



تعیین غلظت عنصر سرب در بافت کبد ماهی زمین کن دم نواری *Platycephalus indicus* در مناطق میناب، قشم و بندر خمیر (خلیج فارس) طی فصول زمستان و تابستان

صادق صمصام پور^{۱*}، اسما گلمرادی زاده^۲، داود صمصام پور^۳، عبدالواحد رحمانی^۴، احسان کامرانی^۲، میرمسعود سجادی^۵

^۱ گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، واحد بین الملل قشم، جزیره قشم

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

^۳ دانشکده مدیریت، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب

^۴ گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس

^۵ گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا

نوع مقاله:	چکیده
کوتاه	این پژوهش به منظور بررسی غلظت عنصر سرب در بافت کبد ماهی زمین کن <i>Platycephalus indicus</i> طی دو فصل زمستان و تابستان در مناطق میناب، قشم و بندر خمیر صورت گرفته است. غلظت عنصر سرب در کبد ماهی زمین کن در فصول متفاوت بین مناطق مختلف اختلاف معنی دار نشان داد ($P < 0.05$). غلظت عنصر سرب در این ماهی بین جنس‌های نر و ماده در مناطق نمونه برداری اختلاف معنی داری نشان نداد ($P > 0.05$). با توجه به نتایج می‌توان گفت که آلودگی‌های ناشی از فعالیت‌های نفتی، صنعتی و شهری در مناطق مختلف خلیج فارس طی فصول متفاوت بر روند تجمع عنصر سرب در ماهی زمین کن دم نواری موثر می‌باشد.
تاریخچه مقاله:	
دریافت: ۹۴/۰۲/۰۵	
اصلاح: ۹۴/۰۳/۰۵	
پذیرش: ۹۴/۰۳/۱۸	
کلمات کلیدی:	
سرب	
ماهی زمین کن	
میناب	

مقدمه

امروزه پیشرفت فن آوری و توسعه‌ی صنایع و به تبع آن افزایش میزان آلودگی زیست محیطی ناشی از فعالیت‌های آبرزی پروری، صنعتی، کشاورزی، شهری و کشتیرانی، سبب شده است که پژوهش‌های بوم‌شناختی به این سمت سوق یابند. فلزات سنگین (از جمله سرب) و تجمع آن‌ها در بدن موجودات آبرزی نیز یکی از موارد بسیار مهم است که در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است (Romeo *et al.*, 1999; Al-Saleh and Shinwari, 2002; Agah *et al.*, 2009; Ganjavi *et al.*, 2010; Saei-Dehkordi *et al.*, 2010). خلیج فارس یک دریای نیمه بسته و کم عمق می‌باشد که وضعیت گردش و چرخش کند آب در آن از یک طرف و قرار گرفتن در معرض آلودگی‌های با منشأ انسانی از سوی دیگر، محیط زیست خلیج فارس را به یک مخزن طبیعی برای آلاینده‌ها تبدیل کرده است. با توجه به اهمیت بوم‌شناختی خلیج فارس به عنوان یک اکوسیستم دریایی تحت فشار، پژوهش در زمینه تجمع عناصر سنگین در بدن موجودات دریایی امری لازم و ضروری می‌باشد

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: sadegh_samsampour63@yahoo.com

(Al- Saleh and Shinwari, 2002; Dugo *et al.*, 2006; Agah *et al.*, 2009; Ganjavi *et al.*, 2010) تجمع فلزات سنگین در بدن موجودات زنده و انتقال آن به حلقه های بعدی زنجیره های غذایی و در نهایت تاثیر فلزات سنگین در حیات موجودات آبی بسیار حائز اهمیت است (Al- Saleh and Shinwari, 2002; Ganjavi *et al.*, 2010). سرب، فراوان ترین عنصر سمی و سنگین در محیط زیست می باشد. همچنین این عنصر از زمان مصرف آن در بنزین از پراکنش بسیار وسیعی در سطح جهان برخوردار شده است. به طوری که، از یخ های قطبی تا رسوبات اعماق دریاها اثرات آن را می توان یافت. در بیشتر سیستم های آب و خاک، سرب دارای حرکت کم است. زیرا حلالیت آن در آب کم می باشد و تمایل زیادی به جذب و تبادل در خاک دارد. در محیط زیست، سرب به شدت جذب رسوبات و ذرات خاک می شود. سرب نیز همانند سایر فلزات سنگین توسط گیاهان، موجودات آبی و میکروارگانیسم ها جذب و تجمع داده می شود که به انحلال آن در محیط بستگی دارد (Esmaeili Sari, 2002). امروزه، ماهی به عنوان یکی از مهم ترین پروتئین های حیوانی مفید مطرح شده تا نیازهای غذایی را فراهم ساخته و از سلامت بشر در سراسر جهان حمایت کند. ماهی دارای کلسترول کم، مقدار پروتئین زیاد و اسیدهای چرب ارزشمند غیراشباع می باشد. بنابراین قرار گرفتن انسان در معرض مواد شیمیایی مضر مانند فلزات سنگین از طریق مصرف غذاهای دریایی اجتناب ناپذیر است (Ganjavi *et al.*, 2010; Saei- Dehkordi *et al.*, 2010; Storelli *et al.*, 2010). از مهم ترین روش های کنترل، انتخاب گونه های مختلف ماهی به عنوان شاخص آلاینده های فلزی در محیط های آبی می باشد که در این مورد بافت های مختلف ماهیان به منظور بررسی اثرات فیزیولوژیک فلزات سنگین می توانند به کار روند. بنابراین سنجش غلظت فلزات سنگین در بافت های بدن ماهی می تواند مقدمه ای برای شناسایی سطح آلودگی اکوسیستم های آبی باشد (Dugo *et al.*, 2006). از جمله گونه های شاخص جهت سنجش میزان آلودگی می توان به ماهی زمین کن دم نواری *Platycephalus indicus* اشاره نمود (Ganjavi *et al.*, 2010; Saei- Dehkordi *et al.*, 2010). پژوهش حاضر به منظور بررسی تأثیر منابع آلاینده دریایی، فعالیت های آبی پروری، جنسیت و فصول متفاوت بر غلظت عنصر سرب در بافت کبد ماهی زمین کن دم نواری در سه منطقه میناب، قشم و بندر خمیر صورت گرفته است.

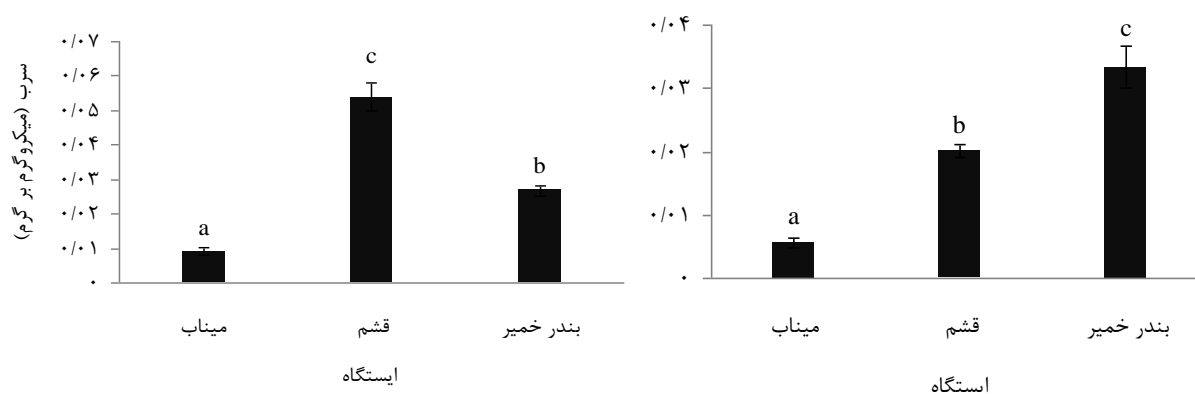
مواد و روش ها

در پژوهش کنونی نمونه برداری از مناطق میناب، قشم و بندر خمیر در فصل گرم اواخر تیر و اوایل مرداد ماه و در فصل سرد در اواخر دی ماه و اوایل بهمن ماه انجام شد. نمونه برداری در منطقه میناب با مختصات جغرافیایی ۲۷ درجه و ۵ دقیقه شمالی و ۵۶ درجه و ۴۸ دقیقه شرقی، در منطقه قشم با مختصات جغرافیایی ۲۶ درجه و ۵۹ دقیقه شمالی و ۵۶ درجه و ۱۴ دقیقه شرقی و در منطقه بندر خمیر با مختصات جغرافیایی ۲۶ درجه و ۵۶ دقیقه شمالی و ۵۵ درجه و ۳۵ دقیقه شرقی صورت گرفت (در هر فصل از هر ایستگاه ۳۰ نمونه جمع آوری شد). پس از انتقال به آزمایشگاه، نمونه ها تا زمان انجام عملیات آزمایشگاهی درون فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره و نگهداری شدند. پس از عملیات زیست سنجی، نمونه ها بر روی میز کار که با صفحه پلاستیکی پوشانده و با اسید نیتریک رقیق تمیز شده بود قرار گرفت (قبل از شروع کار تمام ابزار و وسایل مورد استفاده به وسیله اسید نیتریک ۵٪ شستشو داده و با آب مقطر دوبار تقطیر آبکشی گردید) (Moopam, 1999; Bu- Olayan and Subrahmanyam, 1997). پس از جداسازی بافت کبد، جهت خشک نمودن نمونه ها و جلوگیری از تبخیر احتمالی مقادیر فلز سرب از خشک کردن مستقیم در آون خودداری گردید. نمونه ها با استفاده از روش خشک کردن با انجماد مدل (Vacos) در دمای ۴۰- درجه سانتی گراد به مدت ۸ تا ۱۰ ساعت خشک شدند. به منظور هضم نمونه ها ابتدا مقدار ۰/۵ گرم از نمونه خشک و پودر شده با استفاده از ترازوی مدل TE313-Sartorius ساخت آلمان با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین گردید. نمونه های توزین شده را درون ویال های میکروویو مدل Thosi ساخت آمریکا ریخته و پس از افزودن ۷ میلی لیتر اسید نیتریک غلیظ ۶۵٪ (پس از هر بار پودر کردن نمونه ها، هاون چینی با اسید نیتریک ۵٪ شستشو داده و با آب مقطر دوبار تقطیر کاملاً آبکشی شد) و ۱ میلی لیتر آب اکسیژنه ۳۰٪، درب ویال ها بسته و در محفظه مخصوص قرار گرفت و به دستگاه میکروویو منتقل و طبق دستورالعمل دستگاه اقدام به هضم نمونه ها گردید (Moopam, 1999). به

منظور اندازه‌گیری غلظت سرب از روش اسپکتروفتومتری جذب اتمی^۱ (AAS) استفاده و برای هر نمونه آزمایش سه بار تکرار و نهایتاً میانگین سه بار سنجش به عنوان مقدار غلظت واقعی فلز مورد نظر ثبت گردید. سنجش صحت^۲ روش در پژوهش حاضر از طریق انتخاب چند نمونه تصادفی از سرب در بافت مورد مطالعه و با استفاده از دستگاه پلاسمای جفت شده القایی (ICP)^۳ علاوه بر دستگاه جذب اتمی انجام گرفت. در پایان آزمایش پس از جمع‌آوری اطلاعات ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگوروف اسمیرنوف^۴ مشخص گردید. سپس داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نمونه‌های مختلف از نظر غلظت عنصر سرب با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) مقایسه گردیدند. جداول و شکلها با استفاده از نرم افزار اکسل ترسیم شد. سپس جهت مقایسه اختلاف میانگین پارامترهای به دست آمده از آزمون توکی در سطح آماری ۹۵ درصد استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که از لحاظ غلظت عنصر سرب در بافت کبد ماهی زمین کن دم نواری در فصول زمستان و تابستان بین مناطق میناب، قشم و بندرخمیر اختلاف معنی دار آماری وجود دارد ($P < 0/05$). در مورد غلظت عنصر سرب در فصل زمستان بین منطقه میناب با مناطق قشم و بندرخمیر اختلاف معنی دار مشاهده شد ($P < 0/05$) و منطقه قشم نیز با بندرخمیر اختلاف معنی دار داشت ($P < 0/05$) (شکل ۱). نتایج حاصل از تحقیق کنونی حاکی از آن است که از لحاظ غلظت عنصر سرب در کبد ماهی زمین کن دم نواری، منطقه بندرخمیر میزان بالاتری را نسبت به مناطق قشم و میناب دارد ($P < 0/05$). از لحاظ غلظت عنصر سرب در کبد ماهی زمین کن دم نواری بین مناطق میناب، قشم و بندرخمیر در فصل تابستان اختلاف معنی دار آماری وجود دارد ($P < 0/05$) (شکل ۲). نتایج نشان داد که از نظر غلظت عنصر سرب در منطقه میناب با قشم و بندرخمیر اختلاف معنی دار وجود داشت ($P < 0/05$) و منطقه قشم نیز با بندرخمیر اختلاف معنی دار نشان داد ($P < 0/05$). در فصل تابستان منطقه قشم بیشترین غلظت عنصر سرب را در کبد ماهی زمین کن دم نواری نسبت به مناطق بندرخمیر و میناب داشت ($P < 0/05$). از لحاظ غلظت عنصر سرب در بافت کبد ماهی زمین کن دم نواری در سه منطقه میناب، قشم و بندرخمیر بین جنس‌های نر و ماده اختلاف معنی دار آماری وجود نداشت ($P > 0/05$) (شکل‌های ۳ و ۴). نتایج حاصل از پژوهش‌های حاضر نشان داد که به طور کلی غلظت عنصر سرب در بافت کبد جنس نر نسبت به جنس ماده میزان بالاتری داشت، هر چند این اختلاف معنی دار نبود ($P > 0/05$).



شکل ۲. مقایسه عنصر سرب در کبد ماهی زمین کن در مناطق میناب، قشم و بندرخمیر در فصل تابستان (میانگین ± انحراف از معیار)

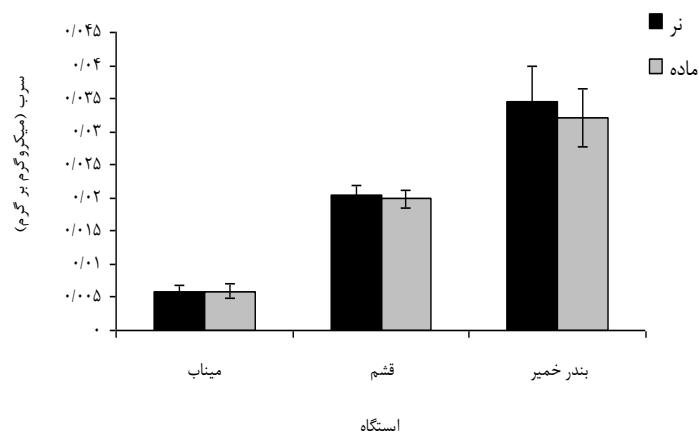
شکل ۱. مقایسه عنصر سرب در کبد ماهی زمین کن در مناطق میناب، قشم و بندرخمیر در زمستان (میانگین ± انحراف از معیار)

¹ Atomic Absorption Spectrophotometry

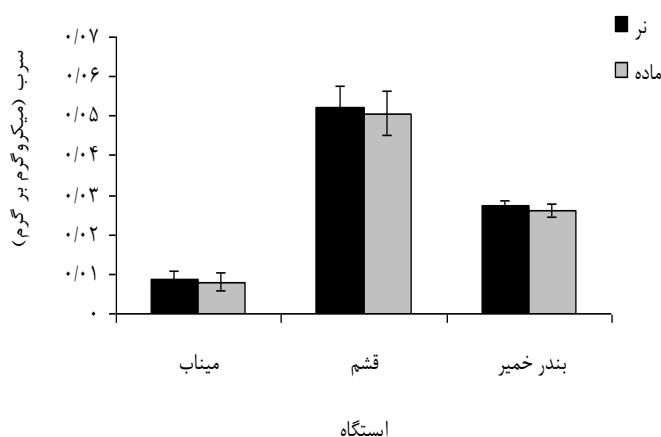
² Accuracy

³ Inductively Coupled Plasma

⁴ Kolmogorov-Smirnov



شکل ۳. مقایسه غلظت عنصر سرب در کبد ماهی زمین کن در زمستان در مناطق میناب، قشم و بندر خمیر در دو جنس نر و ماده (میانگین \pm انحراف از معیار)



شکل ۴. مقایسه غلظت عنصر سرب در بافت کبد ماهی زمین کن در تابستان در مناطق میناب، قشم و بندر خمیر در دو جنس نر و ماده (میانگین \pm انحراف از معیار)

بحث

نتایج حاصل از پژوهش کنونی نشان داد که در فصل زمستان از لحاظ غلظت عنصر سرب در بافت کبد ماهی زمین کن دم نواری بین مناطق میناب، بندرخمیر و قشم اختلاف معنی دار آماری وجود دارد. Romeo و همکاران (۱۹۹۹) با بررسی توزیع فلزات سنگین در گونه های مختلف ماهی در آب های ساحلی منطقه Mauritania در فرانسه نشان دادند که غلظت عناصر کادمیوم، مس، روی و جیوه در عضله گونه های ناحیه سطح زی نسبت به گونه های کف زی کمتر است. Chen (۲۰۰۲) نشان داد که اختلاف معنی داری در غلظت عناصر سرب، کادمیوم، جیوه، نقره، مس و آهن در نمونه های مناطق مختلف تالاب چی-کو وجود دارد. Fabris و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که غلظت فلزات سنگین مثل آرسنیک، سرب و جیوه در ماهی زمین کن *Platycephalus bassensis* و لایستر *Jasus edwardsis* و آبالونی *Haliotis rubra* به مکانی که ماهی در آن زیست می کند بستگی دارد و بین غلظت عناصر در این گونه ها در مناطق مختلف آب های ساحل ویکتوریا در استرالیا تفاوت معنی دار مشاهده شد ولی یک الگو و روند ثابت در بین مناطق در غلظت فلزات سنگین وجود نداشت. وجود تفاوت معنی دار در بین میزان غلظت عناصر سنگین در گونه های مختلف و در مناطق مختلف می تواند به دلیل کاربرد مدیریتی مختلف، شرایط محیطی، تخلیه فاضلاب ها، وجود کارخانه های صنعتی و فعالیت های آبی پروری در مناطق باشد (Forstner and Wittmann, 1983; Wong و همکاران (۲۰۰۰) با بررسی میزان فلزات کادمیوم، سرب، مس و روی بر روی گونه *Perna viridis* در منطقه هنگ کنگ نشان داد که بین غلظت تمامی عناصر ذکر شده به غیر از کادمیوم و مس در فصول تابستان و زمستان اختلاف معنی دار وجود دارد. بررسی غلظت عنصر کادمیوم در کبد گونه های *Valamugil cunnesius* و *Liza macrolepis Acanthopagrus berda* در دو منطقه متفاوت دارای آلودگی و فاقد آلودگی در تونس و یوگسلاوی نشان داد که غلظت این عنصر در مناطق مختلف تفاوت معنی دار دارد (Chen, 2002). Turkmen و همکاران (۲۰۰۵) بیان کردند که غلظت فلزات سنگین در عضله ماهی با توجه به منطقه ای که ماهی صید شده است و با توجه به گونه ماهی می تواند بسیار متنوع و متغیر باشد، همچنین نشان دادند که غلظت فلزات سنگین گونه های مختلف

ماهیان در مناطق متفاوت نمونه برداری با یکدیگر اختلاف معنی دار دارد. Fabris و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که در اکثر موارد در ماهی زمین کن *P. bassensis* و لابستر *J. edwardsis* و آبالون *H. rubra* بین غلظت عناصر در بدن موجود و در جنس های نر و ماده ماهی اختلاف معنی دار وجود ندارد. تحقیقات حاکی از آن است که، جنسیت موجود آبی در غلظت عناصر در بافت های کبد، عضله و آبشش بی تأثیر می باشد (Dimari et al., 2007; Burger et al., 2005; I-Hsun et al., 2008). Gaspic و همکاران (۲۰۰۲) با بررسی غلظت سرب و کادمیوم در بافت های کبد و عضله دو گونه ماهی هیگ اروپایی *Merluccius merluccius* و کفال قرمز *Mullus barbatus* در دریای آدریاتیک نشان دادند که بین غلظت عنصر سرب و کادمیوم در کبد و عضله ماهیان مذکور در جنس نر و ماده اختلاف معنی دار آماری وجود ندارد. Turkmen و همکاران (۲۰۰۵) بیان کردند که عامل جنسیت در میزان تجمع فلزات سنگین در موجودات دریایی بی تأثیر می باشد. نتایج پژوهش کنونی نشان داد که غلظت عنصر سرب در ماهی زمین کن دم نواری در فصل تابستان در منطقه قشم بالاترین مقدار را نشان می دهد در حالی که در فصل زمستان منطقه بندر خمیر بیشترین غلظت سرب را نسبت به منطقه قشم دارد. عنصر سرب یکی از ترکیبات مهم نفت می باشد، بنابراین میزان بالای آن در محیط به دلیل فعالیت های نفتی است. علاوه بر این میانگین دمای منطقه قشم در فصل تابستان بیشتر از مناطق بندر خمیر و میناب می باشد، در فصل تابستان درجه حرارت درگرم ترین روزها ممکن است به ۵۰ درجه سانتی گراد نیز برسد، در نتیجه میزان تبخیر در این منطقه افزایش می یابد. از آنجایی که غلظت عنصر سرب با میزان شوری همبستگی مثبت دارد، احتمالاً یکی دیگر از عوامل افزایش سرب در فصل تابستان در ماهی زمین کن دم نواری میزان شوری در منطقه قشم است. با توجه به اینکه در پژوهش های پیشین به تأثیر به سزای بارندگی در افزایش میزان فلزات در فصل زمستان اشاره شده است (Saei-Dehkordi et al., 2010) و با توجه به موارد ذکر شده شاید بتوان دلیل افزایش میزان عنصر سرب در ماهی زمین کن دم نواری در منطقه بندر خمیر را به آبشویی از مناطق صنعتی نزدیک به آن در نتیجه بارندگی در فصل زمستان نسبت داد. با توجه به نتایج پژوهش کنونی می توان گفت که آلودگی های ناشی از فعالیت های نفتی، صنعتی و شهری در مناطق مختلف ناحیه خلیج فارس (میناب، بندرخمیر و قشم) طی فصول متفاوت بر روند تجمع عنصر سرب در بافت کبد ماهی زمین کن دم نواری مؤثر می باشد.

منابع

- Agah, H., Leermakers, M., Marc Elskens, S., Fatemi, M. 2009. Accumulation of trace metals in the liver and liver tissues of five species from the Persian Gulf. *Environmental Monitoring Assess.* 157: 499-514.
- AL-Saleh, I., Shinwari, N. 2002. Preliminary report on the levels of elements in four fish species from the Persian Gulf of Saudi Arabia. *Chemosphere.* 48: 749-755.
- Bu- Olayan, A.H., Subrahmanyam, M.N. 1997. Accumulation of copper, nickel, lead and zinc by snail, *Lunella coronatus* and Pearl oyster, *Pinctada radiata* from the Kuwait coast before and after the Gulf War oil spill. *Science Total Environment.* 97: 161- 165.
- Burger, J., Gochfeld, M., Jeitner, C., Burke, S., Stamm, T. 2007. Metal levels in flathead Sole (*Hippoglossoides elassodon*) and great sculpin (*Myoxocephalus polyacan elassodon*) from Adak Island, Alaska: Potential risk to predators and fishermen. *Environmental Research.* 103: 62-69.
- Chen, M.H. 2002. Baseline metal concentration in sediments and fish and the determination of bioindicators in the subtropical. *Baseline. Marine Pollution Bulletin.* 44: 703-714.
- Dimari, G.A., Abdulrahman, F.I., Akan, J.C., Garba, S.T. 2008. Metal concentration in tissues *Tilapia gallier*, *Craias lazera* and *Osteoglossidae* caught from Alau Dam, Maiduguri, Borono State, Nigeria. *American Journal of Environmental Sciences.* 4: 373-379.
- Dugo, G., Lopera, L., Bruzzes, A., Pellicano, T.M., Lotorco, V. 2006. Concentration of Pb, Cu, Pb, Se and Zn in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) tissue from Tyrrhenian sea and Sicilian sea by derivative stripping Potentiometer. *Food Control.* 17: 146-152.
- Esmaili Sari, A. 2002. Environmental pollutant and standards in environment. Naghshe Mehr Publication. 769 p. (in Persian)

Fabris, G., Turoczy, N.J., Stagnitti, F. 2006. Trace metals concentration in edible tissue of snapper, flathead, lobster and abalone from coastal waters of Victoria, Australia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 63: 286-292.

Forstner, U., Wittmann, G.T.W. 1983. *Metal Pollution in the Aquatic Environment*. 2nd edition. Berlin, Springer, 486 p.

Ganjavi, M., Ezzatpanah, H., Givianrad, M.H., Shams, A. 2010. Effect of canned tuna fish processing steps on lead and lead contents of Iranian tuna fish. *Food Chemistry*. 118: 525-528.

Gaspic, Z.K., Zvonaric, T., Vrgoc, N., Odzak, N., Baric, A. 2002. Lead and cadmium in selected tissues of two commercially important fish species from the Adriatic Sea. *Water Research*. 36: 5023-5028.

I-Hsun, N., Chen, S.M., Wang, W.X. 2005. Influences of salinity on the biokinetics of Pb, Se and Zn in the intertidal mudskipper *Periophthalmus cantonensis*. *Chemosphere*. 61: 1607-1617.

Moopam, M. 1999. *Manual of Oceanographic Observation and Pollutant Analysis Methods*. 3rd edition. Kuwait. 321 p.

Phillips, D.J.H. 1992. *Rainbow Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants*. Oxford; Elsevier Science Publishers. 371 p.

Romeo, M., Siau, Y., Sidoumou, Z., Gnassia-Barelli, M. 1999. Heavy metal distribution in different fish species from the Mauritania coast. *The Science of Total Environment*. 23(2): 169-172.

Saei-Dehkordi, S.S., Fallah, A.Z., Nematollahi, A. 2010. Arsenic and mercury in commercially valuable fish species from the Persian Gulf: influences of season and habitat. *Food and Chemical Toxicology*. 48: 2945-2950.

Storelli, M.M., Barone, G., Cuttone, G., Giungato, D., Garofalo, R. 2010. Occurrence of toxic metals (Hg, Pb and Pb) in fresh and canned tuna: Public health implications. *Food and Chemical Toxicology*. 48: 3167-3170.

Turkmen, A., Turkmen, M., Tqe, Y., Akyu, I. 2005. Heavy metals in three Commercially Valuable fish species from Iskenderun Bay, North East Mediterranean sea, Turkey. *Food Chemistry*. 91: 167-172.

Wong, C.K.C., Cheung, R.Y.H., Wong, M.H. 2000. Heavy metals concentration in green-lipped mussels collected from Tolo harbor and markets in Hong Kong and Shenzhen. *Environmental Pollution*. 109: 165-171.