



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره سوم، شماره چهارم، زمستان ۹۴

<http://jair.gonbad.ac.ir>

تأثیر ترکیب ال-کارنیتین (L-Carnitine) و بتائین (Betaine) جیره با منابع روغنی مختلف، بر فراسنجه‌های رشد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و مقاومت در برابر استرس‌های محیطی در بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)

ریحانه حیدری^۱، سعید مشکینی^{۲*}، ابراهیم حسین نجدگرمی^۳

^۱دانشجوی کارشناسی‌ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

^۲استادیار گروه بهداشت و مواد غذایی، دانشکده‌های دامپزشکی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

^۳استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ ارسال: ۹۴/۱۰/۲۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱/۱۵

چکیده

بتائین (Betaine) و ال‌کارنیتین (L-Carnitine) به‌عنوان دو مکمل مهم غذایی در صنعت آبی‌پروری مورد استفاده قرار می‌گیرند. به منظور بررسی اثرات متقابل این دو ماده و نوع روغن جیره بر شاخص‌های رشد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و مقاومت در برابر استرس‌های محیطی، طرحی با چهار تیمار (۱- جیره حاوی روغن ماهی، ۲- روغن ماهی + بتائینو ال‌کارنیتین، ۳- روغن ذرت، ۴- روغن ذرت + بتائینو ال‌کارنیتین) با سه تکرار به مدت دو ماه روی ۴۲۰ قطعه بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) با وزن اولیه (۹/۹ ± ۰/۱) طراحی و اجرا شد. میزان بتائین و ال‌کارنیتین مصرفی به ترتیب ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بودند. داده‌های نهایی طرح بر اساس آنالیز واریانس دوطرفه تجزیه و تحلیل شدند. نتایج نشان داد که هر یک از متغیرهای آزمایش (مکمل‌ها و روغن) به‌صورت مجزا تأثیر معنی‌دار بر افزایش وزن بچه ماهیان نداشتند در حالی‌که تأثیرات متقابل آنها برافزایش وزن معنی‌دار بوده است ($p < 0/05$). همچنین نتایج نشان داد که استفاده از بتائین و ال‌کارنیتین به‌صورت مستقل بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی تأثیر معنی‌دار نداشته ($p > 0/05$) و بلعکس تأثیرات متقابل این مکمل‌ها با نوع روغن مصرفی در جیره، بر فعالیت آمیلاز و آلکالین فسفاتاز معنی‌دار بوده است ($p < 0/05$). استفاده از جیره‌های غذایی مورد بررسی تأثیر معنی‌دار بر مقاومت بچه‌ماهیان در برابر استرس اکسیژن و شوری نداشته است اگرچه بتائین و ال‌کارنیتین به‌صورت مستقل و همچنین توأم با روغن جیره به‌طور معنی‌داری میزان مقاومت بچه‌ماهیان را در برابر استرس حرارتی افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: *O. mykiss*، ال‌کارنیتین، بتائین، آنزیم‌های گوارشی، استرس‌های محیطی

*نویسنده مسئول: s.meshkinii@yahoo.com

مقدمه

رشد سریع صنعت آبی‌پروری، تقاضا برای نهاده‌های غذایی در جیره‌های غذایی آبزیان را نیز افزایش داده است. مهم‌ترین منابع تأمین نهاده‌ها غذایی آبزیان (پودر و روغن ماهی) ذخایر طبیعی آبزیان در اقیانوس‌ها می‌باشند که در حال حاضر این صنعت برای تأمین این نهاده‌ها با چالش جدی مواجه است. بنابراین لازمه توسعه پایدار (Sustainable development) صنعت آبی‌پروری، توجه به مقوله استفاده از منابع پایدار و مطمئن برای جیره‌های غذایی می‌باشد (Beel *et al.*, 2002). کمبود منابع آب در کنار لزوم تأمین نهاده‌های غذایی برای آبزیان، از دیگر چالش‌های اساسی پیش رو در صنعت آبی‌پروری می‌باشد. استفاده بی‌رویه از منابع آبی و همچنین تغییرات اقلیمی کره زمین، از جمله دلایل کمبود این عنصر کلیدی در این صنعت می‌باشد که متخصصان را بر آن داشته تا با استفاده از سیستم‌های گوناگون راهکارهایی را جهت حل این مشکل ارائه دهند (De Schryver *et al.*, 2008). استفاده از مواد افزودنی و مکمل‌ها در جیره‌های غذایی آبزیان از جمله راهکارهایی است که در چند دهه اخیر محققان برای افزایش کارایی جیره‌های غذایی و در نتیجه کاهش مصرف نهاده‌ها و آب پیشنهاد داده‌اند. این مکمل‌ها از طریق افزایش راندمان غذایی، افزایش مقاومت ماهی در برابر استرس‌های محیطی، تقویت سیستم ایمنی ماهی و کاهش طول دوره پرورش ماهی در کاهش مصرف نهاده‌های غذایی و همچنین آب نقش عمده‌ای بازی می‌کنند. از جمله این مواد می‌توان به بتائین اشاره کرد. این ماده از جمله مواد جاذب غذایی (Attractant) در جیره‌های آبزیان می‌باشد که از طریق افزایش سرعت بلع غذا، زمان باقی ماندن غذا در آب را کاهش داده و از حل شدن عناصر غذایی محلول و در نتیجه آلودگی آب جلوگیری می‌کند. از طرفی مصرف غذا با حداقل ضایعات، بازدهی غذایی بالایی را در پی خواهد داشت (Mackie, 1987; Coman *et al.*, 1996; Jobling *et al.*, 2001). این ماده به‌عنوان تنها دهنده مستقیم گروه متیل، نقش مهمی در تأمین این گروه در بدن دارد که می‌تواند در واکنش‌های ترانس متیلاسیون برای ساخت موادی مانند کراتین، فسفاتیدیل کولین، کارنتین، آدرنالین، متیونین و متیل پورین‌ها مورد استفاده قرار گیرد، که در متابولیسم پروتئین و انرژی نیز نقش کلیدی دارند (Kolkovski *et al.*, 1997; Tiril *et al.*, 2008). تأثیرات این ماده بر بهبود پارامترهای رشد و بازماندگی در بسیاری از ماهیان در منابع مختلف گزارش شده است (Virtanen *et al.*, 1989; Virtanen *et al.*, 1994; Kolkovski *et al.*, 1997; Knights, 1996). یکی دیگر از مکمل‌ها ال کارنیتین می‌باشد که نوعی پروویتامین (Provitamin) است که قبلاً تحت عنوان ویتامین BT یا B₁₁ شناخته می‌شد. این ماده در بدن عمدتاً در کبد ساخته شده و در بافت‌هایی مانند ماهیچه اسکلتی و قلب که اسیدهای چرب به‌عنوان عمده‌ترین منبع تأمین انرژی است، تجمع می‌یابد (Mc Dowell, 1989; Ozorio, 2001).

تأثیر ترکیب ال-کارنیتین (L-Carnitine) و بتائین (Betaine) جیره با منابع روغنی مختلف...

ال کارنیتین توانایی کاتابولیسم چربی را افزایش می‌دهد و ممکن است منجر به صرفه جویی در مصرف پروتئین شود (Harpez, 2005).

امروزه سعی بر این است تا با جایگزینی بخشی از روغن ماهی مورد استفاده در جیره آبزیان با روغن‌های گیاهی، بخشی از نیاز انرژی ماهی از روغن‌های گیاهی تأمین شود. با توجه به منابع مختلف، روغن‌های گیاهی دارای مقادیر زیادی اسیدهای چرب n6 در ترکیب خود می‌باشند و با توجه به اهمیت اسیدهای چرب n3 که در روغن ماهی فراوان می‌باشد و دارای اهمیت کلیدی در ساختار دیواره سلولی و فسفولیپیدها می‌باشد جایگزینی این روغن با روغن‌های گیاهی می‌تواند بر میزان رشد، تأثیرگذار باشد (Kowalska et al., 2012). بنابراین با استفاده از مکمل‌های غذایی می‌توان این کاهش رشد را با تغییراتی که در جیره غذایی ماهیان می‌توان انجام داد جبران کرد. منابع زیادی در رابطه با استفاده از بتائین و ال کارنیتین در جیره‌های غذایی آبزیان وجود دارد ولی متأسفانه منبعی که استفاده همزمان این دو مکمل را با توجه به ویژگی‌های ارزشمند آنها، در جیره‌های آبزیان پیشنهاد کند وجود ندارد. با توجه به دستیابی به بیوتکنیک تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در کشور و اهمیت آن در سبد تولید آبزیان ایران که در حال حاضر دومین تولید کننده این ماهی در جهان می‌باشد (سازمان خواربار و کشاورزی، ۱۳۹۴)، این آزمایش با هدف بررسی تأثیرات استفاده همزمان دو مکمل غذایی بتائین و ال-کارنیتین و نوع روغن مورد استفاده در جیره و تأثیرات متقابل این دو متغیر، طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی شرایط آزمایش و تیمارها: تعداد ۵۵۵ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی $9/1 \pm 0/35$ از یکی از مزارع تکثیر و پرورش قزل‌آلا در استان آذربایجان غربی خریداری و به مخازن ۱۰۰۰ لیتری سالن تکثیر و پرورش پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه دانشگاه ارومیه منتقل شد. برای سازگاری با شرایط آزمایش ماهیان به مدت دو هفته با جریان آب $6/5$ لیتر در دقیقه در سالن نگهداری شدند. پس از سازگاری، ماهی‌ها با نمک محلول پنج درصد ضدعفونی شدند و در ۱۲ تانک ۳۰۰ لیتری فایبرگلاس (حاوی ۱۵۰ لیتر آب) که قبلاً با فرمالین ضدعفونی شده بودند با تراکم ۳۷ عدد بچه ماهی در هر حوضچه، به مدت هشت هفته، با دبی آب $4/3$ لیتر در دقیقه ذخیره‌سازی شدند. بچه‌ماهیان به مدت دو ماه با چهار جیره (جیره حاوی روغن ماهی، جیره حاوی روغن ماهی + بتائین و ال کارنیتین، جیره حاوی روغن ذرت، جیره حاوی روغن ذرت + بتائین و ال کارنیتین) تغذیه شدند. ترکیب و نوع جیره‌ها در جدول شماره ۱ ارائه شده است.

غذادهی در طول کل دوره به صورت دستی، بر اساس سیری و در سه نوبت صبح، ظهر و عصر (ساعات ۸، ۱۳، ۱۹) انجام گرفت. در هر وعده غذادهی، با استفاده از ۱۲ ظرف آزمایشگاهی جدا برای

هر تکرار انجام شد. در طول دوره پرورش، پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب نظیر دما، pH با استفاده از pH متر ساخت شرکت CRISON اسپانیا، میزان اکسیژن محلول با استفاده از اکسیژن متر الکتریکی (USA, HANNA instrument) اندازه‌گیری گردید که بر اساس اندازه‌گیری‌ها میزان دمای آب در طول دوره حدود ۱۴ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن ۸/۲ میلی‌گرم در لیتر و pH آب ۷/۰۷ بود.

جدول ۱: ترکیب جیره‌های مورد استفاده بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) در طول دوره پرورشی

روغن ماهی	روغن ماهی + بتائین و آل- کارنتین	روغن ذرت	روغن ذرت + بتائین و آل کارنتین
۴۳/۱	۴۳/۱	۴۳/۱	۴۳/۱
۱۸/۴	۱۸/۴	۱۸/۴	۱۸/۴
۲۶	۲۶	۲۶	۲۶
۶	۶	-	-
-	-	۶	۶
۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
۱	۱	۱	۱
۲	۲	۲	۲
۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
آنالیز تقریبی ترکیبات (درصدی از ماده خشک)			
۴۸/۲			پروتئین خام
۱۸/۸۶			چربی خام
۸/۲۳			کربوهیدرات
۱۲/۲۵			خاکستر
۱۲/۴۱			رطوبت
۲۰۲۵			انرژی

محاسبه شاخص‌های رشد و درصد بازماندگی: در پایان دوره برای بررسی وضعیت رشد ماهی‌ها و مقایسه عملکرد تیمارهای مختلف، شاخص‌های رشد شامل ضریب تبدیل غذایی، ضریب رشد ویژه، درصد افزایش وزن بدن محاسبه گردید (Shepherd and Bromage, 1992; Tacon, 1990).

سنجش فعالیت‌های آنزیمی: جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های گوارشی، نمونه‌برداری در پایان دوره پرورشی صورت پذیرفت. عمل غذایی ماهیان ۲۴ ساعت قبل از انجام نمونه‌برداری قطع گردید. از هر تیمار نه قطعه (از هر تانک سه قطعه ماهی) به‌صورت کاملاً تصادفی انتخاب و بعد از بیهوشی

تأثیر ترکیب ال-کارنیتین (L-Carnitine) و بتائین (Betaine) جیره با منابع روغنی مختلف...

کامل با ۲۰۰ ppm پودر گل میخک، کل دستگاه گوارش بچه ماهیان (لوله گوارشی) از ابتدای معده تا مخرج نمونه برداری گردید. در پایان تمامی نمونه‌ها بلافاصله به فریزر ۸۰- سانتی‌گراد منتقل شدند (Lemieux *et al.*, 1999). هر کدام از تکرارها در یک بافر 100 mM Tris-HCl buffer, 0.1 mM EDTA, 0.1% triton X-100, pH 7.8 با نسبت ۱ به ۹ با دستگاه هموژنایزر (Heidolph, Instruments Switzerland) هموژنایز شدند. با توجه به شرایط خاص آنزیم‌های گوارشی تمام مراحل تهیه محلول آنزیم‌های گوارشی از هموژنایز تا سانتریفیوژ در ۴ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. محلول هموژنایز شده با سرعت ۲۰۰۰۰ g برای ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و محلول بالایی پس از جمع‌آوری به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

فعالیت آنزیم آمیلاز که بر اساس روش ماتیس و بیت انجام گرفت با استفاده از محلول ۰/۳ درصد نشاسته محلول به‌عنوان سوبسترا در بافر NaH_2PO_4 با pH برابر ۷/۴ انجام شد. میزان فعالیت آمیلاز بر اساس میزان نشاسته تجزیه شده در طول ۳۰ دقیقه در یک میلی‌لیتر هموژنات در ۳۷ درجه سانتی‌گراد محاسبه شد. فعالیت لیپاز با توجه به تأثیر هموژنات بر سوبسترای p-nitrophenol myristate در بافر ۰/۲۵ مولار Tris-HCl در pH برابر ۹ به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰ درجه سانتی‌گراد محاسبه شد. بر اساس تعریف یک قسمت از فعالیت لیپاز (U/ml) برابر با مقداری است که بتواند یک میکرومول از سوبسترا را در یک دقیقه در ۳۰ درجه حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد هیدرولیز کند (Iijima *et al.*, 1998). فعالیت آلکالین فسفاتاز بر اساس روش بیزی و همکاران (Bessy *et al.*, 1946) سنجش شد که در این روش از محلول 4-nitrophenyl phosphate در بافر ۳۰ میلی‌مولار NaHCO_3 در pH برابر ۹/۸ در ۳۷ درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان سوبسترا استفاده می‌شود.

میزان پروتئین کل در هموژنات بر اساس روش (Bradford, 1976) با استفاده از آلبومین گاوی به‌عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد. فعالیت ویژه این آنزیم‌ها بر اساس فعالیت آنزیم به ازای میلی‌گرم پروتئین بیان شد (U/mg protein).

آزمایش مقاومت در برابر استرس‌های محیطی: در انتهای آزمایش از هر تکرار ۶ عدد ماهی (از هر تیمار ۱۸ عدد) به‌طور کاملاً تصادفی انتخاب و در معرض استرس کمبود اکسیژن، افزایش دما و شوری قرار داده شد. برای جلوگیری از بروز اشتباه در نتیجه‌گیری، ماهی‌های نمونه‌برداری شده فقط یک‌بار و فقط در معرض یک استرس، بصورت یک‌باره، قرار گرفتند.

تنش کمبود اکسیژن: ۱۸ قطعه از هر تیمار در انتهای طرح در داخل ساچوک به مدت ۱۰ دقیقه به منظور سنجش تنش کمبود اکسیژن، نگهداری شد و پس از آن به آب جاری با دمای دوره پرورشی برگردانده شد. با شمارش تعداد تلفات ماهیان در طول مدت استرس و پس از آن تا ۲۴ ساعت، میزان

مقاومت ماهیان در تیمارهای مختلف نسبت به استرس کمبود اکسیژن سنجیده شد (Takami *et al.*, 2005).

استرس حرارتی: ۱۸ قطعه از هر تیمار در انتهای طرح به مدت سه ساعت تحت تنش حرارتی بالا (۱۰ درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای دوره پرورشی) قرار داده شد و پس از آن به آب جاری با دمای دوره پرورشی برگردانده شد. با شمارش ماهیان در طول مدت استرس و پس از آن تا ۲۴ ساعت، میزان مقاومت ماهیان در تیمارهای مختلف نسبت به استرس گرمایی سنجیده شد (Asadi *et al.*, 2010).

شوری بالا: ۱۸ قطعه از هر تیمار در انتهای طرح به آب با شوری ۳۵ در هزار به مدت ۳ ساعت معرفی و سپس پس از زمان ذکر شده به آب جاری معمولی برگردانده شد. مشابه آزمایشات قبلی تعداد تلفات ماهیان در دوره استرس شوری و پس از آن تا ۱۲ ساعت ثبت شد (Niroomand *et al.*, 2011).

آنالیز داده‌ها: برای آنالیز داده‌های حاصل از زیست‌سنجی و آنالیز اسیدهای چرب از برنامه آماری Spss استفاده شد. داده‌ها در مرحله اول از بابت همسان بودن واریانس‌ها (Homogeneity of variances) مورد بررسی قرار گرفتند. بعد از اطمینان از همسانی واریانس‌ها، آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح معنی‌دار ۹۵ درصد اجرا شد. برای تعیین معنی‌دار بودن بین میانگین‌ها از تست دانکن استفاده شد.

نتایج

شاخص‌های رشد: نتایج تأثیر استفاده همزمان از دو متغیر ترکیب بتائین و آل کارنیتین و همچنین نوع روغن در جیره، بر پارامترهای شاخص رشد در جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود. بر اساس این نتایج، تأثیر هر یک از این متغیرها (ترکیب بتائین + آل کارنیتین، نوع روغن) به تنهایی بر میزان وزن نهایی و افزایش وزن بچه ماهیان معنی‌دار نبوده است ($p > 0.05$) ولی تأثیرات متقابل آنها بر این پارامترها معنی‌دار شد ($p < 0.05$) و بالاترین میزان افزایش وزن در تیمار دوم (روغن ماهی و بتائین + آل کارنیتین) و سوم (روغن ذرت) مشاهده شد. همچنین نتایج طرح نشان داد که تأثیرات این متغیرها چه به صورت مجزا و چه ترکیب با همدیگر، تأثیر معنی‌داری بر ضریب تبدیل غذایی ندارد ($p > 0.05$) ولی تأثیرات آنها به صورت مجزا بر ضریب رشد ویژه بچه ماهیان معنی‌دار بوده ($p < 0.05$) در حالی که تأثیرات متقابل آنها بر این پارامتر معنی‌دار نبوده است ($p > 0.05$).

فعالیت آنزیم‌های گوارشی: نتایج حاصل از فعالیت آنزیم‌های گوارشی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در انتهای دوره پرورش در جدول شماره ۳ ارائه شده است. نتایج این طرح نشان داد که استفاده از بتائین + آل کارنیتین و همچنین نوع روغن، بر میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی بچه ماهیان

تأثیر ترکیب ال-کارنیتین (L-Carnitine) و بتائین (Betaine) جیره با منابع روغنی مختلف...

تأثیر معنی‌دار داشته است ($p < 0.05$). بر اساس این نتایج، متغیرهای بتائین + ال کارنیتین و نوع روغن بر فعالیت آنزیم‌های آمیلاز به‌صورت مستقل تأثیر معنی‌دار نداشته در حالی که تأثیر متقابل آن‌ها بر فعالیت این آنزیم معنی‌دار بود است ($p < 0.05$) و بیشترین میزان فعالیت آنزیم آمیلاز در تیمارهای دوم و سوم دیده می‌شود. همچنین نتایج نشان داد که تأثیر نوع روغن در جیره بچه‌ماهیان به‌صورت مستقل بر میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز معنی‌دار بوده است ($p < 0.05$). در حالی که بتائین + ال کارنیتین بر فعالیت این آنزیم‌ها به‌صورت مستقل تأثیری نداشته است. تأثیرات متقابل این دو عامل بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز معنی‌دار بوده است ($p < 0.05$). استفاده از جیره‌های حاوی بتائین + ال کارنیتین و همچنین تغییر نوع روغن بر فعالیت آنزیم لیپاز در بچه‌ماهیان در این طرح معنی‌دار نبود است ($p > 0.05$).

جدول ۲: جدول آنالیز واریانس دو طرفه تأثیرات همزمان استفاده از روغن‌های مختلف و بتائین و ال کارنیتین بر رشد بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*).

پارامترها	جیره‌ها				P value		
	روغن ماهی	روغن ماهی+بتائین و ال کارنیتین	روغن ذرت	روغن ذرت+ بتائین و ال کارنیتین	روغن	بتائین+ ال- کارنیتین	روغن+ بتائین+ال- کارنیتین
وزن اولیه (گرم)	9/1±0/35	9/1±0/26	9/0±0/15	9/2±0/28	-	-	-
وزن نهایی (گرم)	33/2±0/73	38/8±2/5	38/4±2/8	35/3±2/9	NS	NS	**
اختلاف وزن (گرم)	23/1±1/0	29/3±2/4	28/4±2/9	26/0±2/6	NS	NS	**
ضریب رشد ویژه	2/09±0/0	2/25±0/0	2/25±0/0	2/3±0/0	**	**	NS
ضریب تبدیل غذایی	1/38±0/0	1/33±0/0	1/37±0/1	1/46±0/0	NS	NS	NS

NS داده‌ها در سطح ($\alpha=0.05$) اختلاف معنی‌دار ندارند.

** داده‌ها در سطح ($\alpha=0.05$) اختلاف معنی‌دار دارند.

مقاومت بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) در برابر استرس‌های محیطی: نتایج تأثیر استفاده همزمان از دو متغیر ترکیب بتائین + ال کارنیتین و همچنین نوع روغن استفاده شده در جیره، بر مقاومت بچه‌ماهیان در برابر استرس‌های محیطی در جدول ۴ مشاهده می‌شود. بر اساس این نتایج، استفاده از ترکیب این مکمل‌ها و همچنین تغییر نوع روغن، به‌صورت مستقل و هم به‌صورت اثر متقابل، تأثیر معنی‌داری بر مقاومت بچه‌ماهیان در برابر استرس شوری و اکسیژن نداشته است ($p > 0.05$) ولی بتائین + ال کارنیتین به‌صورت مستقل و هم به‌صورت اثر متقابل با نوع روغن، میزان مقاومت بچه‌ماهیان در برابر استرس حرارتی را به‌طور معنی‌داری افزایش دادند ($p < 0.05$).

جدول ۳: جدول آنالیز واریانس دو طرفه فعالیت آنزیم‌های گوارشی بچه‌ماهیان در انتهای دوره پرورش بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*).

پارامترها	جیره‌ها				P value		
	روغن ماهی	روغن ماهی+بتائین و ال کارنتین	روغن ذرت	روغن ذرت+بتائین و ال کارنتین	روغن	بتائین+ ال کارنتین	روغن+بتائین +ال کارنتین
لیپاز	۴۴/۳ ± ۸/۳	۳۳/۰ ± ۷/۰	۳۴/۵ ± ۱۲/۰	۱۵/۰ ± ۴/۸	ns	Ns	Ns
آمیلاز	۰/۵۷ ± ۰/۱	۰/۹۱ ± ۰/۳	۰/۹ ± ۰/۲	۰/۱۶ ± ۰/۰	ns	Ns	*
آلكالین فسفاتاز	۰/۰۳۷ ± ۰/۰	۰/۰۲۴ ± ۰/۰	۰/۰۴۸ ± ۰/۰	۰/۰۸۱ ± ۰/۰	*	Ns	*

ns داده‌ها در سطح ($\alpha=0.05$) دارای اختلاف معنی‌دار نیستند.

* داده‌ها در سطح دارای ($\alpha=0.05$) اختلاف معنی‌دار هستند.

جدول ۴: جدول آنالیز واریانس دو طرفه تأثیرات همزمان استفاده از روغن‌های مختلف و بتائین و ال کارنتین بر مقاومت بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) در برابر استرس‌های محیطی.

پارامترها	جیره‌ها				P value		
	روغن ماهی	روغن ماهی+بتائین و ال کارنتین	روغن ذرت	روغن ذرت+بتائین و ال کارنتین	روغن	بتائین+ ال کارنتین	روغن+بتائین - ال کارنتین
استرس اکسیژن	۳۳/۳ ± ۰/۰	۴۴/۴ ± ۱۹/۲	۳۳/۳ ± ۰/۰	۴۴/۴ ± ۱۹/۲	ns	ns	Ns
استرس حرارت	۵۰/۰ ± ۰/۰	۸۷/۵ ± ۱۷/۵	۷۵/۰ ± ۰/۰	۸۳/۳ ± ۱۴/۴	ns	*	*
استرس شوری	۷۵/۰ ± ۰/۰	۸۳/۳ ± ۱۴/۴	۸۷/۵ ± ۱۷/۶	۸۷/۵ ± ۱۷/۶	ns	ns	Ns

ns داده‌ها در سطح ($\alpha=0.05$) دارای اختلاف معنی‌دار نیستند.

* داده‌ها در سطح دارای ($\alpha=0.05$) اختلاف معنی‌دار هستند.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مطالعات مختلف نشان داده است که استفاده از جیره‌های غذایی مناسب، مواد محرک رشد و دستکاری‌های ژنتیکی می‌تواند در افزایش تولید مزارع پرورش ماهی کمک شایانی کند (Becker et al., 1999). در این میان استفاده از مکمل‌های رشد طبیعی که برخلاف آنتی‌بیوتیک‌ها تأثیرات سوء بر بافت و فلور میکروبی آبزیان ندارند گسترش زیادی در بخش صنعت آبزی‌پروری داشته است. از جمله این محرک‌های رشد طبیعی، می‌توان به ال کارنتین و بتائین اشاره کرد که تأثیرات مثبت استفاده از آن‌ها به صورت مجزا به عنوان یک مکمل غذایی در جیره غذایی انواع آبزیان به اثبات رسیده است. با توجه به تأثیرات مثبت این دو ماده بر رشد و پارامترهای فیزیولوژیکی گونه‌های مختلف آبزی، بررسی اثرات سینرژیکی ترکیب آنها در کنار تغییر روغن، می‌تواند به بهتر شدن فرمولاسیون جیره‌های غذایی

آبزیان کمک شایانی کند. در این تحقیق نتایج استفاده و یا عدم استفاده از ترکیب بتائین+ ال کارنیتین در دو جیره روغن ماهی و روغن ذرت با استفاده از آنالیز واریانس دو طرفه بررسی شد و نتایج نشان داد که استفاده از مکمل و همچنین نوع روغن در جیره غذایی بچه ماهیان قزل آلاهی رنگین کمان به صورت مستقل تأثیر معنی دار بر میزان افزایش رشد، وزن نهایی و ضریب تبدیل غذایی در بچه ماهیان ندارد ولی به صورت ترکیبی، این دو متغیر (مکمل و روغن) می تواند رشد بچه ماهیان را به طور معنی داری دستخوش تغییر نماید و بالاترین میزان رشد در تیمار دوم (روغن ماهی و بتائین + ال کارنیتین) و سوم (روغن ذرت) مشاهده شد. دلیل افزایش رشد در تیمار سوم که تیمار روغن ذرت می باشد روشن نیست. شاید این افزایش وزن به علت تجمع چربی حاصل از روغن گیاهی موجود در جیره باشد. ولی در مورد تیمار دوم که تیمار روغن ماهی به همراه ال کارنیتین و بتائین می باشد به نظر می رسد به دلیل وجود مکمل های غذایی به همراه روغن ماهی باشد. بتائین به عنوان یک ماده محلول در آب، دارای خاصیت تحریک کنندگی گیرنده های بویایی و چشایی ماهی است (Polat and Beklevik, 1999). همچنین این ماده در نقش یک ماده لیپوتروپیک، با حذف مواد چربی از سلول های کبدی در افزایش کارایی آن و در نتیجه بهبود عملکرد کبد که از اندام های کلیدی بدن در بحث متابولیسم مواد غذایی است نقش به سزایی ایفا می کند (Shankar et al., 2008). از طرف دیگر ال کارنیتین به عنوان یک اسید آمینه با تحریک اکسیداسیون اسیدهای چرب و در نتیجه ذخیره پروتئین باعث بهبود پارامترهای رشد و نمو در برخی از گونه های آبی شده است. تأثیرات مثبت استفاده از این دو ماده به صورت مجزا در جیره های غذایی آبزیان در گونه هایی مانند بچه ماهیان سی باس اروپایی (*Dicentrarchus labrax*)، گربه ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*)، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) میگوی سفید هندی (*Penaeus indicus*) برای ال کارنیتین (Santulli and D'Amelio, 1986; Torreele et al., 1993; Becker and Focken, 1995; Jayaprakas and Sambhu, 1996) و بچه ماهیان قزل آلاهی رنگین کمان (*O. mykiss*)، بچه ماهیان تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*)، لارو گربه ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) سوف انگشت قد (*Sander lucioperca*) برای بتائین به اثبات رسیده است (Can and Sener, 1992; Clarke et al., 1994; Polat and Beklevik, 1999; Kasper et al., 2002; Yilmaz, 2005; Tiril et al., 2008).

فعالیت آنزیم های گوارشی به عنوان یک شاخص گوارشی و وضعیت تغذیه ای در ماهیان مطرح می باشد (Ueberschar, 1988) و تغییر در جیره غذایی ماهیان، فعالیت آنزیم های گوارشی را تغییر می دهد (Mohapatra et al., 2001). در این آزمایش فعالیت آنزیم های گوارشی بچه ماهیان تحت تأثیر دو عامل متغیر روغن و مکمل غذایی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که استفاده از مکمل های غذایی به صورت مستقل با میزان استفاده شده در این آزمایش، تأثیری در فعالیت آنزیم های گوارشی ندارد. نتایج مشابه به استثناء آلکالین فسفاتاز برای عامل متغیر روغن مشاهده شد. ولی وقتی

این دو عامل متغیر با هم وارد عمل شدند (اثر متقابل) تغییرات فعالیت آنزیم‌های گوارشی معنی‌دار شد. به‌طور کلی بالاترین فعالیت آنزیم‌های گوارشی (آمیلاز و آلکالین فسفاتاز) در تیمار دوم و سوم مشاهده شد که دارای بالاترین میزان افزایش رشد بودند. متأسفانه هیچ‌گونه منبع معتبری در آبریان در رابطه با تأثیرات مکمل‌های غذایی مانند بتائین و ال کارنیتین وجود نداشت و تنها منبعی که با توجه به بررسی‌های نگارنده پیدا شد در رابطه با استفاده از بتائین در بلدرچین ژاپنی (*Coturnix japonica*) بود که افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی با افزایش غلظت آن در جیره تا میزان ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم غذا مشاهده شد (Abdel-Fattah *et al.*, 2014) که دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی را افزایش میزان غذای مصرفی به علت افزایش جذابیت غذایی در اثر مصرف بتائین اعلام کرده بودند. همچنین بر اساس مطالعات انجام شده، تغییر روغن جیره با تغییر پروفیل اسیدهای چرب همراه می‌باشد و این تغییرات می‌تواند با تغییر زمان ماندگاری محتویات روده در بخش‌های مختلف آن همراه باشد (Castro *et al.*, 2016). در نتیجه مواد غذایی با پروفیل اسیدهای چرب مختلف و با زمان ماندگاری متفاوت، می‌توانند در تحریک آنزیم‌های گوارشی نقش اساسی داشته باشند. به نظر می‌رسد در این آزمایش، تأثیرات مکمل‌های غذایی به‌عنوان جاذب در تیمار دوم و تأثیر روغن ذرت با توجه به نوع متفاوت اسیدهای چرب در ماندگاری غذایی در روده ماهیان از عوامل تأثیرگذار در افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی در این دو تیمار بوده است.

بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) بعد از تغذیه با تیمارهای غذایی حاوی روغن ماهی و مکمل بتائین و ال کارنیتین، تحت تأثیر استرس اکسیژن، حرارت و شوری قرار گرفتند و نتایج نشان داد که تغییر نوع روغن، تأثیر معنی‌دار در مقاومت بچه‌ماهیان برابر استرس‌های محیطی ندارد در حالی که استفاده از مکمل بتائین و ال کارنیتین مقاومت بچه‌ماهیان را در برابر استرس دمایی افزایش می‌دهد. روغن ماهی دارای مقادیر بالایی از اسیدهای چرب بلند زنجیره مانند EPA و DHA می‌باشد که در ساختمان غشای سلولی نقش اساسی دارند و باعث افزایش مقاومت آبریان در برابر استرس‌های محیطی می‌شوند (Noori *et al.*, 2011). بنابراین نتایج این آزمایش با نتایج تحقیق اخیر که استفاده از روغن ماهی می‌تواند تأثیر معنی‌دار بر مقاومت لارو آبریانی مانند تاس‌ماهی ایرانی داشته باشد در تضاد است (Noori *et al.*, 2011). احتمالاً این مسئله می‌تواند به علت تفاوت‌های فیزیولوژیک و مرحله تکاملی در آبریان مورد بررسی باشد. تأثیرات مثبت بتائین و ال کارنیتین در افزایش مقاومت آبریان و همچنین سایر جانداران در برابر استرس در مطالعات مختلف گزارش شده است (Rabie *et al.*, 1997; Kalaiselvi and Panneerselvam, 1998; Sinatra and Sinatra, 1999; Ma *et al.*, 2008; Mohseni and Ozório, 2014; Niroomand *et al.*, 2011). تأثیرات کاهنده بر اکسیداسیون چربی‌ها و افزایش دهنده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند (Superoxide dismutase, Phenoloxidase, Glutathione

تأثیر ترکیب ال-کارنیتین (L-Carnitine) و بتائین (Betaine) جیره با منابع روغنی مختلف...

peroxidase) و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی (ویتامین E,C و glutathione) در موش‌ها و فیل ماهی تحت تغذیه با این مکمل‌ها از علل افزایش مقاومت در برابر استرس‌ها بیان شده است (Kalaiselvi and Panneerselvam, 1998; Mohseni and Ozório, 2014). در هر حال با توجه به نتایج این پژوهش مشخص شد که افزودن ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بتائین و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ال‌کارنیتین همراه با روغن ماهی سبب بهبود رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی و افزایش مقاومت بچه‌ماهیان قزل-آلای ۹ گرمی گردید. بنابراین با توجه به حساس بودن بچه‌ماهیان در دوران اولیه زندگی و کاهش میزان بازماندگی و رشد بچه‌ماهیان اضافه کردن این مکمل‌ها می‌تواند در عملکرد رشد ماهیان اثرات مثبتی داشته باشد، افزایش رشد بچه‌ماهیان در طول دوره نگهداری، کاهش مدت زمان نگهداری و کاهش هزینه‌های تولید را در بر خواهد داشت.

منابع

- Abdel-Fattah S.A., El-Daly Eman F., Ali Nematallah G.M. 2014. Growth performance, immune response, serum metabolites and digestive enzyme activities of Japanese quail fed supplemental L-Carnitine. *Global Veterinaria*, 12 (2): 277-286.
- Asadi M., Azari Takami Gh., Sajadi M.M., Moezi M., Niroomand M. 2010. Effect of rotifers enriched with betaine and concentrated diet containing betaine on growth, survival and stress resistance of Indian white prawn (*Fenneropenaeus indicus*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 3(19): 1-10. (In Persian).
- Becker K., Focken U. 1995. Effect of feed supplementation with L-carnitine on growth, metabolism and body composition of carp (*Cyprinus capio* L.). *Aquaculture*, 129(1-4): 341.
- Becker K., Schreiber S., Angoni C., Blum R. 1999. Growth performance and feed utilization response of *Oreochromis niloticus* + *Oreochromis aureus* hybrid to L-carnitine measured over a full fattening cycle under commercial conditions. *Aquaculture*, 174(3-4): 313-322.
- Beel G.J., Henderson R.J., Tocker D.R., Ghee F.M., Dick J.R., Porter A., Smullen R.P., Sargent J.R. 2002. Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) affect muscle fatty acid composition and hepatic fatty acid metabolism. *Journal of Nutrition*, 132: 222-230.
- Bessey O.A., Lowry O.H., Brock M.J. 1946. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *Journal of Biological Chemistry*, 164: 321-329.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

- Can K., Sener E. 1992. The effect of Betaine added starter feeds on the growth of Rainbow trout (*O. mykiss*, W. 1792) fry. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 1: 95-104.
- Castro C., Couto A., Pérez-Jiménez A., Serra C.R., Díaz-Rosales P., Fernandes R., Corraze G., Panserat S., Oliva-Teles A. 2016. Effects of fish oil replacement by vegetable oil blend on digestive enzymes and tissue histomorphology of European Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(1): 203-217.
- Clarke W.C., Virtanen E., Blackburn J., Higgs D.A. 1994. Effects of dietary Betaine/amino acid additive on growth and sea water adaptability in yearling Chinook salmon. *Aquaculture*, 121: 137-145.
- Coman G.J., Sarac H.Z., Fielder D., Thorne M. 1996. Evaluation of 4-crystalline amino acid, Betaine and AMP as food attractant of the Giant Tiger Prawn (*Penaeus monodon*). *Comparative Biochemistry and Physiology- Part A: Physiology*, 113(3): 247-253.
- De Schryver P., Crab R., Defoirdt T., Boon N., Verstraete W. 2008. The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture*, 277(3-4): 125-137.
- Harpez Sh. 2005. L-Carnitine and its attributed functions in fish culture and nutrition, A Review. *Aquaculture*, 249(1-4): 3-21.
- Iijima N., Tanaka S., Ota Y. 1998. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red Sea bream (*Pagrus major*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 18(1): 59-69.
- Jayaprakas V., Sambhu C. 1996. Growth response of white prawn *Penaeus indicus*, to dietary L-carnitine. *Asian Fisheries Science*, 9: 209-219.
- Jobling M., Gomes E., Dias J. 2001. Feed types, manufacture and ingredients. In: Houlihan D., Boujardand T., Jobling M. (Eds.). *Food Intake in Fish*. Blackwell Science, Oxford, pp. 25-48.
- Kalaiselvi T., Panneerselvam C. 1998. Effect of L-carnitine on the status of lipid peroxidation syndrome in breeder type poultry. Available on line and antioxidants in aging rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 9(10): 575-581.
- Kasper C.S., White M.R., Brown P.B. 2002. Betaine can replace choline in diets for juvenile Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 205(1-2): 119-126.
- Knights B. 1996. Studies of feeding stimulation in young Eels, *Anguilla anguilla* L., before and after first feeding using a novel rapid-screening method. *Aquaculture Research*, 27(5): 379-385.
- Kolkovski S., Arieli A., Tandler A. 1997. Visual and chemical cues stimulate microdiet ingestion in Sea bream larvae. *Aquaculture International*, 5(6): 527-536.

- Kowalska A., Zakes Z., Krzysztof Siwicki A., Jankowska B., Jarmolowicz S., Demska-Zake K. 2012. Impact of diets with different proportions of linseed and sunflower oils on the growth, liver histology, immunological and chemical blood parameters, and proximate composition of pikeperch *Sander lucioperca* (L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(2): 375-388.
- Lemieux H., Blier P., Dutil J. 1999. Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 20(4): 293-303.
- Ma J.J., Xu Z.R.Q., Shao J.J., Xu Z., Hung S.S.O., Hu W.L., Zhou L.Y. 2008. Effect of dietarsupplemental L-carnitine on growth performance, body composition and antioxidant status in juvenile black Sea bream, *Sparus macrocephalus*. *Aquaculture Nutrition*, 14(5): 464-471.
- Mackie A.M. 1987. Preliminary studies on the chemical defenses of the British octocorals *Alcyonium digitatum* and *Pennatula phosphorea*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Physiology*, 86(4): 629-632.
- Mc Dowell L.R. 1989. Vitamin-like substances. In: Mc Dowell LR (Eds.), *Vitamins in Animal Nutrition Comparative Aspects to Human Nutrition*. Academic Press Inc., New York, pp. 388-399.
- Mohapatra S., Chakraborty T., Prusty A., Paniprasad K., Mohanta K. 2011. Use of different microbial probiotics in the diet of Rohu (*Labeo rohita*) fingerlings: effects on growth, nutrient digestibility and retention, digestive enzyme activities and intestinal microflora. *Aquaculture Nutrition*, 18(1): 1-11.
- Mohseni M., Ozório R.O.A. 2014. Effects of dietary L-carnitine level on growth performance, body composition and antioxidant status in Beluga (*Huso huso* L. 1758). *Aquaculture Nutrition*, 20(5): 477-485.
- Niroomand M., Sajadi M., Yahyavi M., Asadi M. 2011. Effects of dietary Betaine on growth, survival, body composition and resistance of fry Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) under environmental stress, *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 20(1): 135-146.
- Noori F., Takami G.A., Van speybroeck M., Van Stappen G., Sorgeloos P. 2011. Feeding *Acipenser persicus* and *Huso huso* larvae with *Artemia urmiana* nauplii enriched with HUFA and vitamin C: II. Effect on tolerance to shock exposure of environmental factors. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(2): 787-795.
- Ozorio R.O.A. 2001. Dietary l-carnitine and energy and lipid metabolism in African catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles. PhD dissertation no. 3092, Wageningen University, the Netherland.
- Polat A., Beklevik G. 1999. The importance of betaine and some attractive substances as fish feed additives. In: Brufu J, Tacon A (Eds.). *Feed manufacturing in the Mediterranean region: Recent advances in research and technology Zaragoza*. CIHEAM, IAMZ, Spain, pp. 217-220.

- Rabie M.H., Szilagyi M., Gipert T. 1997. Effect of dietary L-carnitine on the performance and egg quality of laying hens from 65–73 weeks of age. *British Journal of Nutrition*, 78(4): 615-623.
- Santulli A., D'Amelio V. 1986. Effects of supplemental dietary carnitine on the growth and lipid metabolism of hatchery reared Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, 59(3–4): 177-186.
- Shankar R., Murthy H.S., Pavadi P., Thanuja K. 2008. Effect of betaine as a feed attractant on growth, survival and feed utilization in fingerlings of the Indian major Carp *Labeo rohita*. *The Israeli Journal of Aquaculture, Bemidgheh*, 60(2): 95-99.
- Shepherd J., Bromage N. 1992. *Intensive Fish Farming*. Black Well Sinatra S.T., Sinatra J. 1999. *L-Carnitine and the Heart*. McGraw Hill, New York.
- Tacon A.G.J. 1990. *Standard methods for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp*. Washington DC, Argent Laboratories Press.
- Takami G., Meshkini S., Rasouli E., Amini F. 2005. The nutritional effects of vitamin C-enriched *Artemia urmiana* nauplii on growth, survival rate and resistance to environmental stresses in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae. *Pajouhesh and Sazandegi*, 66: 25-32. (In Persian).
- Tiril S.U., Alagil F., Yagci F.B., Aral O. 2008. Effects of betaine supplementation in plant protein based diets on feed intake and growth performance in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Israeli Journal of Aquatics, Bamidgheh*, 60(1): 57-64.
- Torreel E., Van Der Sluiszen A., Verreth J. 1993. The effect of dietary l-carnitine on the growth performance in fingerlings of the African catfish (*Clarias gariepinus*) in relation to dietary lipid. *British Journal of Nutrition*, 69(1): 289-299.
- Ueberschar B. 1988. Determination of the nutritional condition of individual marine fish larvae by analyzing their proteolytic enzyme activities with a highly sensitive fluorescence technique. *Meeresforschung-Reports on Marine Research*, 32: 144-154
- Virtanen E., Hole R., Resink R., Slinning J.W., Junnila M. 1994. Betaine/amino acid additive enhances sea water performance of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed standard fish-meal-based diets. *Aquaculture*, 124(1-4): 220-220.
- Virtanen E., Junnila M., Soivio A. 1989. Effects of food containing Betaine/amino acid additive on the osmotic adaptation of young Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture*, 83(1–2): 109-122.
- Yilmaz E. 2005. The effect of two chemoattractants and different first feeds on the growth performances of African catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell, 1822) at different larval stages. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science*, 29: 309-314.