

تولید و غنی سازی لارو شیرونومیده با سطوح مختلف ویتامین C و تاثیر آن بر تغذیه لاروی تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)

علی حمید اوغلی^۱، بهرام فلاحتکار*^۲، مجید رضا خوش خلق^۱، احد صحراگرد^۲

۱- دانشگاه گیلان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، صومعه سرا، ایران، صندوق پستی: ۱۱۴۴

۲- دانشگاه گیلان، دانشکده کشاورزی، گروه گیاه پزشکی، رشت، ایران، صندوق پستی: ۴۱۶۳۵-۳۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۳ مهر ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۵ تیر ۱۳۹۲

چکیده

لاروهای خانواده شیرونومید (با نام تجاری کرم خونی) یکی از اقلام غذایی با ارزش برای بسیاری از ماهی‌ها به شمار می‌روند. در تحقیق حاضر، تولید لاروهای شیرونومید در محیط کاملاً بسته، با کنترل شرایط فیزیکیوشیمیایی انجام شد. میزان تولید در هر متر مربع به طور میانگین 80 ± 10 گرم برآورد شد. غنی‌سازی لاروها با اضافه کردن مقادیر صفر (C_0)، 100 (C_{100}) و 1000 (C_{1000}) میلی‌گرم ویتامین C (اسید اسکوربیک) در هر کیلوگرم از کود مرغی (به عنوان بستر پرورش) انجام شد. اندازه‌گیری میزان اسید اسکوربیک در لاروهای شیرونومید، مقادیر $0.74/2 \pm 15/4 \mu\text{g/g}$ ، $325/0 \pm 116/6 \mu\text{g/g}$ و $779/8 \pm 81/3 \mu\text{g/g}$ را به ترتیب در تیمارهای C_0 ، C_{100} و C_{1000} با اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها نشان داد ($P < 0/05$). در مرحله بعد، شیرونومیدهای غنی‌سازی شده و دافنی‌زنده (D) برای تغذیه لاروهای تاسماهی ایرانی با وزن ابتدایی $0.3 \pm 0/03$ گ مورد استفاده قرار گرفته و مقایسه شدند. تعداد ۲۰ قطعه لارو تاسماهی ایرانی در تانک‌های پلاستیکی ۱۰ لیتری به مدت ۱۴ روز تغذیه شدند. اندازه‌گیری طول و وزن لاروهای تاسماهی ایرانی، اختلاف معنی‌داری را در فاکتورهای رشد نشان نداد ($P > 0/05$). ولی میزان بازده تبدیل غذایی در گروه C_{1000} به طور معنی‌داری از گروه D بیشتر بود ($P < 0/05$). در نهایت می‌توان از لاروهای شیرونومید به عنوان یک غذای زنده با قابلیت غنی‌سازی نام برد و عنوان نمود که استفاده از ویتامین C برای غنی‌سازی این موجودات می‌تواند نیازهای ماهیان به این ماده مغذی را برطرف کند.

کلمات کلیدی: پرورش لاروی، کرم خونی، اسید اسکوربیک، ماهی‌خواری.

* عهده دار مکاتبات (✉). falahatkar@guilan.ac.ir

مقدمه

ماهیان خاویاری (Acipenseriformes) از قدیمی‌ترین اعضای رده ماهیان استخوانی (Osteichthyes) می‌باشند و به علت تولید گوشت و خاویار از مهم‌ترین ماهیان تجاری جهان محسوب می‌شوند (Webb and Doroshov, 2011). چرخه تولید مثلی نسبتاً طولانی، مهاجرت‌های طولانی و نیاز به آب شیرین برای تولید مثل، این موجودات را نسبت به تاثیرات منفی فعالیت‌های انسانی آسیب پذیر کرده است (Billard and Lecointre, 2000). بر اساس گزارش اتحادیه بین‌المللی حفاظت محیط زیست (IUCN) ۸۶٪ ماهیان خاویاری از جمله تاسماهی ایرانی در لیست قرمز (در معرض انقراض) جای دارند. شیلات ایران، هر ساله میلیون‌ها بچه ماهی خاویاری در استخرهای خاکی پرورش داده و پس از رسیدن به وزن متوسط ۲-۳ گرم جهت بازسازی ذخایر به رودخانه‌های منتهی به دریای خزر رهاسازی می‌کند تا شاید گام موثری به منظور جبران و رفع این مشکل برداشته شود.

یکی از سخت‌ترین مراحل تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری، فاز پرورش لاروی این ماهیان می‌باشد (LeBreton *et al.*, 2005). در شرایط پرورشی، بعد از تفریخ تخم‌ها و بعد از این که لاروها ذخایر کیسه زرده را به اتمام رساندند، بازماندگی آن‌ها به چندین فاکتور از جمله غذای مصرفی، شرایط نگهداری و مدیریت تفریخگاه بستگی دارد (Conte *et al.*, 1988). آزمایشات مختلف در خصوص تغذیه لاروی ماهیان خاویاری بعد از جذب کیسه زرده توسط غذاهای فرموله شده، اغلب منجر به ایجاد تلفات بالا شده است (Ware *et al.*, 2006; Mohler *et al.*, 2012; Ronyai and Feledi, 2012). بنابراین، به دلیل عدم وجود

غذای دستی مناسب برای تغذیه مراحل لاروی تاسماهی ایرانی، پرورش این ماهی با ارزش در مراحل ابتدایی زندگی وابسته به غذای زنده می‌باشد.

لارو شیرونومید (کرم خونی)، یکی از غذاهای زنده شناخته شده در اکثر کشورها می‌باشد و در اغلب اکوسیستم‌های آب شور و شیرین گسترش دارد. این موجودات پتاسیل‌بالایی در تولید مثل دارند که آن‌ها را قادر می‌سازد در هر چرخه تولید مثلی حدود ۲۰۰۰ تخم تولید کنند (Armitage, 1995). ارزش غذایی بالای لاروهای شیرونومید شامل مقادیر بالای پروتئین (حدود ۵۵٪ در وزن خشک) و حضور اسیدهای آمینه ضروری (Bogut *et al.*, 2007)، آن‌ها را به غذای زنده‌ای مناسب برای اغلب ماهیان به خصوص ماهیان خاویاری مبدل ساخته است (Volkman, *et al.*, 2004). با وجود این موضوع، غذاهای زنده همیشه تمامی مواد غذایی مورد نیاز لارو ماهیان را تامین نمی‌کنند و به منظور جبران این کاستی‌ها، آن‌ها نیاز به غنی‌سازی توسط انواع مواد غذایی دارند. فرایند غنی‌سازی به منظور امکان رقابت غذاهای زنده با غذاهای فرموله شده و کسب رشد و بازماندگی بیشتر لارو ماهیان صورت می‌پذیرد (Moren *et al.*, 2011).

ویتامین C یا اسید اسکوربیک، جزء ویتامین‌های قابل حل در آب می‌باشد که در فعالیت‌های دفع مسمومیت و واکنش‌های متابولسمی موجودات آبرزی نقش بسزایی ایفا می‌کند (Norrgrén *et al.*, 2001). در تحقیقات مختلف توجه بسیاری به این ویتامین، به دلیل نقش بسزای آن در بیوسنتز کارنیتین، شبکه‌های عصبی و کلاژن شده است (Kraus *et al.*, 2004). اسید اسکوربیک همچنین در متابولسم مواد معدنی (Sandnes, 1991)، پاسخ به واکنش‌های استرسی

ارتفاع ۲ متر قرار داشت که دارای دو پنجره به منظور تامین نور طبیعی بود. بستر حوضچه توسط کود مرغی الک شده (تهیه شده از مرغداری) به میزان ۲ کیلوگرم پوشانده شد و توسط آب شهر کلرزدایی شده تا عمق ۲۰ سانتی متر و به میزان ۱۴۰ لیتر آبگیری شد. حوضچه ذخیره سازی توسط پمپ هوای متصل به یک سنگ هوا، هوادهی می‌شد و دمای آب توسط بخاری آکواریوم ترموستات دار به میزان $25 \pm 1/5^{\circ}\text{C}$ تنظیم شد. فضای مناسب موجود در اتاقک به بالغین نر و ماده این اجازه را می‌داد که پرواز جفت‌گیری خود را به طور کامل انجام دهند. بعد از جفت‌گیری، پشه‌های نر مرده و پشه‌های ماده روی حاشیه‌های ذخیره سازی تخم‌ریزی کردند. توده‌های تخمی توسط پشه‌ها به نحوی به دیواره حوضچه چسبانده شدند که نیمی از بخش ژلاتینی داخل آب قرار داشت و جداسازی تخم‌ها به آسانی توسط پنس از دیواره حوضچه امکان پذیر بود.

پرورش لاروهای شیرونومید زمانی آغاز شد که تخم‌های جدا شده به تشتک‌های پلاستیکی مدور (۶ عدد) که دارای ۴۱ سانتی‌متر قطر و ۱۵ سانتی‌متر عمق بودند، منتقل شدند. قابل ذکر است که همه تشتک‌ها به رنگ سفید بودند. تشتک‌ها توسط آب شهری کلرزدایی شده، تا عمق ۱۰ سانتی‌متر پر شدند به طوری که هر تشتک ۱۳/۲ لیتر آب را در خود جای داد. برای کنترل دمایی آب تشتک‌ها از دماسنج جیوه‌ای استفاده شد و دمای آب آن‌ها توسط بخاری آکواریوم ترموستات‌دار (JBL, Ludwigshafen, Germany) در $25 \pm 2/5^{\circ}\text{C}$ تنظیم شد. همچنین رژیم نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی برای پرورش لاروهای شیرونومیده در نظر گرفته شد. هوادهی به منظور تولید

(Ren et al., 2010)، ایمنی بدن (Waagbø, 2006) و ترمیم زخم‌ها (Wahli et al., 2003) نقش بسزایی را ایفا می‌کند. با توجه به موارد ذکر شده در رابطه مزایای اسید اسکوربیک برای سلامت و بقای موجودات آبی، مقادیر مناسب و کافی از این ویتامین می‌بایست در جیره این موجودات در نظر گرفته شود (Pitaksong, 2013). در شرایط اسارت و در تفریخگاه‌های پرورش لاروی ماهیان، به دلیل مناسب نبودن شرایط زیستی و وجود عوامل استرس‌زا، برای به دست آوردن رشد مناسب و سلامت، مقادیر بیشتر اسید اسکوربیک در جیره ماهیان مورد نیاز است. از طرفی با توجه به این که خانواده شیرونومید جزو رده حشرات می‌باشد، این موجودات دارای مقادیر ناچیزی از اسید اسکوربیک در بدن خود می‌باشند (Banjjo et al., 2006). بنابراین هدف این تحقیق بررسی امکان غنی سازی لاروهای شیرونومید توسط اسید اسکوربیک به منظور ارتقای ارزش غذایی این غذای زنده و مقایسه آن با دافنی به عنوان غذای زنده معمول مورد استفاده در تغذیه لاروی تاسماهی ایرانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه زنده لارو، تخم و سفیره شیرونومیده از یک استخر پرورش ماهی واقع در دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان (صومعه‌سرا، گیلان) به همراه مقداری از بستر محل (به میزان ۱ کیلوگرم)، توسط ساچوک جمع آوری و به کارگاه پرورش ماهی دانشکده منابع طبیعی منتقل شد. نمونه جمع آوری شده به داخل حوضچه‌ای مستطیلی شکل (به ابعاد $120 \times 60 \times 40$ سانتی متر) به عنوان حوضچه ذخیره‌سازی انتقال یافت. حوضچه ذخیره‌سازی در یک اتاقک به مساحت ۴ مترمربع با

همراه لاروهای نقب زده صید شده و به سطح آب آورده شدند. رسوبات جمع آوری شده به آرامی در آب تکان داده شدند تا مواد پوسیده شسته شده و لاروهای شیرونومید در داخل توری باقی بمانند.

کل بیومس برداشت شده از هر تشتک به یک کاغذ صافی منتقل شد و توسط ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ میلی گرم وزن شد. میانگین نرخ رشد (AGR) و بیومس تولید شده در متر مربع (B) توسط فرمول‌های زیر محاسبه شدند:

$$AGR \text{ (mg/day)} = T / W$$

$$B \text{ (g/m}^2\text{)} = S / TB$$

W = وزن مرطوب کل (گرم)، T = طول مدت پرورش (روز)، TB = بیومس کل (گرم)، S = سطح مقطع تشتک (سانتی متر مربع)

علاوه بر این، به طور تصادفی ۲۵ عدد لارو از هر تکرار برای اندازه گیری طول و وزن با دقت ۰/۰۰۱ به آزمایشگاه منتقل شدند. حدود ۲ گرم لارو نیز برای انجام آنالیزهای ویتامین C به فریزر 80°C منتقل شدند.

نمونه‌های لاروی توسط تانک ازت به مرکز تحقیقات مرکبات کشور (رامسر، مازندران)، برای سنجش ویتامین C منتقل شدند. در این تحقیق از روش آنالیز DNPH (دی نیترو فیل هیدرازین) بر گرفته از Dabrowski و Hinterleitner (۱۹۸۹) برای بررسی میزان ویتامین C در بدن لاروهای شیرونومید استفاده شد. منحنی استانداردها در طول موج ۵۲۴ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شده و رسم گردید (شکل ۱).

این بخش از تحقیق در مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر شادروان دکتر یوسف پور سیاهکل (سیاهکل، گیلان) انجام شد.

کارآمد و برطرف کردن نیاز اکسیژنی لاروها به صورت مداوم برای هر تشتک توسط سنگ هوای متصل به پمپ صورت می گرفت. برای تغذیه و رشد لاروها از کود مرغی الک شده (با اندازه چشمه ۱ میلی متر) به میزان ۹۰ گرم برای هر تشتک (۶۸۷ g) به ازای هر متر مربع) استفاده شد. تعداد ۱۰ توده تخمی به هر کدام از تشتک‌ها اضافه شد و میزان pH آب به طور روزانه بررسی می شد. شرایط پرورشی محیا شده در این تحقیق در جدول ۱ آورده شده است.

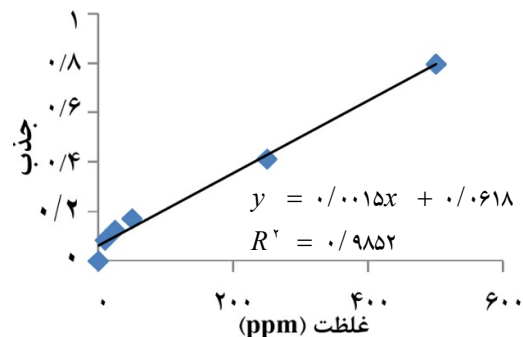
جدول ۱: شرایط فیزیکی و شیمیایی مهیا شده برای

پرورش لارو شیرونومید

عامل	میانگین \pm SE
pH آب	$6/8 \pm 0/9$
دمای آب ($^{\circ}\text{C}$)	$25 \pm 2/5$
دمای هوا ($^{\circ}\text{C}$)	$24 \pm 2/4$
رژیم نوری	۱۲ L:۱۲D
شدت نور (lux)	$700/6 \pm 100$

در این تحقیق از فرم پایدار اسید اسکوربیک (ال-آسکوربیل-۲-پلی فسفات) با نام تجاری stay-C برای غنی سازی بستر استفاده شد (Basel, Roche, Switzerland). مقادیر مختلف شامل صفر (C_0)، ۱۰۰ (C_{100}) و ۱۰۰۰ (C_{1000}) میلی گرم اسید اسکوربیک به صورت خشک به هر کیلوگرم کود مرغی اضافه، به خوبی مخلوط شده و به تشتک‌ها منتقل شد. برداشت زمانی انجام شد که لاروها بیشترین رشد خود را به دست آورده و طولی برابر با ۱-۱/۵ سانتی متر داشتند. در شرایط مهیا شده در این تحقیق و دمای 25°C ، حدود ۱۸ روز نیاز بود که لاروها رشد کامل خود را به دست بیاورند. با استفاده از یک ساچوک با اندازه چشمه ۲ میلی متر کود مرغی موجود در تشتک‌ها به

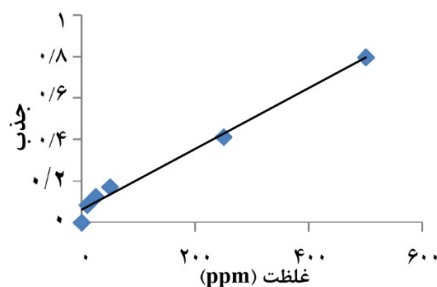
شرایط پرورشی مهیا شده برای لاروها در جدول ۲ آورده شده است. عملیات تغذیه زمانی آغاز شد که لاروهای تاسماهی ایرانی حدود $34/7 \pm 30/1$ میلی-گرم وزن داشتند. شیرونومیدهای غنی سازی شده با مقادیر مختلف اسید اسکوریک شامل تیمارهای ذکر شده C_0 ، C_{100} و C_{1000} و همچنین دافنی زنده (D) صید شده از استخر هر کدام در ۳ تکرار به بچه ماهیان خاویاری خورانده شدند. شایان ذکر است که در این آزمایش از طرحی کاملاً تصادفی استفاده شد.



شکل ۱: منحنی استاندارد اسید اسکوریک در طول موج ۵۲۴ نانومتر. روی نمودار معادله خط (y) و شیب (R^2) بر روی نمودار نشان داده شده است.

جدول ۲: شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی پرورش لارو تاسماهی

عامل	میزان
اکسیژن محلول (mg/l)	$7/4 \pm 0/2$
دبی (ml/min)	$197/5 \pm 31/4$
دما ($^{\circ}C$)	$25 \pm 2/3$
pH	$7/2 \pm 0/9$
دوره نوری	۱۲D:۱۲L



لاروهای تازه هیچ شده تاسماهی ایرانی حدود ۱۰ روز از کیسه زرده به عنوان منبع غذایی استفاده کردند. پس از شروع تغذیه فعال، لاروها به مدت ۵ روز توسط ناپلی آرتمیا و ۵ روز توسط زئوپلاتکتون‌هایی (انواع کوپه‌پدا و کلادوسرها) به اندازه ۴۰۰-۵۰۰ میکرون تغذیه شدند. پس از گذشت این مدت لاروها به تانک‌های پلاستیکی مدور با مساحت ۱۲۵۶ سانتی متر مربع منتقل شدند. تانک‌ها به میزان ۱۰ لیتر آب گیری شده و ۲۰ عدد ماهی برای هر تانک در نظر گرفته شد (۰/۵ لیتر حجم به ازای هر ماهی). لاروها به مدت ۷ روز در این شرایط توسط دافنی تغذیه شده تا با شرایط جدید سازگار شوند. آب مورد نیاز برای این آزمایش از رودخانه گرفته شد و سیستم به صورت جریان غیر چرخشی برای تمامی تانک‌ها در طول دوره پرورش در نظر گرفته شد.

دافنی‌های زنده و لاروهای شیرونومیدی که در مرحله قبلی در دمای $8^{\circ}C$ - درجه سانتی گراد نگهداری شده بودند، ۶ مرتبه در روز (ساعات ۸:۳۰، ۱۱:۳۰، ۱۴:۳۰، ۱۷:۳۰، ۲۰:۳۰ و ۲۳:۳۰) و به میزان اشتها به ماهیان خورانده شدند. غذای اضافی و مدفوع ماهیان هر روز قبل از اولین وعده غذایی توسط سیفون کردن از تانک‌ها خارج می‌شد. بعد از گذشت هفت روز تمامی بچه ماهیان توسط ترازوی دیجیتال با دقت $0/01$ گرم توزین و به تانک‌ها باز گردانده شدند. در انتهای دوره ۱۴ روزه نیز تمامی ماهیان موجود در تانک‌ها صید شده و طول و وزن آن‌ها اندازه گیری شد. از هر تیمار ۲ عدد بچه ماهی برای تعیین مقدار اسید

داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه (One - Way ANOVA) و تست Tukey به عنوان Post Hoc، جهت مقایسه میانگین‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. اختلاف بین میانگین‌ها در کلیه موارد در تیمارهای مختلف با سطح اطمینان $P < 0/05$ تعیین شد. تجزیه و تحلیل کلیه عملیات مربوطه بوسیله نرم افزار SPSS انجام پذیرفت (SPSS 17.0, Chicago, IL).

نتایج

بعد از گذشت ۱۸ روز لاروهای شیرونومید به بالاترین حد رشد خود رسیده و وزن و طول مناسب برای برداشت را به دست آوردند. میانگین بیومس نهایی لاروهای شیرونومید در تانک‌ها $0/04 \pm 10/06$ گرم برای تیمار C_0 ، $0/39 \pm 9/72$ گرم برای تیمار C_{100} و $0/31 \pm 10/22$ گرم برای تیمار C_{1000} به دست آمد، که البته گروه‌ها اختلاف معنی داری نداشتند ($P < 0/05$). همچنین میانگین طول و وزن هر لارو به ترتیب در تیمارهای C_0 $10/22 \pm 0/45$ میلی‌متر و $2/64 \pm 0/07$ میلی‌گرم، C_{100} $9/56 \pm 0/24$ میلی‌متر و $2/61 \pm 1/01$ میلی‌گرم، و C_{1000} $10/54 \pm 0/14$ میلی‌متر و $2/72 \pm 0/03$ میلی‌گرم بدون اختلاف معنی دار ($P > 0/05$) اندازه‌گیری شدند. مقایسه میانگین نرخ رشد (AGR) مقادیر بالاتری را در گروه C_{1000} نسبت به گروه‌های دیگر نشان داد، هر چند که این اختلاف معنی دار نبود ($P > 0/05$ جدول ۳).

میزان اسید اسکوریک گروه C_{1000} (غنی شده توسط 1000 mg/kg اسید اسکوریک) $11/31 \pm 779/86$ محاسبه شد که این مقدار از گروه‌های C_0 (تیمار کنترل) و C_{100} (غنی شده توسط 100 mg/kg اسید اسکوریک) به ترتیب با میزان اسید اسکوریک $15/45 \pm 74/2$ و $116/61 \pm 325/03$ به طور معنی داری بیشتر بود (شکل ۲؛ $P < 0/05$). این در حالی

اسکوریک موجود در امعاء و احشاء جدا و در فریزر 80°C - نگهداری شدند.

جهت اندازه‌گیری پارامترهای رشد از روابط افزایش وزن (WG)، میانگین نرخ رشد برای طول (AGR_L) و وزن (AGR_W)، نرخ رشد ویژه برای طول (SGR_L) و وزن (SGR_W)، درصد افزایش وزن بدن (BWI)، بازده تبدیل غذایی (FCE) و فاکتور وضعیت (CF) استفاده شد (Volkman, et al., 2004).

$$WG (g) = W_t - W_i$$

$$AGR_L (mm/d) = \frac{L_t - L_i}{T}$$

$$AGR_W (g/d) = \frac{WG}{T}$$

$$SGR_L (\%/d) = 100 \times \frac{\log L_t - \log L_i}{T}$$

$$SGR_W (\%/d) = 100 \times \frac{\log W_t - \log W_i}{T}$$

$$BWI(\%) = 100 \times \frac{WG}{W_i}$$

$$FCE(\%) = 100 \times \frac{WG}{F}$$

$$CF = 100 \times \frac{W_t}{L_t^3}$$

L_t = طول نهایی (میلی متر)، L_i = طول اولیه (میلی متر)،
 W_t = وزن نهایی (گرم)، W_i = وزن اولیه (گرم)،
 T = طول مدت پرورش (روز)،
 F = مقدار غذای خورده شده (گرم)

طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی (Completely Randomized Design) برنامه‌ریزی و اجرا شد. کلیه داده‌های جمع‌آوری شده در هر مرحله در نرم افزار Excel ثبت شدند. کنترل همگنی واریانس‌ها بوسیله تست Levene و نرمال بودن داده‌ها توسط Kolmogornov-Smirnov بررسی شد. سپس

است که بین گروه‌های C₀ و C₁₀₀ اختلاف معنی داری وجود نداشت (P > ۰/۰۵).

گیری شد که بعد از گذشت ۱۴ روز این مقدار برای تیمارهای C₀، C₁₀₀، C₁₀₀₀ و D به ترتیب ۰/۱ ± ۱۵/۳، ۰/۲ ± ۰/۵، ۱/۱۵ ± ۱۶/۸ و ۱/۱ ± ۱۶/۲ گرم بدون اختلاف معنی دار (P > ۰/۰۵) به دست آمد.

میانگین بیومس لاروهای تاسماهی ایرانی قبل از شروع غذادهی ۶/۱۴ گرم در مخزن نگهداری اندازه-

جدول ۳: شاخص‌های رشد لاروهای شیرونومید در هر متر مربع بستر پس از ۱۸ روز دوره پرورش با کود مرغی غنی شده با مقادیر مختلف اسید اسکوربیک.

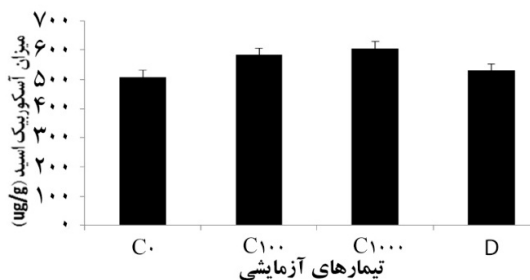
سطح اسید اسکوربیک (mg/kg)	بیومس برداشتی (g)	وزن هر لارو (mg)	طول هر لارو (mm)	AGR (mg/day)	تعداد لارو/ تانک	بیومس کل (g/m ²)
۰	۱۰/۰۶ ± ۰/۰۴	۲/۶۴ ± ۰/۰۷	۱۰/۲۲ ± ۰/۴۵	۰/۱۴۶ ± ۰/۰۴	۳۸۱۲ ± ۹۵/۷۹	۷۶/۷۹ ± ۱/۸
۱۰۰	۹/۷۲ ± ۰/۳۹	۲/۶۱ ± ۰/۰۱	۹/۵۶ ± ۰/۲۴	۰/۱۴۵ ± ۰/۰	۳۷۱۱ ± ۱۳/۵۵	۷۴/۱۹ ± ۱/۷
۱۰۰۰	۱۰/۲۲ ± ۱/۳۰	۲/۷۲ ± ۰/۰۳	۱۰/۵۴ ± ۰/۱۴	۰/۱۵۳ ± ۰/۰۰۲	۳۷۴۴ ± ۴۷۱/۱	۷۷/۹۸ ± ۲/۷۴

نتایج بر اساس میانگین ± SE شامل سه تکرار می‌باشند
بیومس برداشتی (g/m²) = بیومس کل / سطح مقطع تانک

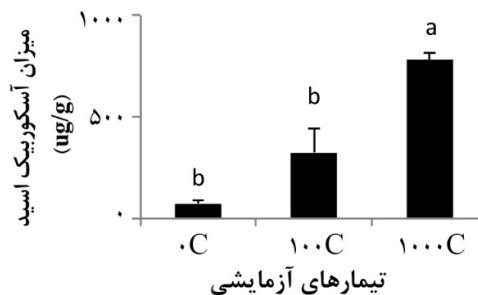
AGR (mg/day) = میزان کل وزن مرطوب / تعداد روزهای آزمایش

اختلافات در بین گروه‌های دیگر معنی دار نبود (P > ۰/۰۵).

آنالیزهای مربوط به میزان اسید اسکوربیک در امعاء و احشاء لاروهای تاسماهی ایرانی مقادیر ۷۰/۰۷ ± ۵۰۷/۰۳ μg/g در تیمار C₀، ۳۵/۷۸ μg/g در تیمار C₁₀₀، ۵۸۴/۵ ± ۵۹/۴۰ μg/g در تیمار C₁₀₀₀ و ۲۸/۴ ± ۵۲۹/۸ μg/g در تیمار D نشان دادند (شکل ۳). مقادیر به دست آمده در گروه‌های مختلف اختلاف معنی داری را نشان ندادند (P > ۰/۰۵).



شکل ۳: مقادیر اسید اسکوربیک کل (میانگین ± SE) در امعاء و احشاء لاروهای تاسماهی ایرانی (n = ۹ در هر تیمار) پس از ۱۴ روز تغذیه توسط شیرونومید غنی شده با صفر، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم (C₀، C₁₀₀ و C₁₀₀₀) اسید اسکوربیک در هر کیلوگرم از کود مرغی و گروه دافنی (D).



شکل ۲: مقادیر اسید اسکوربیک کل (میانگین ± SE) در لاروهای شیرونومید غنی شده با صفر، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم (C₀، C₁₀₀ و C₁₀₀₀) اسید اسکوربیک در هر کیلوگرم از کود مرغی. ستون‌های با حروف متفاوت اختلاف معنی داری را نشان می‌دهند (P < ۰/۰۵).

فاکتورهای رشد برای هر گروه در جدول ۴ نشان داده شده است. ماهیان تغذیه شده توسط لاروهای شیرونومید که با مقادیر بیشتری از اسید اسکوربیک غنی سازی شده بودند (C₁₀₀₀) به طور معنی داری بازده تبدیل غذایی بالاتری را نسبت به گروهی که از دافنی (D) تغذیه کرده بودند نشان دادند (P < ۰/۰۵)، ولی

بحث

طراحی شد ثبت شده است. این روش با اضافه کردن توده‌های تخمی *Chironomus dorsalis* به بستر محل پرورش (تانک‌های مدور) انجام شد که میزان تولید روزانه در مترمربع بستر ۴۰۰ گرم گزارش شد. همچنین در بین روش‌های بدون اضافه کردن توده‌های تخمی به آب، Yashouv (۱۹۷۰) با تولید $250-375 \text{ g/m}^2$ در هفته بالاترین میزان برداشت را گزارش کرده است.

نتایج مربوط به میزان برداشت و رشد لاروهای شیرونومید در تحقیق حاضر نشان دادند که با استفاده از این سیستم می‌توان تولید پایا (در طول سال) و موفقی از این موجودات را به ثمر رساند. روش‌های مختلفی برای پرورش لاروهای شیرونومید در سرتاسر دنیا استفاده شده است. بالاترین رکورد تولید لارو شیرونومید در سیستمی که توسط Konstanitinov (۱۹۵۲، ۱۹۵۴، ۱۹۵۸)

جدول ۴: پارامترهای رشد در لارو تاسماهی ایرانی تغذیه شده با لاروهای شیرونومید غنی شده با مقادیر مختلف ویتامین C به مدت ۱۴ روز. داده‌ها بر حسب میانگین (\pm SE) سه تکرار آورده شده‌اند.

تیمارهای آزمایشی				
D	C ₁₀₀₀	C ₁₀₀	C ₀	فاکتور
$1/1 \pm 1/1$	$0/53 \pm 0/05$	$0/46 \pm 0/01$	$0/45 \pm 0/01$	WG (g)
$1/4 \pm 0/1$	$1/40 \pm 0/12$	$1/3 \pm 0/12$	$1/53 \pm 0/08$	AGR _L (mm/day)
$0/7 \pm 0/1$	$0/038 \pm 0/00$	$0/033 \pm 0/00$	$0/032 \pm 0/00$	AGR _w (g/day)
$0/06 \pm 0/00$	$0/06 \pm 0/004$	$0/05 \pm 0/004$	$0/06 \pm 0/003$	SGR _L (%/day)
$0/06 \pm 0/00$	$0/07 \pm 0/004$	$0/06 \pm 0/001$	$0/06 \pm 0/000$	SGR _w (%/day)
$164/6 \pm 17/4$	$173/56 \pm 16/6$	$152/17 \pm 3/15$	$148/58 \pm 1/69$	BWI (%)
$37/9 \pm 4/1^b$	$58/55 \pm 5/6^a$	$51/33 \pm 1/06^{ab}$	$50/12 \pm 0/57^{ab}$	FCE (%)

مقادیر با حروف مختلف اختلاف معنی دار دارند ($P < 0/05$).

مترمربع، ۲۰/۷ گرم لارو در هر متر مربع برداشت کردند. این در حالی است که در تحقیق حاضر با استفاده سیستم پرورش در مکان مسقف در هر دوره ۱۸ روزه میزان ۶۸۷ گرم کود مرغی به ازای هر متر مربع استفاده شده و میزان تولید برای تیمارهای C₀، C₁₀₀ و C₁₀₀₀ به ترتیب $1/8 \pm 76/79$ ، $1/7 \pm 74/19$ و $2/74 \pm 77/98$ گرم در مترمربع محاسبه شد. این امر نشان داد که با استفاده از این روش با به کارگیری کود مرغی کمتر میزان تولید بیشتری حاصل شد. روشی دیگر که توسط صحراگرد و رفعتی فرد (۱۳۸۵) در محیط نیمه

این در حالی است که در محیط‌های طبیعی و در بهترین شرایط میزان تولید بی‌مهرگان آبرزی به کمتر از 15 g/m^2 می‌رسد (Armitage, 1977). Alston و Dendy (۱۹۷۴) لاروهای شیرونومید را در استخرهای پلاستیکی مدور با مساحت $1/25 \text{ m}^2$ پرورش دادند و به این نتیجه رسیدند که کود مرغی استفاده شده به مقدار ۲۲۴ گرم به ازای هر متر مربع از نظر اقتصادی بهترین بستر برای پرورش است که منجر به تولید لاروهای شیرونومید به میزان 17 g/m^2 شد. Shaw و Mark (۱۹۸۰) با مصرف ۲۱۳۰ گرم کود مرغی در هر

بسته گلخانه‌ای و با استفاده از ظروف آکواریومی به ابعاد $۳۵ \times ۱۶ \times ۲۵$ سانتی متر انجام شد، کود مرغی، پودر سویا و سبوس برنج با مقادیر مختلف وزنی در پرورش لاروهای *Chironomus riparius* با هم مقایسه شدند. نتایج نشان دادند که کود مرغی بهترین بستر برای پرورش شیرونومید می‌باشد و میزان تولید در مدت ۱۳ روز با اضافه کردن توده‌های تخمی در این روش حدود ۸۰ گرم در مترمربع واحد سطح محاسبه شد که این نتایج با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. نتایج به‌دست آمده نشان دهنده این موضوع است که تنها مقادیر بالای کود مرغی باعث افزایش میزان تولید نخواهد شد، بلکه سیستم استفاده شده برای پرورش نیز از اهمیت بالایی برخوردار است.

در تحقیق حاضر نتایج نشان داد که لاروهای شیرونومیدی که از مقادیر بیشتری اسید اسکوربیک در بستر آنها استفاده شده بود، به همان ترتیب میزان بیشتری از این ویتامین را در بافت خود نشان دادند. Kiyashko و همکاران (۲۰۰۴)، با بررسی اسیدهای چرب لاروهای شیرونومیده (*Stictochironomus pictulus*) توسط کروماتوگرافی گازی به این نتیجه رسیدند که اسیدهای چرب موجود در این لاروها همبستگی زیادی با بستر محل زندگی داشته و مشابه اسیدهای چرب باکتری‌های موجود در بستر می‌باشد. در نتیجه می‌توان از خصوصیت تاثیر پذیری شیرونومیدها از ترکیبات محل زندگی و بستر به منظور غنی سازی و افزایش کارایی تغذیه‌ای آنها استفاده کرد و در واقع موفقیت در غنی سازی لاروهای شیرونومید را می‌توان با توجه به ابقاء اسید اسکوربیک در بدن این موجودات اعلام کرد.

مقدار اسید اسکوربیک اندازه‌گیری شده در تیمار کنترل که غنی‌سازی نشده بود ($۷۴/۲ \mu\text{g/g}$) مسلماً جوابگوی نیازهای تغذیه‌ای ماهیان به اسید اسکوربیک نخواهد بود. بر اساس گزارش NRC (۲۰۱۱)، ذکر شده است که ماهیان گونه‌های مختلف نیازهای تغذیه‌ای متفاوتی دارند و این مقادیر بین ۵۰-۵۰۰ میلی گرم اسید اسکوربیک در هر کیلوگرم از جیره می‌باشد. به عنوان مثال، گزارش شده است که $۱۰۰ \mu\text{g/g}$ اسید اسکوربیک در جیره ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) ضروری می‌باشد (Moren, et al., 2011). هرچند که در شرایط استرس زا و محیط‌های پرورشی نامناسب، مقادیر بیشتری از اسید اسکوربیک مورد نیاز می‌باشد. میانگین اسید اسکوربیک به‌دست آمده در تیمار C_{100} ($۳۲۵/۰۳ \mu\text{g/g}$) و C_{1000} ($۷۷۹/۷۶ \mu\text{g/g}$) شاید جوابگوی نیازهای تغذیه‌ای لارو برخی از ماهیان به این ویتامین باشد.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری‌های طول و وزن لاروهای شیرونومید نشان می‌دهد که این میانگین در تیمار C_{1000} با وجود برتری نسبی، اختلاف معنی داری با تیمارهای C_0 و C_{100} نداشت. به نظر می‌رسد که مقادیر مختلف اسید اسکوربیک تاثیر چندانی در فاکتورهای رشدی لاروهای شیرونومید نداشته است اما نتایج ثابت کرد که ابقای این ویتامین در بدن به نحو مطلوبی صورت می‌گیرد.

همان‌طور که ذکر شد لاروهای تاسماهی ایرانی گروه C_{1000} مقادیر نسبتاً بیشتری از افزایش وزن، نرخ رشد ویژه وزن و نرخ رشد ویژه طول نشان دادند که البته اختلافات معنی دار نبودند ولی اختلاف معنی داری در مقادیر بازده تبدیل غذایی بین گروه‌های C_{1000} و D مشاهده شد. بازده تبدیل غذایی معیاری برای سنجش

کارایی جانور در استفاده از غذا برای رشد و نمو می‌باشد. با توجه به این موضوع که مهم‌ترین مشکلات در استفاده از غذای زنده هزینه بالا و در دسترس نبودن می‌باشد (Cahu and Zambonino Infante, 2001)، محاسبه فاکتور بازده تبدیل غذایی برای بسیاری از پرورش دهندگان می‌تواند مفید باشد. مقادیر بالاتر بازده تبدیل غذایی در این مطالعه احتمالاً مربوط به مقادیر بالاتر اسید اسکوربیک در تیمار C₁₀₀₀ باشد، چون اسید اسکوربیک در متابولیسم مواد نقش داشته و همچنین به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی عمل می‌کند (Sandnes, 1991). اگرچه، باید در نظر گرفت که تاثیر اسید اسکوربیک زمانی به وقوع می‌پیوندد که میزان این ویتامین از میزان طبیعی مورد نیاز برای رشد و سلامت ماهیان، در جیره غذایی، بیشتر باشد (Moren, 2011).

در این تحقیق، اندازه گیری‌های وزن و طول کل لاروهای تاسماهی ایرانی بعد از دوره ۱۴ روزه آزمایش نشان داد که در تیمارهای C₀، C₁₀₀، C₁₀₀₀ و D با وجود اختلافات جزئی این اختلاف‌ها معنی دار نبودند. مطالعات گوناگون بر روی گونه‌های مختلف حکایت از اثر مثبت و در برخی گونه‌های دیگر بدون اثر بودن اسید اسکوربیک در رشد ماهیان دارد. همانطور که گفته شد ماهیان استخوانی بدلیل عدم وجود آنزیمی تحت عنوان ال-گلوکونولاکتون اکسیداز قادر به سنتز اسید اسکوربیک ازال-گلوکز نمی‌باشند، این درحالی است که در ماهیان خاویاری ثابت گردیده که آنزیم مذکور در بافت کلیه وجود دارد و به عنوان مثال در تاسماهی سفید (*Acipenser transmontanus*) قابلیت سنتز ۳ میلی گرم اسید اسکوربیک به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد وجود دارد (Moreau et al., 1999; Dabrowski, 2001) شاید

دلیل عدم وجود اختلاف در طول و وزن ماهیان نیز همین موضوع باشد که با وجود مقادیر بالای اسید اسکوربیک در تیمار C₁₀₀₀ اختلاف معنی داری در رشد ماهیان ایجاد نشد. عدم وجود اختلاف در درصد بازماندگی نیز ممکن است به همین دلیل باشد چرا که لاروهای تاسماهی ایرانی مقدار مورد نیاز و کافی از اسید اسکوربیک را در کلیه خود تولید می‌کنند که نیاز به مقادیر اضافی در جیره ندارند (Dabrowski, 2001).

در تغذیه فیل ماهیان (*Huso huso*) جوان توسط مقادیر مختلف اسید اسکوربیک در پایان هفته چهارم افزایش وزن، متوسط وزن، نرخ رشد ویژه و بازده تبدیل غذایی بین دوزهای صفر با ۲۰۰ و ۸۰۰ اختلاف معنی داری مشاهده شد و طی ۸ هفته غذا دهی مشخص شد که بچه فیل ماهیان خصوصاً در مراحل ابتدایی رشد و نمو نیاز بیشتری به اسید اسکوربیک داشته چرا که مقاومت آن‌ها نسبت به عوامل پاتوژن، پارامترهای زیست محیطی و کیفیت آب و شرایط موجود در پرورش پایین تر می‌باشد (فلاحکار و همکاران، ۱۳۸۵).

Papp و همکاران (۱۹۹۵)، با بررسی اثر سطوح مختلف اسید اسکوربیک (صفر، ۱۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی گرم در کیلوگرم) در تاسماهی هیریس (*Acipenser ruthenus* × *A. baeri*) با وزن متوسط ۱۱/۹g در شروع آزمایش، پس از ۸ هفته پرورش و در دمای متوسط ۲۳-۲۲ °C و رسیدن ماهیان به ۵ برابر وزن ابتدایی (۴۵-۵۴g)، اختلاف معنی داری مشاهده نکردند ولی اثر مثبت ناچیزی بدنبال اضافه کردن اسید اسکوربیک در میزان رشد مشاهده شد. در مورد اثر اسید اسکوربیک روی تاسماهی ایرانی، خصوصاً از طریق غنی سازی غذای زنده، تحقیقات زیادی انجام نشده است. Hafezieh (۲۰۰۹)، ناپلی آرتیمیا را توسط

Chironomidae). دانش نامه انجمن حشره شناسی ایران،

شماره ۲۶، سال اول، صفحات ۴۵-۵۵.

۲. فلاحتکار، ب.، سلطانی، م.، ابطحی، ب.، کلباسی، م.، پورکاظمی، م.، یاسمی، م.، ۱۳۸۵. تاثیر ویتامین C بر بازماندگی و شاخص کبدی در فیل ماهیان (*Huso huso*) جوان پرورشی. پژوهش و سازندگی در امور دام و آبریان، شماره ۷۲، سال اول، صفحات ۹۸-۱۰۳.

3. Alston, D.E., Dendy, J.S., 1974. Progress report on outdoor culture and harvest of midge (Chironomidae: Diptera) larvae for fish food. Journal of World Aquaculture Society, Vol. 5, pp. 403-409.
4. Armitage, P.D., 1977. Development of the macro-invertebrate fauna of Cow Green reservoir (Upper Teesdale) in the first five years of its existence. Freshwater Biology, Vol. 7, pp. 441-454.
5. Armitage, P., 1995. Chironomidae as food In: Armitage, P., Cranston, P., Pinder, C., (Ed.), The Chironomidae: The biology and ecology of non-biting midges, Melbourne. Chapman & Hall, pp. 450-470.
6. Billard, R., Lecointre, G., 2000. Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. Reviews in Fish Biology and Fisheries, Vol. 10, pp. 355-392.
7. Banjo, A.D., Lawall, O.A., Songonuga, E.A., 2006. The nutritional value of fourteen species of edible insects in southwestern Nigeria. African Journal of Biotechnology, Vol. 5, pp. 298-301.
8. Bogut, I., Has-Schon E., Adamek, Z., Rajković, V., Rajković, V., 2007. *Chironomus plumosus* Larvae - A suitable nutrient for freshwater farmed fish. Poljoprivreda, Vol.13, pp. 159-162.
9. Cahu, Ch., Zambonino Infante, J., 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. Aquaculture, Vol. 200, pp. 161-180.
10. Conte, F.S., Doroshov, S.I., Lutes, P.B., Strange, E.M., 1988. Hatchery manual for the white sturgeon, *Acipenser transmontanus* Richardson. Cooperative Extension University of California, Division of Agriculture and Natural Resources Publishing. 104 p.
11. Dabrowski, K., Hinterleitner, S., 1989. Simultaneous analysis of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and ascorbic sulfate in biological material. Analyst, Vol. 114, pp. 83-87.
12. Dabrowski, K., 2001. Ascorbic acid in aquatic organisms. Boca Raton, FL: CRC press. 280 p.
13. Hafezieh, M., 2009. Effect of *Artemia urmiana* enrichment in larviculture of Persian sturgeon

اسید اسکوربیک غنی سازی کرد و تاثیر آن را در ضریب رشد و بازماندگی لاروهای تاسماهی ایرانی بررسی نمود. نتایج نشان داد که مقادیر اسید اسکوربیک در آرتمیا بعد از غنی سازی و در لاروهای ماهیان پس از تغذیه افزایش یافت. بررسی ها نشان دادند که مقادیر مختلف اسید اسکوربیک باعث افزایش کارایی رشد نسبت به گروه کنترل (بدون غنی سازی) نشد، هر چند که اختلاف معنی داری در میزان بازماندگی لاروهای تاسماهی ایرانی مشاهده شد.

در انتها می توان عنوان نمود که اضافه کردن اسید اسکوربیک به بستر محل پرورش باعث افزایش این ویتامین در بافت لاروهای شیرونومید می شود. نتایج نشان دادند که اسید اسکوربیک در لاشه لاروهای شیرونومید ابقا شده و از روش غنی سازی در این تحقیق می توان در پرورش انبوه استفاده نمود. همچنین از لاروهای غنی سازی شده در این تحقیق می توان به رای تغذیه ماهیان خاویاری و سایر ماهیانی که نیاز به غذایی با مقادیر بالای اسید اسکوربیک دارند استفاده نمود.

سپاسگزاری

نگارندگان مقاله بر خود لازم می دانند از مدیران و کارکنان مرکز تحقیقات مرکبات کشور به خصوص آقای دکتر جواد فتاحی مقدم و خانم مهندس معصومه کیا و همچنین از کارکنان مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر شادروان دکتر یوسف پور سیاهکل به خصوص مهندس بهمن مکتت خواه به دلیل همکاری در انجام این تحقیق تشکر کنند.

منابع

۱. صحراگرد، ا.، رفعتی فرد، م.، ۱۳۸۵. پرورش انبوه لاروهای (*Chironomus riparius* (Dip.:

- feeding of European Catfish (*Silurus glanis* L.) and Sturgeon hybrid (*Acipenser ruthenus* L. × *Acipenser baeri* L.). Journal of Applied Ichthyology, Vol. 11, pp. 372-374.
26. Pitaksong, T., Kupittayanant P., Boonanuntanasarn, S., 2013. The effects of vitamins C and E on the growth, tissue accumulation and prophylactic response to thermal and scidic stress of hybrid Catfish. Aquaculture Nutrition, Vol. 19, pp. 148-162.
 27. Shaw, P.C., Mark, K.K., 1980. Chironomid farming-a means of recycling farmmanure and potentially reducing water pollution in Hong Kong. Aquaculture, Vol. 21, pp. 155-163.
 28. Ren, T., Koshio, S., Jiang, Z.Q., Yokoyama, S., Komilus, C.F., Gao, J., Ishikawa, M., 2010. Interactive effects of dietary vitamin C and phospholipid in micro-bound diet for growth, survival, and stress resistance of larval Red Sea Bream, *Pagrus major*. Aquaculture Nutrition, Vol. 16, pp. 475-482.
 29. Ronyai A., Feledi, T., 2012. Co-feeding as a weaning procedure in Sterlet (*Acipenser ruthenus* L.) larvae. Aquaculture Research, Vol. 44, pp. 1-3.
 30. Sandnes, K., 1991. Vitamin C in fish nutrition – a review. Fiskeridirektoratets Skrifter. Serie Ernaering, Vol. 4, pp. 3-32.
 31. Volkman, E.T., Pangel, K.L., Rajchel, D.A., Sutton, T.M., 2004. Hatchery performance attributes of juvenile lake sturgeon fed two natural food types. North American Journal of Aquaculture, Vol. 66, pp. 105-112.
 32. Waagbø, R., 2006. Feeding and disease resistance in fish. In: Mosenthin, J., Zentek, R., and Zebrowska, T. (eds.) Biology of Growing Animal. Elsevier Limited, London, UK, pp. 363-398.
 33. Wahli, T., Verlhac, V., Girling, P., Gabaudan, J., Sebischer, C., 2003. Influence of dietary vitamin C on the wound healing process in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, Vol, 225, pp. 371-386.
 34. Ware, K.M., Henne, J.P., Hickson, B.H., Charlesworth K., 2006. Evaluation of six feeding regimens for survival and growth of Shortnose sturgeon fry. North American Journal of Aquaculture, Vol, 68, pp. 211-216.
 35. Webb, M.A.H., Doroshov, S.I., 2011. Importance of environmental endocrinology in fisheries management and aquaculture of sturgeons. General and Comparative Endocrinology, Vol, 170, pp. 313-321.
 36. Yashouv, A., 1970. Propagation of chironomid larvae as food for fish fry. Bamidgheh, Vol. 22, pp. 5-17.
 - (*Acipenser persicus*). PhD thesis. University Putra. Selangor, Malaysia. 124 p.
 14. Kiyashko, S.I., Imbs, A.B., Naritab, T., Svetashev, V.I., Wada, E., 2004. Fatty acid composition of aquatic insect larvae *Stictochironomus pictulus* (Diptera: Chironomidae): evidence of feeding upon methanotrophic bacteria. Comparative Biochemistry and Physiology, Vol. 139, pp.705-711.
 15. Konstantinov, A.S., 1952. Semicommercial propagation of Chironomid larvae. Rybnoje Choziajstvo, Vol. 1, pp. 31-37.
 16. Konstantinov, A.S., 1954. An experience in semicommercial midge propagation. Rybnoje Choziajstvo, Vol. 11, pp. 41-49.
 17. Konstantinov, A.S., 1958. Biology of the Chironomidae and their Cultivation. Saratov, U.S.S.R. pp. 362.
 18. Kraus, V.B., Huebner, J.L., Stabler, T., Flahiff, C.M., Setton, L.A., Fink, C., Vilim, V., Clark, A.G., 2004. Ascorbic acid increases the severity of spontaneous knee osteoarthritis in a guinea pig model. Arthritis & Rheumatism, Vol. 50, pp. 1822-1831.
 19. LeBreton, G.T.O., Beamish, F.W.H., Mckinley, R.S., 2005. Sturgeons and paddlefish of North America. New York: Kluwer Academic Publishers. Series: Fish & Fisheries Series, Vol. 27, 323 p.
 20. Mohler, J.W., Sweka, J.A., Kahnle, A., Hattala, K., Higgs, A., DuFour, M., Breece, M.W., Fox, D.A., 2012. Growth and Survival of Hatchery-Produced Atlantic Sturgeon Released as Young-of-Year into the Hudson River, New York. The Journal of Fish and Wildlife Management, Vol. 3, pp. 23-32.
 21. Moreau, R., Dabrowski, K., Sato, P.H., 1999. Renal L-gulonol-1, 4-lactone oxidase activity as affected by dietary ascorbic acid in Lake Sturgeon (*Acipenser fluvescens*). Aquaculture, Vol 180, pp. 359-372.
 22. Moren, M., R. Waagbo, Hamre, K., 2011. Micronutrients In: Holt, G.J. (Ed.), Larval fish nutrition. U.K.: Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons, Inc. pp. 117-149.
 23. Norrgren, L., Borjeson, H., Forlin, L., Akerblom, N., 2001. The role of ascorbic acid and its derivatives in resistance to environmental and dietary toxicity of aquatic organisms In: Dabrowski, K. (Ed.), Ascorbic acid in aquatic Organisms- Status and Perspectives, FL.: CRC press, Boca Raton, pp. 133-149.
 24. NRC (National Research Council), 2011. Nutrient Requirements of fish, National Academy Press, Washington, D.C. 114 pp.
 25. Papp, Z.G., Jeney, Z., Jeney, G., 1995. Comparative studies on the effect of vitamin C