در طی 16 هفته انجام داد. حداقل مقدار لیزوزیم اندازه‌گیری شده را در هفته شانزدهم در تیمار صفر با 85/6±24/7 و حداکثر آن را در تیمار 800mg/kg به میزان µg/ml 101/2±28/4 مشاهده کرد. با توجه به این که اختلاف معنی‌دار نیست، میزان افزایش فعالیت لیزوزیم موجود در سرم خون فیل ماهیان با افزایش ویتامینC افزایش می‌یابد. بنابراین ویتامینC تاثیر مثبتی بر فعالیت لیزوزیم سرم خون هر چند کم بر فیل ماهیان می گذارد.

تشکر و قدردانی

لازم می‌دانیم مراتب قدردانی و سپاس خود را از آقایان دکتر مسعود فرخ روز، مهندس میرعماد میرراسخیان 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.

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 شاخص های خونی بچه ماهی شیپ، پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان،80صفحه.

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 viatamin 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 viatamin C. J. Nutr, 128; 1745-1751.

7.Haghighi, 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 onthe 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.

.