



بررسی سمیت حاد کلونید نانو ذرات نقره سنتتیک تولید شده از طریق سایش لیزری بر ماهی گامبوزیا *Gambusia holbrooki*

سیده ژینو حسینی^۱، لیلا حبیبی^۱، سید علی جوهری^{۱*}، ایمان سوری نژاد^۲

^۱گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان

^۲گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی و جوی، دانشگاه هرمزگان

نوع مقاله:	چکیده
پژوهشی	
تاریخچه مقاله:	
دریافت: ۹۳/۰۳/۱۴	
اصلاح: ۹۳/۰۵/۰۹	
پذیرش: ۹۳/۰۶/۱۴	
کلمات کلیدی:	
نانو ذرات نقره	با توجه به روند رو به رشد تولید و مصرف نانو مواد و احتمال رهایش آنها به بوم سازگان های آبی، مطالعه در مورد اثرات سمی این مواد بر زیست‌مندان آبی دارای اهمیت بسیاری می باشد. در این پژوهش اثرات سمیت حاد نانو ذرات نقره تولید شده به روش فیزیکی (سایش لیزری) بر ماهی گامبوزیا (<i>Gambusia holbrooki</i>) مورد بررسی قرار گرفت. آزمایشات سم شناسی حاد بر اساس روش استاندارد سازمان همکاری و توسعه اقتصادی برنامه ریزی و اجرا گردید. به این منظور پس از ۹۶ ساعت در معرض قرار دادن ماهیان با غلظت های متفاوت نانو ذرات نقره، داده های حاصل از تلفات آنها، با استفاده از نرم افزار پروبیت آنالیز گردید و مقادیر غلظت های کشنده محاسبه شد. بر اساس نتایج، مقدار غلظت کشنده میانی (LC ₅₀) کلونید نانو ذرات نقره مورد مطالعه طی ۹۶ ساعت برای ماهی گامبوزیا، ۰/۰۱۶ میلی گرم در لیتر برآورد گردید. با توجه به این مقدار، نانو ماده مذکور جزو مواد شیمیایی بسیار سمی برای آبریان طبقه بندی می شود و در صورت رهایش آن به محیط زیست، می تواند دارای اثرات نامطلوب بر آبریان باشد. بنابراین جلوگیری از رهایش عمدی یا تصادفی نانو ذرات نقره به بوم سازگان های آبی باید مورد توجه بیشتر قرار گیرد.
گامبوزیا	
سایش لیزری	
سم شناسی	

مقدمه

در سال های اخیر فن آوری نانو در ایران و جهان با روند فزاینده ای در حال رشد بوده است و در بسیاری از زمینه های علمی، تحقیقاتی و صنعتی کاربرد گسترده یافته است و به همین دلیل تولید انبوه و صنعتی نانو مواد از مدت ها پیش شروع شده و روز به روز نیز نانو مواد جدید با ویژگی ها و کاربردهای جدید متولد می شوند. بر اساس پیش بینی ها، بازار محصولات محتوی نانو مواد تا سال ۲۰۱۵، از ارزشی معادل ۱ تریلیون دلار برخوردار خواهد بود (Laban *et al.*, 2010). اگرچه تولید و استفاده از نانو مواد مختلف در سطح جهان پیوسته در حال افزایش بوده است (Benn *et al.*, 2008)، اما هنوز اطلاعات کافی در مورد تاثیرات سمیت نانو مواد به خصوص اثرات آنها بر محیط زیست و به ویژه بر موجودات آبی اندک است (Johari *et al.*, 2013). در یک مطالعه تخمین زده شده است که از ۲۶۰۰۰۰ تا ۳۰۹۰۰۰ تن نانو مواد تولید شده در جهان در سال ۲۰۱۰، ۰/۴ تا ۷ درصد آن وارد محیط های آبی شده است (Keller *et al.*, 2013)؛ بر این اساس، شناخت اثرات احتمالی این مواد بر موجودات آبی دارای اهمیت زیادی خواهد بود (Johari *et al.*, 2013).

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: a.johari@uok.ac.ir

بر اساس تعریف مصوب کمیسیون اروپا (۱۸ اکتبر ۲۰۱۱) نانو مواد عبارتند از مواد طبیعی، تولید شده به صورت اتفاقی و یا ساخته شده به دست بشر، که حاوی ذراتی به صورت آزاد^۱، تجمع یافته^۲ و یا کلوخه شده^۳ بوده و از نظر توزیع اندازه، حداقل ۵۰ درصد ذرات آن حداقل در یک بُعد دارای اندازه ای بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر باشند. در موارد ویژه همچون مسائل مربوط به بهداشت و سلامت، ایمنی و محیط زیست، از نظر شرط توزیع اندازه، حتی موادی که ۱ تا ۵۰ درصد آن‌ها بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر باشند نیز در حیطه نانو مواد قرار می‌گیرند (<http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech>). به طور کلی نانو مواد به دو روش قابل تولید می‌باشند؛ در روش های پایین به بالا^۴، طی فرآیندهای بسیار ویژه شیمیایی مولکول‌ها به هم می‌پیوندند تا ساختارهای بزرگتری را در ابعاد نانومتری تشکیل دهند. ولی در روش های بالا به پایین^۵، مواد با ابعاد بزرگ توسط روش‌های فیزیکی تبدیل به ساختارهای نانومقیاس می‌شوند (Rodgers, 2006). مهمترین کاربرد نانو ذرات نقره در تولید محصولات با ویژگی های ضد میکروبی است و همچون سایر نانو مواد، امکان تولید این نانو ماده نیز به هر دو روش فیزیکی و شیمیایی وجود دارد. در این رابطه در روش بالا به پایین، ابتدا یک حجم بزرگ از فلز نقره به روش مکانیکی تراش می‌خورد و سپس نانو ذرات نقره تولیدی با افزودن مواد محافظ کلئوئیدها تثبیت می‌گردند (Gaffet et al., 1996; Amulyavichus et al., 1998). در مقابل، روش‌های پایین به بالا شامل روش کاهش شیمیایی یون‌های نقره، روش الکتروشیمیایی و روش سونوشیمیایی می‌باشند (Prabhu and Poulose, 2012).

در بسیاری از مطالعاتی که تا به امروز در مورد سمیت نانو ذرات نقره انجام شده اند، از نانو ذراتی استفاده گردیده است که به روش احیاء شیمیایی تولید گردیده اند؛ در این مطالعات علاوه بر اثری که خود نانو ذرات بر موجود مورد مطالعه می‌گذارند، ترکیبات شیمیایی استفاده شده برای تبدیل یون های نقره به نانو ذرات نقره نیز ممکن است دارای اثرات سمی باشند. اما یکی از روش های فیزیکی برای تولید نانو ذرات نقره، استفاده از انرژی اشعه لیزر برای تبدیل فلز نقره به نانو ذرات نقره در ابعاد بسیار کوچکتر می‌باشد. در این روش قابلیت تولید نانو ذرات، بدون افزودن مواد شیمیایی اضافه، در محیط آب یا هر نوع محیط مایع دیگر وجود دارد و بنابراین میزان خلوص نانو ذرات به دست آمده بالاتر است.

ماهی گامبوزیا با نام علمی *Gambusia holbrooki*، از خانواده گامبوزیا ماهیان یا کپور ماهیان زنده زای دندان دار است که در اقلیم‌های معتدل جهان به طور گسترده ای پراکنده است. از آنجا که این ماهی از لحاظ پراکنش طبیعی در اکثر آب‌های داخلی ایران گسترش یافته است (عبدلی، ۱۳۷۸؛ جوهری و همکاران، ۱۳۸۹)، بنابراین می‌تواند به عنوان یک گونه مدل مناسب جهت بررسی اثر آلاینده های زیست محیطی بر زیست‌مندان آب های داخلی ایران مطرح شود. از طرفی فراوانی طبیعی، سادگی صید، شرایط راحت نگهداری در آزمایشگاه و قابلیت سازگاری با شوری های مختلف، این ماهی را به گونه ای مناسب جهت مطالعات سم شناسی آبیان تبدیل کرده است (Nunes et al., 2005). هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی اثرات سمیت کلئوئید نانو ذرات نقره تولید شده از طریق یک روش بالا به پایین (سنتز فیزیکی به کمک سایش لیزری)، بر ماهی گامبوزیا بود و به این منظور بازماندگی این ماهی در رویارویی با غلظت های مختلف نانو ماده مذکور طی دوره ۹۶ ساعته مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نانو ذرات نقره مورد استفاده در این پژوهش از طریق سایش فیزیکی فلز نقره در آب با استفاده از اشعه لیزر (Bärsch et al., 2009) و توسط شرکت Particular GmbH آلمان تولید گردیده بود. بر اساس آنالیزهای دستگاهی ارائه شده از طرف شرکت مذکور، این ماده به صورت نانو ذرات نقره کلئوئیدی با غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر در آب مقطر خالص بوده که برای جلوگیری از ته نشینی نانو ذرات، ۰/۰۱ درصد وزنی پلی وینیل پیرولیدون (PVP) به آن افزوده شده است. بر اساس نتایج

1. Unbound
2. Agglomerate
3. Aggregate
4. Bottom-up approaches
5. Top-down approaches

آزمون پراکنندگی نوری پویا (DLS^۱) که توسط دستگاه زتاسایزر ساخت شرکت Malvern انجام گردیده بود، محدوده قطر هیدرودینامیک نانو ذرات در این کلئوئید ۵ تا ۲۰ نانومتر بود و بیشترین تعداد این ذرات دارای اندازه ۹/۲۴۴ نانومتر بودند؛ بر همین اساس شاخص غیر یکنواختی (PDI^۲) ذرات برابر ۰/۳۹۶ بود که نشان دهنده پراکنندگی قطر ذرات به صورت مونودیسپرس بوده و به عبارتی قطر ذرات در یک محدوده یکنواخت می باشد (اگر مقدار این شاخص کمتر از ۲۰ باشد نشان دهنده یکنواختی قطر ذرات در کلئوئید است).

ماهیان استفاده شده در این پژوهش، گامبوزیای بالغ صید شده از دریاچه زریوار واقع در استان کردستان بودند که بیش از ۴ ماه در شرایط آزمایشگاهی نگهداری و سازگار شده بودند و میانگین وزن آن‌ها در زمان شروع آزمایشات، 49.0 ± 2.3 میلی گرم بود. در طی مدت نگهداری، ماهیان با غذای مخصوص ماهیان آکواریومی تغذیه شدند. آب مورد استفاده برای نگهداری ماهیان طی دوره سازگاری و همچنین طی انجام آزمایشات سم شناسی، آب شرب شهر سنندج بود که برای کلرزدایی از آن، حداقل به مدت ۲ هفته هوادهی شدید شده بود. نکته بسیار مهم این است که در بررسی سمیت زیستی نانو ذرات نقره، به دلیل احتمال واکنش نقره با ترکیبات سولفات، نمی توان به منظور کلرزدایی آب از تیوسولفات سدیم استفاده کرد. برخی از ویژگی های آب هوادهی شده با استفاده از کیت سنجش شاخص های شیمیایی آب (شرکت Sera، ایتالیا) اندازه گیری گردید. بر این اساس میزان آمونیاک و کلر آب صفر میلی گرم در لیتر، میزان کلسیم ۱۰۰ میلی گرم در لیتر و میزان pH برابر ۸/۵ بود.

آزمایشات سم شناسی بر اساس استاندارد سازمان همکاری و توسعه اقتصادی برنامه ریزی (OECD^۳) و اجرا گردید (OECD, 1992). بر این اساس ابتدا آزمایش تعیین محدوده کشندگی نانو ذرات انجام شد. به این منظور تعداد ۱۸ عدد ماهی گامبوزیا در ۶ تیمار ۳ تایی و به مدت ۹۶ ساعت در معرض ۵ غلظت شامل ۰/۲، ۰/۱، ۰/۰۵، ۰/۰۲۵، ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر نانو ذرات نقره به همراه گروه شاهد (آب فاقد نانو ذرات) قرار گرفتند. بر اساس داده های به دست آمده از آزمایشات اولیه، محدوده کشندگی نانو ذرات نقره در ماهی گامبوزیا بین ۰/۰۵ و ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر به دست آمد. در ادامه برای انجام آزمایشات اصلی، تعداد ۱۶۸ عدد ماهی گامبوزیا در ۸ تیمار ۷ تایی و به مدت ۹۶ ساعت در معرض ۷ غلظت شامل ۰/۰۵۲، ۰/۰۴۶، ۰/۰۴۰، ۰/۰۳۴، ۰/۰۲۸، ۰/۰۲۲ و ۰/۰۱۶ میلی گرم در لیتر نانو ذرات نقره به همراه گروه شاهد (آب فاقد نانو ذرات نقره) قرار گرفتند. هر دو آزمایش تعیین محدوده کشندگی و آزمایش اصلی در آکواریوم های محتوی ۱۰ لیتر آب هوادهی شده انجام گرفت و مطابق استاندارد، در طول تمام آزمایشات ماهی ها غذادهی نشدند. در مدت زمان انجام آزمایشات، میانگین دمای آب 25 ± 1 درجه سانتیگراد و میزان اکسیژن محلول همواره بالاتر از ۸ میلی گرم در لیتر بود. تلفات ماهیان تیمارها، هر ۲۴ ساعت یک بار شمارش گردیده و ماهیان مرده از آب خارج می شدند. در پایان داده های حاصل از شمارش تلفات، با استفاده از نسخه ۱/۵ نرم افزار Probit Analysis (منتشر شده توسط سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا) بررسی گردید و مقادیر غلظت های کشنده محاسبه شد.

نتایج

یکی از مشاهدات در پژوهش حاضر، دفع ناگهانی تخم های نارس و یا بچه‌ی ماهیان ماده پس از مواجهه با نانو ذرات نقره بود. در این رابطه در غلظت ۰/۰۱۶ میلی گرم در لیتر، یک عدد تخم نارس دفع شده بود و در غلظت های ۰/۰۲۲ و ۰/۰۲۸ مجموعاً تعداد ۱۱ عدد گامبوزیا متولد شده بودند که ۶ عدد آن ها مرده بودند ولی ۵ عدد پس از انتقال به آب سالم تا ۲۴ ساعت زنده ماندند. از دیگر مشاهدات این پژوهش، به ویژه در غلظت های بالاتر نانو ذرات، مشکل تنفسی و کاهش باز و بسته شدن سرپوش های آبششی و شنای وارونه و عدم تحرک ماهی به خصوص قیل از مرگ بود.

بر اساس نتایج به دست آمده در این پژوهش، بیشترین غلظت فاقد اثر سمیت (NOEC^۴) و کمترین غلظت ایجاد کننده سمیت (LOEC^۵) نانو ذرات نقره برای ماهی گامبوزیا به ترتیب برابر ۰/۰۱ و ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر بودند. همچنین بر اساس بررسی

1. Dynamic Light Scattering

2. Polydispersity Index

3. Organisation for Economic Co-operation and Development

4. No Observable Effect Concentration

5. Lowest Observable Effect Concentration

داده های مرگ و میر با نرم افزار Probit، حداکثر غلظت قابل قبول ($^{1}MATC$) نانو ذرات نقره برای ماهی مذکور، برابر $0/007$ میلی گرم در لیتر محاسبه گردید. بر همین اساس غلظت کشنده میانی^۲ (LC_{50}) کلویید نانو ذرات نقره طی ۹۶ ساعت برای ماهی گامبوزیا به میزان $0/016$ میلی گرم در لیتر برآورد گردید.

بحث

در آزمون های سم شناسی حاد، به طور معمول سنجش میزان تلفات موجود زنده به عنوان مهمترین نقطه هدف در نظر گرفته می شود. در ادامه بر اساس قوانین اتحادیه اروپا (EC, 2008) و رهنمود شماره 67/548/EEC شورای این اتحادیه، مصوب ۲۷ ژوئن ۱۹۶۷ میلادی (EC, 1999)، مواد شیمیایی با توجه به میزان غلظت های کشنده میانی (LC_{50}) به دست آمده از آزمون های سم شناسی ۹۶ ساعته بر روی ماهی، به صورت زیر طبقه بندی می گردند:

- اگر میزان LC_{50} بین ۱۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر باشد، ماده شیمیایی برای آزمون مضر است و ممکن است دارای اثرات نامطلوب بر بوم سازگان آبی باشد.
- اگر میزان LC_{50} بین ۱ و ۱۰ میلی گرم در لیتر باشد، ماده شیمیایی برای آزمون سمی است و باعث اثرات نامطلوب بر بوم سازگان آبی می گردد.
- اگر میزان LC_{50} کمتر از ۱ میلی گرم در لیتر باشد، ماده شیمیایی برای آزمون بسیار سمی است و دارای اثرات نامطلوب بر بوم سازگان آبی می باشد.

با توجه به نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، میزان LC_{50} ۹۶ ساعته نانو ذرات نقره سنتز شده با کمک اشعه لیزر، برای ماهی گامبوزیا $0/016$ میلی گرم در لیتر به دست آمد که چون این میزان کمتر از ۱ میلی گرم در لیتر می باشد. بنابراین کلویید نانو ذرات نقره مورد مطالعه جزو مواد شیمیایی بسیار سمی برای این آزمون طبقه بندی می شود و در صورت رهائش این نانو ماده به محیط زیست، می تواند دارای اثرات نامطلوب بر بوم سازگان آبی باشد. نتایج مشابهی در مورد سمی بودن نانو ذرات نقره تولید شده با روش های شیمیایی بر ماهی قزل آلی رنگین کمان (Johari et al., 2013; Kalbassi et al., 2013; Salari Joo et al., 2013) و دافنی ماگنا (Asghari et al., 2012) گزارش شده است.

دفع بچه ماهیان و تخم های نارس از مولدین ماده که در پژوهش حاضر بر اثر مواجهه ماهی گامبوزیا با کلویید نانو ذرات نقره مشاهده گردید، می تواند نشان دهنده اثر استرس زاوی تولید مثلی این نانو ذرات بر ماهی مذکور باشد. بنابراین مطالعات دقیق تر بر روی اثرات نانو مواد بر تولید مثل آزمون در آینده ضروری به نظر می رسد.

مشکلات تنفسی ناشی از در معرض قرارگیری ماهیان با کلویید نانو ذرات نقره، که در پژوهش حاضر مشاهده گردید، در مطالعات پیشین نیز گزارش شده بود (جوهری، ۱۳۹۰؛ Johari et al., 2013). بر اساس یافته های این پژوهشگران، نانو ذرات نقره سنتز شده به روش شیمیایی باعث افزایش ترشح موکوس از آبشش ماهی قزل آلی رنگین کمان شده و نانو ذرات پس از واکنش با موکوس، بر روی سطح بافت آبشش ماهی تجمع یافته و از این طریق باعث خفگی ماهی می شوند.

در مجموع به نظر می رسد انجام مطالعات نانو سم شناسی آزمون می تواند به عنوان شاخصی بسیار مناسب به منظور پیش بینی اثرات احتمالی ناشی از رهائش نانو مواد به بوم سازگان های آبی قلمداد شود. در همین رابطه نتایج مطالعات سم شناسی حاد و مزمن هر کدام در جای خود دارای اهمیت ویژه ای می باشند. با توجه به نتایج پژوهش حاضر و نیز نتایج منتشر شده در سایر مطالعات، به نظر می رسد که نانو ذرات نقره دارای اثرات سمی بر آزمون بوده و جلوگیری از رهائش عمدی یا تصادفی آنها به زیست بوم های آبی باید مورد توجه بیشتر قرار گیرد.

منابع

جوهری، س. ع.، مظلومی، س.، عبدلی، ا.، خواجهی، ح.، اصغری، ص. ۱۳۸۹. شناسایی و تعیین پراکندگی ماهیان قنوات و رودهای دائمی شهرستان قائنات. مجله شیلات. سال چهارم، شماره اول، صفحات ۱۲۱-۱۱۵.

¹ Maximum Acceptable Toxicant Concentration

² Median Lethal Concentration

جوهری، س. ع. ۱۳۹۰. کاربرد نانو ذرات نقره در کاهش عفونت های قارچی تخم در دوره انکوباسیون و اثرات احتمالی رهایش آنها بر تغییرات برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی و ژنومیک‌های ماهی قزل‌آلای رنگین کمان. رساله دکترای تخصصی. دانشگاه تربیت مدرس. ۱۹۰ ص.
عبدلی، ا. ۱۳۷۸. ماهیان آبهای داخلی ایران. انتشارات موزه طبیعت و حیات وحش. ۳۷۸ ص.

- Amulyavichus, A., Daugvila, A., Davidonis, R., Sipavichus, C. 1998. Study of chemical composition of nanostructural materials prepared by laser cutting of metals. *The Physics of Metals and Metallography*. 85: 111-117.
- Asghari, S., Johari, S.A., Lee, J.H., Kim, Y.S., Jeon, Y.B., Choi, H.J., Moon, M.C., Yu, I.J. 2012. Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*. *Journal of Nanobiotechnology*. 10:14. DOI: 10.1186/1477-3155-10-14.
- Bärsch, N., Jakobi, J., Weiler, S., Barcikowski, S. 2009. Pure colloidal metal and ceramic nanoparticles from high-power picosecond laser ablation in water and acetone. *Nanotechnology*. 20: 44. doi:10.1088/0957-4484/20/44/445603.
- Benn, T.M., Westerhoff, P. 2008. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environmental Science and Technology*. 42: 4133-4139.
- EC. 1999. Annex VI of Directive 1999/45/EC to consolidated version of directive 67/548/EEC. General classification and labeling requirements for dangerous substances and preparations.
- EC. 2008. Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and Council of 16 December 2008 on classification, labeling and packaging of substances and mixtures. *Official Journal of the European Union*.
- Gaffet, E., Tachikart, M., El Kedim, O., Rahouadj, R. 1996. Nanostructural materials formation by mechanical alloying: morphologic analysis based on transmission and scanning electron microscopic observations. *Materials Characterization*. 36: 185-190.
- Johari, S.A., Kalbassi, M.R., Soltani, M., Yu, I.J. 2013. Toxicity comparison of colloidal silver nanoparticles in various life stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 12(1): 76-95.
- Kalbassi, M.R., Johari, S.A., Soltani, M., Yu, I.J. 2013. Particle Size and Agglomeration Affect the Toxicity levels of Silver Nanoparticle types in Aquatic Environment. *ECOPERSIA* 1(2): 247-264.
- Keller, A.A., McFerran, S., Lazareva, A., Suh, S. 2013. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research*. 15:1692
- Laban, G., Nies, L.F., Turco, R.F., Bickham, J.W., Sepu'lveda, M.S. 2010. The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos. *Ecotoxicology*. 19: 185-195.
- Nunes, B., Carvalho, F., Guilhermino, L. 2005. Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species: *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* and *Tetraselmis chuii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 61: 413-419.
- OECD. 1992. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- Prabhu, S., Poulouse, E.K. 2012. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*, 2:32.
- Rodgers, P. 2006. Nanofabrication: Top down, bottom up. *Nature Nanotechnology* doi:10.1038/nnano.2006.87.
- Salari Joo, H., Kalbassi, M.R., Yu, I.J., Lee, J.H., Johari, S.A. 2013. Bioaccumulation of silver nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): influence of concentration and salinity. *Aquatic Toxicology*. 140-141, 398-406.