

พยาธิวิทยาของปลาดุกด้านที่ขาดกรดแพนโทเทนิก

Pathology of the Pantothenic Acid Deficiency in Walking Catfish (*Clarias batrachus*)

ชลอ ลิ้มสุวรรณ¹ นันทวัฒน์ เกิดขึ้น และ สุปราณี ชินบุตร²

Chalor Limsuwan, Nanthawat Kirdchuen and Supranee Chinabut

ABSTRACT

Walking catfish (*Clarias batrachus*) fingerlings fed purified diet devoid of pantothenic acid showed reduced appetite at the end of the 4th week and reduced growth at the end of the 9 - week feeding. Average mortality rate for the fish fed pantothenic acid - deficient diet was 80%. Mortalities first occurred during the 5th week. At the beginning of 5th week the fish fed the pantothenic acid - free diet showed eroded barbels and fins. Moribund fish fed vitamin - free diet at the 12th week showed hemorrhagic areas on the skin and *Aeromonas hydrophila* was isolated from liver and kidney. Histopathologically, epidermal necrosis of the barbels was observed on fish fed pantothenic acid - free diet at 5th week. However, clubbed gills was found at the 12th week. Lesions were also observed in skin, liver and spleen of moribund fish fed vitamin - free diet accompanied by *A. hydrophila* infection at 12 weeks.

บทคัดย่อ

ปลาดุกด้าน (*Clarias batrachus*) ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ขาดกรดแพนโทเทนิกจะแสดงอาการเบื่ออาหารเมื่อสิ้นสุดสัปดาห์ที่ 4 และการเจริญเติบโตจะลดลงเมื่อเลี้ยงไปได้ 9 สัปดาห์ อัตราการตายเฉลี่ยของปลาดุกด้านที่ขาดกรดแพนโทเทนิก 80%

ปลาจะเริ่มตายในระหว่างสัปดาห์ที่ 5 เมื่อเริ่มเข้าสัปดาห์ที่ 5 ปลาที่ขาดกรดแพนโทเทนิกจะมีหนวดถูกและครีบกร่อน ปลาที่ขาดวิตามินและมีอาการใกล้เคียง

ในสัปดาห์ที่ 12 มีการตกเลือดบนลำตัว และสามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* จากตับและไตได้ จากการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อพบว่าการตายของชั้น epidermis ในหนวดปลาที่ขาดวิตามินในสัปดาห์ที่ 5 อย่างไรก็ตามลักษณะที่เป็น clubbed gill จะปรากฏในสัปดาห์ที่ 12 ส่วนในผิวหนังตับและม้าม ของปลาที่ขาดวิตามินที่มีอาการใกล้เคียงและติดเชื้อ *A. hydrophila* ในสัปดาห์ที่ 12 จะมีการผิดปกติ

¹ ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dept. of Fishery Biology, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

² สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ กรมประมง

National Inland Fisheries Institute, Department of Fisheries

คำนำ

ปลาต้องการวิตามินเพื่อใช้เป็นสารเร่งหรือกระตุ้นปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นในร่างกายเพื่อการดำรงชีวิต เช่น การสร้างพลังงาน การสร้างโปรตีนและการเจริญเติบโต การศึกษาเกี่ยวกับปริมาณของวิตามินแต่ละชนิดที่ปลาต้องการส่วนใหญ่เป็นผลการศึกษาของ Halver (1957) ซึ่งได้ทำการศึกษากับปลาในเขตหนาว ได้แก่ ปลาเทรา และปลาแซลมอน สำหรับปลาในเขตอบอุ่น Dupree (1966) ศึกษาวิตามินที่มีความจำเป็นในการเจริญเติบโตของปลา channel catfish (*Ictalurus punctatus*) Aoe et al. (1967, 1969) รายงานปริมาณต่ำสุดของวิตามินที่ละลายน้ำ (water-soluble vitamin) ที่ปลาแคร์พ (*Cyprinus carpio*) ต้องการ

กรดแพนโทเทนิค (pantothenic acid) เป็นวิตามินที่ละลายน้ำชนิดหนึ่ง เป็นส่วนประกอบของโคเอ็นไซม์ ซึ่งทำหน้าที่สำคัญในปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ เพื่อสลายคาร์โบไฮเดรตและไขมันให้เกิดพลังงาน นอกจากนั้นยังทำหน้าที่สังเคราะห์กรดไขมันและสารอื่น ๆ เมื่อขาดวิตามินชนิดนี้ร่างกายจะสร้างสารต้านทานโรคลดลง Halver (1957) รายงานว่า ปลา chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) ที่ขาดวิตามินชนิดนี้จะมีอัตราการตายสูง เนื่องจากเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับเหงือก โดยเซลล์บุผิวเหงือกจะเพิ่มจำนวนขึ้น (hyperplasia) และทำให้กึ่งเหงือก (secondary lamellae) ข่มติดกันเป็นลักษณะที่เรียกว่า clubbed gills

การศึกษาเกี่ยวกับความต้องการวิตามินหรือผลจากการขาดวิตามินของปลาในประเทศไทยยังมีน้อยมาก เชมรูนพ (2526) ศึกษาผลจากการขาดวิตามินละลายน้ำ ต่อการเจริญเติบโตและอัตราเหลือรอดของลูกปลาดุกด้าน (*Clarias batrachus*) ประเสริฐและคณะ (2527) ศึกษาผลของวิตามินละลายน้ำบางชนิดต่อ

การเจริญเติบโตและอัตราการรอดของลูกปลาดุกอุย (*C. macrocephalus*) วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาทางพยาธิวิทยาของปลาดุกด้านที่ขาดกรดแพนโทเทนิค

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาผลต่อการเจริญเติบโตและอัตราการตาย

ปลาดุกด้านที่ใช้ทดลองซื้อมาจากฟาร์มเอกชนในอำเภอบางป่อ จังหวัดสมุทรปราการ มีขนาดความยาว 8.0 – 11.0 ซม. นำมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์ขนาดความจุ 500 ลิตร เป็นเวลานาน 1 สัปดาห์ โดยให้อาหารสำเร็จรูปสูตร ปสข. 12 หลังจากปลาเคยชินกับสภาพห้องทดลอง และแข็งแรงดีแล้ว จึงคัดเลือกปลาที่มีขนาดใกล้เคียงกันมาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 45 × 100 × 45 ซม. บรรจุน้ำ 120 ลิตร ใส่ปลาตู้ละ 15 ตัว รวม 4 ตู้ เริ่มให้อาหารสมบูรณ์ (complete diet) ซึ่งมีส่วนผสมที่แสดงไว้ในตารางที่ 1 แก่ปลาทุกตู้ วันละ 2 ครั้ง หลังจากปลาเคยชินกับอาหารเป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ ทำการชั่งน้ำหนักปลาในแต่ละตู้แล้วจึงเริ่มการทดลองโดยใน 2 ตู้แรกเป็นกลุ่มควบคุมให้อาหารสมบูรณ์ ส่วนอีก 2 ตู้ที่เหลือให้อาหารที่มีส่วนผสมทุกอย่างเหมือนกับอาหารสมบูรณ์ แต่ไม่มีวิตามินกรดแพนโทเทนิค

การเตรียมอาหาร สำหรับอาหารสมบูรณ์ซึ่งสารแต่ละตัวใน Table 1 แล้วนำมารวมและคลุกเคล้าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหาร (Hobart mixer) นานประมาณ 6 – 7 นาที เติมน้ำอุ่นประมาณ 35% โดยน้ำหนักของสาร แล้วให้เครื่องผสมนาน 7 – 8 นาที นำอาหารที่ผสมเข้ากันดีแล้วเข้าเครื่องบด อัดออกมาเป็นเส้น มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5 มิลลิเมตร ตัดเป็นแท่งเล็ก ๆ แล้วบรรจุในถุงพลาสติกนำไปแช่แข็งจนกว่าจะนำมาใช้เลี้ยงปลา ส่วนอาหารที่ขาดวิตามิน

Table 1 Composition of complete diet.

Ingredient	Percentage
Vitamin - free casein	29
Corn dextrin	30
Salad oil	6
Vitamin mix ^{1/}	2
Mineral mix ^{2/}	4
Cellulose	20
C.M.C. (carboxyl methyl cellulose)	3
Gelatin	6

^{1/} Vitamin premix contained the following (mg/kg of diet) : vitamin K, 10; choline, 550; niacin, 100; riboflavin, 20; pyridoxine, 20; thiamine, 20; D - calcium pantothenate, 50; biotin, 5; folacin, 5; ascorbic acid, 100; inositol, 100; vitamin B₁₂, 20 microgram; vitamin A, 5,000 IU; vitamin D₃, 1,000 IU; vitamin E, 50 IU.

^{2/} Mineral premix contained the following (gm/100 gm of diet) : CaHPO₄ · 2H₂O, 2.07; CaCO₃, 1.47; KH₂PO₄, 1.00; NaCl, 0.60; MnSO₄ · H₂O, 0.035; FeSO₄ · 7H₂O, 0.05; MgSO₄, 0.30; KIO₃, 0.001; CuSO₄ · 5H₂O, 0.003; ZnCO₃, 0.015; CoCl₂, 0.00017; NaMoO₄, 0.00083; Na₂SeO₃, 0.00002.

กรดแพนโทเรนิคดำเนินการเช่นเดียวกับอาหารสมบูรณ์ แต่ไม่มีวิตามินชนิดนี้

ให้อาหาร 9% ของน้ำหนักปลาต่อวัน เปลี่ยนน้ำสองวันต่อครั้ง น้ำที่ใช้ระหว่างการทดลองเป็นน้ำบาดาลที่พักไว้ในถังไฟเบอร์อย่างน้อย 2 วัน และมีเครื่องให้อากาศตลอดเวลาในทุกตู้ คุณสมบัติของน้ำระหว่างการทดลองมีดังนี้ ปริมาณออกซิเจนละลาย 6.0 – 6.2 มก./ลิตร ความเป็นด่าง 320 – 341 มก./ลิตร ในรูปของแคลเซียมคาร์บอเนต ความเป็นกรดเป็นด่าง 7.5 – 7.6 ความกระด้าง 125 – 132 มก./ลิตร ในรูปของแคลเซียมคาร์บอเนต ปริมาณแอมโมเนียทั้งหมด 0.41 – 0.52 มก./ลิตร และอุณหภูมิ 27 – 29°C ซึ่งน้ำหนักปลาทุก 3 สัปดาห์ และปรับปริมาณอาหารทุกครั้งหลังจากซึ่งน้ำหนัก ข้อมูลที่ได้นำไปวิเคราะห์หาเหวี่ยง (Analysis of variance) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ระหว่างการทดลอง สังเกตพฤติกรรมและอาการของปลาที่ผิดปกติไป จากกลุ่มควบคุม บันทึกอัตรา

การตายของปลาในแต่ละตู้

การศึกษาพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อ

วิธีดำเนินการเหมือนกับการศึกษาการเจริญเติบโต โดยใช้ปลาคูกด้านขนาดเดียวกันใส่ตู้ละ 15 ตัว จำนวน 2 ตู้ ตู้แรกให้อาหารสมบูรณ์ อีกตู้หนึ่งให้อาหารที่ไม่มีกรดแพนโทเรนิค ทำการเก็บตัวอย่างเมื่อปลาเริ่มแสดงอาการผิดปกติ และเก็บตัวอย่างปลาจากตู้ที่เป็นกลุ่มควบคุมคองปลาในน้ำยาบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินเข้มข้น 10% นานอย่างน้อย 24 ชั่วโมง แล้วนำชิ้นส่วนของอวัยวะต่าง ๆ ไปผ่านขั้นตอนการทำเนื้อเยื่อ โดยฝังตัวอย่างในพาราฟาส ตัดด้วยเครื่องมือโครโตมหนา 5 – 6 ไมครอน ย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิลิน และอีโอซิน แล้วทำเป็นสไลด์ถาวรเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อต่อไป ส่วนปลาที่มีอาการผิดปกติบางส่วนจะนำไปแยกเชื้อแบคทีเรียจากไตและตับลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion agar ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและจำแนกชนิดตามวิธีของ Buchanan and Gibbons (1974)

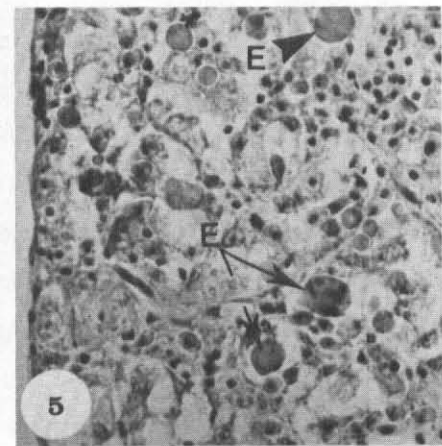
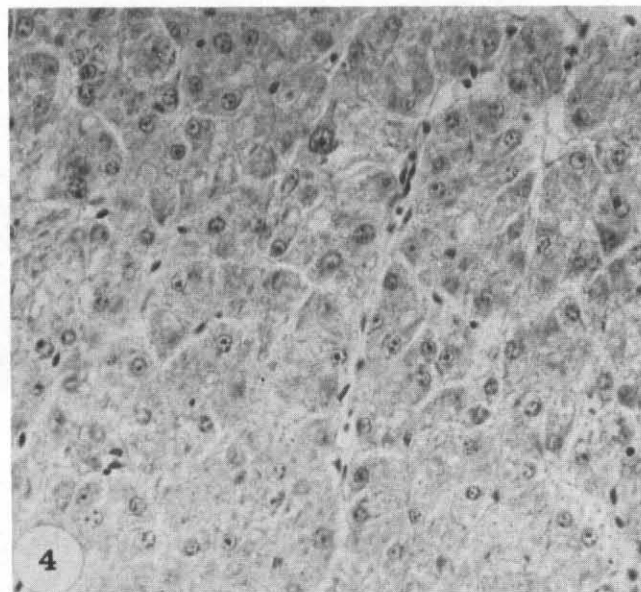
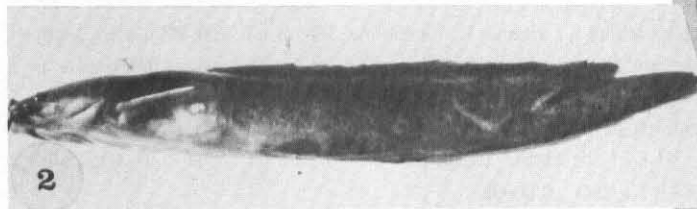
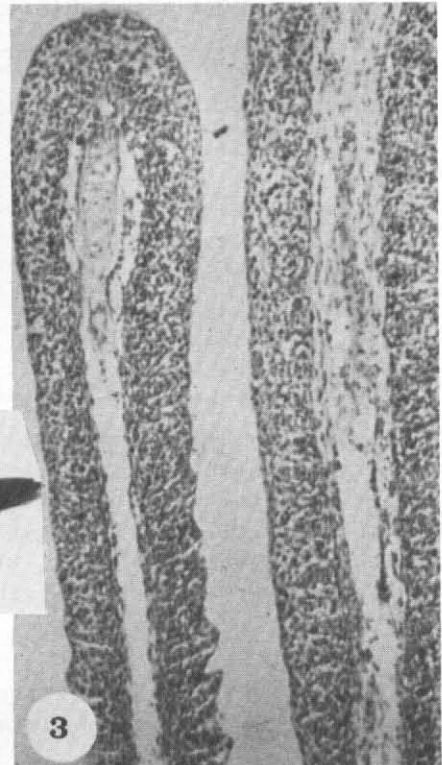
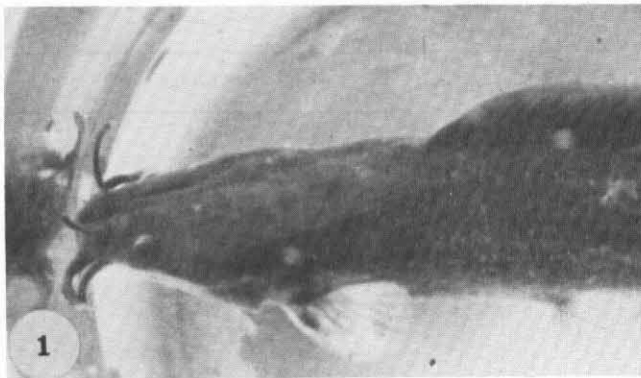


Figure 1. Walking catfish fed a pantothenic acid - free diet showed severe eroded barbels at 5 weeks.

Figure 2. Walking catfish fed a pantothenic acid - free diet showed severe eroded fins and hemorrhagic areas on fins and skin at 12 weeks.

Figure 3. Clubbed gills of pantothenic acid - deficient walking catfish, showing fusion of distal gill lamellae. (H & E; x 264)

Figure 4. Normal liver. (H & E; x 528)

Figure 5. Liver from walking catfish fed the pantothenic acid - free diet showing various sizes of eosinophilic granule. (E) (H & E; x 528)

Table 2 Average weight per fish at different periods for walking catfish fed complete diet and pantothenic acid - free diet for 12 weeks.^{1/}

Diet		Weeks				
		0	3	6	9	12
Complete diet	1	8.13	11.53	16.13	19.07	22.00
	2	8.00	11.07	15.33	18.33	19.20
	average	8.06 ^a	11.30 ^a	15.73 ^a	18.70 ^a	20.60 ^a
Pantothenic acid - free diet	1	8.67	13.00	14.73	14.60	14.00
	2	7.87	11.23	12.53	12.40	12.00
	average	8.27 ^a	12.11 ^a	13.63 ^a	13.50 ^b	13.00 ^b

^{1/}Values in columns not sharing a common superscript letter are significantly different.

Table 3 Accumulative mortality of walking catfish fed pantothenic acid - free diet for 12 weeks.

Diet	Accumulative death of fish						
							weeks
	0	2	4	6	8	10	12
Complete diet							
aquarium 1	15	0	0	0	0	0	0
aquarium 2	15	0	0	0	0	0	0
Pantothenic acid - free diet							
aquarium 1	15	0	0	3	4	7	12
aquarium 2	15	0	0	4	4	8	12

สัปดาห์ที่ 12 มีปลาตายอีก 9 ตัว ลักษณะของปลาที่ตายในสัปดาห์ที่ 12 มีปลาที่มีหนวดกุดสั้นเป็นจำนวนมาก แต่ปลาที่ตายบางตัวหนวดไม่กุด ลักษณะของปลาที่ตายทุกตัวจะมีการตกเลือดบนลำตัวเล็กน้อย สีของผิวหนังผิดปกติเป็นรอยด่างทั้งตัว ตามลำตัวเป็นรอยถลอก ครีบขาดแหว่งมาก (Figure 2)

การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

จากการศึกษาปลาดุกด้านที่เริ่มแสดงอาการผิดปกติในสัปดาห์ที่ 5 พบว่ากึ่งเหงือกมีการบวมน้ำ (edema) เล็กน้อย แต่เซลล์ผิวหนังยังไม่เพิ่มจำนวนขึ้น หนวดที่กุดสั้นบริเวณชั้น epidermis มีเซลล์ตายเป็นหย่อม ๆ และมีการตกเลือดในชั้น dermis อวัยวะภายใน เช่น ตับ ไต และม้าม ยังไม่ผิดปกติ ปลาที่มีอาการหนวดกุดในระยะต่อมาเซลล์ผิวหนังกึ่งเหงือกจะเพิ่มจำนวนขึ้น ส่วนปลาดุกด้านที่มีอาการหนักใกล้ตายในสัปดาห์ที่ 12 บริเวณผิวหนังบนลำตัวและครีบบวมมีเซลล์ตายเป็นหย่อม ๆ และพบการตกเลือดลึกลงไปถึงชั้นกล้ามเนื้อ อวัยวะภายใน เช่น ตับมีการเปลี่ยนแปลงมาก เซลล์ของตับมีรูปร่างผิดปกติไปจากปกติ มีการตาย (necrosis) และเกิดการอักเสบ (inflammation) เป็นแห่ง ๆ นอกจากนั้นจะพบ eosinophilic granule จำนวนมากขนาดต่าง ๆ กันกระจายทั่วไป (Figure 5) ม้ามจะถูกทำลายมากเช่นเดียวกับตับ และเห็นเป็นช่องว่างขนาดใหญ่อยู่ภายใน เซลล์ผิวหนังของกึ่งเหงือกบริเวณตอนปลายจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นจนทำให้กึ่งเหงือกเชื่อมติดกันมีลักษณะเป็น clubbed gills (Figure 3)

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียในตับและไต (trunk kidney) ของปลาที่มีอาการผิดปกติ ในสัปดาห์ที่ 5, 7 และ 9 ตรวจไม่พบแบคทีเรีย แต่สามารถแยกแบคทีเรียได้เป็นจำนวนมากจากปลาดุกด้านที่มีอาการหนักใกล้ตายในสัปดาห์ที่ 12 เมื่อทำการทดสอบทางชีวเคมีปรากฏว่าเป็นเชื้อ *Aeromonas hydrophila*

วิจารณ์

ปลาดุกด้านที่ขาดกรดแพนโทเทนิกมีการเจริญเติบโตต่ำและมีอัตราการตายสูง อาการของปลาดุกที่ขาดวิตามินชนิดนี้คล้ายกับที่เชษฐพงศ์ (2528) ทำการศึกษาในลูกปลาดุกขนาด 4 - 5 กรัม ส่วนปลาชนิดอื่น ๆ ที่มีการศึกษา ได้แก่ ปลา channel catfish (Dupree, 1966) จะมีครีบขาดแหว่งและมีบาดแผลตามลำตัว ปลา chinook salmon ที่ Halver (1957) ทำการศึกษาพบว่าถ้าขาดกรดแพนโทเทนิกจะมีอัตราการตายสูง และเป็นโรคเหงือก ส่วน McLaren *et al.* (1947) รายงานว่าปลา rainbow trout (*Salmo gairdneri*) ที่ขาดวิตามินชนิดนี้จะมีการเจริญเติบโตต่ำ แต่ Tunison *et al.* (1944) ไม่พบอาการผิดปกติในปลา silver salmon (*Oncorhynchus kisutch*) ที่ขาดวิตามินชนิดนี้

ลักษณะสำคัญในปลาชนิดอื่น ๆ ที่ขาดกรดแพนโทเทนิกคือจะมีความผิดปกติที่เหงือกมากโดยเซลล์ของกึ่งเหงือกจะเพิ่มจำนวนเซลล์ทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้นจนในที่สุดทำให้กึ่งเหงือกเชื่อมติดกัน การแลกเปลี่ยนออกซิเจนระหว่างเลือดและน้ำที่บริเวณกึ่งเหงือกจะไม่ได้เท่ากับปลาปกติ ทำให้ปลาเป็นโรคเหงือกติดเชื้อแบคทีเรียได้ง่ายในเวลาต่อมา แต่จากการศึกษาในครั้งนี้อย่างไรก็ตามปลาดุกด้านมีอาการผิดปกติทางเหงือกน้อยมาก โดยเฉพาะในระยะแรก ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับอาการผิดปกติภายนอก คือ หนวดกุดสั้น และครีบขาดร่อน ซึ่งเป็นลักษณะที่เด่นชัดมากตั้งแต่สัปดาห์ที่ 5 ลักษณะของเหงือกปลาดุกที่ผิดปกติคล้ายกับการขาดกรดแพนโทเทนิกทั่ว ๆ ไป ต้องใช้เวลานานมากคือสัปดาห์ที่ 12 ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะปลาดุกเป็นปลาที่มีอวัยวะช่วยในการหายใจคือ dendrite การใช้เหงือกในการแลกเปลี่ยนออกซิเจน คงจะไม่มีประสิทธิภาพเท่ากับปลาชนิดอื่น ๆ ที่ไม่มีอวัยวะดังกล่าว จากพฤติกรรมของปลาดุกที่จะขึ้นมาสูดอากาศตลอดเวลา ทำให้เหงือก

อาจจะทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนออกซิเจนน้อยกว่าปลาชนิดอื่น ๆ ดังนั้นความผิดปกติที่เหงือกจึงมีความรุนแรงน้อยกว่าปลาชนิดอื่น ๆ ด้วย

ปลาคูที่ขาดกรดแพนโทเทนิคในระยะแรก ๆ ไม่พบความผิดปกติในอวัยวะภายใน แต่ปลาที่มีอาการหนักในสัปดาห์ที่ 12 สามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* เป็นจำนวนมากจากตับ และไต ดังนั้นความผิดปกติส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นในอวัยวะภายใน คงจะมาจากทอกซินที่ผลิตโดยแบคทีเรีย การขาดกรดแพนโทเทนิคทำให้ปลาเบื่ออาหารมีอาการผิดปกติ เมื่อขาดเป็นเวลานาน ๆ ปลาจะอ่อนแอติดเชื้อแบคทีเรียและเกิดโรคได้ โดยเฉพาะ *A. hydrophila* ซึ่งตามปกติจะทำให้ปลาเป็นโรคได้ง่ายเมื่อปลาอ่อนแอ

จากการทดลองครั้งนี้จะเห็นได้ว่าปลาคูกด้านต้องการกรดแพนโทเทนิคเพื่อการเจริญเติบโตเป็นปกติเช่นเดียวกับปลาชนิดอื่น ๆ แต่ในสภาพตามธรรมชาติและในการเลี้ยงปลาคูกทั่ว ๆ ไป โอกาสที่ปลาจะขาดกรดแพนโทเทนิคคงจะเป็นไปได้ยาก เนื่องจากอาหารที่ใช้เลี้ยงปลาคูกด้านส่วนใหญ่ซึ่งเป็นเนื้อปลาสดจะมีวิตามินชนิดนี้อย่างเพียงพออยู่แล้ว

เอกสารอ้างอิง

เชษฐพงศ์ บุตรเทพ. 2526. ผลของวิตามินละลายน้ำที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของลูกปลาคูกด้าน. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ประเสริฐ สีตะสิทธิ์, นันทิยา อุ้นประเสริฐ และวิมล จันทร์โรทัย. 2527. ความต้องการวิตามินที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและอัตราการเหลือรอดของลูกปลาคูกอุย. เอกสารวิชาการฉบับที่ 36. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ. กรมประมง.

Aoe, H., I. Masuda and T. Takada. 1967. Water-soluble vitamin requirements of carp-III. Requirement for niacin. Bull. Jpn. Soc. Fish. 33 : 681 - 685.

Aoe, H., I. Masuda, T. Saito and A. Komo. 1969. Water-soluble vitamin requirements of carp-VI. Requirement for thiamine and effects of antithiamines. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 35(5) : 355 - 360.

Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore. 1268 p.

Dupree, H.K. 1966. Vitamins essential for growth of channel catfish. Bureau of Sport Fish and Wildl. Tech. Paper. No. 7, 12 p.

Halver, J.E. 1957. Nutrition of salmonid fish-III. Water-soluble vitamin requirements of chinook salmon. J. Nutr. 62 : 225 - 243.

McLaren, B.A., D. Keller, D.J. O Donnell and C.A. Elevehjem. 1947. The nutrition of rainbow trout I. Studies on vitamin requirements. Arch. Biochem. 15 : 169 - 185.

Tunison, A.V., A.M. Phillips, H.B. Shaffer, J.M. Maxwell, D.R. Brockway and C.M. McCay. 1944. The nutrition of trout. In Rucher, R.R., E.H. Johnson and M.G. Kaydas. An interior report on gill diseases. Prog. Fish - Culturist. 14 : 10.