شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۶۸، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۲/۲۳

ص ۳۶۹-۳۸۲

بررسی تأثیر ویتامین C جیرهٔ غذایی در رشد، ترکیب شیمیایی بدن و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بچه‌ماهی نورس آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)

❖ **مریم خواجوی:** کارشناس ارشد تکثیر و پرورش آبزیان دانشکدهٔ علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس
❖ **عبدالمحمد عابدیان کناری*:** استاد گروه تکثیر و پرورش آبزیان دانشکدهٔ علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس
❖ **عباس زمانی:** استادیار گروه شیلات،دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست،دانشگاه ملایر

چکیده

به منظور بررسی عملکرد ویتامین C در ترکیب شیمیایی بدن و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در بچه‌ماهی نورس آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)، پنج جیرهٔ غذایی حاوی سطوح مختلف ویتامین C (صفر (شاهد)، ۵۰، ۲۵۰، ۷۵۰ و ۱۵۰۰ میلی‌گرم ویتامین به ازای هر کیلوگرم غذا) در سه تکرار و به مدت شش هفته به بچه‌ماهیان با میانگین وزنی ۰/۱ ±۰/۰۲ گرم خورانده شد. پس از گذشت شش هفته پرورش، نتایج شاخص‌های رشد و زنده‌مانی اختلاف معنی‌داری در بین تیمارها نشان داد (P<۰/۰۵) پایین‌ترین درصد میانگین افزایش وزن (BWG)، نرخ رشد ویژه (SGR) و زنده‌مانی در گروه شاهد و بالاترین درصد این فاکتورها در گروه تغذیه‌شده با سطح ۷۵۰ mg/kg مشاهده شد. میزان تجمع ویتامین C در بافت با افزایش آن در جیرهٔ غذایی رابطهٔ مثبتی نشان داد. نیاز ویتامین C بر اساس درصد افزایش وزن بدن ۵۶۹/۱ mg/kg تخمین زده شد. نتایج بررسی ترکیب شیمیایی بدن نشان داد که مقادیر رطوبت، خاکستر، چربی و پروتئین اختلاف معنی‌داری بین تیمارها ندارند (P> ۰/۰۵). تأثیر تست استرس محدودیت اکسیژنی در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز نشان داد که فعالیت این آنزیم‌ها بعد از اعمال تست استرس نسبت به قبل از آن افزایش معنی‌داری در تیمار کنترل داشته است (P<۰/۰۵) در حالی که فعالیت آنزیمی سایر تیمارها پس از اعمال استرس اختلاف معنی‌داری نسبت به قبل از استرس نشان نداد (P>۰/۰۵). بر اساس نتایج، سطح ۷۵۰ mg/kg ویتامین C برای رشد و زنده‌مانی بچه‌ماهیان نورس آزاد دریای خزر پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: بچه‌ماهی نورس آزاد دریای خزر، ترکیب بدن، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، ویتامین C.

* نویسندهٔ مسئول
Email: aabedian@yahoo.co.uk

۱. مقدمه

رادیکال‌های آزاد مولکول‌هایی بسیار واکنش‌پذیرند که یک یا چند الکترون غیرجفتی دارند و طی فرایندهای فیزیولوژیک معمول بدن تولید می‌شوند (Machlin and Bendich, 1987; Martinez et al., 2005). افزایش رادیکال آزاد از طریق سلولْ استرس اکسیداتیو گفته می‌شود که در نهایت به تخریب سلول منجر می‌شود (Gao et al., 2014). یکی از مسیرهای تولید رادیکال آزاد در بدن زنجیرهٔ انتقال الکترون در فرایند تنفس سلولی است که در این زنجیره مولکول اکسیژن نقش آخرین پذیرندهٔ الکترون را دارد که بر اثر احیای آن به مولکول آب، رادیکال‌های آزادی نظیر آنیون سوپراکسید (O_2^-)، هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH) تولید می‌شوند (Mourente et al., 2007; Gao et al., 2014). این رادیکال‌ها پتانسیل بالایی در آسیب‌رساندن به سیستم بیولوژیک دارند و طی فرایند اکسیداسیون مولکول‌های زیستی، از جمله لیپیدها، رادیکال‌های آزاد دیگری مانند پروکسیل را به وجود می‌آورند و با آغاز واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون سبب آسیب بافتی می‌شوند (Martinez et al., 2005; Halliwell and Gutteridge, 1990). یکی از روش‌هایی که بدن برای مقابله با رادیکال‌های آزاد از آن بهره می‌برد سیستم آنزیمی شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است که حذف‌کنندهٔ رادیکال‌های آزادند به طوری که، آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، که نقش آنتی‌اکسیدانی بنیادی دارد، رادیکال آنیون سوپراکسید را خنثی کرده و از انتشار آن جلوگیری می‌کند و محصول فعالیت این آنزیم پراکسید هیدروژن است که از طریق آنزیم کاتالاز به آب و اکسیژن تجزیه می‌شود (Hampton et al., 1998; Mourente et al., 2007). بدن برای جلوگیری از آسیب‌های اکسیداتیو و دفاع آنتی‌اکسیدانی مؤثر به سیستم آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی شامل مکمل‌های غذایی و آنتی‌اکسیدان‌های ضروری به‌ویژه ویتامین‌های C و E وابسته است (Mourente et al., 2007; Dabrowski, 2001).

ویتامین C یکی از ویتامین‌های گروه محلول در آب است که تحت تأثیر آنزیم ال-گلونولاکتون اکسیداز (GLO) از دی-گلوکز سنتز می‌شود (Halver, 1989; Park and Levine, 1996). بسیاری از ماهیان استخوانی به دلیل فقدان آنزیم GLO قادر به سنتز ویتامین C نیستند بنابراین، ضروری است که مقدار مورد نیاز این ویتامین از راه تغذیهٔ خارجی تأمین شود تا رشد، زنده‌مانی، سلامتی و تولیدمثل طبیعی حاصل شود (Moreau and Dobrowski, 2000; Verlhac, 1999). ویتامین C به دلیل نقش آنتی‌اکسیدانی، ساختاری و ایمنی‌زایی خود اهمیت ویژه‌ای دارد. همچنین جزء ضروری جیره برای حفظ رشد بهینه است (Tewary and Patra, 2008). ویتامین C با احیای رادیکال‌های آزاد آنیون سوپراکسید و هیدروژن پراکسید که سوبسترای آنزیم‌های SOD و کاتالاز محسوب می‌شوند در میزان فعالیت این دو آنزیم تأثیرگذار است (Bendich et al., 1986). ماهی آزاد دریای خزر جزء گونه‌های با ارزش تجاری بالا محسوب می‌شود که کلید موفقیت پرورش مصنوعی آن شناسایی نیازمندی‌های غذایی و فرموله‌کردن یک جیرهٔ غذایی مناسب است (Ramezani, 2009).

اثر ویتامین C در رشد، ترکیب بدن و آنزیم‌های

آنتی‌اکسیدانی گونه‌های مختلف بررسی شده است که در ذیل به برخی از آن‌ها اشاره می‌شود: (Ovissipour et al., 2006) (*Acipenser persicus*)، (Gao et al., 2014) (*Paralichthys olivaceus*)، (Xiao et al., 2010) (*Rachycentron canadum*)، (Eo and Lee, 2008) (*Takifugu rubripes*)، (Kumari and Sahoo, 2005) (*Clarias batrachus*)، (Puangkaew et al., 2005) (*Onchorhynchus mykiss*)، (Ai et al., 2004) (*Lateolabrax japonicus*)، (Tocher et al., 2002) (*Scophthalmus maximus*)، (Mourente et al., 2000) (*Sparus aurata*)، (Kolkovski et al., 2000) (*Stizostedion vitreum*)، (Navarre and Halvar, 1989) (*Oncorhynchus mykiss*). در این تحقیق اثر ویتامین C در میزان رشد، ترکیب شیمیایی بدن و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در بچه‌ماهی نورس آزاد دریای خزر بررسی شده است. هدف از این آزمایش تخمین سطح مطلوب ویتامین C در جیرهٔ غذایی بچه‌ماهیان نورس آزاد دریای خزر است.

۲. مواد و روش کار

۱.۲. تهیهٔ نمونه

تخم چشم‌زدهٔ ماهی آزاد دریای خزر از مرکز تکثیر و پرورش قزل‌چشمهٔ کوثر واقع در روستای عسل‌محلهٔ شهرستان تنکابن تهیه شد و به سالن پرورش آبزیان دانشکدهٔ علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس انتقال یافت. پس از جذب کامل کیسهٔ زرده، تغذیهٔ فعال با غذای پایهٔ فاقد ویتامین C آغاز و به منظور سازگارسازی به مدت یک هفته ادامه یافت. سپس ماهیان با وزن اولیهٔ ۱۰۰ میلی‌گرم و تراکم ۰/۱ گرم در لیتر، در قالب ۵ تیمار در تانک‌های ۹۰ لیتری ذخیره‌سازی شدند. غذادهی ۵ نوبت در روز تا حد سیری انجام شد بدین صورت که لاروها پس از سیرشدن تمایلی به غذاگیری نشان نمی‌دادند و غذادهی متوقف می‌شد. تانک‌ها هر روز قبل از اولین و پس از آخرین وعدهٔ غذایی سیفون شدند. به منظور تأمین اکسیژن از سنگ هوا استفاده شد. آزمایش در سالن سرپوشیده، با دورهٔ نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی به مدت ۶ هفته انجام شد.

۲.۲. فرمولاسیون و آماده‌سازی جیرهٔ غذایی

فرمولاسیون جیره‌های آزمایشی با سطوح مختلف ویتامین C (صفر (شاهد)، ۵۰، ۲۵۰، ۷۵۰ و ۱۵۰۰ میلی‌گرم ویتامین به ازای هر کیلوگرم غذا) با نرم‌افزار لیندو انجام شد. به منظور آماده‌سازی جیرهٔ آزمایشی، اجزای خشک جیره پس از تهیه از الک ۱۰۰ میکرون گذرانده سپس در همزن به‌خوبی با یکدیگر مخلوط شد. ویتامین C در ابتدا با سلولز مخلوط شد. سپس به سایر اجزای غذایی افزوده شد. سپس روغن لسیتین، روغن ماهی و روغن سویا به مخلوط به‌دست‌آمده اضافه شد. پس از اضافه‌کردن آب به مخلوط، عمل اختلاط ادامه یافت. سپس تودهٔ غذا برای ساخت پلت به چرخ گوشت منتقل شد، پلت‌های ساخته‌شده پس از خشک‌شدن از الک‌های ۳۰۰، ۵۰۰ و ۷۰۰ میکرون عبور داده شدند و تا زمان استفاده در کیسه‌های جداگانه در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. جیرهٔ آزمایشی به دلیل حساسیت ویتامین C یک هفته قبل از شروع آزمایش تهیه شد (جدول ۱).

جدول ۱. اجزا و ترکیب تقریبی غذای ساخته‌شده برای تغذیهٔ بچه‌ماهیان

اجزای جیره‌های آزمایشی (گرم در کیلوگرم غذا)	شاهد	تیمار			
		۵۰	۲۵۰	۷۵۰	۱۵۰۰
کازئین[۱]	۴۹۰	۴۹۰	۴۹۰	۴۹۰	۴۹۰
ژلاتین[۲]	۱۳۵	۱۳۵	۱۳۵	۱۳۵	۱۳۵
دکسترین[۲]	۱۷۷/۳	۱۷۷/۳	۱۷۷/۳	۱۷۷/۳	۱۷۷/۳
روغن ماهی[۳]	۶۵	۶۵	۶۵	۶۵	۶۵
روغن سویا[۴]	۶۵	۶۵	۶۵	۶۵	۶۵
لسیتین[۳]	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
آنتی‌اکسیدان[۳]	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲
ضد قارچ[۳]	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰
مکمل معدنی[۳]	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰
مکمل ویتامینی[۵]	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵
ویتامین C[۶]	۰	۰/۰۵	۰/۲۵	۰/۷۵	۱/۵
حامل (سلولز)	۵	۴/۹۵	۴/۷۵	۴/۲۵	۳/۵
ترکیب تقریبی جیره‌های آزمایشی (٪ ماده خشک)					
پروتئین	۵۶/۴۶	۵۷/۴	۵۸/۵	۵۷/۶۶	۵۷/۰۸
چربی کل	۱۴/۷	۱۲/۹۲	۱۴/۵۴	۱۳/۱۹	۱۳/۶۸
خاکستر	۹/۰۳	۸/۴۴	۸/۵۷	۸/۷۹	۸/۵۹
کربوهیدرات	۱۹/۷۸	۲۱/۲۳	۱۸/۳۸	۲۰/۳۴	۲۰/۶۴
انرژی ناخالص(KJ/g)	۲۲/۵۴	۲۲/۳	۲۲/۷۱	۲۲/۳۲	۲۲/۴۲

۱. شرکت Fluka (امریکا St. Louis, MO 63178)، ۲. شرکت سیگما (امریکا St. Louis, MO 63178)، ۳. کارخانهٔ خوراک دام و آبزیان مازندران (ساری کیلومتر ۵ جادهٔ نکا)، ۴. شرکت غنچه (تهران بزرگراه مدرس)، ۵. شرکت ارس‌بازار (شهرک صنعتی آمل)، ۶. شرکت F.Haffmann-La Roche (سوئیس بازل). مکمل ویتامینی حاوی ویتامین‌های: A=۱۲۰۰۰۰ IU، D_3 =۴۰۰۰۰ IU، E=۳۰۰mg، K_3 =۱۲۰ mg، B_1=۲۰ mg، B_2 =۳۳۶ mg، B_7 =۷۲۰ mg، B_5=۹۰۰ mg، B_6 =۲۴۰mg، B_9 =۶۰ mg، B_{12} =۰/۴ mg کریر تا ۱۰۰ میلی‌گرم است. هر کیلوگرم مکمل معدنی شامل آهن: ۲۰g، روی: ۶۰g، سلنیم: ۴۰۰mg، کبالت: ۲۰۰ mg، مس: ۲g، منگنز: ۴۰g، ید: ۴۰۰ mg، کولین کلراید: ۶۰g، کریر: تا ۱ کیلوگرم است. پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت بر حسب درصد مادهٔ خشک است. محاسبهٔ کربوهیدرات بر حسب رابطهٔ (پروتئین + چربی + خاکستر+ رطوبت)- ۱۰۰ و محاسبهٔ انرژی ناخالص بر حسب کیلوژول بر گرم جیره از رابطهٔ حاصل‌ضرب مقدار انرژی موجود در هر گرم پروتئین (۲۳/۶ KJ)، چربی (۳۹/۵ KJ) و کربوهیدرات (۱۷/۲ KJ) تعیین شد (NRC، ۱۹۹۳).

۳.۲. جمع‌آوری و آنالیز نمونه‌ها

۱.۳.۲. سنجش ویتامین C بافت

سنجش میزان ویتامین C بافت و جیره بر اساس روش (Nelis and Liheer, 1997) انجام شد. یک گرم نمونه به یک لولهٔ پلاستیکی ۲۵ میلی‌لیتری منتقل شد و ۱۰۰ میکرولیتر استاندارد داخلی (ایزو آسکوربیک اسید) سپس، ۲ میلی‌لیتر محلول استاندارد (EDTA ۱ میلی‌مولار و هموسیستئین ۲ میلی‌مولار) به آن افزوده شد. پس از هموژن‌کردن نمونه‌ها، فاز

شفاف جدا و سانتریفیوژ شد. سوپرنتنت به‌دست‌آمده پس از عبور از کارتریژ ۱۸ -C، به دستگاه کروماتوگرافی مایع (HPLC: Wissenschaftliche Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH / Hegauer Weg 38 / D-14163 Berlin GERMANY) مجهز به ستون (ODS_3, C_{18}) و آشکارساز نوع UV و در دمای اتاق استفاده شد. از KH_2PO_4 ۵۰ میلی‌مولار، pH ۲/۸ و با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه به‌منزلهٔ فاز متحرک استفاده شد و تزریق شد. شناسایی آسکوربیک اسید با توجه به زمان بازداری و محاسبهٔ مقدار آن با توجه به مقدار استاندارد داخلی اضافه‌شده به نمونه صورت پذیرفت. برای محاسبهٔ سطح زیر پیک از نرم‌افزار EZchromElit استفاده شد و نتایج به صورت غلظت µg/g بافت گزارش شد.

۲.۳.۲. فاکتورهای رشد

برای بررسی تغییرات رشد و مقایسهٔ تیمارهای مختلف، درصد زنده‌مانی، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، نرخ رشد ویژه (SGR) و درصد افزایش وزن بدن (BWG) با استفاده از روابط زیر محاسبه شد (Hamza et al., 2008; Peidecausa et al., 2007).

۱۰۰* (تعداد بچه‌ماهیان اول دوره / تعداد بچه‌ماهیان پایان دوره)= درصد زنده‌مانی

افزایش وزن (گرم) / غذای خشک داده‌شده (گرم)= (FCR)

۱۰۰*(طول دورهٔ پرورش / (وزن اولیه)ln – (وزن نهایی)ln)= (SGR)

۱۰۰*[وزن اولیه(گرم/(میانگین وزن اولیه(گرم)– میانگین وزن ثانویه(گرم)))]=(BWG)

۳.۳.۲. آنالیز تقریبی بدن و جیرهٔ غذایی

میزان رطوبت بر اساس اختلاف وزن حاصل از قراردادن نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آون (Heaeus Instrument مدل Hanau D-63450) با دمای ۱۰۵ درجهٔ سانتی‌گراد به دست آمد. برای تعیین خاکستر، نمونهٔ بافت که قبلاً در فریز درایر خشک شده بود، در کوره با دمای ۵۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت سوزانده شد. میزان پروتئین خام با استفاده از روش کلدال (Kjeldahl method) با ضریب تبدیل ۶/۲۵ محاسبه شد و مقدار چربی نیز با روش سوکسله و به کمک دستگاه Soxtec System اندازه‌گیری شد (AOAC, 2005).

۴.۳.۲. سنجش فعالیت اختصاصی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

سنجش فعالیت اختصاصی آنزیم SOD بر اساس روش (Witerburn et al., 1975) با اقتباس از راهنمای آنزیم Worthington, (1993) و با استفاده از Nitro Blue Tetrazolium hydrochloride (NBT) انجام شد. آنزیم SOD از احیای NBT از طریق رادیکال آزاد آنیون پراکسید جلوگیری می‌کند. یک واحد از فعالیت SOD برابر است با مقدار آنزیمی که در مدت زمان یک دقیقه در طول موج ۵۶۰ نانومتر، نیمی از بیشینهٔ بازدارندگی احیای NBT را شامل شود.

سنجش فعالیت اختصاصی آنزیم کاتالاز با استفاده از H_2O_2 به‌منزلهٔ سوبسترا انجام شد (Worthington, 1993). یک واحد از فعالیت کاتالاز برابر است با مقدار آنزیمی که می‌تواند در مدت زمان یک دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر H_2O_2 را به آب و اکسیژن تبدیل کند.

۵.۳.۲. تست استرس

به منظور بررسی میزان مقاومت بچه‌ماهیان آزاد دریای خزر تغذیه‌شده با سطوح مختلف ویتامین C، نسبت به محدودیت اکسیژن، در پایان دورهٔ پرورش تعداد بچه‌ماهیان هر تیمار به ۲۰ عدد کاهش یافت. سپس بچه‌ماهیان با استفاده از ساچوک از آب خارج و پس از ۳۰ ثانیه به تانک بازگردانده شدند و به منظور ارزیابی میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ۳ ساعت پس از اعمال استرس نمونه‌برداری انجام شد (Kumari and Sahoo, 2005; Izquierdo et al., 2002).

۴.۲. آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS ۱۷ انجام شد. نرمال‌بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smironov ارزیابی شد و آزمون همگنی واریانس با تست Levene انجام شد. برای مقایسهٔ فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در مراحل پیش از استرس و پس از استرس در هر تیمار از آزمون تی استیودنت غیرجفتی و به منظور مقایسهٔ فعالیت آنزیم‌ها در مرحلهٔ قبل و بعد از استرس، رشد، ویتامین C همچنین ترکیب شیمیایی بدن در تیمارها از آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده شد. مقایسهٔ میانگین تیمارها در ۳ تکرار و با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. همچنین میزان بهینه نیاز ویتامینی بچه‌ماهی نورس آزاد دریای خزر بر مبنای درصد افزایش وزن بدن، با استفاده از نرم‌افزار Graph pad prism و روش broken-line تخمین زده شد.

۳. نتایج

۱.۳. رشد

نتایج شاخص‌های رشد نشان داد فاکتورهای رشد با افزایش میزان ویتامین C بهبود یافت (جدول ۲). نتایج SGR بیانگر آن است که افزایش ویتامین C در جیرهٔ غذایی در مقایسه با نبود ویتامین باعث افزایش معنی‌دار این فاکتور می‌شود ($P<۰/۰۵$) و بالاترین میزان این فاکتور در سطح ۷۵۰ mg/kg مشاهده شد. درصد افزایش وزن بدن با افزایش سطح ویتامین C به طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار گرفت ($P<۰/۰۵$). بیش‌ترین اختلاف بین تیمارهای فاقد ویتامین C و تیمار حاوی ۷۵۰ mg/Kg ویتامین مشاهده شد. مقایسهٔ میانگین‌ها نشان داد که افزایش غلظت ویتامین C از تیمار شاهد به تیمار حاوی ۷۵۰ mg/Kg ویتامین باعث افزایش بیش از ۲ برابری این فاکتور شده است و در تیمار ۱۵۰۰ mg/Kg کاهش یافت. ضریب تبدیل غذایی در سطوح بالا نسبت به تیمار شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$) کم‌ترین و بیش‌ترین میزان این فاکتور به ترتیب در تیمارهای ۷۵۰ mg/kg و شاهد رؤیت شد. دربارهٔ فاکتور زنده‌مانی نتایج نشان‌دهندهٔ تأثیر معنی‌دار ویتامین C بوده است به طوری که زنده‌مانی در تیمار شاهد نسبت به سایر تیمارها دارای مقدار کم‌تری بود ($P<۰/۰۵$) و بالاترین میزان زنده‌مانی با اختلاف ناچیزی از تیمار ۱۵۰۰ mg/kg در گروه تغذیه‌شده با سطح ۷۵۰ mg/kg مشاهده شد.

جدول ۲. شاخص‌های رشد بچه‌ماهی نورس آزاد دریای خزر تغذیه‌شده با سطوح مختلف ویتامین C جیره به مدت ۶ هفته

پارامترها	جیرهٔ غذایی (میلی‌گرم ویتامینC به ازای یک کیلوگرم غذا)				
	۰	۵۰	۲۵۰	۷۵۰	۱۵۰۰
وزن اولیه (گرم)	۰/۱±۰/۰۲	۰/۱±۰/۰۱	۰/۱۱±۰/۰۱	۰/۰۹۶±۰/۰۲	۰/۱±۰/۰۱
افزایش وزن بدن(٪)	۲۰۴/۸۱±۴۹[c]	۳۰۰/۶۷±۲۵[bc]	۳۳۷/۶±۷۱[abc]	۴۶۰/۹۸±۱۲۱[a]	۳۶۶/۶۶±۵۷[ab]
نرخ رشد ویژه(٪)	۲/۵۵±۰/۵ [b]	۳/۳±۰/۱۵ [a]	۳/۴۹±۰/۳۹[a]	۴/۰۶±۰/۵۱ [a]	۳/۶۵±۰/۳ [a]
ضریب تبدیل غذایی	۱/۷۲±۰/۲۴[b]	۱/۲۱±۰/۱۵[ab]	۱/۰۷±۰/۰۹ [a]	۰/۸۸±۰/۱ [a]	۱/۰۵±۰/۱۹[a]
زنده‌مانی(٪)	۵۳/۳۳±۱۷ [b]	۷۱/۵۵±۵ [a]	۷۶/۰۷±۹ [a]	۸۳/۰۳±۴ [a]	۸۲±۶ [a]

(α =۰/۰۵، n =۳، Mn ±SD). حروف کوچک غیرمشترک بیانگر تفاوت معنی‌دار است.

۲.۳. ویتامین C بافت

نتایج بررسی تجمع بافتی ویتامین C در بافت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطوح مختلف ویتامین C جیره بوده است (P<۰/۰۵). بدین صورت که با افزایش سطح ویتامین C جیره، میزان تجمع این ویتامین در بدن افزایش یافت و بالاترین میزان در گروه تغذیه‌شده با سطح ۱۵۰۰ mg/Kg ویتامین C و حداقل تجمع بافتی در سطح صفر مشاهده شد (جدول ۳).

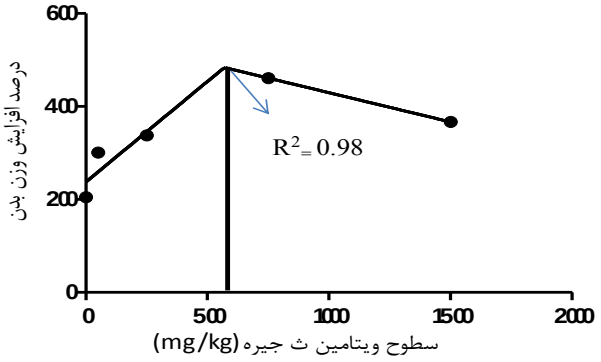
۳.۳. تخمین ویتامین C در بافت

به منظور تعیین نقطهٔ بهینه برای نشان‌دادن حداکثر درصد افزایش وزن بدن از معادلهٔ خط شکسته استفاده شد (شکل ۱). نتایج نشان داد نقطهٔ شکست معادله که بیانگر نقطهٔ بهینه بر اساس افزایش وزن بدن است برابر با ۵۶۹/۱ mg/kg بوده است.

جدول ۳. میزان تجمع بافتی آسکوربیک اسید در بدن بچه‌ماهی نورس آزاد دریای خزر تغذیه‌شده با سطوح مختلف ویتامین C به مدت ۶ هفته

پارامترها	جیرهٔ غذایی (میلی‌گرم ویتامین C به ازای یک کیلوگرم غذا)				
	۰	۵۰	۲۵۰	۷۵۰	۱۵۰۰
میزان ویتامین C بدن (µg/g WW)	۱۱/۸ ± ۰/۵[d]	۸۸/۸±۱۳[c]	۱۹۸/۲±۹[b]	۴۳۱/۲±۴۳[a]	۴۸۶/۹۶± ۴۱[a]

(α =۰/۰۵، n = ۲، Mn ±SD). حروف کوچک غیرمشترک بیانگر تفاوت معنی‌دار است.



شکل ۱. اثر سطوح مختلف ویتامین C جیره بر درصد افزایش وزن بدن

۴.۳. ترکیب بدن

آنالیز ترکیب بدن در پایان دورهٔ پرورش نشان داد بیش‌ترین میزان خاکستر و پروتئین خام مربوط به تیمار ۵۰ mg/Kg، رطوبت در تیمار کنترل و چربی در سطح ۷۵۰ mg/Kg بود این در حالی است که مقدار کمینهٔ خاکستر و پروتئین خام در تیمار ۲۵۰ mg/Kg، رطوبت در تیمار ۵۰ mg/Kg و چربی در تیمار شاهد ملاحظه شد. به استثنای چربی، هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری در بین تیمارهای تغذیه‌شده با سطوح مختلف ویتامین C مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (جدول ۴).

۵.۳. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

نتایج فعالیت آنزیم‌های SOD و کاتالاز نشان داد فعالیت این آنزیم‌ها در هر دو مرحلهٔ قبل و بعد از استرس متناسب با افزایش سطح ویتامین C از تیمار شاهد به تیمار ۱۵۰۰ mg/Kg کاهش معنی‌داری نشان داد (P< ۰/۰۵). میزان فعالیت هر دو آنزیم در تمامی تیمارها در زمان پس از استرس بیش‌تر از زمان قبل از استرس بود، ولی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P> ۰/۰۵)؛ در تیمار شاهد این افزایش اختلاف معنی‌داری نشان داد (P< ۰/۰۵) (جداول ۵ و ۶).

جدول ۴. آنالیز تقریبی بدن بچه‌ماهی نورس آزاد دریای خزر تغذیه‌شده با سطوح مختلف ویتامین C جیره به مدت ۶ هفته

پارامترها (٪)	جیرهٔ غذایی (میلی‌گرم ویتامین C به ازای یک کیلوگرم غذا)				
	۰	۵۰	۲۵۰	۷۵۰	۱۵۰۰
رطوبت	۸۵/۱۱±۰/۳	۸۱/۲۳±۳/۲	۸۴/۵۳±۰/۴	۸۲/۳۳±۲/۴	۸۴/۱۹±۰/۱۹
پروتئین	۱۱/۸۵±۰/۲۸	۱۳/۷۹±۲/۰۵	۱۱/۷۷±۰/۴۶	۱۳/۲۷±۱/۹	۱۱/۹۹±۰/۱۶
چربی	۱/۱۹±۰/۱۱	۱/۷۴±۰/۱۹	۱/۸۵±۰/۱	۲/۴۷±۰/۳۴	۱/۸۹±۰/۰۲
خاکستر	۱/۶۳±۰/۰۴	۱/۹۴±۰/۳	۱/۵۶±۰/۱۱	۱/۷۶±۰/۲	۱/۷۱±۰/۶

ترکیب شیمیایی بدن در ۳ تکرار و داده‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار نشان داده شده‌اند (n =۳، Mn ±SD).

جدول ۵. فعالیت آنزیم SOD (Unit/mg/min) در بافت عضلهٔ بچه‌ماهی نورس آزاد دریای خزر تغذیه‌شده با سطوح مختلف ویتامین C جیره به مدت ۶ هفته

سطوح مختلف ویتامین C جیرهٔ غذایی (mg/kg)	پیش از استرس	پس از استرس
شاهد	۰/۱۳ ±۰/۰۱ $^{A\,a}$	۰/۱۵ ± ۰/۰۰۴ $^{B\,a}$
۵۰	۰/۱۰۹ ±۰/۰۱ $^{A\,b}$	۰/۱۱۳ ± ۰/۰۰۷ $^{A\,c}$
۲۵۰	۰/۱۲ ±۰/۰۰۶ $^{A\,ab}$	۰/۱۲۸ ±۰/۰۱ $^{A\,b}$
۷۵۰	۰/۰۹ ± ۰/۰۱ $^{A\,b}$	۰/۱ ± ۰/۰۰۱ $^{A\,c}$
۱۵۰۰	۰/۰۶ ± ۰/۰۱ $^{A\,c}$	۰/۰۶ ± ۰/۰۰۱ $^{A\,d}$

(Mn ±SD ،n =۳ ،α=۰/۰۵). حروف کوچک غیرمشترک در هر ستون و حروف بزرگ غیرمشترک در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار است.

جدول۶. فعالیت آنزیم کاتالاز (Unit/mg/min) در بافت عضلهٔ بچه‌ماهی نورس آزاد دریای خزر تغذیه‌شده با سطوح مختلف ویتامین C جیره به مدت ۶ هفته

سطوح مختلف ویتامین C جیرهٔ غذایی (mg/kg)	پیش از استرس	پس از استرس
شاهد	۰/۱۸۸ ±۰/۰۱ ^{Aa}	۰/۲۹۴ ± ۰/۰۲ ^{Ba}
۵۰	۰/۱۳ ±۰/۰۴ ^{Aab}	۰/۱۸۹ ±۰/۰۱ ^{Ab}
۲۵۰	۰/۱۲ ±۰/۰۳ ^{Aab}	۰/۱۸۳ ±۰/۰۱ ^{Ab}
۷۵۰	۰/۰۸۶ ± ۰/۰۳ ^{Ab}	۰/۱۰۹ ± ۰/۰۰۸ ^{Ac}
۱۵۰۰	۰/۰۸ ± ۰/۰۲ ^{Ab}	۰/۰۹۴ ± ۰/۰۱ ^{Ac}

(Mn ±SD ،n =۳ ،α=۰/۰۵). حروف کوچک غیرمشترک در هر ستون و حروف بزرگ غیرمشترک در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار است.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد با افزایش سطح ویتامین C جیره، تجمع ویتامین C در بافت افزایش یافت. در گروه شاهد نیز مقداری هرچند ناچیز ویتامین در بافت مشاهده شد. با توجه به این‌که ماهی آزاد دریای خزر قادر به سنتز ویتامین C نیست، می‌توان نتیجه گرفت که این مقدار ویتامین از مولدین به بچه‌ماهیان منتقل شده و طی مدت پرورش به طور کامل تخلیه نشده و ممکن است نبود علائم کمبود ویتامین در اوایل دورهٔ پرورش به دلیل وجود مقادیر بالاتر ویتامین در بدن بچه‌ماهی بوده باشد که به مرور زمان کاهش یافته است.

مطالعات متعددی در زمینهٔ اثر ویتامین C جیره در رشد و زنده‌مانی انواع آبزیان انجام شده است که نتایج برخی از آن‌ها از اثر مثبت این ویتامین در شاخص‌های رشد حکایت دارد و برخی بی‌اثربودن آن را به اثبات رسانده است. نتایج این تحقیق نشان‌دهندهٔ اثر معنی‌دار ویتامین C در شاخص‌های رشد بچه‌ماهی آزاد دریای خزر است. درصد افزایش وزن بدن، SGR همچنین زنده‌مانی از گروه شاهد به گروه تغذیه‌شده با سطح ۷۵۰ mg/kg افزایش یافت سپس، در تیمار ۱۵۰۰ mg/kg کاهش یافت. در این زمینه می‌توان گفت که سلامتی ماهی تغذیه‌شده با مقادیر بیش از حد یا ناکافی مواد مغذی خاص کاهش

خواهد یافت. محققان مختلف عملکرد مناسب ویتامین C را در رشد و زنده‌مانی ماهیان مختلف گزارش کردند: (Ovissipour et al., 2006) تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)، (Xiao et al., 2010) ماهی کوبیا (*Rachycentron canadum*)، (*Takifugu rubripes*) (Eo and Lee, 2008)، (Kumari and Sahoo, 2005) گربه‌ماهی آسیایی جوان (*Clarias batrachus*)، (Ai et al., 2014) (*Lateolabrax japonicus*)، (Kolkovski et al., 2000) اردک‌ماهی آب شیرین (*Stizostedion vitreum*)، (Navarre and Halvar, 1989) ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان جوان (*Oncorhynchus mykiss*). نتایج این مطالعات نشان می‌دهد که ویتامین C درصد زنده‌مانی را افزایش می‌دهد و در برخی گونه‌ها سبب بهبود رشد می‌شود. Sandes, (1991) اظهار داشت حضور این ویتامین در جیرهٔ غذایی به منظور حفظ سلامت و عملکرد فیزیولوژیک و بهبود رشد ماهی ضروری است (Falahatkar et al., 2005). بر این اساس، این احتمال وجود دارد که افزایش غلظت ویتامین C، ROS تولیدشده در فرایند هضم را، که ممکن است از جذب مواد غذایی جلوگیری کند، مهار می‌کند؛ بنابراین رشد را بهبود می‌بخشد (Brown and Lavens, 2001). عامل تنظیم‌کنندهٔ نیاز ویتامین C نرخ متابولیک است و این عامل در سنین پایین‌تر بیش‌تر است (Dabrowski, 2001). بنابراین به نظر می‌رسد نیاز به این ویتامین در مراحل اولیه بیش‌تر باشد (Kolkovski et al., 2000). همچنین دلیل تفاوت در بین گونه‌های مختلف می‌تواند ترکیب غذا، شرایط پرورش و وضعیت تغذیه‌ای متفاوت باشد. بنابراین نیاز بالای بچه‌ماهی آزاد خزر می‌تواند بدین وسیله توجیه‌پذیر باشد. تخمین نیازمندی گونه‌های مختلف بر پایهٔ فاکتورهای گوناگونی از جمله WG، حداکثر ذخیره در بدن و نبود علائم کمبود در بدن صورت می‌پذیرد که در این مطالعه به منظور تأمین نیازمندی بچه‌ماهی نورس آزاد دریای خزر به ویتامین C، بر مبنای درصد افزایش وزن بدن، سطح ۵۶۹/۱ mg/Kg سطح مناسبی تلقی می‌شود.

ترکیب بدن همواره تحت تأثیر ترکیب جیره و حتی درصد و مقدار غذادهی روزانه است. ویتامین‌ها نیز با اثر در سیستم متابولیسم بدن می‌توانند در ترکیب لاشه مؤثر باشند (Falahatkar et al., 2005). در مطالعهٔ حاضر، تغییرات رطوبت، پروتئین خام و خاکستر در تیمارهای مختلف از الگوی خاصی تبعیت نمی‌کند و نبود اختلاف معنی‌دار در این پارامترها با نتایج مطالعات انجام‌شده در این زمینه هم‌خوانی دارد (Bae et al., Gao et al., 2014; Xiao et al., 2010; 2012;). اثر ویتامین C در ترکیب بدن ماهیان *Paralichthys olivaceus*، *Anguilla japonica* و *Rachycentron canadum* را بررسی کردند و هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری را مشاهده نکردند. Chen et al. (2004) بیان کردند سطح ۹۸ mg/kg ویتامین C سبب افزایش مادهٔ خشک نسبت به سطوح پایین‌تر این ویتامین در بدن ماهی *Notemigonus crysoleucas* شده است. میزان چربی کل در تیمار ۷۵۰ mg/Kg نسبت به گروه شاهد افزایش یافت، ولی اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. به نظر می‌رسد افزایش مقدار چربی به دلیل متابولیسم بالا طی عملکرد در سنتز چربی باشد (Falahatkar et al., 2005). این نتیجه با نتیجهٔ تحقیق Falahatkar et al, (2005) دربارهٔ فیل‌ماهی مطابقت دارد.

نتایج این تحقیق نشان داد آنزیم‌های SOD و کاتالاز متناسب با افزایش سطح ویتامین C روند کاهشی نشان دادند و مقدار بیشینهٔ این آنزیم‌ها در تیمار شاهد مشاهده شد. در زمینهٔ تأثیر ویتامین C در فعالیت آنزیم‌های SOD و کاتالاز تحقیق مرتبطی یافت نشد، ولی در زمینهٔ تأثیر آنتی‌اکسیدان‌های جیرهٔ غذایی در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مطالعاتی صورت گرفته است. Puangkaew et al. (2005) با بررسی اثر برهمکنش ویتامین E و HUFA در دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم SOD را در کلیه و آنزیم کاتالاز در بافت کبد را در ارتباط با افزایش سطح ویتامین E گزارش کرد.

در بررسی اثر ویتامین E جیره در دفاع آنتی‌اکسیدانی سه گونهٔ Turbot و Halibut و شانک (Tocher et al., 2002) ثابت شد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت کبد به طور معنی‌داری تحت تأثیر مقادیر مختلف این ویتامین است؛ بدین صورت که فعالیت آنزیم کاتالاز در هر سه گونه با افزایش سطح ویتامین E کاهش یافت، اما دربارهٔ آنزیم SOD کاهش فعالیت فقط در گونهٔ شانک صادق بود. مطالعهٔ فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD و کاتالاز ماهی شانک سر طلایی پس از ۳۰ روز تغذیه با جیرهٔ غذایی حاوی آنتی‌اکسیدان اختلاف معنی‌داری در بین تیمارها نشان نداد (Mourente et al., 2000). آنزیم SOD رادیکال آنیون سوپراکسید را به مولکول اکسیژن و H_2O_2 تبدیل می‌کند که کاهش در تولید و دسترسی نداشتن به سوبسترای آنیون سوپراکسید در حضور ویتامین C می‌تواند دلیل کاهش فعالیت آنزیم SOD در سطوح بالای ویتامین باشد. آنزیم کاتالاز رادیکال H_2O_2 حاصل از عمل آنزیم SOD و سایر فرایندهای فیزیولوژیک را مهار می‌کند. از این رو فعالیت بالای آن در گروه شاهد می‌تواند بیانگر حضور مقادیر بالای H_2O_2 در بدن باشد (Puangkaew et al., 2005). مادامی که مواد آنتی‌اکسیدانی مانند ویتامین C و E در سطوح مناسب در بدن موجود باشند در واکنش با ROS، به‌ویژه آنیون سوپراکسید و هیدروژن پرکسید، وارد عمل شده و با مهار آن‌ها سبب قطع واکنش‌های زنجیره‌ای تولید رادیکال‌های آزاد می‌شوند. بنابراین در حضور این مواد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی فعالیت کم‌تری نشان می‌دهند (Puangkaew et al., 2005; Dabrowski, 2001).

با توجه به نتایج این تحقیق، به منظور دست‌یابی به افزایش رشد و حفظ شرایط مطلوب فیزیولوژیک بچه‌ماهیان نورس آزاد دریای خزر سطح ۷۵۰ mg/kg ویتامین C به‌منزلهٔ سطح بهینه در جیرهٔ غذایی پیشنهاد می‌شود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از مدیریت کارخانهٔ تولید خوراک ارس‌بازار آمل و کارکنان آزمایشگاه دانشکدهٔ علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس به دلیل همکاری صمیمانهٔ ایشان تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

References

[1]. Ai, Q., Mai, K., Zhang, C., Xu, W., Duan, Q., Tan, B., and Liufu, Z., 2004. Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese seabass. Aquaculture 242, 489-500.

[2]. AOAC., 2005 Official Method Of Analysis 17th (end), Washington. DC. Association of Official Analytical Chemists.

[3]. Bae, J.-young, Park, G.-hyun, Yoo, K.-yeol, Lee, J.-yeol, Kim, D.-jung, and Bai, S. C., 2012. Re-evaluation of the Optimum Dietary Vitamin C Requirement in Juvenile Eel *Anguilla japonica* by Using L-ascorbyl-2-monophosphate. Aquaculture 25,1, 98 - 103.

[4]. Bendich, A., Machlin, L.J and Scandurra, O., 1986. The role antioxidant of vitamin C. Free Radical Biology and Medicine 2, 419-444.

[5]. Brown, M., Lavens, P., 2001. Critical review of the concentration, interactions with other nutrients, and transfer of ascorbic acid in algae, crustaceans and fish. In: Dabrowski, K. (Ed.), Ascorbic Acid in Aquatic Organisms, Status and Perspectives. CRC Press, Boca Raton, pp. 167–189.

[6]. Chen, R., Lochmann, R., Goodwin, A., Praveen, K., Dabrowski, K., and Lee, K.-jun. 2004. Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonuscrysoleucas*). Aquaculture 242, 553 - 569.

[7]. Dabrowski,K., 2001.Ascorbic Acid in Aquatic Organisms—Status and Perspectives. CRC Press, Boca Raton, 255– 277.

[8]. Eo, J., and Lee, K.-jun. 2008. Effect of dietary ascorbic acid on growth and non-specific immune responses of tiger puffer ,*Takifugu rubripes*. Fish and Shellfish Immunology 25, 5, 611-616.

[9]. Falahatkar, B. 2005. Effect of vitamin C on hematological, biochemical and growth parameters in gient sturgeon *Huso huso*. PhD thesis. Marine Sciences Faculty of Tarbiat Modares University, 84 p. (in persian).

[10]. Gao, J., Koshio, Sh., Ishikawa, M., Yokoyama, S and Mamauag, R., 2014. Interactive effects of vitamin C and E supplementation on growth performance, fatty acid composition and reduction of oxidative stress in juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* fed dietary oxidized fish oil. Aquaculture 84-90

[11]. Halliwell B, Gutteridge JMC., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview.Meth Enzymol186.1-85.

[12]. Halver, J and Hardy, R., 1989. Fish Nutrition. 3rd edition, Elsevier Science Publisher, California: P. 824.

[13]. Hampton MB, KettleAJ, Winterbourn CC., 1998.Inside the neutrophil phagosome:oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. Blood 27,186–92.

[14]. Hamza, N., Mhetli, M., Ben Khemis, I., Cahu, C and Kestemont P. 2008. Effect of dietary phospholipd levels on performance, enzyme activities and fatty acid composition of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. Aquaculture 275, 274-282.

[15]. Hilton, J. W., Brown, R. G., Slinger, S. J., 1978. Effect of graded level of ascorbic acid in practical diet fed to raibow trout (*Salmo gairderi*). Comparative Biochemistry and Physiology 62, 427-432.

[16]. Izquierdo, M., Liu, J., Caballero, M. J., Ali, T.E.S., Hernandez-cruz, C.M., Valencia, A and Fernandez-palacios, H. 2002. Necessity of dietary lecithin and eicosapentaenoic acid for growth, survival, stress resistance and lipoprotein formation in gilthead sea bream *Sparus aurata*. Fish. Science 68, 1165-1172.

[17]. Kolkovski, S., Czesny, S., Yackey, C., Moreau, R., Cihla, F., Mahan, D and Dabrowski, K., 2000. The effect of vitamins C and E in (n-3) highly unsaturated fatty acids-enriched Artemia nauplii on growth , survival , and stress resistance of fresh water walleye *Stizostedion vitreum* larvae. Aquaculture Nutrition 6, 199-206.

[18]. Kumari, J. and Sahoo, P. K., 2005. High dietary vitamin C affects growth, non-specific immune responses and disease resistance in Asian catfish, *Clarias batrachus*. Molecular and Cellular Biochemistry 280, 25–33.

[19]. Machlin, L.J and Bendich, A., 1987. Food radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrient. Federation of American societies for experimental biology 1, 441-445.

[20]. Mourente, G., and Ciencias, F. D., 2000. Effects of dietary polyunsaturated fatty acid / vitamin E (PUFA / tocopherol ratio on antioxidant defence mechanisms of juvenile gilthead sea bream *Sparus aurata L*. Fish Physiology and Biochemistry 23, 337-351.

[21]. Mourente, G., Bell, J. G., and Tocher, D. R., 2007. Does dietary tocopherol level affect fatty acid metabolism in fish? Fish Physiology and Biochemistry 33, 269-280.

[22]. Martinez- Alvarez, R M., Morales, A E and Sanz, A., 2005. Antioxidant defenses in fish : Biotic and abiotic factors. Reviews in Fish Biology and Fisheries 15, 75-88.

[23]. Moreau, R and Dobrowsky, K., 2000. Biosynthesis of ascorbic acid by extant actinopterygians. Fish Biology 57, 733-745.

[24]. Navarre, O and Halver, J. E., 1989. Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. Aquaculture 79, 207-221.

[25]. Nelis, H. J., De Leenheer, A. P., 1997. Liquid chromatographic determination of vitamin C in aquatic organism. Choromatographic Science 35, 337-341.

[26]. Ovissipour, M. R. 2006. Daphnia enrichment by fish oil and vitamin C and its performance on growth, survival and body composition of Persian sturgeon *Acipencer persicus*. M.Sc thesis. Marine Sciences faculty of Tarbiat Modares University, 38 p. (in persian).

[27]. Park, J. B and Levine, M., 1996. Purification, cloning, and expression of dehydroascorbic acid reduction activity from human neutrophils: Identification as glutaredoxin. Biochemistry 315, 931-8.

[28]. Piedecausa, M. A., Mazon, M.J., Garcia, B.G and Hernandez, M.D.2007. Effect of total replacement of fish oil by vegetable oils in the diets of sharpsnout seabream (*Diaplodus puntazzo*). Aquaculture 263, 211-219.

[29]. Puangkaew, J., Kiron V., Satoh S., and Watanabe T., 2005. Antioxidant defense of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to dietary n-3 highly unsaturated fatty acids and vitamin E contents. Comparative Biochemistry and Physiology 140, 187 - 196.

[30]. Ramezani, H., 2009. Effect of different protein and energy levels on growth performance of Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877). Fisheries and aquatic sciencs 4, 203-209.

[31]. Tewary, A., and Patra, B. C., 2008. Use of vitamin C as an immunostimulant. Effect on growth, nutritional quality, and immune response of *Labeo rohita* (Ham.). Fish physiology and biochemistry 34, 251-9.

[32]. Tocher, D. R., Mourente, G., Eecken, A. V., Evjemo J. O., Diaz, E., Bell, J. G., Geurden., Lavens, P and Olsen, Y., 2002. Effects of dietary vitamin E on antioxidant defence mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L), halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.). Aquaculture Nutrition 8, 195-207.

[33]. Verlhac, V and Gabaudan, J., 1999. The effect of vitamin C on fish health. Centre for Research in Animal Nutrition, Société Chimique Roche, BP 170, 68305 Saint-Louis Cedex, France: 33 p.

[34]. Worthington Enzyme Manual., 1993. Superoxide Dismutase. Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ, 368–369 p.

[35]. Witerbourn,C., Hawkins R.E., Brian M. and Correll R.W., 1975. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. Laboratory and Clinical Medicine 85, 337–341.

[36]. Xiao, L. D., Mai, K. S., Ai, Q. H., Xu, W., Wang, X. J., Zhang, W. B and Liufu, Z. G., 2010. Dietary ascorbic acid requirement of cobia, *Rachycentron canadum* Linneaus. Aquaculture Nutrition 16, 582-589.