



University of Guilan

University of Guilan with collaboration of Iranian
Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 8, No. 4, 2023, pages: 19-30
DOI: 10.22124/janb.2023.24121.1195



Effects of different levels of galactooligosaccharide on growth, biochemical body composition, and blood indices in juvenile common carp, *Cyprinus carpio*

Foad Pour, Nasim Zanguee, Hamid Mohammadiazarm*

Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Khuzestan, Iran

Received 12 October 2022

Revised 17 December 2022

Accepted 20 December 2022

KEYWORDS

Common carp
Prebiotic
Growth
Biochemical
body
composition
Blood

ABSTRACT

In this study, in order to use prebiotics as one of the best solutions to maintain the health of farmed aquatic animals and increase their resistance against pathogens instead of antibiotics, the effects of different levels of galactooligosaccharide (GOS) prebiotics on growth performance, biochemical body composition, and some blood serum indices were investigated. Therefore, two hundred and forty fish were randomly distributed into 12 tanks with capacity of 100 L in four treatments with three replicates. Experimental treatments included control (no GOS added), T₁: 1% dietary GOS added, T₂: 2% dietary GOS, and T₃: 4% dietary GOS. The fish were fed *ad libitum* two times daily for 8 weeks. The results showed that GOS improved growth and nutritional performance, body biochemical composition, and some blood serum indices in common carp. T₂ exhibited the highest performance in terms of final weight (32.58 ± 1.08 g), food conversion ratio (1.57 ± 0.09), protein content of the body ($14.78 \pm 3.77\%$), serum total protein (4.66 ± 0.18 g/dL), globulin (3.34 ± 0.15 g/dL), and some other biochemical parameters of blood. Therefore, 2% dietary GOS had beneficial effects on performance of juveniles common carp.

*Corresponding author: azarmhamid@gmail.com





تغذیه آبریان

سال هشتم، شماره چهارم، زمستان ۱۴۰۱، صفحات ۱۹-۳۰

DOI: 10.22124/janb.2023.24121.1195

"مقاله پژوهشی"

اثرات سطوح مختلف پری بیوتیک گالاکتوالیگوساکارید بر عملکرد رشد، ترکیب بیوشیمیایی بدن و برخی شاخص-های بیوشیمیایی خون ماهی جوان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

فواد پور، نسیم زنگویی، حمید محمدی آذر*

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، خوزستان

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۹

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۹/۲۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۲۰

کلمات کلیدی

چکیده

در این مطالعه برای استفاده از پری بیوتیک‌ها به عنوان یکی از بهترین راهکارها برای حفظ سلامت آبریان پرورشی و افزایش مقاومت آنها در برابر عوامل بیماریزا، اثرات سطوح مختلف پری بیوتیک گالاکتوالیگوساکارید بر عملکرد رشد، ترکیب بدن و برخی شاخص‌های بیوشیمیایی خون ماهیان جوان کپور معمولی بررسی شد. به این منظور، تعداد ۲۴۰ عدد ماهی در ۱۲ مخزن با حجم آبگیری ۱۰۰ لیتر در ۴ تیمار با ۳ تکرار به صورت تصادفی تقسیم شدند. تیمارهای آزمایشی به شرح تیمار شاهد: جیره غذایی پایه بدون گالاکتوالیگوساکارید، تیمار اول: ۱٪ گالاکتوالیگوساکارید، تیمار دوم: ۲٪ گالاکتوالیگوساکارید، تیمار سوم: ۴٪ گالاکتوالیگوساکارید بودند. ماهیان دو بار در روز در حد سیری به مدت ۵۶ روز تغذیه شدند. نتایج نشان داد که گالاکتوالیگوساکارید استفاده شده منجر به بهبود عملکرد رشد و تغذیه‌ای، ترکیبات بیوشیمیایی بدن و برخی شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون ماهی کپور معمولی شده است. تیمار غذایی حاوی ۲٪ گالاکتوالیگوساکارید در بین تیمارهای آزمایشی، بهترین عملکرد را از نظر مقدار وزن نهایی ($32/58 \pm 1/08$ گرم)، ضریب تبدیل غذایی ($1/57 \pm 0/09$)، درصد پروتئین بدن ($14/78 \pm 0/18$)، پروتئین سرم خون ($0/17$ g/dL) $\pm 4/66$ ، گلوبولین ($3/34 \pm 0/07$ g/dL) و دیگر شاخص‌های بیوشیمیایی خون نشان داد. بنابراین، استفاده از ۲٪ گالاکتوالیگوساکارید در جیره غذایی اثرات مطلوبی بر عملکرد ماهیان جوان کپور معمولی داشت.

مقدمه

تغذیه مناسب به عنوان یکی از عوامل کلیدی در ارتقای رشد و سلامت ماهی است. به واسطه غذای مناسب همواره باید علاوه بر تأمین نیازهای فیزیولوژیک ماهی، موجبات سلامت ماهیان را تأمین کرد (Lee et al. 2015). در طی ده سال گذشته، آنتی‌بیوتیک‌ها به طور مرسوم برای مدیریت بیماری‌های آبزیان و همچنین برای افزایش رشد و بهبود ضریب تبدیل غذای استفاده شدند (Akrami et al. 2010). با توجه به اینکه پخش و گسترش باکتری‌های مقاوم نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها به اثبات رسیده است، این خطر وجود دارد که باکتری‌های مقاوم نسبت به آنتی-بیوتیک‌ها از محیط آبی پروری به محیط‌های آبی وارد شوند و در نتیجه منجر به صدمه به جوامع میکروبی و دستگاه ایمنی ماهیان موجود در محیط‌های آبی شوند (Sapkota et al. 2008). همچنین آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به متوقف کردن رشد یا کشتن باکتری‌های مفید روده‌ای شده و از سوی دیگر در بدن آبی تجمع می‌کنند (Merrifield and Ringo, 2014).

بر همین اساس، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها بعنوان محرک رشد در سیستم‌های تولید آبزیان با محدودیت و ممنوعیت همراه است. لذا در ارتباط با ممنوعیت استفاده از محرک‌های رشد آنتی بیوتیکی برنامه‌های جدیدی برای مدیریت تغذیه و سلامتی آبی در نظر گرفته شده است، مانند بکارگیری مکمل‌های غذایی جدید نظیر پروبیوتیک‌ها، پری بیوتیک‌ها، سین‌بیوتیک‌ها، فیتوبیوتیک‌ها و سایر مکمل‌های غذایی کاربردی که حاوی ترکیبات مختلف برای افزایش رشد، تحریک و بلوغ سریع سیستم ایمنی، بهبود کارایی غذا، کاهش میزان مرگ و میر، بهبود فرآیند هضم، رشد سریع میکرو فلورهای مناسب روده، تاثیر بر میزان اشتها و افزایش میزان تغذیه است (Denev et al. 2009).

پری‌بیوتیک‌ها مواد غذایی غیرقابل هضمی هستند که به عنوان محرک رشد شناخته شده و همچنین با محدود کردن تمام یا تعدادی از باکتری‌های روده منجر به بهبود سلامت میزبان می‌شوند (Gibson and Roberfroid, 1995). پری‌بیوتیک با تغییر فلور دستگاه گوارش و مهار رشد گونه‌های بیماری‌زا یا رشد باکتری‌های مفید دستگاه گوارش اثر خود را اعمال می‌کند (Merrifield and Ringo, 2014). این مواد به عنوان کربوهیدرات‌ها

پیچیده جیره که غیرقابل هضم هستند تعریف می‌شوند، زیرا باندهای بتا بین مونومرهای فروکتوز نمی‌توانند توسط آنزیم‌های داخلی بدن حیوان هیدرولیز شوند. در نتیجه به عنوان سوپسترا در دسترس ریزموجودات دستگاه گوارش قرار می‌گیرند (Merrifield and Ringo, 2014). از طرفی، پری‌بیوتیک‌ها به صورت انتخابی باعث تحریک فعالیت و سوخت و ساز باکتری‌های مفید موجود در انتهای دستگاه گوارش شده و از این طریق باعث تعادل باکتریایی در میزبان می‌شوند (Lee et al. 2015). یکی از انواع الیگوساکاریدها که اخیراً به عنوان پری‌بیوتیک در تغذیه آبزیان مطرح شده گالاتوالیگوساکارید است.

با وجود اثرات مفیدی که برای پری‌بیوتیک در نظر گرفته شده است، تحقیقات در این زمینه هنوز در ابتدای راه قرار داشته و مطالعات محدودی انجام شده است. برای مثال، در مطالعه‌ای در خصوص اثر ۰/۴٪ بتاگلوکاکان و ۰/۴٪ مانان الیگوساکارید در ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)، شاخص‌های رشد و ایمنی ماهیان بهبود یافت (Jami et al. 2019). استفاده از ۰/۵ تا ۱/۵ گرم بتاگلوکاکان و مانان الیگوساکارید در جیره غذایی ماهی تیلپایی نیل (*Oreochromis niloticus*) منجر به افزایش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زای محیطی شد (Ismail et al. 2019). همچنین در مطالعه‌ای بر ماهی شانک سفید (*Diplodus sargus*)، اثر سطوح مختلف فروکتوالیگوساکارید، گالاتوالیگوساکارید و زیلوالیگوساکارید بر عملکرد رشد، زنده‌مانی، ایمنی، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و ریخت‌شناسی روده ماهیان انجام شد. لذا نتایج نشان دهنده اثرگذاری مطلوب ۱٪ فروکتوالیگوساکارید، زیلوالیگوساکارید و یا گالاتوالیگوساکارید بر فراسنجه‌های بیان شده در ماهیان بود (Guerreiro et al. 2018). استفاده از ۱٪ فروکتوالیگوساکارید در جیره غذایی ماهیان ازون برون (*Acipenser stellatus*) منجر به افزایش فعالیت لیزوزیم سرم در ماهیان شد (Akrami et al. 2013). همچنین، استفاده از ۱٪ گالاتوالیگوساکارید در جیره غذایی ماهیان شوریده قرمز (*Sciaenops ocellatus*)، منجر به افزایش سطوح شاخص‌های ایمنی مانند فعالیت لیزوزیم و انفجار تنفسی و همچنین درازای پرزهای روده ماهیان شد (Zhou et al. 2010). از طرفی، بررسی اثرات استفاده از سطوح مختلف مانان الیگوساکارید در

نظر گرفته شد. سه تیمار آزمایشی و یک گروه شاهد بود. قبل از ذخیره‌سازی، مخازن کاملاً با بتادین (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) ضدعفونی و با آب شستشو داده شدند و سپس آبیگری آنها با آب شهری کلرزدايي شده با هوادهی انجام شد. دوره سازگاری ماهیان برای سازگار شدن با شرایط جدید، به مدت دو هفته قبل از شروع آزمایش انجام شد. در طول دوره سازگاری، روزانه ۲ بار غذایی تا حد سیری با غذای فرموله پایه (غذای تجاری شرکت فرادانه) انجام شد. بر اساس اعلام شرکت مذکور این جیره حاوی ۳۵-۳۸٪ پروتئین، ۴-۸٪ چربی، ۵-۱۱٪ رطوبت و ۷-۱۱٪ رطوبت بود.

تیمارهای آزمایشی به شرح تیمار شاهد: جیره غذایی پایه بدون گالاتوالیگوساکارید، تیمار اول: جیره غذایی حاوی ۱ درصد گالاتوالیگوساکارید، تیمار دوم: جیره غذایی حاوی ۲٪ گالاتوالیگوساکارید، تیمار سوم: جیره غذایی حاوی ۴٪ گالاتوالیگوساکارید بودند.

برای آماده‌سازی جیره‌های آزمایشی ابتدا جیره پایه استفاده شده در دوره سازگاری آسیاب، و از الک عبور داده شد. سپس با استفاده از ترازوی دیجیتال توزین و در ادامه مقادیر مورد نیاز پری‌بیوتیک گالاتوالیگوساکارید تهیه شده (BENE0 GmbH, Mannheim, Germany) به همراه محلول آب و پودر ژلاتین به مخلوط اضافه شده و خمیر حاصله توسط دستگاه چرخ گوشت برقی به صورت رشته‌های غذایی در سینی‌های جداگانه قرار گرفتند. در نهایت، جیره‌های غذایی تهیه شده در دامای معمولی آزمایشگاه به مدت ۲۴ ساعت خشک و در کیسه‌های پلاستیکی بسته بندی و در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف نگهداری شد. در طول مدت آزمایش که به مدت ۸ هفته ادامه یافت، ماهیان ۲ بار در روز در ساعات ۹ و ۱۶ در حد سیری تغذیه شدند. برای توزیع یکنواخت غذا، کاهش تلاطم آب و افزایش زمان ماندگاری غذا در آب، در طی مدت غذایی، هوادهی در مخازن قطع شده و پس از ۳۰ دقیقه، مجدداً هوادهی انجام شد.

در انتهای دوره و پس از بیهوشی کامل با عصاره گل میخک (۲۰۰ میلی‌گرم به ازای هر یک لیتر آب)، تمام ماهیان هر تکرار وزن شدند. در ادامه، شاخص‌های افزایش وزن بدن، ضریب رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی و میزان بازماندگی، بر اساس روابط زیر محاسبه شدند:

جیره غذایی سی‌بریم اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) نشان دهنده اثرات مثبت سطح ۰/۴٪ پری‌بیوتیک به کار رفته در جیره غذایی ماهیان بود (Torrecillas et al. 2016). همچنین بررسی‌های یک مطالعه نشان داد استفاده از گالاتوالیگوساکارید در جیره غذایی بچه ماهی کلمه خزری (*Rutilus rutilus caspicus*) باعث افزایش شاخص‌های ایمنی سرم، پوست و افزایش رشد می‌شود (Hoseinifar et al. 2015). از این رو تعیین سطح مناسب پری‌بیوتیک در جیره غذایی با توجه به نوع آنها و گونه آبزیان ضروری است.

همچنین ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) گونه‌ای با گسترش جهانی پرورش است و در بیش از ۱۳۰ کشور پرورش می‌یابد. نوع بومی و وحشی محدود به کشورهای چین، روسیه، جمهوری آذربایجان، گرجستان، قزاقستان، مغولستان، ترکیه، ازبکستان، اتریش، بلغارستان و غیره است. ماهی کپور معمولی دارای اهمیت اقتصادی است و نقش مهمی در سبد غذایی و پایداری امنیت غذایی مردم دارد.

میزان تولید محصولات آبی پروری در بخش آب‌های داخلی ۵۱/۳ میلیون تن وزن تر در سال ۲۰۱۸ است. از این میزان ۵۴۲۷۹ هزار تن متعلق به ماهیان است. که از این میان ۷/۷٪ با میزان تولید ۴۱۸۹/۵ هزار تن متعلق به کپور معمولی است (FAO, 2020). در کشور ایران، ماهیان گرمابی با میزان تولید ۲۲۱۰۹۰ تن دارای رتبه اول ماهیان پرورشی و استان خوزستان با تولید ۷۲۲۴۰ تن رتبه اول کشور در سال ۱۳۹۹ در تولید را دارا بود. حدود ۳۰٪ از تولید ماهیان گرمابی در کشور متعلق به پرورش کپور معمولی به میزان ۶۶۳۲۷ تن تولید است. بر این اساس، آزمون تغذیه‌ای برای بررسی و ارزیابی اثر تغذیه‌ای پری-بیوتیک گالاتوالیگوساکارید در جیره غذایی فرموله شده کپور معمولی طراحی شد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۲۴۰ قطعه ماهی کپور معمولی با میانگین وزن اولیه یکسان از شرکت پرورش ماهی اخوان نصر خرمشهر تامین و به طور کاملاً تصادفی بین ۱۲ عدد مخزن با حجم آبیگری ۱۰۰ لیتر توزیع شد (۲۰ قطعه ماهی به ازای هر مخزن یا تکرار). در این مطالعه چهار تیمار با سه تکرار در وزن اولیه (گرم) - وزن نهایی (گرم) = افزایش وزن بدن (WG)

$$100 \times \text{دوره پرورش به روز} / (\ln W_2 - \ln W_1) = \text{ضریب رشد ویژه (SGR)}$$

$$\text{افزایش وزن بدن (گرم)} / \text{مقدار غذای خورده شده (گرم)} = \text{ضریب تبدیل غذایی (FCR)}$$

$$\text{پروتئین مصرفی (گرم)} / \text{افزایش وزن بدن (گرم)} = \text{نسبت کارایی پروتئین (PER)}$$

$$100 \times \text{خوراک خورده شده (گرم)} / \text{افزایش وزن بدن (گرم)} = \text{درصد کارایی غذا (FE)}$$

$$100 \times \text{تعداد ماهیان کل} / \text{تعداد ماهیان باقی مانده} = \text{درصد بازماندگی (SR)}$$

استفاده از سرم کنترل‌های TruLab N و TruLab P ساخت شرکت پارس آزمون قبل از انجام آزمایش و در طول انجام آزمایش کنترل شد. برای به دست آوردن میزان گلوبولین نیز، مقادیر آلبومین از پروتئین کسر شد. نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون Shapiro Wilk بررسی شد. شاخص‌های زیستی با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و تست Duncan به عنوان پس‌آزمون، برای مقایسه میانگین‌ها تجزیه و تحلیل شد. تجزیه و تحلیل کلیه داده‌ها توسط نرم افزار SPSS انجام شد. نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد (Mean \pm SE) بیان شده است.

نتایج

نتایج ارزیابی شاخص‌های رشد و تغذیه ای ماهیان کپور معمولی در انتهای دوره آزمایشی در جدول ۱ آمده است. نتایج ارزیابی شاخص‌های رشد و تغذیه‌ای در تیمارهای حاوی پری بیوتیک نشان دهنده بهبود نسبت به تیمار شاهد بود ($p < 0.05$). در این بین، وزن نهایی ماهیان کپور معمولی در تیمار ۲٪ پری بیوتیک نسبت به گروه شاهد و دیگر گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌دار داشت ($p < 0.05$). به طوری که با افزایش معنی‌دار میزان وزن نهایی در این تیمار، میزان افزایش وزن بدن و میزان ضریب رشد ویژه، افزایش معنی‌داری نشان داد ($p < 0.05$). میزان ضریب تبدیل غذایی نیز به صورت معنی‌داری در تیمار ۲٪ پری بیوتیک نسبت به گروه شاهد و دیگر گروه‌های آزمایشی کاهش پیدا کرد ($p < 0.05$). همچنین میزان کارایی غذای در یافتی و نسبت کارایی پروتئین در تیمارهای حاوی پری بیوتیک نیز به طور معنی‌دار نسبت به گروه شاهد بهبود پیدا کرد ($p < 0.05$). اما میزان بازماندگی در پایان دوره آزمایشی هیچ اختلاف معنی‌داری در بین گروه‌های آزمایشی نداشت ($p > 0.05$).

همچنین در پایان دوره آزمایشی برای ارزیابی ترکیبات بیوشیمیایی لاشه ماهیان، تعداد ۳ قطعه ماهی از هر تکرار (۹ قطعه ماهی از هر تیمار) به طور تصادفی از مخازن خارج و تا زمان انجام سنجش‌ها در فریزر، در دمای -20°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سنجش تقریبی ترکیبات بیوشیمیایی لاشه با استفاده از روش‌های استاندارد (AOAC, 1995) انجام شد. مقدار رطوبت درون نمونه‌ها با استفاده از آون در دمای 105°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت سنجش شد. میزان پروتئین بدن ماهیان براساس روش کلدال و با استفاده از دستگاه کلدال اتوماتیک (مدل TM2300، شرکت Foss، سوئد) تعیین گردید. همچنین میزان چربی نمونه‌های ماهی، با استفاده از دستگاه سوکسله (مدل TM8000، شرکت Foss، سوئد) سنجش شد. در ادامه، به منظور سنجش مقدار خاکستر، نمونه‌ها به مدت ۶ ساعت در یک کوره الکتریکی با دمای تقریبی 550°C درجه سانتی‌گراد سوزانده شدند. در پایان دوره آزمایش، به منظور ارزیابی فاکتورهای سرمی خون تعداد ۳ قطعه ماهی از هر تکرار (۹ قطعه ماهی از هر تیمار) به صورت کاملاً تصادفی انتخاب شده و به وسیله عصاره گل میخک (200 میلی‌گرم در لیتر) بیهوش شدند. خون‌گیری از طریق ساقه دمی و با استفاده از سرنگ‌های غیر هیپارینه انجام شد. در ادامه، سرم مورد آزمایش تا زمان سنجش در دمای 80°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون در این مطالعه شامل گلوکز، کلسترول، تری‌گلیسرید، پروتئین، آلبومین، لیپوپروتئین کم چگال (LDL)، لیپوپروتئین پر چگال (HDL) به وسیله دستگاه اتوانالایزر (Mindrey BS200، چین) با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی (شرکت پارس آزمون، کرج، ایران) و روش فتومتریک سنجش شد. همچنین قبل از اندازه‌گیری فراسنجه‌های مورد نظر، برای بالابردن دقت و صحت نتایج، دستگاه اتوانالایزر توسط سرم کالیبراتور TruCal U و سپس با

جدول ۱ شاخص های رشد و تغذیه ماهیان کپور معمولی جوان در انتهای دوره آزمایش.

درصد پری بیوتیک گالاکتوالیگوساکارید				
۴	۲	۱	شاهد	
۱۵/۱۲ ± ۰/۱۲	۱۵/۱۳ ± ۰/۱۳	۱۵/۱۰ ± ۰/۱۰	۱۵/۱۱ ± ۰/۱۱ ^{ns}	وزن اولیه (گرم)
۲۷/۴۱ ± ۱/۵۹ ^a	۳۲/۵۸ ± ۱/۰۸ ^c	۳۰/۰۳ ± ۱/۳۷ ^b	۲۶/۱۴ ± ۰/۹۴ ^a	وزن نهایی (گرم)
۱۲/۳۰ ± ۱/۴۷ ^a	۱۷/۴۳ ± ۱/۰۲ ^c	۱۴/۹۰ ± ۱/۲۵ ^b	۱۱/۰۳ ± ۰/۸۶ ^a	افزایش وزن (گرم)
۱/۰۶ ± ۰/۰۹ ^a	۱/۳۶ ± ۰/۰۵ ^b	۱/۲۲ ± ۰/۰۷ ^b	۰/۹۷ ± ۰/۰۵ ^a	نرخ رشد ویژه (درصد در روز)
۱/۷ ± ۰/۱۴ ^{ab}	۱/۵۷ ± ۰/۰۹ ^c	۱/۶۰ ± ۰/۰۵ ^{ab}	۲/۰۱ ± ۰/۱۹ ^{ab}	ضریب تبدیل غذایی
۵۹/۰۶ ± ۴/۸۶ ^b	۶۳/۶۳ ± ۳/۹۳ ^b	۶۲/۴۶ ± ۲/۱۳ ^b	۵۰/۲۶ ± ۵/۱۵ ^a	کارایی غذا (درصد)
۱/۶۸ ± ۰/۱۴ ^b	۱/۸۱ ± ۰/۱۰ ^b	۱/۷۸ ± ۰/۰۶ ^b	۱/۴۳ ± ۰/۱۴ ^a	نسبت کارایی پروتئین
۹۵ ± ۵	۹۶/۶۶ ± ۵/۷۷	۹۸/۳۳ ± ۲/۸۸	۹۳/۳۳ ± ۵/۷۷ ^{ns}	زنده مانی (درصد)

* حروف متفاوت در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی دار بین گروه‌های آزمایشی است (میانگین ± خطای استاندارد، $p < 0.05$). تفاوت غیر معنی دار ($p > 0.05$): ns

به گروه شاهد کاهش یافت که این مقدار در تیمار ۲٪ پری بیوتیک در مقایسه با شاهد معنی دار بود ($p < 0.05$). کمترین درصد چربی لاشه ($6/98 \pm 0/11$) و بیشترین درصد پروتئین لاشه ($14/78 \pm 0/18$) در تیمار ۲٪ پری بیوتیک مشاهده شد. همچنین میزان رطوبت و خاکستر تفاوت معنی داری در بین گروه‌های آزمایشی نداشت ($p > 0.05$).

نتایج ارزیابی شاخص‌های ترکیبات بیوشیمیایی بدن ماهیان کپور معمولی در انتهای دوره آزمایشی در جدول ۲ آمده است. نتایج ارزیابی میزان پروتئین کل ماهیان کپور معمولی در انتهای دوره آزمایشی نشان داد، میزان پروتئین کل در تیمارهای حاوی پری بیوتیک به طور معنی دار نسبت به دیگر گروه شاهد افزایش داشتند ($p < 0.05$). میزان چربی بدن در تیمارهای حاوی پری بیوتیک نسبت

جدول ۲ آنالیز تقریبی لاشه ماهیان کپور معمولی در انتهای دوره آزمایش (درصد وزن تر).

درصد پری بیوتیک گالاکتوالیگوساکارید				
۴	۲	۱	شاهد	
۱۴/۳۱ ± ۰/۱۴ ^b	۱۴/۷۸ ± ۰/۱۸ ^c	۱۴/۴۹ ± ۰/۱۵ ^{bc}	۱۳/۶۲ ± ۰/۲۵ ^a	پروتئین
۷/۱۷ ± ۰/۰۹ ^b	۶/۹۸ ± ۰/۱۱ ^a	۷/۰۹ ± ۰/۱۵ ^{ab}	۷/۲۵ ± ۰/۰۸ ^b	چربی
۲/۷۵ ± ۰/۱۵	۲/۷۳ ± ۰/۲۰	۲/۷۴ ± ۰/۲۱	۲/۷۱ ± ۰/۲۴ ^{ns}	خاکستر
۷۴/۶۵ ± ۲/۷۷	۷۴/۴۳ ± ۳/۷۷	۷۴/۶۵ ± ۲/۴۷	۷۵/۲۶ ± ۱/۲۳ ^{ns}	رطوبت

* حروف متفاوت در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی دار بین گروه‌های آزمایشی است (میانگین ± خطای استاندارد، $p < 0.05$). تفاوت غیر معنی دار ($p > 0.05$): ns

آزمایشی بود ($p < 0.05$). همچنین، مقدار کلسترول و تری گلیسرید در ۲٪ پری بیوتیک به صورت معنی داری نسبت به گروه شاهد کاهش پیدا کرد ($p < 0.05$). مقدار لیپوپروتئین پرچگال (HDL) در ۲٪ پری بیوتیک به طور معنی دار نسبت به شاهد و تیمار ۳ (۴٪ پری بیوتیک) افزایش یافت ($p < 0.05$)، اما مقدار لیپوپروتئین کم چگال در تیمار ۴٪ پری بیوتیک نسبت به شاهد به طور معنی دار

نتایج حاصل از ارزیابی فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون ماهیان در جدول ۳ ارائه شده است. مقدار پروتئین، گلوبولین و آلبومین در تیمارهای حاوی پری بیوتیک نسبت به گروه شاهد افزایش داشت که در تیمار ۲٪ پری بیوتیک این افزایش معنی دار بوده است ($p < 0.05$). نتایج ارزیابی گلوکز حاکی از کاهش معنی دار میزان گلوکز در ۲٪ پری بیوتیک نسبت به گروه شاهد و دیگر گروه‌های

کاهش یافت ($p < 0.05$) که با تیمار ۲٪ پری بیوتیک تفاوت معنی دار نداشت ($p > 0.05$).

جدول ۳ فاکتورهای بیوشیمیایی سرم ماهیان کپور معمولی در انتهای دوره آزمایش.

درصد پری بیوتیک گالاکتوالیگوساکارید				
۴	۲	۱	شاهد	
۴/۳۱ ± ۰/۱۰ ^{ab}	۴/۶۶ ± ۰/۱۷ ^b	۴/۵۳ ± ۰/۲۴ ^b	۴/۱۵ ± ۰/۱۲ ^a	پروتئین کل (g/dL)
۱/۱۷ ± ۰/۱۰ ^{ab}	۱/۳۲ ± ۰/۱۰ ^b	۱/۲۵ ± ۰/۰۹ ^b	۱/۰۸ ± ۰/۰۷ ^a	آلبومین (g/dL)
۳/۱۴ ± ۰/۰۲ ^{ab}	۳/۳۴ ± ۰/۰۷ ^b	۳/۲۸ ± ۰/۱۴ ^{ab}	۳/۰۷ ± ۰/۰۵ ^a	گلوبولین (g/dL)
۷۰/۸۱ ± ۰/۹۶ ^{bc}	۶۲/۸۴ ± ۱/۳۵ ^a	۶۸/۴۵ ± ۱/۰۲ ^b	۷۲/۷۹ ± ۱/۰۳ ^c	گلوکز (mg/dL)
۱۴۸/۸ ± ۴/۷۱ ^{ab}	۱۳۸/۷ ± ۸/۱۴ ^a	۱۴۲/۸ ± ۴/۰۴ ^{ab}	۱۵۸/۱ ± ۳/۷۸ ^b	کلسترول (mg/dL)
۲۷/۳۳ ± ۰/۲۸ ^b	۲۹/۰۸ ± ۰/۸۱ ^c	۲۸/۲۳ ± ۱/۱۷ ^{bc}	۲۵/۱۴ ± ۰/۷۸ ^a	لیپوپروتئین پرچگال (mg/dL)
۲۵/۹۷ ± ۰/۲۲ ^a	۲۲/۶۶ ± ۰/۳۴ ^{ab}	۲۲/۸۵ ± ۰/۱۸ ^{ab}	۳۲/۸۷ ± ۰/۳۲ ^b	لیپو پروتئین کم چگال (mg/dL)
۲۴۹/۸ ± ۱۹/۰۳ ^b	۲۳۵/۱ ± ۱۵/۴۴ ^a	۲۳۹/۸ ± ۱۴/۰۱ ^a	۲۷۳/۱ ± ۹/۸۱ ^c	تری گلیسرید (mg/dL)

* حروف متفاوت در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی دار بین گروه‌های آزمایشی است (میانگین ± خطای استاندارد، $p < 0.05$).

بحث

صرفاً توسط برخی از باکتری‌های بی‌هوازی موجود در دستگاه گوارش قابلیت تجزیه شدن را دارند (Merrifield and Ringo, 2014). لذا، عمدتاً باکتری‌ها شامل لاکتوباسیلوس‌ها، بیفیدوباکترها و بسیاری از باکتری‌های اسید لاکتیک هستند که می‌توانند با استفاده از تخمیر از الیگوساکاریدها تغذیه کرده و به این وسیله اثرات مفیدی روی میزبان داشته باشند. در نتیجه، تغذیه ماهیان با این نوع کربوهیدرات‌ها می‌تواند باعث افزایش جمعیت باکتری‌های مفید روده و به‌خصوص بیفیدوباکترها و باکتری‌های اسید لاکتیک گردد. همچنین به علت کاهش pH روده به دلیل وجود شرایط تخمیری و تولید اسید توسط جمعیت باکتری‌های مفید، از فعالیت باکتری‌های مضر و بیماری‌زا در دستگاه گوارشی جلوگیری شده و از طرفی جذب مواد معدنی افزایش می‌یابد (Merrifield and Ringo, 2014) که با توجه به مقادیر افزایشی سطح آلبومین در تیمارهای آزمایشی که در ارتباط با جذب عنصر فسفر است این فرضیه می‌تواند تأیید شود.

در خصوص ترکیب بیوشیمیایی لاشه ماهیان مورد آزمایش، مقدار پروتئین و چربی تحت تأثیر استفاده از پری بیوتیک گالاکتوالیگوساکارید به ترتیب افزایش و کاهش یافت. در این خصوص، Aftabgard و همکاران در سال ۲۰۲۰ بیان کردند استفاده از پری بیوتیک به همراه پروبیوتیک در جیره غذایی ماهی آزاد در یای خزر دارای

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که استفاده از سطوح مختلف پری بیوتیک گالاکتوالیگوساکارید منجر به بهبود عملکرد رشد و تغذیه‌ای در ماهیان کپور معمولی می‌شود، که در این بین ماهیان تغذیه شده با مقدار ۲٪ یا ۲۰ گرم پری بیوتیک به ازای کیلوگرم غذا بهترین عملکرد را نشان دادند. در این باره، Ibrahim و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند که استفاده از پری بیوتیک در جیره غذایی تیلاپیا نیل منجر به افزایش معنی دار رشد و مصرف خوراک شده است که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. همچنین، دیگر مطالعات همانند Jami و همکاران در سال ۲۰۱۹ بر ماهی آزاد دریای خزر، Ismail و همکاران در سال ۲۰۱۹ بر تیلاپیا نیل، Guerreiro و همکاران در سال ۲۰۱۸ بر شانک سفید، Akrami و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر ماهی ازون برون، Zhou و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر ماهی شوریده قرمز نشان دهنده اثرات بهینه به-کارگیری پری بیوتیک‌ها در جیره غذایی ماهیان بر رشد، زنده مانی و ایمنی ماهیان بوده است.

در خصوص اثرگذاری مطلوب پری بیوتیک مورد استفاده می‌توان عنوان کرد که الیگوساکاریدها به دلیل ساختار خاص و عدم برخورداری ماهیان از آنزیم‌های هیدرولیزکننده اتصالات نوع β بین واحدهای مونوساکاریدی، در برابر فرآیند گوارش مقاومت کرده و

توان بالقوه مؤثری در مصرف چربی برای تولید انرژی مورد نیاز بدن و در نتیجه، صرفه‌جویی در مصرف پروتئین و تبدیل بیشینه غذای مصرفی به پروتئین بافت بدن بوده است که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. همچنین لازم به ذکر است در برخی آزمایشات عدم تاثیرگذاری استفاده از پری بیوتیک در ترکیب بیوشیمیایی لاشه ماهیان گزارش شده است (Akrami et al. 2010). به طور کلی دلیل اختلاف در نتایج را می‌توان به نوع، اندازه و سن گونه پرورشی و همچنین طول دوره پرورشی، شرایط محیطی و بهداشتی، رفتار شناسی تغذیه‌ای، خصوصیات فیزیولوژیک موجود، نوع مواد تشکیل دهنده جیره غذایی و کمیت و کیفیت آن‌ها، ترکیب جیره غذایی، نوع پری بیوتیک مورد استفاده، میزان درجه خلوص و سطح مورد استفاده آن در جیره غذایی، نحوه افزودن پری بیوتیک به جیره غذایی و حتی فلور میکروبی روده ماهی که قادر به استفاده از آن به عنوان سوپ‌ستراه هستند، نسبت داد (Sabrin Joibari et al. 2017).

بررسی اثر سطوح مختلف گالاکتوالیگوساکارید بر شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون نشان داد تا سطح ۲۰ گرم بر کیلوگرم منجر به ایجاد روند افزایشی در مقدار پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین سرم خون در ماهیان مورد آزمایش می‌شود. در این خصوص، Lotfan و همکاران در سال ۲۰۰۹ بیان کرده‌اند که افزایش پروتئین سرم می‌تواند نشان دهنده افزایش متابولیسم، قابلیت هم‌ضم و جذب پروتئین در اندام‌های جاندار تغذیه شده با جیره‌های حاوی پری بیوتیک باشد. همچنین بیان کردند پری بیوتیک‌ها با افزایش باکتری‌های مفید روده، موجب تشدید سوخت و ساز پروتئین و افزایش جذب آن در اندام‌های موجود و با تحریک جذب و ذخیره مواد معدنی به‌خصوص کلسیم و فسفر، روی متابولیت‌های خون از جمله آلبومین اثر می‌گذارند. Mokhtari و همکاران در سال ۲۰۱۶ اظهار داشتند که سطح بالای پروتئین و گلوبولین خون نشان‌دهنده بالا بودن ایمنی در آبی است. لذا، افزایش سطح گلوبولین ممکن است ناشی از تحریک گلوبول‌های سفید به خصوص لنفوسیت‌ها و ترشح ایمنوگلوبولین‌ها باشد که بیشترین میزان گلوبولین‌های خون را به خود اختصاص می‌دهند.

از طرفی در مطالعه حاضر مشاهده شد که سطوح مختلف پری بیوتیک گالاکتوالیگوساکارید تا سطح ۲۰ گرم در

کیلوگرم غذا به‌طور معنی‌دار منجر به ایجاد روند کاهش‌ی در مقدار تری‌گلیسرید، کلسترول و گلوکز در مقایسه با شاهد شده است. در تطابق با نتایج این آزمایش، نتایج دیگر تحقیقات نشان می‌دهد که اضافه کردن پری بیوتیک‌ها به جیره جانداران منجر به کاهش کلسترول و تری گلیسرید می‌شود (Gargari et al. 2013). در خصوص کاهش کلسترول توسط پری بیوتیک‌ها، مکانیسم‌های متفاوتی پیشنهاد شده است. برای مثال، بیان شده است که اثرات مفید پری بیوتیک‌ها بر روی الگوی لیپیدی سرم از طریق اسیدهای چرب کوتاه زنجیره است که طی تخمیر توسط پری بیوتیک‌ها در دستگاه گوارش تولید می‌شوند. بوتیرات از تولید کلسترول در کبد جلوگیری می‌کند و منبع خوبی از انرژی، برای یاخته‌های پوششی روده را فراهم می‌کند (Demigne et al. 1995). همچنین، پروپیونات احتمالاً با کاهش استفاده از استات به عنوان پیش ساز برای سنتز کلسترول، سرعت سنتز کلسترول در کبد کاهش می‌دهد (Delzenne and Kok, 1999).

علاوه بر این، بیان شده است که مصرف پری بیوتیک‌ها سبب افزایش رشد باکتری‌های اسید لاکتیک در دستگاه گوارش می‌گردند. این میکروارگانیسم‌ها با غیر مزدوج ساختن نمک‌های صفراوی، قابلیت جذب آن‌ها را در روده کاهش می‌دهند. در نتیجه بخش زیادی از نمک‌های صفراوی به شکل مدفوع از بدن خارج می‌شوند. به دنبال این فرایند با افزایش نیاز تبدیل کلسترول به اسیدهای صفراوی در کبد از غلظت کلسترول سرم خون کاسته می‌شود (Ooi and Liong, 2010).

یکی دیگر از مکانیسم‌های پیشنهادی، کاهش قابلیت جذب روده‌ای کلسترول با افزایش ضخامت لایه‌های پوششی جدار روده است. همچنین، افزایش بیان ژنی آنزیم ۳ هیدروکسی ۳ متیل گلوکوتاریل کوآنزیم آ ردوکتاز و افزایش در پروتئین‌های عناصر پیوندی کنترل استرول نیز از مکانیسم‌های دیگر کاهش کلسترول توسط پری بیوتیک‌هاست (Gargari et al. 2013). در خصوص کاهش تری گلیسرید سرم، احتمالاً مکانیسم اصلی کاهش فعالیت‌های لیپوژنیک در کبد است. کاهش بیان ژنی آنزیم‌های لیپوژنیک مانند استیل کوآ کربوکسیلاز، آنزیم مالیک، سترات لیپاز، گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز و اسید چرب سنتاز، کاتابولیسم لیپوپروتئین‌های غنی از

۲۰ گرم پری‌بیوتیک گالاکتوالیگوساکارید در کیلوگرم جیره غذایی ماهی کپور معمولی جوان توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

از مسئولین دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر به دلیل حمایت از انجام پژوهش حاضر در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را در این پژوهش شناسایی نکردند.

منابع

- Akrami, R., Ghelichi, A., Gharaei, A. 2010. The use of prebiotics in aquaculture. *Journal of Fisheries* 4: 77-84. (in Persian).
- Akrami, R., Iri, Y., Rostami, H.K. and Mansour, M.R. 2013. Effect of dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) on growth performance, survival, lactobacillus bacterial population and hematoimmunological parameters of stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) juvenile. *Fish & Shellfish Immunology* 35: 1235-1239.
- Aftabgard, M., Salarzadeh, A., Mohseni, M., Rastravan, M.E., Bahri, A.H., Zorriehzahra, S.J., Najjar Lashgari, S., Lashtoo Aghae, G.R. 2020. The synergistic effects of BetaPlus Ultra and prebiotic oligosaccharides on growth performance, hepatosomatic index, hematological parameters, and carcass quality of Caspian trout (*Salmo caspius*). *Iranian Scientific Fisheries Journal* 29: 99-110. (in Persian).
- AOAC. 1995. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 16th edn. AOAC, Arlington 331-337.
- Beylot, M. 2005. Effects of inulin type fructans on lipid metabolism in man and in animal models. *British Journal of Nutrition* 93: 163-168.
- Denev, S., Staykov, Y., Moutafchieva, R., Beev, G. 2009. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. *International Aquatic Research* 1: 1-29.
- Delzenne, N.M., Kok, N.N. 1999. Biochemical basis of oligofructose-induced hypolipidemia in animal models. *Journal of Nutrition* 129: 1467-1470.
- Demigne, C., Morand, C., Levrat, M.A., Besson, C., Moundras, C., Remesy, C. 1995. Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *British Journal of Nutrition* 74: 209-219.
- FAO, 2020. The state of world fisheries and aquaculture. Food and Agriculture of United Nations, Rome.
- Gargari, B.P., Dehghan, P., Mirtaheri, E., Aliasgarzadeh, A. 2013. Effects of inulin on lipid profile, inflammation and blood pressure in women with type 2 diabetes: A randomized controlled trial, *Journal of Ardabil University of Medical Sciences* 13: 359-370.
- Gargari et al. 2013). در خصوص کاهش گلوکز بیان شده است که فیبرهای پری‌بیوتیکی منجر به بهبود و تعدیل سطح گلوکز خون و کاهش ترشح انسولین به‌واسطه داشتن اندیس گلیسمی پایین می‌شوند (Weickert et al. 2006).
- در نهایت، با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان اظهار داشت که تحت تأثیر استفاده از جیره‌های غذایی حاوی پری‌بیوتیک گالاکتوالیگوساکارید شاخص‌های رشد، تغذیه، ترکیب لاشه و بیوشیمیایی خون ماهیان کپور معمولی بهبود پیدا کردند که با توجه به دستیابی به بالاترین عملکرد از نظر شاخص‌های مربوطه، استفاده از

- Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125: 1401-1412.
- Guerreiro, I., Serra, C.R., Pousao-Ferreira, P., Oliva-Teles, A., Enes, P. 2018. Prebiotics effect on growth performance, hepatic intermediary metabolism, gut microbiota and digestive enzymes of white sea bream (*Diplodus sargus*). *Aquaculture Nutrition* 24: 153-163.
- Haghipoor, M., Sudagar, M., Mazandarani, M., Hoseinifar, S.H. 2015. The effects of prebiotic isomaltooligosaccharide on some growth factors, survival, and resistance to salinity stress of Common carp (*Cyprinus carpio*) fry. *Journal of Animal Environment* 7: 235-240. (in Persian).
- Hoseinifar, S.H., Rufcahei, R. 2015. Comparative study of Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) fry gut microbiota modulation following administration of galacto and fructooligosaccharide prebiotics. *Biological Journal of Microorganism* 4: 135-144
- Ibrahim, M.T., Samy, H.M., Mahmoud, M.M., Fathalla, G.M. 2013. Evaluation of prebiotic (isomaltooligosaccharide) as a feed additive on growth performance, digestibility, and intestinal histology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Arabian Journal of Science* 1: 1-12
- Ismail, M., Wahdan, A., Yusuf, M.S., Metwally, E., Mabrok, M. 2019. Effect of dietary supplementation with a synbiotic (Lacto Forte) on growth performance, haematological and histological profiles, the innate immune response and resistance to bacterial disease in *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Research* 50: 2545-2562.
- Jami, M.J., Kenari, A.A., Paknejad, H., Mohseni, M. 2019. Effects of dietary β -glucan, mannan oligosaccharide, *Lactobacillus plantarum* and their combinations on growth performance, immunity and immune related gene expression of Caspian trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877). *Fish & Shellfish Immunology* 91: 202-208
- Lee, C.S., Lim, C., Gatlin, D.M., Webster, C.D. 2015. *Dietary Nutrients, Additives, and Fish Health*. Wiley-Blackwell. 371 p.
- Lotfan, M., Nazer, A.K., Ebrahimnezhad, Y., Moghadam, M. 2009. The effects of different sources and levels of prebiotics on performance and carcass characteristics of broiler chickens. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources* 16: 11-22. (in Persian).
- Merrifield, D.L., Ringo, E. 2014. *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics, and Prebiotics*. Wiley-Blackwell. 496 p.
- Mokhtari, M., Imanpoor, M.R., Hajimoradloo, A., Hoseinifar, S.H., 2016. Effects of bacto cell probiotic and galactooligosaccharide peribiotic on the growth, survival, blood parameters, and resistance to salinity stress in treespot gourami (*Trichogaster trichopterus*). *Journal of Animal Environment* 8: 199-206. (in Persian).
- Ooi, L.G., Liong, M.T. 2010. Cholesterol lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. *International Journal of Molecular Sciences* 11: 2499-2522.
- Sabrin Joibari, M., Qobadi, S., Watan Dost, S. 2017. The effect of different levels of prebiotic AMAX on growth indices, survival and carcass composition in common carp fry (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Development* 11: 63-75. (in Persian).
- Sapkota, A., Sapkota, A.R., Kucharski, M., Burke, J., McKenzie, S., Walker, P., Lawrence, R. 2008. *Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities*. *Environment International* 34: 1215-1226
- Torrecillas, S., Caballero, M.J., Montero, D., Sweetman, J., Izquierdo, M. 2016. Combined effects of dietary mannan oligosaccharides and total fish oil

- substitution by soybean oil on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juvenile diets. *Aquaculture Nutrition* 22: 1079-1090
- Weickert, M.O., Mohlig, M.A.T.T.H.I.A.S., Schofl, C., Arafat, A.M., Otto, B., Viehoff, H., Koebnick, C., Kohl, A., Spranger, J., Pfeiffer, A.F. 2006. Cereal fiber improves whole body insulin sensitivity in overweight and obese women. *Diabetes Care* 29: 775-780
- Zhou, Q.C., Buentello, J.A., Gatlin III, D.M. 2010. Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 309: 253-257.