شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۷۱، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۷

صفحات ۳۱۶-۳۰۶

مطالعهٔ اثرات تجویز خوراکی لاکتوباسیلوس رامنوسوس (*Lactobacillus rhamnosus*) بر پارامترهای بیوشیمیایی خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در زمان مواجه با سمیت تحت‌کشنده مالاتیون

سعید مرادی[۱]، علیرضا میرواقفی*[۲]، کامران رضایی توابع[۳]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۲. استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۳. استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۱۲ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۱۲/۱۷

چکیده

در آزمایش حاضر اثرات تجویز خوراکی *Lactobacillus rhamnosus* بر شاخص‌های بیوشیمیایی خون ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تحت استرس ناشی از سمیت تحت‌کشنده‌ی مالاتیون بررسی شد. تعداد ۱۸۰ ماهی با میانگین وزن اولیه ۲/۶±۴۳ گرم به چهار گروه شاهد، پروبیوتیک، مالاتیون توام با پروبیوتیک و مالاتیون تقسیم شدند. غلظت انتخابی از مالاتیون ۰/۰۳۶ میلی‌گرم بر لیتر بود و مکمل *L. rhamnosus* به میزان ۱ گرم (واحد کلنی: 10^{10} سلول در هر گرم) بر کیلوگرم جیره‌ی غذایی مورد استفاده قرار گرفت. پس از پایان دوره ۲۸ روزه آزمایش درصد افزایش وزن و برخی شاخص‌های بیوشیمیایی خون ماهیان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج کاهش درصد افزایش وزن در ماهیان تحت تیمار با مالاتیون را نشان داد و تجویز خوراکی مکمل *L. rhamnosus* تاثیر معنی‌داری در افزایش این شاخص نداشت ($P>0/05$). ارائه جیره پروبیوتیک به ماهیان تحت تیمار با مالاتیون در مقایسه با جیره پایه سطح پروتئین کل و آلبومین پلاسما را به‌طور معنی‌داری افزایش داد ($P<0/05$). سطح کورتیزل و آنزیم آلکالین فسفاتاز در خون ماهیان تحت تیمار با مالاتیون بالاتر از گروه شاهد بود و تجویز خوراکی *L. rhamnosus* در مقایسه با جیره شاهد به‌طور معنی‌داری هر دو را کاهش داد ($P<0/05$). با توجه به نتایج این‌طور استنباط می‌شود که تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در زمان مواجه با سمیت تحت کشنده‌ی مالاتیون تاثیری بر کاهش اختلالات و آسیب بافتی ماهیان ندارد اما می‌تواند در کاهش استرس و بهبود عملکرد سیستم دفاعی ماهیان سودمند باشد.

واژگان کلیدی: آفت کش ارگانوفسفره، قزل آلای رنگین کمان؛ پارامترهای بیوشیمیایی، خون.

* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۴۴+۹۸۲۶۳۲۲۲۳ ایمیل: avaghefi@ut.ac.ir

۱. مقدمه

بخش آبزی‌پروری در کنار پیشرفت قابل توجهی که داشته، همواره با مشکلاتی نیز روبرو بوده است که از آن جمله می‌توان به تغییرات کیفیت آب، شیوع بیماری‌ها و مشکلات تغذیه‌ای اشاره کرد (Sinyakov *et al.*, 2002). کیفیت آب در پرورش ماهی نقش تعیین‌کننده‌ای ایفا می‌کند و معمولاً آبی دارای کیفیت مطلوب محسوب می‌شود که بقا و رشد ماهیان را به بهترین وجه تأمین نماید (Baratizadeh *et al.*, 2018). از جمله عوامل آلاینده‌ی آب که تهدیدی جدی برای سلامت آبزیان محسوب می‌شوند شامل مجموعه‌ای از عوامل خطرناک همچون فلزات سنگین، آفت‌کش‌ها، فاضلاب، مواد روغنی، آلودگی حرارتی و غیره می‌باشد (Mohapatra *et al.*, 2012). در بین عوامل یاد شده آفت‌کش‌ها در بخش‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند و برآوردها نشان می‌دهد که کمتر از ۵ درصد از این مواد به موجودات هدف می‌رسند و باقی مانده آن‌ها در خاک، بدنه‌های آبی و موجودات غیر هدف قرار می‌گیرد (Kazemi *et al.*, 2012). در بخش کشاورزی این ترکیبات در آب حل شده و سپس مزارع با این آب مورد آبیاری و یا سم‌پاشی قرار می‌گیرند که در نتیجه به روش‌های گوناگون به منابع آب‌های سطحی مورد استفاده در امر پرورش ماهی می‌رسند (Ebrahimzadeh *et al.*, 2004). یکی از محبوب‌ترین گونه‌های آفت‌کش‌ها که در حال حاضر در بخش کشاورزی استفاده می‌شود، آفت‌کش‌های ارگانوفسفره می‌باشند و برای موجودات آبزی بسیار سمی هستند (Yonar *et al.*, 2014). مالاتیون از جمله خطرناک‌ترین سموم ارگانوفسفره است و مشکلاتی برای محیط زیست در سرتاسر دنیا بوجود آورده است (Farrokhi *et al.*, 2016). در ایران نیز یکی از آفت‌کش‌های پرمصرف می‌باشد (Farsani *et al.*, 2016). بیشترین موارد کاربرد آن مربوط به سم‌پاشی باغات، مرکبات و شالیزارها می‌باشد (Shiri *et al.*, 2014). نتایج مطالعات گذشته حاکی از آثار مخرب مالاتیون بر سلامت آبزیان است و به نقل از Dietrich و همکاران (۲۰۱۴) می‌تواند موجب تغییراتی در سیستم ایمنی و آسیب اکسیداتیو به اندام‌های مربوط به سیستم ایمنی شود، موجب تغییر در مسیرهای انتقال سیگنال جهت فعال‌سازی، تکثیر و تمایز سلول‌های وابسته به سیستم ایمنی می‌شود و همچنین می‌تواند موجبات مهار استیل کولین استراز را فراهم کند (Dietrich *et al.*, 2014). همچنین در مطالعه‌ی Yonar و همکاران (۲۰۱۴) مشخص شد که مالاتیون روی پارامترهای خونی، پاسخ ایمنی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اثرات مخرب دارد.

به نقل از Agrahari و همکاران (۲۰۰۷) تجزیه و تحلیل پارامترهای بیوشیمیایی خون به شناسایی اندام‌های مورد هدف برای سموم و وضعیت سلامت عمومی موجودات کمک می‌کند و می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر قرارگیری ماهی در معرض سموم و تاثیر آن‌ها بر ماهی عمل کند و از آن‌جایی که در طی شرایط استرس، ماهی عملکردهای متابولیک خود را در جهت سازگاری با شرایط جدید تغییر می‌دهد، بنابراین مهار یا به فعالیت افتادن آنزیم‌ها برای نشان دادن آسیب یا اختلال در عملکرد بافت‌های مختلف می‌تواند استفاده شود (Abhijith *et al.*, 2016).

نتایج مطالعات متعدد اثرات سودمند پروبیوتیک‌ها در ارتباط با انواع استرس‌ها از جمله استرس مربوط به آلودگی‌های محیطی را نشان می‌دهد (Castex *et al.*, 2009). مفهوم پروبیوتیک در آبزی‌پروری شامل استفاده از سلول زنده، غیرزنده و یا ترکیبی از سلول‌های میکروبی هست که در هنگام بکارگیری در خوراک یا آب محیط پرورش مزیت‌هایی برای میزبان ایجاد می‌کند؛ که از آن جمله می‌توان به بهبود عملکرد رشد و پاسخ به استرس یا توان کلی اشاره نمود و این مهم از طریق بهبود وضعیت تعادل میکروبی میزبان یا محیط زندگی او به‌دست می‌آید (Hoseinifar *et al.*, 2016). شواهد گویای آن است که که لاکتوباسیل‌ها از جمله *Lactobacillus rhamnosus* در سرکوب آثار مخرب استرس اکسیداتیو و آسیب‌های سلولی ناشی از قرارگیری در معرض سموم کارآمد هستند و استفاده از آن‌ها به عنوان یک پروبیوتیک جهت فعالیت آنتی اکسیدانی می‌تواند موثر باشد. همچنین شواهد به صورت غیرمستقیم نشان می‌دهد که لاکتوباسیل‌ها قادر به متابولیسم یا تجزیه سموم دفع آفات از طریق آنزیم‌های فسفاتاز خود هستند و بهره‌وری از آن‌ها به منظور تخریب طیف وسیعی از آفت‌کش‌ها در داخل بدن دور از انتظار نیست (Trinder *et al.*, 2015).

حال با توجه به اثرگذاری‌های مفید ذکر شده برای باکتری‌های پروبیوتیک در ارتباط با توان زیست‌پالایی و تجزیه زیستی سموم و همچنین با در نظرگیری اثرات سودمند مصرف خوراکی آن‌ها برای موجود آبزی در خصوص بهبود عملکرد رشد و کارایی سیستم دفاع آنتی‌آکسیدانی، هدف از این مطالعه بررسی اثرات تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* بر عملکرد بیوشیمیایی و یکپارچگی غشاء سلولی بافت‌های مختلف ماهی قزل آلای رنگین کمان در زمان مواجه با سمیت زیرکشنده‌ی مالاتیون می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. تهیه ماهی و شرایط نگهداری

کلیه مراحل پرورش و تغذیه ماهیان در کارگاه بهداشت و بیماری آبزیان واقع در دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران (کرج) انجام شد. بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان از روستای برغان واقع در استان البرز تهیه گردید و به کارگاه انتقال یافت. پس از انتقال، به‌منظور سازگاری با شرایط محیطی جدید به‌مدت یک هفته در مخازن ۱۰۰۰ لیتری فایبرگلاس در محیط کارگاه با دوره نورانی ۱۲:۱۲ نگهداری شدند که در طی این مدت با غذای تجاری قزل‌آلای رنگین‌کمان (ساخت شرکت غذای آبزیان فرادانه، شهرکرد، ایران؛ ۴۵ درصد پروتئین و ۱۴ درصد چربی) طی دو نوبت در روز راس ساعت ۷:۰۰ و ۱۹:۰۰ به میزان ۲ درصد وزن بدن تغذیه شدند. در طی این مدت هوادهی مخزن نگهداری ماهیان دائماً انجام شد و روزانه ۲۵٪ از حجم آب مخزن نگهداری تعویض گردید. پس از پایان دوره سازگاری ماهیان با میانگین وزنی ۲/۶±۴۳ گرم جهت شروع آزمایش به‌طور تصادفی در ۱۲ تانک فایبرگلاسی توزیع شدند (هر تانک ۱۵ قطعه ماهی) و تحت تاثیر تیمارهای گوناگون قرار گرفتند.

۲.۲. مواد مورد استفاده

مالاتیون مورد استفاده در این آزمایش به صورت مایع امولسیون شونده با خلوص ۵۷٪ ساخت شرکت اکسیر کشاورزی (Agroxir) مورد استفاده قرار گرفت. پروبیوتیک مورد استفاده در این آزمایش نیز سویه‌ی *L. rhamnosus* جدا شده از روده‌ی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و به‌صورت فریزدرای شده با واحد کلنی 10^{10} سلول در هر گرم، از شرکت (زیست‌یار وارنا، ایران) تهیه و مورد استفاده قرار گرفت.

۳.۲. آماده‌سازی جیره

جهت تهیه پلت حاوی پروبیوتیک *L. rhamnosus* از روش Wache و همکاران (۲۰۰۶) استفاده شد. در این روش به ازای هر یک کیلوگرم غذا، سوسپانسیونی از یک گرم پروبیوتیک *L. rhamnosus* با ۳۲ میلی‌لیتر روغن ماهی کاد تهیه و به غذا اسپری شد تا غذا را پوشش دهد. مقدار مورد استفاده از پروبیوتیک جهت استفاده در خوراک مطابق با دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت تولیدکننده بود.

۴.۲. طرح آزمایش

غلظت تحت‌کشنده انتخابی جهت انجام آزمایش معادل با $\frac{1}{5}$ میزان LC_{50} ۹۶ ساعته مالاتیون برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بود. بر طبق گزارش Gries و Purghart (۲۰۰۱) میزان LC_{50} ۹۶ ساعته مالاتیون برای قزل‌آلای رنگین کمان ۰/۱۸ میلی‌گرم بر لیتر عنوان گردیده است. طول دوره آزمایش ۲۸ روز بود و قبل از شروع آزمایش ماهی‌های موجود در تیمارهای پروبیوتیک به‌مدت یک هفته جهت انجام پیش تیمار با جیره حاوی پروبیوتیک تغذیه شدند. در طی مدت آزمایش مخازن دائما هوادهی می‌شدند و آزمایشات بر اساس راهنمای استاندارد O.E.C.D (۱۹۸۴) به صورت نیمه‌ساکن (تعویض روزانه ۲۰٪ آب) روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان صورت گرفت. جهت تعویض آب از محلول ذخیره‌ای که قبلاً ساخته شده بود و غلظت مالاتیون در آن با آب مخازن تحت تیمار با مالاتیون برابر بود استفاده می‌شد. اندازه‌گیری عوامل کیفی آب، همچون دمای آب (با دماسنج جیوه‌ای) به‌صورت روزانه، اکسیژن محلول (توسط اکسیژن‌متر) و pH (از طریق دستگاه pH متر) به‌صورت هفتگی انجام گرفت. میزان دمای آب، اکسیژن محلول و pH به‌ترتیب ۱۳تا ۱۶ درجه سانتی‌گراد، ۸ تا ۹ میلی‌گرم در لیتر و ۷/۴ تا ۸ اندازه‌گیری گردید. آزمایش ۴ تیمار در قالب ۳ تکرار را شامل می‌شد و به‌طور کلی ۱۲ مخزن را شامل می‌شد که درون هر مخزن ۱۵ ماهی قرار گرفت.

بنابراین ماهی‌ها به ۴ گروه زیر تقسیم شدند:
گروه ۰ (شاهد): جیره تجاری بدون مکمل پروبیوتیک – ۰ میلی‌گرم بر لیتر مالاتیون
گروه ۱: جیره غذایی حاوی ۱ گرم مکمل پروبیوتیک بر کیلوگرم جیره‌ی غذایی – ۰ میلی‌گرم بر لیتر مالاتیون
گروه ۲: جیره غذایی حاوی ۱ گرم مکمل پروبیوتیک بر کیلوگرم جیره‌ی غذایی – ۰/۰۳۶ میلی گرم بر لیتر مالاتیون
گروه ۳: جیره تجاری بدون مکمل پروبیوتیک – ۰/۰۳۶ میلی‌گرم بر لیتر مالاتیون

۵.۲. روش‌های سنجش

۱.۵.۲. سنجش رشد

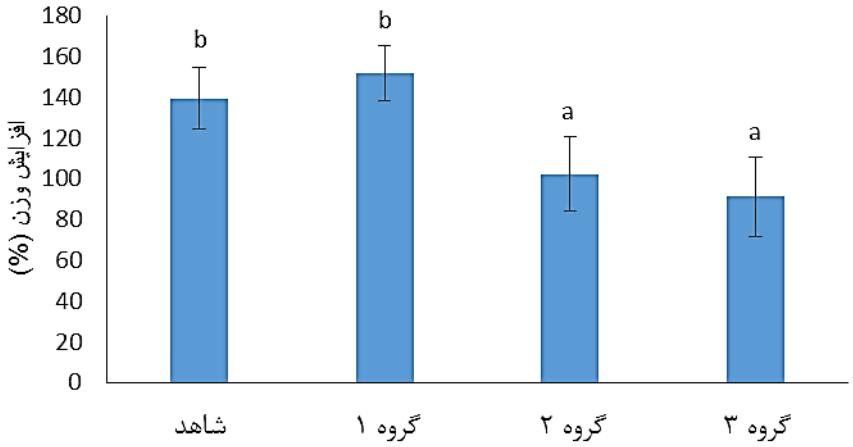
در پایان دوره ۲۸ روزه آزمایش، غذادهی برای مدت ۲۴ ساعت قطع گردید و پس از آن تعداد ۵ ماهی از هر مخزن برداشت شد و جهت آرام‌سازی به مدت ۵ دقیقه در محلول ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پودر گل میخک قرار گرفتند. در انتها وزن ماهی‌ها اندازه‌گیری شد و درصد افزایش وزن با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:
درصد افزایش وزن (گرم) = {(میانگین وزن نهایی - میانگین وزن اولیه) ÷ میانگین وزن اولیه}×۱۰۰

۲.۵.۲. شاخص‌های خون

پس از اتمام دوره‌ی آزمایش جهت اندازه‌گیری فاکتورهای خونی ماهیان در محلول ppm ۲۰۰ پودر گل میخک قرار گرفتند و پس از بی‌هوشی کامل خون-گیری از ساقه دمی توسط سرنگ‌های استریل ۲ میلی-لیتری انجام شد. نمونه‌ها پس از ۶ ساعت نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و لخته شدن کامل، با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۷ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد، سپس لایه فوقانی توسط سمپلر از روی نمونه‌ها برداشته شد. با توجه به یکسانی ساختار مولکولی هورمون کورتیزول در مهره‌داران از کیت انسانی و از روش رادیوایمینواسی (RIA) برای تعیین غلظت کورتیزول پلاسما استفاده شد (Avella, 1990). میزان گلوکز خون با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون ایران با روش فتومتریک اندازه‌گیری شد. اساس آزمایش بر ترکیب آب اکسیژنه آزاد شده از گلوکز در مجاورت گلوکز اکسیداز و ترکیب آن با فنول و ۴-آمینوآنتی پیرین در مجاورت آنزیم پراکسیداز جهت تشکیل کینونیمین می‌باشد. میزان کینونیمین تشکیل شده که به‌صورت فتومتریک قابل اندازه‌گیری است با مقدار گلوکز رابطه مستقیم دارد. سنجش پروتئین کل با استفاده از کیت بیونیک Bionik ساخت کشور ایران به‌روش بیوره–رنگ‌سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (به‌صورت دستی) طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. غلظت آلبومین پلاسمای خون نیز با استفاده از کیت آزمایشی ساخت شرکت پارس آزمون ایران با روش فتومتریک سنجش شد. اساس آزمایش بر ایجاد کمپلکس رنگی سبز-آبی توسط آلبومین موجود در پلاسما با بروموکروزول سبز (در pH اسیدی) می‌باشد. شدت رنگ ایجاد شده متناسب با مقدار آلبومین در نمونه است. سنجش میزان گلوبولین پلاسما نیز با کسر آلبومین از پروتئین کل به‌دست آمد. جهت سنجش سطح آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانس‌فراز (AST)، آلانین آمینوترانس‌فراز (ALT)، آلکالین فسفاتاز (ALP) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) در سرم خون از کیت‌های تولیدی توسط شرکت پارس آزمون استفاده گردید. اندازه‌گیری سطح فعالیت آنزیم‌های SAT و ALT و LDH بر اساس مصرف NADPH و تبدیل آن به NAD^+ در طول موج ۳۴۰ نانومتر و سنجش فعالیت ALP نیز براساس واکنش تبدیل نیتروفنیل فسفات به نیتروفنول و فسفات در طول موج ۴۰۵ نانومتر بود. سطح آنزیم کراتین فسفوکیناز (CPK) نیز براساس تبدیل کراتین فسفات به کراتین در طول موج ۳۴۰ نانومتر تعیین و بر اساس میزان جذب نوری (OD) و فرمول ارائه شده در کیت محاسبه شد. سنجش فعالیت آنزیم استیل کولین استراز پلاسما نیز با استفاده از کیت الایزا ساخت شرکت Eastbiopharm چین و تحت لیسانس آمریکا مطابق با دستورالعمل شرکت تولیدی با استفاده از روش ساندویچ دو طرفه الایزا محاسبه گردید.

۷.۲. تحلیل‌های آماری

تمام داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف معیار برای



شکل ۱ – اثرات تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* بر درصد افزایش وزن ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت سمیت زیر کشنده‌ی مالاتیون. مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است. حروف متفاوت بر روی هر ستون نشان دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

جدول ۱ - اثرات تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* بر پارامترهای بیوشیمیایی خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت سمیت تحت‌کشنده مالاتیون.

تیمار آزمایشی	شاهد	گروه ۱	گروه ۲	گروه ۳
کورتیزول (ng/ml)	۲/۰۸±۲۷^{a}	۳/۲۱±۲۵^{a}	۳/۵۱±۳۰^{a}	۵/۶۸±۴۳^{b}
گلوکز (mg/dl)	۷/۱±۶۵^{ab}	۶/۶۶±۶۰^{a}	۵/۶۹±۷۸^{bc}	۴/۱۷±۸۴^{c}
پروتئین کل (g/dl)	۰/۳۷±۴/۸۷^{b}	۰/۲۶±۵/۱۲^{b}	۰/۲۴±۴/۷۲^{b}	۰/۴۳±۳/۷۹^{a}
آلبومین (g/dl)	۰/۰۷±۲/۲۸^{bc}	۰/۱۶±۲/۴۹^{c}	۰/۱±۲/۰۹^{b}	۰/۰۷±۱/۷۵^{a}
گلوبولین (g/dl)	۰/۴۱±۲/۵۹^{a}	۰/۱۷±۲/۶۲^{a}	۰/۱۷±۲/۶۳^{a}	۰/۵۰±۲/۰۴^{a}

مقادیر به‌صورت میانگین (± انحراف معیار) ارائه شده است.

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P<۰/۰۵$).

هر گروه بیان شده است. تفاوت میان گروه‌های آزمایشی با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA پیوسته با آزمون توکی در سطح معنی-داری ($P<۰/۰۵$) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین جهت انجام تمام تجزیه و تحلیل‌های آماری، از نرم‌افزار تحت ویندوز SPSS نسخه ۲۴ استفاده گردید.

۳. نتایج

۱.۳. عملکرد رشد

در پایان دوره ۲۸ روزه آزمایش، عملکرد رشد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان مورد سنجش قرار گرفت (شکل ۱). براساس نتایج آفت‌کش مالاتیون وزن‌گیری (٪) در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان را به‌طور معنی‌دار در مقایسه با تیمارهایی که در معرض این آفت‌کش نبودند کاهش می‌دهد ($P<۰/۰۵$). تجویز خوراکی پروبیوتک *L. rhamnosus* تاثیر معنی‌داری در افزایش وزن هیچ یک از گروه‌های در معرض مالاتیون و آب عاری از مالاتیون نداشت ($P>۰/۰۵$).

۲.۳. پارامترهای بیوشیمیایی خون

در پایان دوره ۲۸ روزه آزمایش برخی از شاخص-های پلاسمای خون که به شکلی بیانگر میزان استرس و آسیب‌های بافتی ناشی از قرارگیری ماهی در معرض مالاتیون بود اندازه‌گیری و مورد سنجش قرار گرفت (جدول ۱). با قرارگیری ماهی در معرض مالاتیون میزان گلوکز و کورتیزول به‌عنوان شاخص‌های استرسی خون به‌طور قابل توجهی تحت تاثیر قرار گرفتند. میزان گلوکز خون در تیمار ۳ به‌طور قابل توجهی بیشتر از سایر تیمارها بود و با تیمار شاهد و گروه آزمایشی ۱ تفاوت معنی‌دار داشت ($P<۰/۰۵$). سطح کورتیزول خون در تیمار ۳ بالاترین میزان را نشان داد و با سایر تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌دار نشان داد ($P<۰/۰۵$). طبق نتایج کمترین میزان از پروتئین کل خون در گروه آزمایشی ۳ دیده شد و با سایر گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌دار داشت ($P<۰/۰۵$). کمترین میزان آلبومین خون نیز مربوط به ماهیان موجود در

جدول ۲ - اثرات تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* بر آنزیم‌های خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت سمیت تحت کشنده مالاتیون.

تیمار آزمایشی	شاهد	گروه ۲	گروه ۳	گروه ۴
استیل کولین استراز (ng/ml)	۳/۰۵±۴۵/۳۳^{b}	۲/۵۱±۴۱/۶۶^{b}	۳/۰۰±۲۵/۰۰^{a}	۵/۰۳±۳۱/۳۳^{a}
آسپارتات آمینوترانس‌فراز (U/l)	۶۳±۵۳۹^{a}	۲۲±۵۰۸^{a}	۳۷±۶۳۹^{b}	۵۸±۶۵۴^{b}
آلانین آمینوترانس‌فراز (U/l)	۴/۵±۱۱/۳۳^{a}	۲/۶۴±۱۰^{a}	۲/۵±۱۲/۶۶^{a}	۳/۱±۱۴^{a}
آلکالین فسفاتاز (U/l)	۴۶±۷۳۳^{a}	۴۵±۶۶۵^{a}	۶۷±۷۷۵^{a}	۹۷±۹۷۸^{b}
لاکتات دهیدروژناز (U/l)	۳۳۱±۱۸۴۹^{ab}	۱۳۷±۱۴۱۱^{a}	۳۲۳±۱۹۰۹^{ab}	۲۹۳±۲۱۶۰^{b}
کراتین فسفوکیناز (U/l)	۲۴۱±۴۴۱۰^{a}	۳۶۳±۵۱۷۶^{ab}	۵۶۹±۵۳۸۶^{ab}	۹۴۷±۶۰۵۵^{b}

مقادیر به‌صورت میانگین (± انحراف معیار) ارائه شده است.

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P<0/05$).

گروه آزمایشی در معرض مالاتیون و تغذیه شده با جیره شاهد می‌باشد و با سایر گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌دار نشان داد ($P<0/05$). تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* در ماهیان تحت تیمار با مالاتیون در مقایسه با جیره شاهد به‌میزان قابل توجهی سطح آلبومین پلاسمای خون را افزایش داد ($P<0/05$). کمترین میزان گلوبولین خون مربوط به ماهیان موجود در گروه آزمایشی در معرض مالاتیون و تغذیه شده با جیره شاهد می‌باشد اما به لحاظ آماری با سایر گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌دار نشان نداد ($P>0/05$).

۳.۳. آنزیم‌های خون

نتایج نشان می‌دهد که قرارگیری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در معرض سمیت تحت‌کشنده مالاتیون باعث مهار فعالیت آنزیم استیل کولین استراز پلاسما و کاهش معنی‌دار غلظت این آنزیم در پلاسمای خون در مقایسه با گروه‌های آزمایشی که در معرض مالاتیون نبودند (گروه آزمایش شاهد و ۱) می‌شود ($P<0/05$) (جدول ۲). سنجش فعالیت‌های آنزیمی پلاسما نشان داد که میزان فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانس‌فراز در تیمارهای قرار گرفته در معرض مالاتیون (گروه آزمایش ۲ و ۳) افزایش قابل توجهی نسبت به دو گروه دیگر نشان داد ($P<0/05$). فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانس‌فراز تفاوت معنی‌داری در بین گروه‌های آزمایشی نشان نداد ($P>0/05$). آنزیم آلکالین فسفاتاز در گروه آزمایشی ۳ بیشترین فعالیت را نشان داد و با سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار نشان داد ($P<0/05$). فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در گروه آزمایشی ۳ بیشترین میزان را نشان داد و با تیمار ۱ اختلاف معنی‌دار نشان داد ($P<0/05$). در مورد کراتین فسفوکیناز نیز تنها تفاوت بین گروه شاهد و گروه آزمایشی ۳ معنی‌دار بود و سایر تیمار ها تفاوت معنی‌داری با هم نشان ندادند ($P>0/05$).

۴. بحث و نتیجه‌گیری

آفت‌کش‌ها به‌عنوان یکی از مهمترین عوامل استرس‌زا در محیط زیست محسوب می‌شوند که باعث ایجاد استرس اکسیداتیو، متابولیک، استرس ایمنی و عقب ماندگی رشدی در تمامی انواع موجودات زنده می‌شوند (Mohapatra *et al*., 2012). بنابراین ارائه‌ی راهکاری جهت کنترل و تقلیل اثرات مخرب این سموم در زمان آلودگی منابع آبی مورد استفاده در امر پرورش آبزیان مورد نیاز می‌باشد. به همین منظور با توجه به اثرات سودمند ذکر شده توسط Trinder و همکاران (۲۰۱۶) برای پروبیوتیک‌ها، از جمله بهبود عملکرد رشد و پاسخ به استرس و همچنین پتانسیل تخریب زیستی ترکیبات ارگانوفسفره توسط سویه‌های لاکتوباسیل، بنابراین در مطالعه حاضر اثرات پروبیوتیک *L. rhamnosus* بر روی پارامترهای بیوشیمیایی خون و میزان رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجه با سمیت تحت‌کشنده‌ی آفت‌کش ارگانوفسفره‌ی مالاتیون مورد بررسی قرار گرفت.

مطالعات زیادی در مورد مزایای استفاده از پروبیوتیک‌ها جهت بهبود هضم مواد مغذی و ارتقاء رشد در آبزیان صورت گرفته است. طبق نتایج کاهش وزن‌گیری مشاهده شده در ماهیان تحت تیمار با مالاتیون، به بیان Mohapatra و همکاران (۲۰۱۲) ممکن است به‌دلیل افزایش تقاضای انرژی جهت مقابله

با شرایط استرسی و متعاقباً افزایش سوخت و ساز به منظور تامین انرژی مورد نیاز تحت شرایط استرس آلودگی باشد. همچنین می‌تواند به‌علت تخریب پروتئین‌های بافتی و از اهم آنان بافت کبد به‌عنوان اندام درگیر در فرایند سوخت و ساز باشد. در مطالعه حاضر تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* تاثیری بر میزان رشد ماهیان تحت تیمار با مالاتیون نشان نداد. در آزمایشی مشابه اثر یک سویه‌ی دیگر از جنس لاکتوباسیلوس به نام *L. plantarum* بر روی سمیت آلومینیوم در ماهی تیلاپیا صورت گرفت که تنها قادر به افزایش رشد در عدم حضور آلومینیوم بود (Leilei Yu *et al*., 2017). بنابراین با توجه به نتایج از افزایش وزن هر دو گروه تحت تیمار با مالاتیون و آب عاری از مالاتیون چنین استنباط می‌شود که پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس تاثیر سودمندی بر وزن‌گیری و سوخت و ساز ماهی قزل‌آلای رنگین-کمان ندارد.

از جمله شاخص‌های استرسی مورد بررسی در آزمایش حاضر گلوکز و کورتیزول خون بودند. افزایش گلوکز خون در ماهی‌ها، تحت شرایط نامساعد مشاهده می شود و به موجود کمک می‌کند تا با رساندن انرژی به اندام‌های حیاتی جوابگوی این افزایش تقاضای انرژی باشد. بنابراین ارزیابی سطح گلوکز خون به‌عنوان یک نشانگر ثانویه از پاسخ استرسی به‌طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد (Banaee *et al*., 2011). در مطالعه‌ی حاضر میزان گلوکز خون در ماهیان تحت تیمار با مالاتیون بیشتر از سایر تیمارها بود که نشان می‌دهد مالاتیون به‌عنوان یک عامل استرسی عمل می-کند. کورتیزول خون نیز به‌عنوان نشانگر عمده استرس در ماهی از دیگر پارامترهای مورد بررسی بود که تنظیم کننده متابولیسم و تنظیمات یونی لازم برای مقابله با استرس است (Koakoski *et al*., 2014). در تحقیق حاضر با ارائه‌ی جیره‌ی حاوی *L. rhamnosus* به ماهیان در معرض مالاتیون میزان کورتیزول خون به طور قابل توجهی نسبت به ماهی‌های تغذیه شده با جیره‌ی شاهد کاهش یافت که گواه از اثرگذاری سودمند پروبیوتیک *L. rhamnosus* بر کاهش استرس ناشی از مواجه با آلودگی آفت‌کش در ماهی است. نتایج این مطالعه با تحقیق Hamed (۲۰۱۵) همخوانی داشت به‌طوری که سطح کورتیزل پلاسمای خون تیلاپیای نیل تحت سمیت تحت‌کشنده‌ی مالاتیون به‌مدت ۱۵ روز افزایش معنی‌دار نشان داد. ارزیابی سطح پروتئین کل و آلبومین خون نشان دهنده کاهش معنادار هر دو پارامتر در ماهی‌های تحت تیمار با مالاتیون بود و تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* نسبت به جیره‌ی شاهد سطح هر دو فاکتور را به‌طور معنی‌دار افزایش داد. سنجش سطح پروتئین کل، در اختلالات سیستم ایمنی، اختلال در عملکرد کبد و کلیه می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد و کاهش پروتئین‌های خون نشان دهنده‌ی آسیب به بافت‌های مذکور و اختلال در سیستم ایمنی است (Banaee *et al*., 2011). بنابراین افزایش سطوح این شاخص در ماهی‌های تغذیه شده با پروبیوتیک می‌تواند نشان دهنده پتانسیل بهبود دهندگی وضعیت ایمنی ماهی توسط این پروبیوتیک و کاهش اثرات مخرب مالاتیون بر سیستم ایمنی باشد.

آفت‌کش‌های ارگانوفسفره دارای اثرات مسمومیت عصبی به‌وسیله‌ی مهار فعالیت استیل کولین استراز می‌باشند و بر قابلیت تغذیه، فعالیت شنا، شناسایی، اجتناب از شکارچی و جهت‌گیری فضایی گونه تاثیر می‌گذارند (Banaee *et al*., 2011; Hakim *et al*., 2016). بنابراین دلیل دیگری که برای کاهش وزن گیری مشاهده شده در ماهیان تحت تیمار با مالاتیون می‌توان ذکر نمود اختلال در فعالیت تغذیه و غذاگیری ماهیان است. تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* هیچ تاثیری بر سطوح خونی این آنزیم نداشت. آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانس‌فراز، آلانین آمینوترانس‌فراز، آلکالین فسفاتاز، لاکتات دهیدروژناز و کراتین فسفوکیناز در اندام‌های گوناگون یافت می‌شوند و در هنگام آسیب و تخریب سلول‌های بافتی این آنزیم‌ها به درون سرم خون آزاد می‌شوند. افزایش فعالیت آنزیم‌های ترانس آمیناز نشان‌دهنده‌ی افزایش فرآیند ترانس آمیناسیون می‌باشد که در زمان ورود اسید آمینه به چرخه کربس برای تامین انرژی رخ می‌دهد (Banaee *et al*., 2011; Velisek *et al*., 2011). در آزمایش حاضر فعالیت آسپارتات آمینوترانس‌فراز پلاسما در ماهی‌های تحت تیمار با مالاتیون به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. به گفته‌ی Banaee و همکاران (۲۰۱۱) افزایش فعالیت

AST نشان‌دهنده افزایش شکست پروتئین در بافت‌های مختلف است. بنابراین می‌توان عنوان کرد که ماهی‌های تحت تیمار با مالاتیون به‌علت افزایش تقاضای انرژی تحت شرایط استرس آلودگی که منجر به شکست پروتئین بافت‌های مختلف برای تامین انرژی می‌شود، این افزایش سطح را نشان داده‌اند. تجویز خوراکی *L. rhamnosus* تاثیر معنی‌داری بر کاهش تجزیه‌ی پروتئینی ناشی از اثرگذاری مالاتیون در بافت‌های مختلف نداشت. آنزیم آلکالین فسفاتاز، استرهای مختلف فسفریک را در pH قلیایی تجزیه می‌کند و فعالیت آن مربوط به آسیب سلولی است (Agrahari *et al*., 2007). فعالیت آلکالین فسفاتاز در گروه آزمایشی در معرض مالاتیون توام با جیره شاهد بیشترین میزان را نشان داد و با سایر گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌دار بود. در آزمایشی مشابه که توسط Mohapatra و همکاران (۲۰۱۲) در مورد اثر‌گذاری مخلوط چند سویه پروبیوتیکی بر فعالیت آلکالین فسفاتاز سرم خون ماهی *Labeo rohita* تحت سمیت فنوالرات انجام شد فعالیت این آنزیم در ماهی‌های تغذیه شده با مخلوط پروبیوتیکی که تحت تیمار با فنوالرات بودند کاهش معنی‌داری در مقایسه با جیره‌ی شاهد نشان داد. در آزمایش حاضر افزایش فعالیت این آنزیم در پلاسما به گفته‌ی Banaee و همکاران (۲۰۱۱) ممکن است به‌علت آسیب بافت کبدی و اختلال در عملکرد بافت کبدی ناشی از سمیت آفت‌کش باشد و به احتمال زیاد به افزایش فعالیت ترانسفسفراسیون مربوط است. از طرفی طبق اظهارات Yarahmadi و همکاران (۲۰۱۶) فعالیت ALP سرم به عنوان یک عامل ایمنی نیز شناخته می‌شود و کاهش معنادار فعالیت این آنزیم در اثر تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* در مقایسه با جیره‌ی شاهد در ماهی‌های تحت تیمار با مالاتیون می‌تواند نشان‌دهنده بهبود وضعیت ایمنی ماهی در این گروه باشد. از دیگر آنزیم‌های خونی مورد سنجش آنزیم لاکتات دهیدروژناز و کراتین فسفوکیناز بود که طبق نتایج به‌دست آمده شاهد بیشترین سطح فعالیت این آنزیم‌ها در ماهیان تحت تیمار با مالاتیون بودیم و تجویز خوراکی پروبیوتیک *L. rhamnosus* تاثیر معنی‌داری بر کاهش سطح خونی هیچ کدام نداشت. سطح بالای این آنزیم‌ها در پلاسما نشان دهنده آسیب متناوب به فیبرهای عضلانی و سایر بافت‌ها است (Banaee *et al*., 2011).

نتایج حاصل از آزمایش حاضر نشان داد که تجویز مکمل تغذیه‌ای *L. rhamnosus* برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پیرو قرارگیری در معرض سمیت تحت‌کشنده‌ی مالاتیون تاثیری بر کاهش آسیب و اختلال عملکردی بافت‌های مختلف ندارد. اما با توجه به نتایج حاصل از بررسی شاخص پروتئین‌های خون و سطح سرمی آنزیم ALP به‌طور غیر مستقیم این طور استنباط می‌شود که استفاده از *L. rhamnosus* باعث بهبود عملکرد سیستم دفاعی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود و اثرات مخرب مالاتیون بر سیستم ایمنی را کاهش می‌دهد. همچنین بررسی شاخص استرسی کورتیزول خون نیز گواه از کاهش معنی‌دار میزان استرس وارده به ماهی در مواجه با سمیت تحت‌کشنده‌ی مالاتیون می‌باشد.

References

Agrahari, S., Pandey, K.C., Gopal, K., 2007. Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 88, 268-272.

Avella, M., Young, G., Prunet, P., Schreck, C. B., 1990. Plasma prolactin and cortisol concentrations during salinity challenges of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) at smolt and post-smolt stages. *Aquaculture* 91, 359-372.

Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A.R., Ahmadi, K., 2011. Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 99, 1-6.

Barham, D., Trinder, P., 1972. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst* 97, 142-145.

Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L., 2009. Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Aquaculture* 294, 306-313.

Dietrich, J.P., Van Gaest, A.L., Strickland, S.A., Arkoosh, M.R., 2014. The impact of temperature stress and pesticide exposure on mortality and disease susceptibility of endangered Pacific salmon. *Chemosphere* 108, 353-359.

Ebrahimzadeh, M.A., Karami, M., Golrokh, M., 2004. Measurement of choline esterase activity in the white fish brain in marine and breeding species as an indicator of the health of these fish. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences* 6, 33-38.

Farrokhi, F., Jamili, Sh., Shahidi, M., Mashinchian, A., Vosoughi, Gh., 2016. Investigating the effect of malathion insecticide on tissue and liver enzymes of *Rutilus rutilus caspicus*. *Scientific Journal of Fisheries Journal* 24, 117-126.

Ghaffari Farsani, H., Pourbagher, H., Farahmand, H., 2016. The effect of malathion on DNA fracture in the liver and gill area of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using the mean weight method. *Journal of Fisheries* 69, 89-99.

Greis, T., Purghart, V., 2001. Malathion technical: acute toxicity test with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under flow-through conditions. Study performed by Springborn Laboratories for Cheminova A/S. Study, (1005.018), p.108.

Hakim, Y., El-Sayed, H.M., Ali, H.A., 2016. Chronic effect of fenitrothion on health of *Oreochromis niloticus* and oxidative stress biomarkers. *Zagazig Veterinary Journal* 42.

Hamed, H.S., 2015. Impact of a short-term malathion exposure of Nile tilapia, (*Oreochromis niloticus*): the protective role of selenium. *International Journal of Environmental Monitoring and Analysis* 3, 30-37.

Hebb, C.D., Castell, J.D., Anderson, D.M., Batt, J., 2003. Growth and feed conversion of juvenile winter flounder (*Pleuronectes americanus*) in relation to different protein-to-lipid levels in isocaloric diets. *Aquaculture* 221, 439-449.

Hoseinifar, S.H., Ringø, E., Shenavar Masouleh, A., Esteban, M.Á., 2016. Probiotic, prebiotic and synbiotic supplements in sturgeon aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture* 8, 89-102.

Kaya, H., Çelik, E.Ş., Yılmaz, S., Tulgar, A., Akbulut, M., Demir, N., 2015. Hematological, serum biochemical, and immunological responses in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to phosalone. *Comparative Clinical Pathology* 24, 497-507.

Koakoski, G., Quevedo, R.M., Ferreira, D., Oliveira, T.A., da Rosa, J.G.S., de Abreu, M.S., Gusso, D., Marqueze, A., Kreutz, L.C., Giacomini, A.C.V., Fagundes, M., 2014. Agrichemicals chronically inhibit the cortisol response to stress in fish. *Chemosphere* 112, 85-91.

Mirvaghefi, A., Farahmand, H., Rafiei, Gh., Banaee, M., 2012. Evaluation of Biochemical Characteristics of Blood and Histopathology in experimental poisoning with diazinon in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fisheries* 65, 119-133.

Mohapatra, S., Chakraborty, T., Prusty, A.K., Kumar, K., Prasad, K.P., Mohanta, K.N., 2012. Fenvalerate induced stress mitigation by dietary supplementation of multispecies probiotic mixture in a tropical freshwater fish, *Labeo rohita* (Hamilton). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 104, 28-37.

Barati Zadeh, S., Pighan, R., Jalali, M.R., 2018. Investigating Interaction of filtration (carbon filter, zeolite and simple filtration) and fish density (*Labidochromis caeruleus*) on growth and nitrogen content of water. *Iranian Journal of Veterinary Medicine* 56, 15-23.

Sheikh Veisi, R., Bagheri, T., Sanchuli, H., Hedayati, S.A.A., 2018. Effects of different levels of probiotic *Lactobacillus casei* and silver nanoparticles on growth indices and carcass composition of common carp (*Cyprinus carpio*). *Scientific Journal of Aquatic Physiology and Biotechnology* 5, 73-90.

Shiri, N., Khoshnoudifar, Kh., Mirvaghefi, A., 2014. Determination of the degree of toxicity of malathion and investigating its effects on some blood indices of Guinea pig carp (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758). *Journal of Fisheries Science and Technology* 3, 1-11.

Sinyakov, M.S., Dror, M., Zhevelev, H.M., Margel, S., Avtalion, R.R., 2002. Natural antibodies and their significance in active immunization and protection against a defined pathogen in fish. *Vaccine* 20, 3668-3674.

Topic Popovic, N., Strunjak-Perovic, I., Sauerborn-Klobucar, R., Barisic, J., Jadan, M., Kazazic, S., Kesner-Koren, I., Prevendar Crnic, A., Suran, J., Beer Ljubic, B., Matijatko, V., 2017. The effects of diet supplemented with *Lactobacillus rhamnosus* on tissue parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss (Walbaum). Aquaculture Research* 48, 2388-2401.

Trinder, M., McDowell, T.W., Daisley, B.A., Ali, S.N., Leong, H.S., Sumarah, M.W., Reid, G., 2016. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* reduces organophosphate pesticide absorption and toxicity to Drosophila melanogaster. *Applied and Environmental Microbiology* 82, 6204-6213.

Velisek, J., Stara, A., Kolarova, J., Svobodova, Z., 2011. Biochemical, physiological and morfological responses in common carp (*Cyprinus carpio* L.) after long-term exposure to terbutryn in real environmental concentration. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 100, 305-313.

Waché, Y., Auffray, F., Gatesoupe, F.J., Zambonino, J., Gayet, V., Labbé, L., Quentel, C., 2006. Cross effects of the strain of dietary Saccharomyces cerevisiae and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, fry. *Aquaculture* 258, 470-478.

Yarahmadi, P., Farsani, H.G., Khazaei, A., Khodadadi, M., Rashidiyan, G., Jalali, M.A., 2016. Protective effects of the prebiotic on the immunological indicators of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and shellfish*

immunology 54, 589-597.

Yonar, S.M., Ural, M.Ş., Silici, S., Yonar, M.E., 2014. Malathion-induced changes in the haematological profile, the immune response, and the oxidative/antioxidant status of *Cyprinus carpio carpio*: Protective role of propolis. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 102, 202-209.

Yu, L., Zhai, Q., Zhu, J., Zhang, C., Li, T., Liu, X., Zhao, J., Zhang, H., Tian, F., Chen, W., 2017. Dietary *Lactobacillus plantarum* supplementation enhances growth performance and alleviates aluminum toxicity in tilapia. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 143, 307-314.