

## تأثیر فرمول بهینه مکمل معدنی بر برخی فاکتورهای ایمنی قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

پویان بهمن<sup>۱</sup>، هومن رجبی اسلامی\*<sup>۱</sup>، مهدی سلطانی<sup>۱</sup>

### چکیده

ارتقای سیستم ایمنی و افزایش رشد و بازماندگی ماهیان در مراحل اولیه زندگی از اصلی‌ترین نیازهای پرورش دهندگان می باشد. به همین منظور آزمایشی برای مشخص کردن تأثیر مکمل معدنی بر میزان بقا ماهیان و بررسی برخی از متغیرهای ایمنی ماهی قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در مزرعه پرورش ماهی طبرستان واقع در آمل طراحی شد. این مکمل حاوی ۸ ماده معدنی روی، ید، مس، کبالت، منگنز، منیزیم، سلنیوم و آهن بود. شش جیره غذایی حاوی مقادیر مختلف مکمل مواد معدنی شامل مقادیر ۲، ۳ و ۴ درصد از مکمل معدنی تیمار ۱ طراحی شد. تعداد ۷۰۰ بچه ماهی با وزن ابتدایی  $1 \pm 40$  گرم به ۶ تیمار و ۳ تکرار تقسیم شدند و تعداد ۴۰ عدد بچه ماهی به صورت تصادفی در هر فضای آزمایشی قرار گرفتند. بچه ماهیان ۱۲ هفته از طریق جیره‌های غذایی تغذیه شدند. در همه آزمایش‌های انجام شده تیمار شاهد دارای پایین‌ترین میزان در متغیرهای ایمنی ماهی بود. نتایج نشان داد که میزان بقای بچه ماهیان در همه تیمارهای آزمایشی برابر ۱۰۰ درصد بوده است و هیچ اختلال ظاهری نظیر تغییر سرپوش آبششی، شنای غیرعادی همراه انحنای افقی و عمودی ستون فقرات در بچه ماهیان قزل آلاهی رنگین کمان در طی ۱۲ هفته دوره پرورش مشاهده نشد. همچنین، تفاوت معنی داری بین پروتئین کل، هماتوکریت، گلبولهای سفید، گلبول‌های قرمز و آلبومین مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). در دو نوبت نمونه‌برداری برخی پارامترهای خون شناسی ماهیان آنالیز شد که اختلاف معنی داری در بین دو بار نمونه‌برداری مشاهده نشد ولی در بین تیمارهای آزمایشی در شمارش تفریقی گلبولهای سفید و قرمز اختلاف معنی داری بین تیمارهای آزمایشی مشاهده گردید ( $P < 0/05$ ). همچنین بیشتر سطح ایمنی مربوط به تیمارهای ۱ و U بود. نتایج این پژوهش نشان داد که میزان مواد معدنی برای بهبود شاخص‌های ایمنی بچه ماهیان قزل آلاهی رنگین کمان نسبت به جیره پیشنهادی U، یک درصد بیشتر است.

**کلید واژه:** مکمل معدنی، ایمنی، بقا، قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*).

تاریخ وصول: ۱۳۹۵/۷/۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۲

<sup>۱</sup> - گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (نویسنده مسؤل)

pooyanbahman@gmail.com

## ۱- مقدمه

تغذیه و مباحث مربوط به آن یکی از عوامل مؤثر در آبی‌پروری است، به طوری که شاید بتوان تهیه غذای مناسب و روش صحیح غذادهی را مهمترین کار در تغذیه آبیان دانست. در آبی‌پروری ۵۰ تا ۶۰ درصد هزینه‌های مربوط به پرورش ماهیان مربوط به غذادهی است (Hazel, 1988). شرایط در هر نوع محیط پرورشی باید به گونه‌ای باشد که مواد مغذی مورد نیاز ماهی برای دست یابی به مقدار بالقوه رشد بهینه فراهم شود.

تحقیقات در سال‌های اخیر نشان می‌دهد که غذای ترکیبی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بایستی شامل کلیه اجزای مورد نیاز ماهی باشد تا رشد خوب و بقای ماهیان را در سیستم‌های پرورشی معمول به همراه داشته باشند (Lovell, 1989). اجزای غذاهای ترکیبی به تنهایی به اندازه ترکیب مجموعه آنها مفید نیست، زیرا هرگز یک جزء از غذا نمی‌تواند تمام نیازهای غذایی ماهی را در بر داشته باشد (Hilton et al, 1983). یک غذای خشک مناسب برای قزل‌آلای رنگین‌کمان شامل مخلوطی از انواع آردهای غذایی مناسب است که مواد معدنی و ویتامین‌های خالص نیز به آن اضافه می‌گردند.

انجام تحقیقات مختلف منجر به معرفی مکمل‌های معدنی مختلف برای استفاده در غذای مصنوعی قزل‌آلای رنگین‌کمان شده است، به طوری که تولیدکنندگان خوراک دام و آبیان همواره با مشکل انتخاب مکمل معدنی و حتی ویتامینه مناسب برای قزل‌آلای رنگین‌کمان هستند (NRC, 1983). علاوه بر این بسیاری از مزرعه‌داران با تلفات و بیماری‌های مختلفی مواجه هستند که در برخی موارد دلایل آن چندان مشخص نمی‌باشد. تحقیق حاضر بر این اساس طراحی گردید تا مکمل مورد نیاز قزل‌آلای رنگین‌کمان برای بالابردن ایمنی و کاهش تلفات در شرایط پرورشی و مدیریتی ایران به دست آورد. از آنجا که تاکنون هیچ تحقیق جامعی در رابطه با تأثیر مواد معدنی انجام نگرفته است، انجام چنین تحقیقاتی می‌تواند دستاوردهای بزرگی را در زمینه افزایش ایمنی ماهیان به ویژه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به ویژه در آبی‌پروری و سایر علوم مرتبط داشته باشد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- آماده‌سازی جیره غذایی

اجزای خشک جیره غذایی پیش از ترکیب به خوبی آسیاب شده و پس از توزین به صورت دستی با

یکدیگر مخلوط شدند. خمیر حاصله در ادامه با کمک چرخ گوشت به قطر نیم میلی‌متر به صورت رشته‌هایی در آمده و برای خشک شدن غذاها در کاغذهای مخصوص پخش شده و برای ۲۴ ساعت در هوای آزاد قرار داده شد که به پلت‌هایی با اندازه متناسب با دهان ماهیان تبدیل گردد. غذای آماده شده تا زمان شروع آزمایش داخل کیسه های نایلونی در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. برای این منظور برای دوره ۲ هفته ابتدایی برای تغییر عادات غذایی ماهیان به غذای جدید در این جیره غذایی، از مواد معدنی استفاده نشد. مقدار ۱۰ کیلوگرم غذا برای ۷۰۰ ماهی تهیه گردید. برای هفته سوم به بعد هر ۲ هفته مقدار ۲۰ کیلوگرم غذا آماده شده و مقدار معینی از مخلوط مواد معدنی به آن اضافه شد که در ادامه توضیح داده می شود.

#### جدول ۱. اجزا و ترکیبات شیمیایی جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

۴۸/۰۰	آرد ماهی
۱۰/۰۰	گلوتن ذرت
۲۰/۰۰	آرد سویا
۲۰	
۱۳/۹۰	میدلینگ گندم
۶/۰۰	روغن ماهی
۱/۰۰	هم‌بند (آرژینات سدیم)

برای هر تیمار به صورت جداگانه مواد غذایی به این صورت که برای تیمار شاهد و U مقدار ۹۶۰ گرم آرد ماهی، ۲۰۰ گرم گلوتن ذرت، ۴۰۰ گرم آرد سویا، ۲۸۰ گرم میدلینگ گندم، ۱۲۰ سی سی روغن ماهی و میزان ۲۰ گرم آرژینات سدیم و مکمل ویتامینه به ترتیب با هم مخلوط شد و بعد از اضافه کردن مقدار معینی آب شهری با چرخ گوشت پلت هایی یکسانی تهیه شد. همچنین برای تیمار های S۱ تا S۴ مقدار ۱۹۲۰ گرم آرد ماهی، ۴۰۰ گرم گلوتن ذرت، ۸۰۰ گرم آرد سویا، ۵۶۰ گرم میدلینگ گندم، ۲۴۰ سی سی روغن ماهی و میزان ۴۰ گرم آرژینات سدیم و مکمل ویتامینه با هم مخلوط و با چرخ گوشت پلت ساخته شد. جیره پایه آزمایشی و ترکیب هر یک از اجزای آن به عنوان تیمار شاهد بر پایه پیشنهاد Hidalgo و همکاران (۲۰۰۲) به جیره مناسب پیشنهادی برای قزل‌آلای رنگین‌کمان با حذف مکمل معدنی جیره تهیه

شده (جدول ۲) تا مبنایی برای مقایسه با سایر جیره‌های غذایی تکمیلی فراهم آید. دومین جیره غذایی تحت عنوان جیره U با آماده‌سازی مکمل معدنی طبق پیشنهاد NRC (۲۰۱۱) و اضافه‌سازی میزان ۱ درصد از آن به جیره غذایی پایه آماده گردید. البته این جیره تنها حاوی عناصر آهن، ید، مس و منگنز می‌باشد، در حالی که مطالعات مختلف بیانگر تاثیر سایر عناصر ضروری و مفید نظیر سلنیوم، روی و منیزیم بر سلامتی، رشد و ایمنی قزل‌آلای رنگین‌کمان هستند. بر این اساس سومین جیره غذایی تحت عنوان جیره S1 با اضافه نمودن ۰/۳۸ گرم سلنیوم (Hilton et al, 1980)، ۳۰ میلی‌گرم روی (Ogino and Yang, 1978)، ۰/۰۵ گرم منیزیم (Ogino et al, 1978) و ۶ گرم آهن (Desjardins et al, 1987) به هر کیلوگرم از مکمل معدنی پیشنهادی NRC آماده و همانند جیره U به میزان ۱ درصد با جیره غذایی پایه ترکیب گردید. سه جیره غذایی دیگر نیز با اضافه نمودن مقادیر ۲، ۳ و ۴ درصد از مکمل معدنی تیمار S1 آمده و به ترتیب عنوان‌های S2، S3 و S4 برای آنها در نظر گرفته شد. ترکیب معدنی هر یک از تیمارهای آزمایشی در جدول ۳ ارائه گردیده است. بنابراین تمام اجزای غذایی تیمارها به استثنای مکمل معدنی مشابه هستند.

جدول ۲. ترکیب مکمل معدنی مربوط به هر یک از جیره‌های غذایی مورد استفاده بر اساس گرم در هر کیلوگرم از مکمل معدنی

تیمار شاهد	تیمار U	تیمار S <sub>1</sub>	تیمار S <sub>2</sub>	تیمار S <sub>3</sub>	تیمار S <sub>4</sub>
روی (Zn)	۳۰	۳۰	۴۵	۶۰	۷۵
ید (I)	۰/۶	۰/۶	۱/۲	۱/۸	۲/۴
مس (Cu)	۳	۳	۶	۱۲	۱۸
کیالت (Co)	—	۱	۲	۳	۴
منگنز (Mn)	۱۲	۱۲	۲۰	۲۸	۳۶
منیزیم (Mg)	۶	۶	۱۲	۱۸	۲۵
سلنیوم (Se)	۰/۳۸	۰/۳۸	۰/۷۶	۱/۱۴	۱/۵۲
آهن (Fe)	—	۶	۱۲	۱۸	۲۴

## ۲-۲- طراحی آزمایش و شیوه غذایی

تعداد ۷۰۰ بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به صورت تصادفی از یکی از مراکز تحقیقات ماهیان سردابی کشور در آمل استان مازندران تهیه و به محل آزمایش در مزرعه قزل‌آلای طبرستان واقع در

کیلومتر ده جاده آمل به محمودآباد منتقل شدند. بچه ماهیان بعد از سازگاری اولیه به شرایط محیطی استخرها برای مدت ۲ هفته به غذای دستی، ساخته شده در آزمایشگاه دانشگاه آزاد علوم و تحقیقات که بدون مواد معدنی بود، عادت داده شدند. میانگین وزن بچه ماهیان در شروع آزمایش  $1 \pm 40$  گرم بود. آب مصرفی طی پرورش از یک چشمه و دو حلقه چاه تأمین شد. آزمایش در ۶ استخر کانالی (Raceway) به ابعاد  $1 \times 1 \times 3/5$  متر با دبی ورودی  $1/5$  لیتر بر ثانیه انجام گرفت. استخرها به وسیله توری هایی که با چوب ساخته شده بود به ۳ قسمت برابر تقسیم و ۳۵ عدد بچه ماهی به صورت تصادفی در هر یک از ۱۸ فضای آزمایشی توزیع شدند. آزمایش به مدت ۹ هفته در تیمارهای آزمایشی هر یک با ۳ تکرار انجام شد. غذایی در حد سیری و روزانه ۳ نوبت به میزان ۵ درصد وزن بدن در ساعت‌های ۸، ۱۲ و ۱۷ در هر یک از تیمارها انجام و مقدار در هر یک از تیمارها انجام و مقدار غذای مصرفی یادداشت شد. لازم به ذکر است که مصرف غذای بچه ماهیان بسیار سریع بود و غذایی در آب باقی نماند. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب شامل دما، اکسیژن محلول، مقدار pH هر ماه یک بار تعیین شدند. بیشینه و کمینه دمای آب به ترتیب برابر  $13/3$  و  $12/9$  سانتی گراد به دست آمد و تغییرات کمی را نشان داد.

## ۲-۳- نمونه برداری و جمع آوری اطلاعات

جهت بررسی تغییرات خونی (آلبومین، هماتوکریت، RBC، WBC و پروتئین کل) بعد از پایان هفته ششم و دوازدهم از ماهیان هم تیمار بعد از بیهوشی با پودر گل میخک، به روش قطع ساقه دم خونگیری شد. خونگیری از ساقه دم روش مناسبی برای خون‌گیری از ماهی‌های کوچک است (Haghighi, 2009). خون هر تیمار وارد لوله های حاوی ماده ضدانعقاد EDTA شده تا برای بررسی فاکتورهای خونی مورد استفاده قادر گیرد. فاکتورهای خونی شامل مقادیر WBC و RBC بوسیله لام مخصوص هموسیتمتر نتوبار و محلول های رقیق کننده گاور و تورک شمارش گردیدند (Blaxhall, 1973). اندازه گیری هماتوکریت با استفاده از سانتریفوژ انجام شد (Haghighi, 2009).

## ۲-۴- تجزیه و تحلیل داده‌ها

اطلاعات به دست آمده در نرم افزار Excel مرتب و از طریق نرم افزارهای SPSS-19 و SigmaPlot 12 تجزیه و تحلیل شد. داده ها پس از تأیید نرمال بودن از طریق آزمون کلموگروف اسمیرنوف و اختلاف

بین میانگین ها از طریق آنالیز واریانس (ANOVA) تعیین و از آزمون HSD و Turkeys برای تعیین محل اختلافات استفاده شد. سطح اطمینان کمتر از ۵ درصد نیز به منزله سطح اختلاف معنی داری مشخص شد.

### ۳- نتایج

#### ۳-۱- میزان بقا و رشد

نتایج نشان داد که میزان بقای بچه ماهیان در همه تیمارهای آزمایشی برابر ۱۰۰ درصد بوده است و هیچ اختلال ظاهری نظیر تغییر سرپوش آبششی، شنای غیرعادی همراه انحنای افقی و عمودی ستون فقرات در بچه ماهیان قزل آلاهی رنگین کمان در طی ۱۲ هفته دوره پرورش مشاهده نشد. در نمونه برداری اول که بعد از ۴۵ روز غذادهی انجام گرفت در تیمارهای شاهد که از مواد معدنی استفاده نشده بود و تیمار U که مطابق NRC به جیره مواد معدنی اضافه شده بود نسبت به تیمار ۱ که به میزان یک درصد مواد معدنی اضافه شده داشت اختلاف معنی دار مشاهده شد. بچه ماهیان تغذیه شده با جیره شاهد نسبت به تیمارهای تغذیه شده با میزان مواد معدنی دیگر پایین ترین میزان فاکتورهای ایمنی را از خود نشان دادند. همچنین در نمونه برداری اول بیشترین میزان سطح آلبومین، هماتوکریت، پروتئین کل، گلبولهای سفید و قرمز در تیمار ۱ مشاهده شد که در این تیمار فقط ۱ درصد نسبت به تیمار U افزایش داشت که نشان دهنده اختلاف معنی داری نسبت به تیمارهای دیگر آزمایشی بوده است. نتایج به دست آمده در نمونه برداری دوم که در انتهای پروژه صورت گرفت نتایج منطبق بر نمونه برداری اول بود در صورتی که در تیمار ۱ بیشترین میزان فاکتورهای تأثیرگذار در افزایش ایمنی ماهی قزل آلاهی رنگین کمان مشاهده

جدول ۳. نمونه برداری اول پس از ۴۵ روز تغذیه بچه ماهی های قزل آلاهی رنگین کمان با سطوح مختلف

تیمار	آلبومین (گرم بر دسی لیتر)	هماتوکریت (درصد)	پروتئین کل (گرم بر دسی لیتر)	گلبولهای قرمز (تعداد در میلی متر مکعب)	گلبولهای سفید (تعداد در میلی متر مکعب)
تیمار شاهد	۲±۰/۱	۳۱±۲	۲/۴±۰/۱	۸۰۳/۲۶±۷۶/۴۱	۶۶۰۰±۲۶۲/۲۲
تیمار U	۲/۱±۰/۲	۳۶/۳±۲/۰۸	۴/۶±۰/۲	۱۰۸۶/۵۰±۲۸/۱	۷۳۱۶±۱۳۶/۷۵
تیمار ۱	۲/۳±۰/۲	۳۹±۲	۴/۷±۰/۱	۱۱۳۶/۱±۶۳/۱۷	۷۷۸۹±۸۸/۳۲
تیمار ۲	۲±۰/۲	۳۸±۲/۶	۴/۴±۰/۲	۱۰۰۲/۸۶±۲۴/۸۴	۷۵۵۴±۱۰۹/۹۱
تیمار ۳	۲/۱±۰/۲	۳۸±۱/۷	۴/۵±۰/۲	۱۰۰۴/۷۳±۵۸/۳۱	۷۳۵۹±۱۸۹/۰۳
تیمار ۴	۲±۰/۲	۳۴/۶±۲/۰۸	۴/۵±۰/۳	۹۱۷/۲±۱۰۳/۶۴	۷۵۵۱±۱۵۳/۰۵

شد. در این نمونه برداری که در نودمین روز پروژه صورت گرفت تیمار شاهد که فاقد هر نوع مواد معدنی اضافی به غذا بود کمترین میزان را در فاکتورهای ایمنی آزمایشی نشان داد.

**جدول ۴. نمونه برداری دوم پس از ۹۰ روز تغذیه بچه ماهی های قزل آلابی رنگین کمان با سطوح مختلف مواد معدنی**

تیمار شاهد	آلبومین (گرم بر دسی لیتر)	هماتوکریت (درصد)	پروتئین کل (گرم بر دسی لیتر)	گلبولهای قرمز (تعداد در میلی متر مکعب)	گلبولهای سفید (تعداد در میلی متر مکعب)
۲/۳±۰/۳	۳۴±۲/۵	۴/۵±۰/۱	۸۹۲/۵۲±۳۹/۵۰	۶۴۲۸/۳۳±۴۱۳/۶۷	
۲/۹±۰/۲	۴۴±۱	۴/۹±۰/۱	۱۱۷۱/۱۴±۶۵/۱۵	۷۸۵۳/۰۰±۳۹۰/۶۱	
۲/۵±۰/۲	۴۴±۱/۱	۴/۵±۰/۴	۱۲۸۶/۰۴±۱۸/۷۰	۸۳۳۲/۶۶±۳۰۹/۳۴	
۲/۶±۰/۱	۴۰±۱/۵	۴/۱±۰/۱	۱۲۵۸/۱۹±۸۰/۷۶	۷۸۲۶/۶۶±۱۱۶/۳۲	
۲/۴±۰/۱	۳۸±۰/۵	۴/۲±۰/۲	۱۲۹۰/۴۳±۶۴/۲۷	۷۸۰۰/۶۶±۱۷۳/۲۳	
۲/۶±۰/۲	۳۹±۱/۱	۴/۲±۰/۳	۸۹۸/۶۲±۲۸/۴۳	۸۳۳۹/۶۶±۲۳۵/۶۳	

#### ۴- بحث و نتیجه گیری

تحقیقات در سال های اخیر نشان می دهد که غذای ترکیبی ماهی قزل آلابی رنگین کمان بایستی شامل کلیه اجزای مورد نیاز ماهی باشد تا رشد خوب و بقای ماهیان را در سیستم های پروری معمول به همراه داشته باشند (Lovell, 1989; Talbot et al, 1999; Amer et al, 2004). اجزای غذاهای ترکیبی به تنهایی به اندازه ترکیب مجموعه آنها مفید نیست، زیرا هرگز یک جزء از غذا نمی تواند تمام نیازهای غذایی ماهی را در بر داشته باشد (Spinelli et al, 1979). ارتقای سیستم ایمنی و افزایش رشد و بازماندگی ماهیان در مراحل اولیه زندگی از اصلی ترین نیازهای پرورش دهندگان می باشد (Guinea, 1992). با توجه به این موضوع طراحی یک مکمل معدنی متناسب با نیازهای غذایی قزل آلابی رنگین کمان و رسیدن به رشد مطلوب و با بازماندگی بالا و تقویت ایمنی بدن در شرایط پرورشی کارگاه های پرورشی داخل کشور کاملاً احساس می شود. با توجه به نتایج به دست آمده در این پروژه می توان نتیجه گیری نمود که در جیره شاهد که هیچگونه مواد معدنی اضافه ای به جیره غذایی اضافه نشده است پایین ترین میزان را در شاخص های ایمنی شاهد بودیم که نشان دهنده این امر می باشد که مواد معدنی حتی به میزان کم نیز دارای تأثیر بسیار زیادی است. همچنین در جیره های دیگر آزمایشی که دارای مواد معدنی با درصدهای خاصی بودند ما

شاهد اختلاف معنی‌داری در متغیرهای ایمنی ماهی بودیم. در تیمار U که جیره پیشنهادی NRC بود، نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری بودیم، ولی بیشترین اختلاف معنی‌دار در آزمایشات به دست‌آمده در تیمار اول آزمایشی بود که حتی با جیره پیشنهادی NRC نیز دارای اختلاف معنی‌داری در جهت مثبت بود. در نتایج به دست آمده در آزمایشات انجام شده تیمار ۱ که به میزان ۱ درصد مواد معدنی بیشتر از جیره U بود ما شاهد بیشترین افزایش متغیرهای ایمنی بودیم. همانطور که Cowey و همکاران در سال ۱۹۷۹ بررسی کاملی روی کمبود عناصر معدنی بر بسیاری از فرآیندهای متابولیکی داشتند که شاهد علائم متفاوتی از قبیل کاهش رشد، کاهش اشتها، نقایص تولید مثلی، کاهش ایمنی، بیماری‌های عمومی، کاهش کیفیت ماندگاری گوشت و دیگر فراورده‌های شیلاتی بودند، پژوهشگران تحقیق حاضر بر این اساس پیشنهاد می‌نمایند که تأثیرات مواد معدنی دیگر نیز بر پارامترهای ایمنی ماهی و همچنین آنزیم‌های کاربردی نیز بررسی شود که به بالا بردن سطح ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان که برای پرورش دهندگان داخل کشور از اهمیت بالایی برخوردار است شود. همچنین با توجه به نتایج به دست آمده استفاده از این مکمل معدنی را می‌توان روی ماهی‌های دیگر نیز بررسی کرد که امید است باعث افزایش ایمنی و رشد ماهیان گردد.

### فهرست منابع

1. Haghghi, M. (2009). Laboratory Methods of Fish Hematology. *Iranian Fisheries Research Organization Publication*. Tehran, Iran.
2. Blaxhall, P.C., Daisley, K.W. (1973). Routine hematological methods for use with fish blood. *J. Fish. Biol.* 5: 771-781.
3. Hazel, J. R., and Landrey, S. R. (1988a). *Am. J. Physiol.* 255, R622.
3. Limsuwan, T. and Lovell, R.T., (1981). Intestinal synthesis and absorption of vitamin B<sub>12</sub> in channel catfish. *J. Nutr.*, 111: 2125-2132.
4. Hilton, J.W. and Hodson, P.V., (1983). Effect of increased dietary carbohydrate on selenium metabolism and toxicity in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Nutr.*, 113: 1241-1248.
5. NRC (National Research Council), (1983). Nutrient Requirements of Warmwater Fishes and Shellfishes.
6. Ogino, C., and Yang, G. Y. (1978). *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 44, 1015.
7. Hilton, J. W., Hodson, P. V., and Slinger, S. J. (1980). *J. Nutr.* 110, 2527.
8. Desjardins, L. M. (1987). M.Sc. thesis, University of Guelph, Guelph, Canada.
9. Lovell, R. T. (1978). *Trans. Am. Fish. Soc.* 107, 617.
10. Hardy, R. W., Shearer, K. D., and Spinel, J. (1979). *Aquaculture* 38, 35-44.
11. Leary, D. F., and Lovell, R. T. (1989). *Trans Am. Fish Soc.* 104, 328-332.
12. Einarsson, S., Davies, P., and Talbot, C. (1999). *Fish Physiol. Biochem.* 15, 439.
13. Guinea, J., and Fernandez, F. (1992). *J. Fish Biol.* 41, 381.
14. Kissil, G. W., Cowey, C.B., and Adron, J. W. (1981). *Aquaculture* 23, 243-255.