

مقایسه میزان رشد و پروفایل اسید چرب کرم‌های *Nereis diversicolor* تغذیه شده با مدفوع و غذای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

محمد یوسفی گراکویی^۱، ابوالقاسم کمالی*^۱، مهدی سلطانی^۲

۱- گروه شیلات، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۸

چکیده

مزارع پرورش ماهی قزل‌آلا همواره مقادیر زیادی مواد آلی ارگانیک به صورت ضایعات دفعی وارد محیط زیست می‌کنند. اگر این ضایعات ارگانیک به عنوان یک منبع غذایی برای تولید یک ارگانسیم ثانویه مانند کرم دریایی *Nereis diversicolor* مورد استفاده قرار گیرد، تعیین اثر این مواد ارگانیک بر روی عملکرد رشد و ارزش غذایی کرم‌های نرئیس تغذیه کننده از آنها حائز اهمیت می‌باشد. در این تحقیق ۲ تیمار با ۳ تکرار با تراکم ۱۰۰۰ کرم در متر مربع برای ۶۰ روز در شرایط یکسان پرورشی (دمای آب °C ۱۷/۷۱±۰/۶، اکسیژن ۷/۷۷±۰/۱۶ میلی‌گرم در لیتر، pH ۷/۹۶±۰/۰۹) نگهداری شدند. تیمار اول با مدفوع تولید شده توسط قزل‌آلای رنگین‌کمان و تیمار دوم با غذای تجاری قزل‌آلا (فراذانه) تغذیه شدند. نتایج نشان داد که کرم‌های تغذیه شده با غذای ماهی از نظر عملکرد رشد در طی ۶۰ روز در تمامی فاکتورهای رشد و بازماندگی شرایط بهتری نسبت به کرم‌های تغذیه شده با مدفوع ماهی داشتند. اسیدهای چرب اصلی در هر دو گروه کرم‌ها، اسید پالمیتیک (C16:0)، اسید اولئیک (C18:1 n9c) و اسید لینولئیک (C18:2 n6c) بودند. نسبت DHA/EPA نیز در هر دو گروه از کرم‌ها کمتر از یک (تیمار اول ۰/۲۲±۰/۴۰ درصد و تیمار دوم ۰/۱۸±۰/۵۹ درصد) بود. به‌طور کلی میزان اسیدهای چرب اصلی، DHA، EPA و نسبت DHA/EPA در نمونه‌های کرم تغذیه شده با غذای ماهی، بالاتر از نمونه‌های تغذیه شده با مدفوع ماهی بود. بنابراین امکان پرورش این گونه از کرم‌های نرئیس با مدفوع قزل‌آلای رنگین‌کمان وجود دارد، ولی برای رسیدن به رشد مناسب احتمالاً به مدت زمان بیشتری برای پرورش نیاز خواهد بود که با توجه به این که هیچ هزینه‌ای برای غذادهی انجام نمی‌شود، می‌تواند حائز اهمیت باشد.

کلمات کلیدی: *Nereis diversicolor*، قزل‌آلای رنگین‌کمان، مدفوع ماهی، غذای ماهی، عملکرد رشد، اسیدچرب.

مقدمه

شبکه‌های غذایی ساختارهای پیچیده‌ای هستند که از موجودات متعلق به سطوح مختلف غذایی تشکیل شده‌اند (Belgrano, 2005). از ضایعات ناشی از مزارع پرورش ماهی می‌توان به عنوان منبع غذایی برای سطوح پایین‌تر شبکه غذایی استفاده کرده و موجودات ثانویه و با ارزش اقتصادی تولید کرد (Bischoff et al., 2009). به علت گستردگی پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان همواره مقدار زیادی از مواد آلی به صورت مدفوع یا غذای خورده نشده وارد اکوسیستم‌های آبی شده و منجر به آلودگی محیط زیست می‌گردند. چنانچه بتوان از این ضایعات تولید شده به عنوان منبع غذایی برای تولید یک موجود ثانویه و با ارزش اقتصادی بالا مانند کرم نرئیس استفاده کرد، ضمن افزایش تولید با کمترین هزینه، بارآلودگی ناشی از مزارع پرورش ماهی نیز کاهش می‌یابد. کرم *Nereis diversicolor* از شاخه کرم‌های حلقوی (Annelidae) و از جمله پرتارانی (Polychaeta) است که در تغذیه انواع ماهیان اقتصادی کفزی‌خوار و میگو استفاده می‌شود و به دلیل تغذیه از مواد آلی پوسیده و یا مواد دفعی سایر جانوران (Batista et al., 2003) از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. این کرم می‌تواند رژیم غذایی خود را از فیلترفیدر (Harley, 1950; Wells and Dales, 1951; Riisgård, 1991; Riisgård and Vedel, 1993) به گوشت‌خواری، گیاه‌خواری، دیتریت‌خواری و حتی هم‌نوع‌خواری تغییر دهد (Esselink and Zwarts, 1989; Esnault et al., 1990). این موجود نسبت به نوسانات فاکتورهای فیزیکوشیمیایی مختلف مانند دما (۲۸/۸-۰ °C)، شوری (۰-۳۴ ppt) و اکسیژن (۲ میلی‌گرم به بالا) تحمل بالایی دارد (پژند و همکاران

۱۳۸۲ و ۱۳۸۸; Ozoh, 1990; Smith, 1964) و در دریای کاسپین نیز زندگی می‌کند (Taheri. et al., 2012; Leppakoski et al., 2002; Ghasemi et al., 2013). بنابراین گونه‌ای مناسب و در دسترس برای اجرای طرح‌های پرورش مشترک با سایر آبزیان از جمله قزل‌آلای رنگین کمان می‌باشد.

از سوی دیگر کرم‌های نرئیس در صنعت به عنوان منابع بسیار خوبی از اسیدهای چرب اشباع نشده (PUFAs) با ارزش بوده و به طور بالقوه‌ای برای مکمل روغن ماهی به عنوان منابع غذایی حاوی ترکیبات اسیدهای چرب ضروری کاربرد دارند (Costa Olive et al., et al., 2000; Lytle et al., 1990; 2000). این اسیدهای چرب نقش مهمی در تعیین مولدین و عملکرد لارو، هم در پرورش ماهی‌های دریایی و هم میگوی *penaeid* بازی می‌کنند (Izquierdo et al., 2001; Wouters et al., 2001). نتایج برخی تحقیقات نشان داد که رژیم غذایی حاوی *Nereis diversicolor* منجر به افزایش تعداد تخم‌ها در هر تخم‌ریزی برای ماده‌ها و افزایش بازماندگی تخم و بقای لاروی در میگو (Briggs et al., 1993) بلوغ در میگوهای پرورشی و کفشک ماهیان (Luis and Ponte, 1993) می‌گردد. Luis و Passos (۱۹۹۵) محتوای چربی و ترکیب اسیدهای چرب *Nereis diversicolor* را مورد بررسی قرار دادند. بر اساس گزارش آن‌ها محتوای چربی کل بین حداکثر ۱۹/۳ درصد وزن خشک در فوریه تا حداقل ۶/۶ درصد در ماه آگوست متغیر بود. همچنین اسیدهای چرب اصلی شامل C20:5n-3 و C18:2n-6، C18:1n-9، C16:0 بودند. Santos و همکاران (۲۰۱۶) نیز اعلام کردند که ترکیب تغذیه‌ای کرم *Nereis diversicolor* انعکاسی از ترکیب جیره غذایی شامل چربی، پروتئین و

پروفایل اسیدهای چرب می‌باشد. از آنجایی که ترکیبات اسیدچرب کرم‌های نرئیس تحت تاثیر نوع غذای مصرف شده توسط آن‌ها تغییر می‌کنند (Luis and Passos, 1995)، بنابراین مشخص شدن ترکیبات اسیدچرب کرم‌هایی که از مدفوع ماهی تغذیه می‌کنند جهت مشخص شدن ارزش تغذیه‌ای آن‌ها حائز اهمیت می‌باشد.

مطالعات صورت گرفته توسط Honda و Kikuchi (۲۰۰۲) بر روی کرم پرتار *Perinereis nuntia vallata* نشان داد که این گونه قادر به تغذیه از مدفوع ماهی فلاندر ژاپنی (*Paralichthys olivaceus*) می‌باشد و نیمی از نیتروژن دفع شده را به بافت بدن کرم تبدیل می‌کند. همچنین Batista و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که *Nereis diversicolor* از برخی ضایعات به عنوان منبع غذای اولیه استفاده می‌کنند و رشد قابل ملاحظه‌ای را از تغذیه از ذرات خروجی به عنوان یک ماده مغذی با ارزش مانند اسیدهای چرب نشان می‌دهند. Garcia-Alonso و همکاران (۲۰۰۸)، امکان پرورش این گونه‌ها را با استفاده از ضایعات پرورش مارماهی به عنوان یک منبع تغذیه ارزیابی کردند به طوری که حدود ۲۰ درصد افزایش در بیومس کرم‌ها توسط آن‌ها به دست آمد. همچنین Bischoff و همکاران در سال (۲۰۰۹) کرم *Nereis diversicolor* را در مخازن تصفیه‌ای که دریافت کننده ضایعات یک سیستم پرورش چرخشی سیم دریایی بوده پرورش دادند. Palmer (۲۰۱۰) رشد و بقای دو گونه از پرتاران *Perinereis nuntia* و *Perinereis helleri* را در بسترهای شن و ماسه که دریافت کننده ضایعات از استخرهای نگهداری میگو بوده مورد ارزیابی قرار داد و توانست ۷۵ درصد میزان Tss در آب خروجی را

کاهش دهد. Brown و همکاران (۲۰۱۱) رشد و همچنین ترکیبات مغذی *Nereis virens* که با ضایعات ناشی از یک سیستم پرورش چرخشی از ماهی هالیبوت اقیانوس اطلس (*Hippoglossus hippoglossus*) پرورش یافته بود را، بررسی کردند. آنها در مطالعات خود کرم‌های پرتار *Nereis virens* با وزن اولیه ۰/۳۷ گرم را به دو گروه تقسیم نمودند به طوری که یک گروه با جیره تجاری مخصوص کرم و گروه دیگر با مدفوع و غذای خورده نشده ماهی مورد تغذیه قرار گرفتند، در پایان آزمایش و پس از ۷۱ روز، وزن نهایی کرم‌ها به ترتیب به ۲/۴۲ و ۲/۳۳ گرم و میزان پروتئین آن‌ها نیز به ترتیب به ۶۱/۹ و ۵۹/۶ درصد رسید. توسط Palmer و همکاران (۲۰۱۴) نیز مطالعاتی در خصوص وضعیت تغذیه‌ای کرم‌های پرتار پرورش یافته در فیلترهای شنی حاوی فضولات آبریان دریایی انجام شد و نتایج نشان داد که کرم‌ها از مواد دفعی و غذای خورده نشده ماهیان تغذیه کرده و مواد غذایی با ارزش مانند اسیدهای چرب را بازیافت می‌نمایند. Pajand و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که کرم پرتار *Nereis diversicolor* یک کانیدبا با پتانسیل عالی برای پرورش توأم با فیل ماهی و بازیافت ضایعات ناشی از پرورش آن‌ها می‌باشد به طوری که نرخ رشد ویژه ۳/۴۰ درصد در روز در مدت ۸ هفته و در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد توسط آن‌ها به دست آمد. آن‌ها همچنین نشان دادند که با افزایش رشد این کرم‌ها میزان تجزیه مواد آلی موجود در رسوبات افزایش و در نتیجه اثرات منفی ناشی از آن‌ها کاهش می‌یابد. به طور کلی در بسیاری از تحقیقات قبلی، نشان داده شده که *Nereis diversicolor* تغذیه شده با مدفوع ماهی

وزن بدن کرم‌ها (Parandavar *et al.*, 2015) به صورت روزانه و به مدت ۶۰ روز تغذیه شدند. برای آماده‌سازی محیط پرورش کرم‌های نرئیس از وان‌های با اندازه ۲۰×۴۰×۶۰ سانتی‌متر استفاده شد. ماسه مورد استفاده برای ایجاد بستر مناسب کرم‌ها در تشتک‌ها، از سواحل دریای خزر جمع‌آوری شده و پس از شستشو و استریل کردن با حرارت بالا با عمق ۷ سانتی‌متر به داخل تشتک‌ها وارد شده و سپس آب‌گیری شدند. آب مورد نیاز در این آزمایش از آب چاه تأمین شد. دبی مورد نیاز برای این آزمایش برای کرم‌ها به میزان ۲-۱ لیتر در دقیقه بود. میزان pH (۰/۹±۷/۹۶)، اکسیژن (-) (۱۷/۷۱±۰/۶°C) و دمای آب (۷/۷۷±۰/۱۶mg/l) استفاده از دستگاه پرتابل و آنالیز کننده (HQ 40d, Hach-Lange, USA) و به طور روزانه اندازه‌گیری و ثبت شد. همچنین کرم‌ها در ابتدا و انتهای آزمایش اندازه‌گیری و بیومتری شده و طول و وزن آن‌ها ثبت گردید. در این آزمایش برای هوادهی در هر یک از تشتک‌ها از سنگ هوای متصل به شبکه هواده مرکزی استفاده شد. پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت لاشه کرم‌ها و مدفوع و غذای ماهی در انتهای تحقیق آنالیز شدند. آنالیز پروتئین و خاکستر به ترتیب با دستگاه کجلدال مدل BAP40 ساخت آلمان و آنالیز چربی و رطوبت به ترتیب با دستگاه سوکسله مدل BOHR ساخت آلمان و آون به روش AOAC (1995) در آزمایشگاه وایرومد رشت اندازه‌گیری شد (AOAC, 1995). عملکرد رشد کرم‌ها با استفاده از فرمول‌های زیر مورد بررسی قرار گرفت:

۱- نرخ رشد ویژه (Pajand *et al.*, 2017)

$$\text{SGR (\%/day)} = 100 \times (\ln W_f - \ln W_i) / t$$

درصد بالایی از اسیدهای چرب دفع شده توسط ماهی را بازیافت می‌نماید.

بنابراین در این تحقیق از مدفوع قزل‌آلا برای تغذیه این کرم‌ها استفاده شد و میزان رشد، بقا و پروفایل اسیدچرب آن‌ها با کرم‌های تغذیه شده با غذای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مقایسه گردید. همچنین پروفایل اسیدچرب غذا و مدفوع ماهی قزل‌آلا را مشخص کرده تا تغییرات آن‌ها را نسبت به کرم‌های تغذیه کننده از آن‌ها بررسی کنیم. هدف از این تحقیق بررسی امکان رشد کرم‌های نرئیس تولید شده با مدفوع قزل‌آلای رنگین‌کمان و همچنین مقایسه کیفیت اسیدهای چرب آن‌ها با کرم‌های تولید شده با غذای ماهی قزل‌آلا می‌باشد که در نهایت باعث کاهش آلودگی ناشی از مزارع پرورش ماهی قزل‌آلا شده و در راستای دستیابی به توسعه پایدار می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در شرکت دانش بنیان زیست پالایشگر خزر واقع در شهرستان سنقر و با لاروهای کرم *Nereis diversicolor* تهیه شده از این شرکت با وزن ۵۰-۱۰ میلی‌گرم انجام شد. دو تیمار با ۳ تکرار و با تراکم ۱۰۰۰ کرم در متر مربع مورد استفاده قرار گرفت. تیمار اول با مدفوع جمع‌آوری شده (به روش سیفون کردن از کف) از وان نگهداری قزل‌آلای رنگین‌کمان حاوی ۱۵ عدد ماهی ۱۰۰ گرمی و تیمار دوم با غذای اکستروود مخصوص قزل‌آلا (شرکت فرادانه، GTF1 با سایز ۴/۵±۰/۴؛ ۴۲-۳۸ درصد پروتئین خام، ۱۷-۱۳ درصد چربی خام، ۴-۲ درصد فیبر خام، ۱۱-۷ درصد خاکستر، ۱۱-۵ درصد رطوبت و ۱/۵-۱ درصد فسفر) هر کدام به میزان ۳/۵ درصد

مشتق سازی اسیدهای چرب از روش به کار رفته توسط Santos و همکاران (۲۰۱۶) استفاده شد.

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از برنامه‌های Excel و SPSS استفاده گردید. جهت تست توزیع نرمال داده‌ها از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف استفاده شد. بنابراین جهت مقایسه درصد نرخ رشد ویژه، افزایش وزن، FER و سایر فاکتورها، در اثر تغذیه، در تیمارهای مورد بررسی، از آزمون T-student استفاده شد. تمامی داده‌های به دست آمده در نرم افزار Excel ثبت و بانک اطلاعاتی حاصل با استفاده از نرم افزار آماری SPSS تحت آنالیز قرار گرفتند.

نتایج

با توجه به جدول ۱ نتایج این آزمایش نشان داد که طول و وزن نهایی و افزایش بیومس کرم‌ها و همچنین پارامترهای درصد بازماندگی، FER، SGR، و WG% در کرم‌های تغذیه شده با غذای ماهی به طور معنی داری از لحاظ آماری بالاتر از کرم‌های تغذیه شده با مدفوع ماهی بوده ($P < 0/05$) و کرم‌هایی که در طی ۶۰ روز با غذای ماهی تغذیه شدند از نظر عملکرد رشد وضعیت بهتری داشته‌اند.

لگاریتم طبیعی متوسط بیوماس اولیه $\ln W_i$ و $\ln W_f$ مدت زمان پرورش (روز) t : و نهایی (گرم)،

۲- ضریب بازده غذایی (Batista *et al.*, 2003)

وزن) $g / (W_f - W_i)$ (افزایش وزن مرطوب)

g (خشک مدفوع تغذیه شده)

- درصد افزایش وزن بدن (Parandavar *et al.*, 2015)

$WG (\%) = [(W_f - W_i) / W_i] \times 100$

WG: درصد افزایش وزن، W_i : وزن اولیه (گرم)،

W_f : وزن نهایی (گرم)

۴- رشد روزانه (Hung *et al.*, 1989)

$GR (g/day) = (W_f - W_i) / n$

W_i = متوسط وزن اولیه در هر تانک، W_f = متوسط

وزن نهایی در هر تانک، n = تعداد روزهای پرورش

۵- بازماندگی (Wahli *et al.*, 2003)

تعداد کل / تعداد موجودات زنده مانده) $SR (\%) =$

$100 \times$ (موجودات ذخیره شده (اولیه)

۶- افزایش بیومس (Pajand *et al.*, 2017)

بیومس اولیه - بیومس نهایی) $Biomass gain (g/m^2) =$

استخراج اسیدهای چرب از تمامی نمونه‌های کرم،

غذا و مدفوع ماهی با استفاده از روش متیل

استرینفیکاسیون مستقیم انجام گرفت (Howel *et al.*, 195).

برای تعیین ترکیب اسیدهای چرب به منظور

جدول ۱: مقایسه پارامترهای رشد و بقای کرم پرتار *Nereis diversicolor* تغذیه شده با مدفوع و غذای ماهی قزل آلابی رنگین کمان در مدت ۶۰ روز.

شاخص	T ₁	T ₂
تیمار	کرم‌های تغذیه شده با مدفوع ماهی	کرم‌های تغذیه شده با غذای ماهی
میانگین طول نهایی (cm)	۳/۸۱±۰/۱۳ ^a	۶/۷۳±۰/۵۳ ^b
میانگین وزن نهایی (g)	۰/۰۸۰±۰/۰۰۱ ^a	۰/۲۰۶±۰/۰۲۳ ^b
بیومس ابتدایی (g/m ²)	۲۰±۰/۰۰	۲۰±۰/۰۰
بیومس نهایی (g/m ²)	۵۸/۴۱۲±۹/۶۲۲ ^a	۱۸۵/۵۹۹±۱۳/۲۵۷ ^b
افزایش بیومس (g/m ²)	۳۸/۴۱۲±۹/۶۲۲ ^a	۱۶۵/۵۹۹±۱۳/۲۵۷ ^b
تراکم اولیه (ind/m ²)	۱۰۰۰±۰/۰۰	۱۰۰۰±۰/۰۰
تراکم نهایی (ind/m ²)	۷۲۸/۰۰۳±۱۱۱/۴۹۹ ^a	۹۰۵/۳۳۳±۳۸/۸۵۰ ^b
ضریب رشد ویژه (SGR%/day)	۲/۳۱۴±۰/۰۲۴ ^a	۳/۸۷۷±۰/۱۹۱ ^b
ضریب بازده غذایی (FER)	۰/۱۲۵±۰/۰۰۳ ^a	۰/۳۸۷±۰/۰۴۸ ^b
در صد افزایش وزن بدن (WG%)	۳۰۰/۷۶۷±۵/۷۲۶ ^a	۹۲۸/۳۳۳±۱۱۵/۹۰۲ ^b
رشد روزانه (GR g/day)	۵/۰۱۳±۰/۰۹۵ ^a	۱۵/۴۷۲±۱/۹۳۲ ^b
بازماندگی (%)	۷۲/۸۰±۱۱/۱۵ ^a	۹۰/۵۳۳±۳/۸۸۵ ^b

حروف a و b نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار می باشد

غذای ماهی کمتر می باشد. علاوه بر این آنالیز لاشه هر دو گروه از کرم‌ها حاکی از آن است که چربی کل، پروتئین کل و میزان خاکستر در کرم‌های تغذیه شده با غذای ماهی کمی بالاتر از کرم‌های تغذیه شده با مدفوع ماهی است (جدول ۲).

همان طوری که در جدول ۲ نشان داده شده است، از نظر میزان مواد مغذی و ارزش غذایی، بعد از آنالیز لاشه هر دو گروه از کرم‌های تغذیه شده با غذا و مدفوع ماهی و همچنین آنالیز مدفوع و غذای ماهی مشخص شد که در مدفوع ماهی نیز مقادیر قابل توجهی چربی و پروتئین وجود دارد اما مقدار آن‌ها نسبت به

جدول ۲: آنالیز نهایی ترکیبات غذایی ماهی، مدفوع ماهی و لاشه کرم‌های *Nereis diversicolor* تغذیه شده با مدفوع و غذای ماهی قزل
آلای رنگین کمان

متغیر	نمونه		غذای ماهی قزل آلا	مدفوع ماهی قزل آلا
	T ₁	T ₂		
چربی کل (%)	۴/۰۲±۰/۳۲	۴/۵۴±۰/۲۰	۱۵/۶۴±۰/۱۶	۴/۱۲±۰/۲۳
پروتئین کل (%)	۷/۷۱±۰/۴۱	۷/۸۳±۰/۱۱	۴۱/۴۷±۰/۶۶	۳/۰۲±۰/۳۷
خاکستر (%)	۱/۶۰±۰/۲۹	۱/۸۴±۰/۲۶	۸/۰۵±۰/۰۷	۴/۴۸±۰/۲۲
رطوبت (%)	۸۶/۹۸±۰/۴۰	۸۶/۷۹±۰/۶۱	۷/۳۰±۰/۱۴	۸۷/۳۵±۰/۴۴



شکل ۱: نمودار مقایسه میزان پروتئین و چربی کل در کرم‌های نریس تغذیه شده با غذا و مدفوع ماهی قزل آلای رنگین کمان

۳۰/۸۷ درصد و $۳۵/۳۵ \pm ۰/۹۱$ درصد بود. در کرم‌های تغذیه شده با مدفوع ماهی مقدار اسیدهای چرب C24:0, C22:0, C20:0, C18:0, C14:0, C12:0, C18:2 n6t و C18:2 n6c, C20:1, C18:1 n9t بیشتر از کرم‌های تغذیه شده با غذای ماهی بود. از سوی دیگر مقدار اسیدهای چرب C18:1 n9c, C16:1, C16:0, C22:6 n3 (DHA) و C20:5 n3 (EPA), C18:3 n3 در کرم‌های تغذیه شده با غذای ماهی بیشتر از کرم‌های تغذیه شده با مدفوع ماهی بود. همچنین اسیدچرب C17:0 در کرم‌های تغذیه شده با غذای ماهی به میزان

بر طبق جدول ۳ پروفایل اسیدچرب در مدفوع ماهی دارای ۱۴ اسیدچرب، در غذای ماهی و کرم‌های تغذیه شده با غذای ماهی دارای ۱۷ اسیدچرب و در کرم‌های تغذیه شده با مدفوع ماهی دارای ۱۶ اسیدچرب بود. اسیدهای چرب اصلی در همه نمونه‌ها اسیدپالمیتیک C16:0، اسید اولئیک C18:1 n9c و اسید آلفا لینولئیک C18:2 n6c می‌باشد. بالاترین مقدار اسیدپالمیتیک در مدفوع ماهی به میزان $۲۴/۹۲ \pm ۰/۱۰$ درصد، بالاترین مقدار اسید اولئیک و اسید آلفا لینولئیک در غذای ماهی به ترتیب به میزان $۰/۱۵ \pm$

۰/۵۰±۰/۱۲ درصد وجود داشت درحالی که در کرم- های تغذیه شده با مدفوع ماهی دیده نشد. جدول ۳: پروفایل اسیدهای چرب (±SD) غذا و مدفوع ماهی قزل آلابی رنگین کمان و کرم‌های *Nereis diversicolor* تغذیه شده با آن‌ها.

غذای ماهی قزل آلابی	مدفوع ماهی قزل آلابی	نمونه		
		T ₂ کرم‌های تغذیه شده با غذای ماهی	T ₁ کرم‌های تغذیه شده با مدفوع ماهی	
۰/۰۶±۰/۶۷	۰/۰۲±۰/۰۸	۰/۰۲±۰/۱۰	۰/۰۹±۰/۷۹	C12:0
۰/۱۰±۳/۱۰	۰/۰۵±۳/۴۵	۰/۱۴±۳/۷۶	۰/۰۴±۵/۰۵	C14:0
۰/۱۵±۱۳/۱۵	۰/۱۰±۲۴/۹۲	۰/۸۹±۱۶/۰۵	۰/۲۲±۱۴/۵۱	C16:0
۰/۱۶±۰/۵۲	۰/۰۰	۰/۱۲±۰/۵۰	۰/۰۰	C17:0
۰/۱۵±۴/۵۳	۰/۳۶±۱۲/۴۰	۰/۵۵±۷/۹۲	۰/۳۰±۹/۲۱	C18:0
۰/۰۶±۰/۴۷	۰/۱۰±۲/۷۰	۰/۰۸±۰/۳۶	۰/۱۵±۲/۹۰	C20:0
۰/۰۶±۰/۳۳	۰/۱۲±۰/۶۳	۰/۰۲±۰/۰۸	۰/۰۹±۱/۰۰	C22:0
۰/۰۰±۰/۱۰	۰/۱۰±۰/۴۰	۰/۰۲±۰/۱۱	۰/۰۸±۰/۷۱	C24:0
۰/۰۴±۰/۳۳	۰/۰۲±۰/۲۱	۰/۰۳±۰/۳۱	۰/۰۲±۰/۱۹	C16:1
۰/۱۵±۳/۰۸۷	۰/۶۰±۱۸/۹۳	۳/۷۰±۲۸/۱۲	۲/۲۳±۲۳/۰۲	C18:1 n9c
۰/۰۲±۰/۱۱	۰/۰۰	۰/۰۳±۰/۱۰	۰/۰۲±۰/۱۶	C18:1 n9t
۰/۰۶±۰/۱۷	۰/۰۶±۰/۹۳	۰/۰۶±۰/۲۲	۰/۲۳±۱/۶۰	C20:1
۰/۹۱±۲۵/۳۵	۰/۳۶±۱۷/۷۰	۱/۸۳±۲۲/۸۷	۳/۱۹±۲۴/۹۰	C18:2 n6c
۰/۰۱±۰/۱۲	۰/۰۰	۰/۲۱±۰/۸۱	۰/۳۲±۱/۴۰	C18:2 n6t
۰/۲۰±۳/۳۳	۰/۳۳±۵/۳۷	۰/۵۶±۹/۶۴	۰/۳۲±۸/۵۰	C18:3 n3
۰/۱۰±۲/۷۹	۰/۱۰±۱/۲۰	۰/۶۲±۵/۶۹	۰/۴۹±۴/۳۰	C20:5 n3 (EPA)
۰/۲۳±۴/۰۴	۰/۵۷±۳/۷۹	۱/۱۸±۳/۳۴	۱/۰۶±۱/۷۲	C22:6 n3 (DHA)
۰/۳۷±۲۲/۸۷	۰/۷۴±۴۴/۵۸	۰/۲۱±۳۷/۸۸	۰/۱۲±۳۴/۱۸	∑ Saturated (SFA)
۰/۲۱±۳۱/۴۷	۰/۵۹±۲۰/۰۷	۳/۶۴±۲۵/۷۵	۱/۹۶±۲۴/۹۷	∑ Monounsaturated
۰/۵۸±۴۵/۶۳	۰/۹۸±۲۸/۰۷	۳/۴۵±۳۶/۳۴	۱/۹۹±۴۰/۸۲	∑ Polyunsaturated(PUFA)
۰/۰۳±۱/۴۴	۰/۴۹±۳/۱۷	۰/۱۸±۰/۵۹	۰/۲۲±۰/۴۰	DHA/EPA
۰/۰۲±۰/۲۹	۰/۰۵±۰/۵۹	۰/۰۵±۰/۷۹	۰/۱۱±۰/۵۵	ω-3:ω-6

بحث

همکاران (۲۰۱۷) بود که نرخ رشد ویژه برای کرم‌های *Nereis diversicolor* تغذیه شده با غذای خورده نشده توسط فیل ماهی را معادل ۳/۳۹±۰/۲۹ درصد در هر روز، در مدت ۸ هفته و در دمای ۲۳ درجه سانتی-گراد تعیین کردند. همچنین در آزمایش ما، این فاکتور برای کرم‌هایی که با مدفوع ماهی قزل آلابی تغذیه شدند (۲/۳۱۴±۰/۰۲۴ درصد در روز)، کمتر از نتایج

نرخ رشد ویژه در کرم‌های *Nereis diversicolor* تغذیه شده با غذای ماهی در این آزمایش بالاتر از کرم‌های تغذیه شده با مدفوع ماهی در طی ۶۰ روز بود. نرخ رشد ویژه کرم‌های نرئیس در این آزمایش در ارتباط با غذای ماهی (۳/۸۷۷±۰/۱۹۱ درصد در روز) کمی بیشتر از نتایج به دست آمده توسط Pajand و

در این تحقیق میزان پروتئین کل در وزن تر کرم‌های تغذیه شده با مدفوع ماهی معادل $7/71 \pm 0/41$ درصد و در کرم‌های تغذیه شده با غذای ماهی $7/83 \pm 0/11$ درصد بود. این میزان توسط Santos و همکاران (۲۰۱۶)، برای کرم‌های *Nereis diversicolor* تغذیه شده با جیره‌های غذایی تجاری Moist sole و Aquagold به ترتیب برابر $8/87 \pm 0/82$ درصد و $8/65 \pm 1/21$ درصد بود. همچنین میزان چربی کل در وزن تر، در آزمایش ما معادل $4/02 \pm 0/32$ درصد برای کرم‌های تغذیه شده با مدفوع ماهی و $4/52 \pm 0/20$ درصد برای کرم‌های تغذیه شده با غذای ماهی بود (جدول ۲). این میزان توسط Luis and Passos (۱۹۹۵)، برای کرم‌های *Nereis diversicolor* بین $4/4$ درصد در ماه فوریه و $1/9$ درصد در ماه آگوست اندازه‌گیری شد. در این آزمایش مشخص شد که مدفوع قزل‌آلای رنگین‌کمان حاوی مقادیر قابل توجهی اسیدهای چرب ضروری می‌باشد (جدول ۳). بنابراین از طریق بازیافت ضایعات تولید شده توسط مزارع پرورش ماهی می‌توان به آبرزی‌پروری پایدار و حداکثر بهره‌وری از امکانات موجود دست یافت. این کار توسط کرم‌های *Nereis diversicolor* قابل انجام می‌باشد (Brown et al., 2011; García-Alonso et al., 2008; Bischoff et al., 2009; Bradshaw et al., 1990; Palmer, 2010).

اسید پالمیتیک (C16:0) در بین اسیدهای چرب اشباع در نمونه‌های کرم، اسیدچرب اصلی بود و مقدار آن در کرم‌های تغذیه شده با مدفوع ماهی معادل $14/51 \pm 0/22$ درصد و در کرم‌های تغذیه شده با غذای ماهی معادل $0/89 \pm 16/05$ درصد بود (جدول ۳). Pajand و همکاران (۲۰۱۷)، Luis and

حاصل از تحقیق Pajand و همکاران (۲۰۱۷) برای کرم‌های تغذیه شده با مدفوع فیل ماهی بود که نرخ رشد ویژه را معادل $3/40 \pm 0/15$ درصد در هر روز در مدت ۸ هفته تعیین کردند. همچنین Brown و همکاران (۲۰۱۱)، نرخ رشد ویژه برای کرم‌های *Nereis virens* تغذیه شده با مدفوع ماهی هالیبوت را حدود ۳ درصد در روز در طی ۷۱ روز و Honda and Kikuchi (۲۰۰۲)، برابر با $1/66$ درصد در هر روز برای کرم‌های *Perinereis nuntia vallata* تغذیه شده با مدفوع ماهی فلاندر اعلام کردند. میزان افزایش بیومس کرم‌ها در گروه کرم‌های تغذیه شده با مدفوع ماهی معادل $38/412 \pm 9/622$ گرم در متر مربع به دست آمد که حدود $1/9$ برابر بیومس اولیه بود در حالی که این افزایش بیومس در گروه کرم‌های تغذیه شده با غذای ماهی معادل $165/599 \pm 13/257$ گرم در متر مربع تعیین شد که حدود $8/3$ برابر بیومس اولیه بود که نشان دهنده شرایط بهتر رشد در آن‌ها می‌باشد (جدول ۱). در این آزمایش درصد بقای کرم‌های نرئیس در گروه تغذیه شده با مدفوع ماهی $72/80 \pm 11/15$ درصد و در گروه تغذیه شده با غذای ماهی $90/53 \pm 3/89$ درصد بود (جدول ۲). همچنین Pajand و همکاران (۲۰۱۷)، درصد بقا در کرم‌های نرئیس تغذیه شده با مدفوع فیل ماهی را معادل $60/40 \pm 4/40$ درصد و در کرم‌های تغذیه شده با غذای خورده نشده توسط فیل ماهی معادل $92/46 \pm 4/82$ درصد تعیین کردند. این کاهش بقا در گروه کرم‌های تغذیه شده با مدفوع می‌تواند به علت تلفات ناشی از کمبود غذا و یا بروز پدیده هم‌نوع-خواری در اثر گرسنگی کشیدن باشد (Batista et al., 2003; Hartmann-Schröder, 1996).

ارگانسیم‌های دریایی گوشت‌خوار دارای نسبت بالاتری هستند، این نسبت کمتر از یک می‌تواند به علت رفتار تغذیه‌ای همه‌چیزخواری این موجودات باشد (Santos *et al.*, 2016). در مطالعات قبلی ثابت شده که اگر مقادیر EPA و DHA در غذا پایین باشد این کرم‌ها قادر به سنتز مجدد آن‌ها می‌باشند و چنانچه مقدار آن‌ها در جیره‌های غذایی زیاد باشد این کرم‌ها تقریباً قادر به حفظ همه EPA موجود در غذا می‌باشند در حالی که تنها ۵۰ درصد از DHA را متابولیز می‌کنند (Costa *et al.*, 2000).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که میزان رشد و پروفایل اسیدچرب کرم‌های تغذیه شده با غذای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در نهایت شرایط بهتری از کرم‌های تغذیه شده با مدفوع این ماهی در طی ۶۰ روز آزمایش دارند. بنابراین برای این که کرم‌های تغذیه شده با مدفوع ماهی به رشد مناسب‌تری برسند، احتمالاً به مدت زمان بیشتری برای پرورش نیاز خواهند داشت که با توجه به این که هیچ هزینه‌ای برای غذادهی این کرم‌ها صورت نمی‌گیرد، در صورتی که پرورش دهنده محدودیت زمانی برای پرورش این کرم‌ها نداشته باشد، با مراقبت، کنترل و حفظ ثبات در شرایط پرورش امکان تولید آن‌ها با رشد مناسب و در نهایت بیومس کافی را خواهد داشت که می‌تواند هم از لحاظ اقتصادی و هم از لحاظ زیست محیطی حائز اهمیت باشد.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر ذبیح اله پژند مدیریت محترم شرکت دانش بنیان زیست پالایشگر خزر و جناب آقای

(García-Alonso، ۱۹۹۵) و همکاران (۲۰۰۸) و Bischoff و همکاران (۲۰۰۹)، نشان دادند که اسید پالمیتیک یکی از فراوان‌ترین اسیدهای چرب در کرم‌های *Nereis diversicolor* می‌باشد. اسید اولئیک (C18:1 n9c) در بین اسیدهای چرب MUFA در نمونه‌های کرم، اسیدچرب اصلی بود و مقدار آن در کرم‌های تغذیه شده با مدفوع ماهی معادل $23/02 \pm 2/23$ درصد و در کرم‌های تغذیه شده با غذای ماهی معادل $28/12 \pm 3/70$ درصد بود (جدول ۳). مقدار این اسید-چرب توسط Pajand و همکاران (۲۰۱۷) معادل $31/09 \pm 1/00$ درصد برای کرم‌های تغذیه شده با مدفوع ماهی و $34/44 \pm 2/06$ درصد برای کرم‌های تغذیه شده با غذای ماهی تعیین شد. اسید لینولئیک (C18:2 n6c) در بین اسیدهای چرب PUFA در نمونه‌های کرم، اسیدچرب اصلی بود و مقدار آن در کرم‌های تغذیه شده با مدفوع ماهی معادل $24/90 \pm 3/19$ درصد و در کرم‌های تغذیه شده با غذای ماهی معادل $22/87 \pm 1/83$ درصد بود (جدول ۳). مقدار این اسیدچرب توسط Pajand و همکاران (۲۰۱۷)، معادل $26/70 \pm 6/05$ درصد برای کرم‌های تغذیه شده با مدفوع ماهی و $20/52 \pm 5/25$ درصد برای کرم‌های تغذیه شده با غذای ماهی تعیین شد.

مقدار EPA در هر دو گروه از کرم‌ها در مقایسه با مقدار آن در غذا و مدفوع ماهی افزایش داشت. این افزایش به وسیله غنی‌سازی انتخابی این اسیدچرب یا به وسیله سنتز PUFA توسط کرم‌های *Nereis diversicolor* توضیح داده می‌شود (Hastings *et al.*, 2001; Tocher *et al.*, 2004; Vásquez *et al.*, 2014). همچنین در هر دو گروه کرم‌ها نسبت DHA/EPA کمتر از یک بود. از آنجایی که معمولاً

changes during herbivory and coprophagy by the marine invertebrate *Nereis diversicolor*. Journal of marine biology. Assoc. U.K. 70: 771-787.

8. Brown, N., Eddy, S. & Plaud, S., 2011. Utilization of waste from a marine recirculating fish culture system as a feed source for the polychaete worm, *Nereis virens*. Aquaculture, 322-323, 177-183.
9. Esnault, G., Retière, C. & Lambert, R. 1990. Food resource partitioning in a population of *Nereis diversicolor* (Annelida, Polychaeta) under experimental conditions. Proceedings of the 24th European Marine Biology Symposium, 453-467.
10. Esselink, P. & Zwarts, L. 1989. Seasonal trend in burrow depth and tidal variation in feeding activity of *Nereis diversicolor*. Marine Ecology Progress Series, 56: 243-254.
11. Costa, P.F.E., Narciso, L. & Cancela da Fonseca, L., 2000. Growth, survival and fatty acid profile of *Nereis diversicolor* (O.F. Mueller, 1776) fed on six different diets. Bulletin of Marine Science, 67: 337-343.
12. García-Alonso, J., Müller, C.T. & Hardege, J.D., 2008. Influence of food regimes and seasonality on fatty acid composition in the ragworm. Aquatic Biology, 4: 7-13.
13. Ghasemi, A.F., Taheri, M. & Jam, A., 2013. Does the introduced polychaete *Alitta succinea* establish in the Caspian Sea? Helgol. Mar. Res. 67(4): 715-720.
14. Harley, M.B. 1950. Occurrence of a filter-feeding mechanism in the polychaete *Nereis diversicolor*. Nature, 165, 734-735.
15. Hartmann-Schröder, G., 1996. Annelida, Borstenwürmer, Polychaeta. Gustav Fischer Verlag, Jena. 201-204.
16. Hastings, N., Agaba, M., Tocher, D. R., Leaver, M. J., Dick, J. R., Sargent, J. R., & Teale, A. J., 2001. A vertebrate fatty acid desaturase with Delta 5 and Delta 6 activities. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98(25): 14304-14309.
17. Honda, H. & Kikuchi, K., 2002. Nitrogen budget of polychaete *Perinereis nuntia*

باقری و سایر عزیزانی که در انجام این کار ما را یاری فرمودند نهایت سپاس‌گزاری و تشکر را داریم.

منابع

۱. پژند، ذ.ا، عمادی، ح، نگارستان، ح، پرند آور، ح، چوبیان، ف. و حدادی مقدم، ک، ۱۳۸۲. بررسی امکان دستیابی به بیوتکنیک پرورش کرم نرئیس (*Nereis diversicolor*). گزارش‌نهایی پروژه، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران. ۷۸ صفحه.
۲. پژند، ذ.ا، حدادی مقدم، ک، چوبیان، ف، روفجایی، ر. و پرندآور، ح، ۱۳۸۸. بررسی تاثیر دما، شوری و دوره نوری در القاء رسیدگی جنسی و رفتارهای تولیدمثلی کرم نرئیس (*Nereis diversicolor*). مجله علمی شیلات ایران، ۱۸(۳): ۱۱-۳۰.
3. AOAC., 1995. Official Methods of Analysis (16th edn). AOAC International Publishers, Arlington VA.
4. Batista, F.M., Costa, P.F.E., Matias, D., Joaquim, S., Massapina, C., Passos, A.M., Pousao Ferreira, P. & Cancela da Fonseca, L., 2003. Preliminary results on the growth and survival of the polychaete *Nereis diversicolor* (O. F. Müller, 1776), when fed with faeces from the carpet sheel clam *Ruditapes decussatus* (L., 1758). Bol. Inst. Esp. Oceanogr, 19: 443-446.
5. Belgrano, A., 2005. Aquatic food webs' ecology: old and new challenges. In: Belgrano, A., Scharler, U.M., Dunne, J., Ulamovicz, R.E. (Eds.), Aquatic Food Webs. Oxford University Press, Oxford.
6. Bischoff, A.A., Fink, P. & Waller, U., 2009. The fatty acid composition of *Nereis diversicolor* cultured in an integrated recirculated system: possible implications for aquaculture. Aquaculture, 296: 271-276.
7. Bradshaw S. A., O'Hara S. C. M., Corner E. D. S. & Eglinton G., 1990. Dietary lipid

- wastewater and its growth performance and fatty acid composition in an integrated culture system with *Huso huso* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture Research*, 48(10): 5271–5279.
28. Palmer, P.J., 2010. Polychaete-assisted sand filters. *Aquaculture*, 306, 369–377.
 29. Palmer, P.J., Wang, S., Houlihan, A., and Brock, I., 2014. Nutritional status of a nereidid polychaete cultured in sand filters of mariculture wastewater. *Aquaculture nutrition*, 20: 675–691.
 30. Parandavar, H., Kim, K. H. & Kim, C. H., 2015. Effects of rearing density on growth of the polychaete rockworm *Marphysa sanguinea*. *Fisheries and Aquatic Science*, 18(1): 57–63.
 31. Riisgård, H. U., 1991. Suspension feeding in the polychaete *Nereis diversicolor*. *Marine Ecology Progress Series*, 70: 29–37.
 32. Riisgard, H. U. & Vedel, A., 1993. Filter-feeding in the polychaete *Nereis diversicolor*: growth and bioenergetics. *Marine Ecology Progeres Series*, 100: 145–152.
 33. Santos, A., Granada, L., Baptista, T., Anjos, C., Simões, T., Tecelão, C. & Pombo, A., 2016. Effect of three diets on the growth and fatty acid profile of the common ragworm *Hediste diversicolor* (O.F. Müller, 1776). *Aquaculture*, 465: 37–42.
 34. Smith, R. I., 1964. On the early development of *Nereis diversicolor* in different salinities. *Journal Morphology*. 114: 437–464.
 35. Taheri, M., Foshtomi, M., Noranian, M. & Mira, S.S., 2012. Spatial distribution and biodiversity of macrofauna in the southeast of the Caspian Sea, Gorgan Bay in relation to environmental conditions. *Ocean Science Journal*, 47(2):113–122.
 36. Tocher, D.R., Fonseca-Madrigal, J., Dick, J.R., Ng, W.-K., Bell, J.G. & Campell, P.J., 2004. Effects of water temperature and diets containing palm oil on fatty acid desaturation and oxidation in hepatocytes and intestinal enterocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative* *vallata* fed on the feces of Japanese flounder. *Fisheries Science*, 68: 1304–1308.
 18. Howell, C.R. & R.D Stipanovic., 1995. Mechanism in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*-induced cotton seedling disease by *Gliocladium virens*: Antibiosis. *Phytopathology*, 85: 469–472.
 19. Hung, S.S.O., Fynn-Aikins, F.K., Lutes, P.B. & Xu, R., 1989. Ability of juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) to utilize different carbohydrate sources. *Journal of Nutrition*, 119: 727–733.
 20. Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H., Tacon, A.G.J., 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, 197: 25–42.
 21. Leppakoski, E., Gollasch, S. & Olenin, S. (eds)., 2002b. *Invasive Aquatic Species of Europe. Distribution, Impacts and Management*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 583 pp.
 22. Luis, O. J. & Ponte, A. C., 1993. Control of reproduction of the shrimp *Penaeus kerathurus* held in captivity. *Journal of the World Aquaculture Society*, 24: 31–39.
 23. Luis, O.J. & Passos, A.M., 1995. Seasonal changes in lipid content and composition of the polychaete *Nereis* (*Hediste*) *diversicolor*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 111: 579–586.
 24. Lytle, J.S., Lytle, T.F. & Ogle, J.T., 1990. Polyunsaturated fatty acid profiles as a comparative tool in assessing maturation diets of *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 89: 287–299.
 25. Olive, P. J. W., Islam, M. D. & Cowin, P. B. D., 2000. Cultured Polychaeta: A dietary resource to increase penaeid hatchery performance. *AQUA 2000 Responsible Aquaculture in the New Millenium*. European Aquaculture Society Special Publication 28, pp523.
 26. Ozoh, P. T. E., & Jones, N. V., 1990. Capacity adaptation of *Hediste* (*Nereis*) *diversicolor* embryogenesis to salinity, temperature and copper. *Marine Environmental Research*, 29(3): 227–243.
 27. Pajand, Z. O., Soltani, M., Bahmani, M., & Kamali, A., 2017. The role of polychaete *Nereis diversicolor* in bioremediation of

39. Wells, G. P. & Dales, R. P., 1951. Spontaneous activity patterns in animal behaviour: the irrigation of the burrow in the polychaetes *Chaetopterus variopedatus* Renier and *Nereis diversicolor* O.F. Müller. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 29: 661-679.
40. Wouters, R., Lavens, P., Nieto, J. & Sorgeloos, P., 2001. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. *Aquaculture*, 202: 1-21.
- Biochemistry and Physiology. Pt. B, 137: 49-63.
37. Vásquez, V., Krieg, M., Lockhead, D. & Goodman, M.B., 2014. Phospholipids that contain polyunsaturated fatty acids enhance neuronal cell mechanics and touch sensation. *Cell Rep.* 6: 70-80.
38. Wahli, T., Verlhac, V., Girling, P., Gabaudan, J. & Aebischer, C., 2003. Influence of dietary vitamin C on the wound healing process in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 225 (1-4): 371-86.