第17卷第4期 上海水产大学学报 Vol. 17, No. 4
2008年7月 JOURNAL OF SHANGHAI FISHERIES UNIVERSITY July, 2008

文章编号：1004-7271(2008)04-0429-06

牛磺酸对鲤非特异性免疫及抗氧化能力的影响

邱小琮[1,2]，赵红雪[1,2]，王远吉[3]，白文贤[4]

（1. 宁夏大学生命科学学院，宁夏 银川 750021；
2. 宁夏饲料工程技术研究中心，宁夏 银川 750021；
3. 宁夏水产研究所，宁夏 银川 750001；
4. 宁夏贺兰县水产站，宁夏 贺兰 750010）

摘　要：采用单因子浓度梯度法，将牛磺酸以0.05%、0.10%、0.15%、0.20%的剂量添加到基础饲料中，以基础饲料为对照，饲喂鲤（体重40.73±3.92 g）30 d后，测定血清和肝胰脏的溶菌酶活力、超氧化物歧化酶活力、过氧化氢酶活力和丙二醛的含量。结果表明：牛磺酸可以提高鲤血清和肝胰脏的溶菌酶活力、超氧化物歧化酶活力、过氧化氢酶活力，降低鲤血清和肝胰脏中的丙二醛含量，其中0.10%添加组效果最好，极显著地提高鲤血清和肝胰脏的溶菌酶活力（$P<0.01$），比对照组分别提高9.74%、8.04%；极显著地提高鲤血清和肝胰脏的超氧化物歧化酶活力，比对照组分别提高18.00%、14.40%；极显著地提高鲤血清的过氧化氢酶活力，显著地提高鲤肝胰脏的过氧化氢酶活力（$P<0.05$），比对照组分别提高16.87%、9.98%；极显著地降低鲤血清和肝胰脏的丙二醛含量，比对照组分别降低25.28%、15.21%。饲料中适宜剂量牛磺酸的添加，能显著增强鲤的抗氧化能力和非特异性免疫功能，减轻鱼体的脂质过氧化作用。

关键词：牛磺酸；鲤；溶菌酶；超氧化物歧化酶；过氧化氢酶；丙二醛
中图分类号：S 963　　**文献标识码**：A

Effect of taurine on the non-specific immunity and antioxidative competence of carp

QIU Xiao-cong[1,2], ZHAO Hong-xue[1,2], WANG Yuan-ji[3], BAI Wen-xian[4]

(1. *Life Science College*, *Ningxia University*, *Yinchuan* 750021, *China*;
2. *Ningxia Feed Engineering Technology Research Center*, *Yinchuan* 750021, *China*;
3. *Ningxia Fishery Institute*, *Yinchuan* 750001, *China*;
4. *Helan Aquatic Station*, *Helan* 750010, *China*)

Abstract: Carp (body weight 40.73 ± 3.92 g) were fed on formulated diet added with taurine at different levels of 0.05%, 0.10%, 0.15%, 0.20% respectively. The lysozyme activities, superoxide dismutase (SOD) activities, catalase (CAT) activities and malondialdehyde (MDA) content of carp's serum and hepatopancreas were determined after 30 days. The result showed that taurine very significantly increased the lysozyme, SOD, CAT activities of carp's serum and hepatopancreas ($P<0.01$), very significantly decreased the MDA content of carp's serum and hepatopancreas ($P<0.01$). The lysozyme activities of carp's serum

收稿日期：2007-10-08
基金项目：宁夏高等学校科研项目（NJ200316）
作者简介：邱小琮（1971－），男，浙江湖州人，副教授，硕士，主要从事水产动物营养与饲料方面的研究。E-mail: qxc7175@126.com

and hepatopancreas of the treated groups - 0.10% were higher than those of the control 9.74%, 8.04% respectively. The SOD activities of carp's serum and hepatopancreas of the treated groups - 0.10% were higher than those of the control 18.00%, 14.40% respectively. The CAT activities of carp's serum and hepatopancreas of the treated groups - 0.10% were higher than those of the control 16.87%, 9.98% respectively. The MDA content of carp's serum and hepatopancreas of the treated groups -0.10% were lower than those of the control 25.28%, 15.21% respectively. The proper taurine can increase the antioxidative competence and non-specific immunity of carp, and decrease lipid peroxidation of carp.

Key words: taurine; carp; lysozyme activities; superoxide dismutase (SOD) activities; catalase (CAT) activities; malondialdehyde (MDA) content

牛磺酸(Taurine)是一种含硫氨基酸,主要以游离状态存在于动物体内各组织器官的组织间液和细胞内液中,是一种条件必需氨基酸[1]。牛磺酸是调节机体正常生理机能的重要物质,具有广泛的生物学活性,是调节细胞内渗透压、稳定细胞膜、维持细胞 Ca^{2+} 稳态和清除自由基等正常生理功能的重要物质,可以保护生物系统使其免收氧的攻击,增强机体的抗氧化能力[2-4],可以促进或改善动物机体的免疫功能[5-7]。目前,对牛磺酸增强机体抗氧化能力和免疫功能的研究主要集中在鸡、鼠等动物方面[2-4,8-10],其对鱼类免疫功能的影响尚未见报道。本试验选用普遍养殖的鲤作为试验对象,通过测定鲤血清和肝胰脏的溶菌酶活力、超氧化物歧化酶(SOD)活力、过氧化氢酶(CAT)活力和丙二醛(MDA)的含量,研究牛磺酸对鲤非特异性免疫及抗氧化能力的影响。

1 材料与方法

1.1 试验设计

基础饲料(表1)参照鲤有关营养标准制备[11]。采用单因子浓度梯度法,在基础饲料中分别添加0.05%、0.10%、0.15%、0.20%剂量的牛磺酸($Ⅰ_{0.05}$表示添加0.05%组,$Ⅰ_{0.1}$表示添加0.10%组,$Ⅰ_{0.15}$表示添加0.15%组,$Ⅰ_{0.2}$表示添加0.20%组,下同),以基础饲料为对照,试验组和对照组各设三个重复。

牛磺酸由中国医药(集团)上海化学试剂公司出品(批号:F20021024)。

表1 基础饲料配方及主要营养成分

Tab.1 Main composition of the basic diet

原料	添加比例(%)	营养成分	含量
进口鱼粉	20.0	总能(MJ/kg)	17.06
豆粕	28.0	粗蛋白(%)	37.13
菜粕	15.0	赖氨酸(%)	2.23
棉粕	10.0	蛋氨酸+胱氨酸(%)	1.26
小麦粉	25.5		
混合无机盐	1.0		
混合维生素	0.5		

在基础饲料中添加不同剂量的牛磺酸,然后用逐级放大混合的方法将饲料混合,加工成直径2.0 mm的颗粒,晾干备用。

1.2 饲养管理

试验鱼由新明渔场购得,将其饲养在100 cm×35 cm×50 cm的玻璃缸中,每缸15尾,初始体重(40.73±3.92) g,充气、加温(水温保持在24~25 ℃),每天投饵两次,日投饵量为鱼体重的3%~5%,并根据水温、摄食情况调整,每天排污并换水1/2~1/3,各组水质基本一致。饲养时间30 d。

1.3 样品处理

饲养试验结束后,每缸随机抽取 5 尾鱼进行尾静脉采血(每个试验处理有 15 个重复),血样静置 4 ℃冰箱过夜,3 000 r/min 离心 10 min 分离获得血清,血清置于 -18 ℃冰箱保存待测。

每缸随机取出 5 尾鱼(每个试验处理有 15 个重复),冲洗后擦干、称重、快速解剖,取出肝胰脏,用 0.86% 的冷生理盐水清洗,再用滤纸吸干,迅速准确进行称重,然后按肝胰脏重量和生理盐水质量比1∶9 加入 0.86% 的冷生理盐水,用玻璃匀浆器研磨制备组织匀浆,4 ℃冷冻离心(3 000 r/min)10 min,取上清液,立即用于测定,或置于 -18 ℃冰箱内保存待测,所有样品在 12 h 内测完。

1.4 测定方法

采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒进行测定。溶菌酶活力测定采用比浊法(单位:血清为 U/mL,肝胰脏为 U/mgPr);SOD 活力测定采用黄嘌呤氧化酶法,SOD 的活力定义为每 mL 血清或每 mg 肝胰脏组织蛋白中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位(U);CAT 活力测定采用钼酸铵显色测定法,CAT 的活力定义为每 mL 血清或每 mg 肝胰脏组织蛋白每秒钟分解 1 μmol 的 H_2O_2 的量为一个活力单位(U)。MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸比色法(单位:血清为 nmol/mL,肝胰脏为 nmol/mgPr)。蛋白质含量测定:采用考马斯亮兰 G-250 法[12]。

1.5 数据处理方法

数据处理采用单因素方差分析及多重检验(Duncan 氏检验)。

2 结果与讨论

2.1 牛磺酸对鲤血清、肝胰脏溶菌酶活力的影响

饲料中添加牛磺酸后,鲤血清中的溶菌酶活力明显提高,$I_{0.1}$ 组极显著的高于对照组,$I_{0.05}$、$I_{0.15}$、$I_{0.2}$ 显著地高于对照组,其它各组之间无显著差异,各组的溶菌酶活力分别比对照组提高了 6.40%、9.74%、7.32%、5.71%。肝胰脏中的溶菌酶活力也有明显提高($P<0.01$),$I_{0.1}$ 组显著地高于 $I_{0.05}$ 组,极显著地高于对照组,$I_{0.15}$ 组极显著地高于对照组,$I_{0.05}$、$I_{0.2}$ 组显著地高于对照组,其它各组之间无显著差异,各组的溶菌酶活力分别比对照组提高了 4.19%、8.04%、5.90%、4.88%。

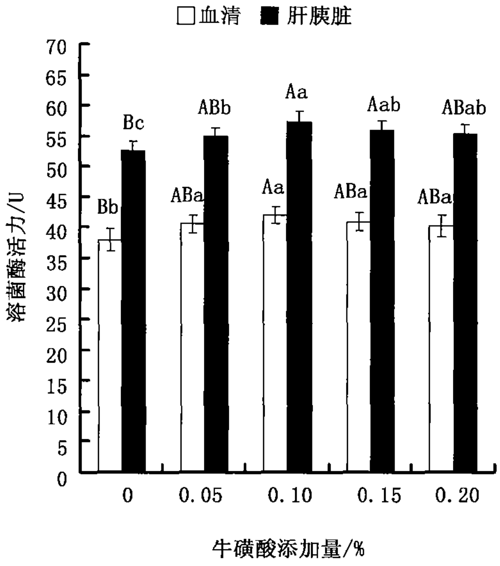

图 1 不同牛磺酸添加量鲤血清、肝胰脏的溶菌酶活力

Fig. 1 The lysozyme activities of serum and hepatopancreas of carp fed dietary taurine

注:图中大写字母不同表示差异极显著($P<0.01$),小写字母不同表示差异显著($P<0.05$),下同。

鱼类是低等的脊椎动物,它的特异性免疫机制还很不完善,而且引起鱼病的主要是条件性致病菌,而不是特异性致病菌,因此,非特异免疫功能在鱼类的防御中具有非常重要的作用,对鱼类的生长抗病有着很大的影响[13]。溶菌酶是鱼类非特异性免疫系统的重要组成部分[14],是吞噬细胞杀菌的物质基础,能水解革兰氏阳性菌细胞壁中粘肽的乙酰氨基多糖并使之裂解被释放出来,形成一个水解酶体系,破坏和消除侵入体内的细菌等病原体,从而担负起机体防御的功能[15-16]。Mφyner 等[17]发现,鱼病暴发后的幸存鱼类的血清中溶菌酶的活力显著性高于对照组的鱼类(未感染鱼病)溶菌酶活力。研究表明,免疫增强剂可以提高鱼类的非特异免疫能力,特别是血液中的一些指标,如溶菌酶活力[18-19]、吞噬细胞吞噬能力、潜在杀伤能力、血清补体活力等[20-22]。吞噬作用在鱼类的免疫防御中起着极为重要的作用,异物被吞入细胞后就与溶酶体融合,最

终被水解酶消化分解,而溶菌酶就是鱼体较为重要的水解酶之一。本试验,饲料中添加牛磺酸后,鲤血清和肝胰脏的溶菌酶活力极显著地提高,从而增强了鱼体的非特异性免疫功能。

2.2 牛磺酸对鲤血清、肝胰脏SOD活力的影响

饲料中添加牛磺酸后,鲤血清中的SOD活力明显提高,各组均极显著的高于对照组,$I_{0.1}$组显著的高于$I_{0.2}$组,其它各组之间无显著差异,各组SOD活力分别比对照组提高12.56%、18.00%、15.13%、9.81%。肝胰脏中的SOD活力也有明显的提高,$I_{0.1}$组极显著的高于对照组,$I_{0.05}$、$I_{0.15}$、$I_{0.2}$组显著地高于对照组,其它各组之间无显著差异,各组SOD活力分别比对照组提高10.81%、14.40%、9.56%、8.98%。

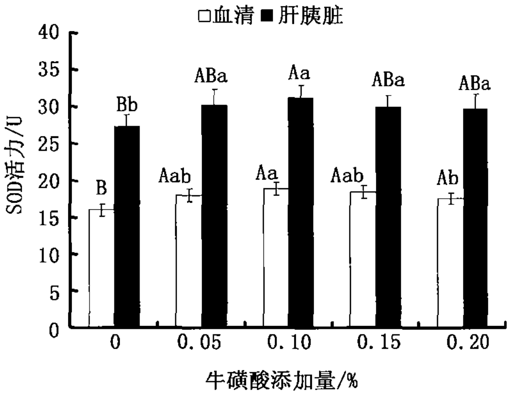

图2 不同牛磺酸添加量鲤血清、肝胰脏的SOD活力

Fig.2 The SOD activities of serum and hepatopancreas of carp fed dietary taurine

氧自由基(O_2^-、脂类过氧化物等)正常条件下在生物体内的浓度极低且处于平衡状态,但当处于逆境条件时(如病原物侵染等),其产生与清除便失去平衡,自由基在体内积累,就会对机体造成氧化胁迫(oxidative stress),从而引起脂质过氧化、碱基核糖基氧化、DNA断裂、酶蛋白失活等一系列生理生化变化、代谢紊乱,致使机体受到伤害[23-24]。在自由基清除的过程中,某些酶起到关键性的作用,其中最为重要的是超氧化物歧化酶(SOD),SOD是催化氧自由基发生歧化反应($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$)的一类金属酶,其基本功能是清除生物体内过高浓度的氧自由基,消除自由基对机体的危害[25]。在正常的生理条件下,SOD的生物生成量可以及时满足清除O_2^-的需要,但在逆境条件下,氧自由基的生产与清除则会失去平衡[26]。当生物体受到逆境轻度胁迫时,出现催剂量效应,SOD活力往往升高;而当受到重度逆境胁迫时,SOD活力通常降低,使生物体内积累过度的氧自由基,从而导致生物体受到伤害[27]。因此,SOD对于维持生物体内氧自由基代谢平衡,保护生物免遭伤害具有重要的生理意义。

SOD广泛存在于生物体内,在生命体的自我保护系统中起着极为重要的作用,除了抗氧化防御功能外,在免疫系统中也有重要的功能[28],是鱼类非特异性免疫系统的重要组成部分[29-31]。吞噬作用在鱼类的免疫防御中起着极为重要的作用,异物被吞入细胞后就与溶酶体融合,最终被水解酶消化分解,同时,吞噬作用会产生大量的O_2^-等活性氧,具有一定的杀菌作用,但也对动物体本身有毒害作用,需要SOD及时清除。本试验,饲料中添加牛磺酸后,鲤血清和肝胰脏的SOD活力极显著地提高,增强了鱼体的抗氧化能力和非特异性免疫功能,从而提高了鱼类的整体抗病力。

2.3 牛磺酸对鲤血清、肝胰脏CAT活力的影响

饲料中添加牛磺酸后,鲤血清中的CAT活力明显提高,$I_{0.1}$、$I_{0.5}$组极显著的高于对照组,$I_{0.05}$、$I_{0.2}$组显著地高于对照组,其它各组之间无显著差异,各组CAT活力分别比对照组提高8.27%、16.87%、12.41%、9.44%。肝胰脏中的CAT活力也有明显著的提高,各组均显著地高于对照组,其它各组之间无显著差异,各组CAT活力分别比对照组提高7.67%、9.98%、9.17%、7.11%。

过氧化氢酶(CAT)是存在生物体内的非常重要的抗氧化防御性功能酶,可清除超氧化物歧化酶歧化超氧阴离子自由基(O_2^-)产生的过氧化氢(H_2O_2),因此在生物体的抗氧化防御系统中占有重要地位[32-33]。本试验,饲料中添加牛磺酸后,鲤血清和肝胰脏的CAT活力极显著地提高,增强了鱼体的抗氧化能力。

2.4 牛磺酸对鲤血清、肝胰脏MDA含量的影响

饲料中添加牛磺酸后,鲤血清中的MDA含量明显地降低,各组均极显著地低于对照组($P<0.01$),分别比对照组降低13.49%、25.28%、19.31%、9.76%。肝胰脏中的MDA含量也明显地降低,各组均

极显著地低于对照组,分别比对照组降低 10.16%、15.21%、12.42%、8.81%。

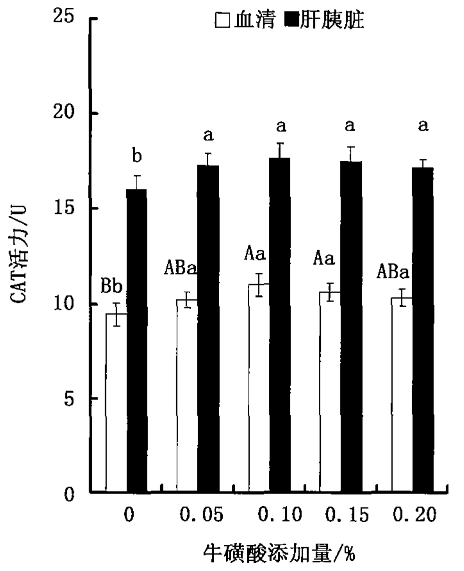

图 3　不同牛磺酸添加量鲤血清、肝胰脏的 CAT 活力

Fig. 3　The CAT activities of serum and hepatopancreas of carp fed dietary taurine

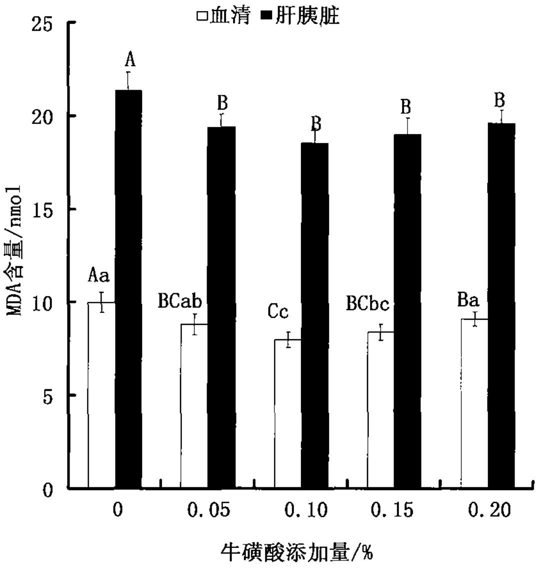

图 4　不同牛磺酸添加量鲤血清、肝胰脏的 MDA 含量

Fig. 4　The MDA content of serum and hepatopancreas of carp fed dietary taurine

脂质过氧化是指活性氧、自由基攻击生物膜中多聚不饱和脂肪酸(PUFA)而引起的一系列氧化过程,此过程可产生一系列脂质过氧化物(LPO),从而对生物体造成一种氧化胁迫状态,当这种氧化胁迫超出了生物体的抗氧化防御系统的保护能力的时候,就会对生物体造成毒害[34-35]。而丙二醛(MDA)是自由基引发的脂质过氧化作用的最终分解产物,MDA 含量的多少可以间接反映活性氧自由基含量的多少以及组织细胞脂质过氧化的强度或速率[36]。本试验结果表明,饲料中添加牛磺酸后,鲤血清 MDA 含量极显著地降低,说明牛磺酸可以增强鲤的抗氧化能力,减轻鱼体的脂质过氧化作用。

本试验,鲤的溶菌酶活力、SOD 活力和 CAT 活力随着饲料中牛磺酸添加量地增加而提高, 0.10% 时效果最好,均显著或极显著地高于对照组,然后随着添加量的增加酶的活力下降,说明牛磺酸可能具有条件毒性,有一定的适用范围,过量摄入可能会有不利后果,这与 Voaden 等[37]的研究结果是一致的,就本试验的结果而言,鲤饲料中的适宜添加量为 0.10% ,但这是否就是鲤饲料中的最佳添加剂量,还有待进一步的研究证实。

3　小结

本试验结果表明,牛磺酸可以提高鲤的溶菌酶活力和 SOD 活力,作为免疫增强剂可以增强鱼类对多种传染性病原的非特异性免疫反应,提高鱼类的整体抗病力。至于牛磺酸对鱼类其它非特异性免疫功能指标的影响,还需要进一步的研究。

牛磺酸能保护生物系统免受氧的攻击,可显著地抑制 MDA 的生成,提高机体的 SOD 活力和 CAT 活力,因此可以认为牛磺酸进入鱼体后,通过提高机体的 SOD 活力和 CAT 活力,抑制 MDA 的生成,增强了鲤的抗氧化能力,减轻了鱼体的脂质过氧化作用,从而增强鱼体体质,提高机体的抗逆能力。

参考文献:

[1]　魏　源. 牛磺酸的代谢特点和运动营养[J]. 韩山师范学院学报,2001,6(2):112-118.

[2]　陈英剑,涂晓文,尹秋霞,等. 牛磺酸对糖尿病大鼠肾脏氧化和抗氧化系统的影响[J]. 放射免疫学杂志,2004,17(4):245-247.

[3] 沈芳兰,张秀珍,李珏声,等.牛磺酸对小鼠抗氧化和DNA修复能力的作用[J].营养学报,1996,18(3):258-262.

[4] 丁 力,张远慧,万华印.牛磺酸抗脂质过氧化作用与调节 Ca^{2+} 作用[J].中国药理学通报,1995,11(6):503.

[5] Huxtable R J. Physiological actions of taurine[J]. Physiol Rev,1992,72:101.

[6] Campbell G L. Effect of dietary taurine supplemention on sudden death sydrome in broiler chickens[J]. Cana J Anin Sci,1989,65:509-512.

[7] Linda S T,Ley S J. Influence of diatary taurine on performance and fat retention in broilers and turkey poults fed varying levels of fat[J]. Poul Sci,1992,71:880-885.

[8] 李学俭,潘树德,袁 缨,等.牛磺酸对鸡ND-HI抗体产生影响的研究[J].动物科学与动物医学,2002,19(5):29-32.

[9] 潘 洁,谢春芳,陈 谊,等.牛磺酸对雏鸡卵黄囊吸收和免疫应答的影响[J].上海畜牧兽医通讯,1997,5:12-14.

[10] 何天培,周毓平.牛磺酸对饲高脂饲料大鼠脂肪代谢及免疫作用的影响[J].营养学报,1997,19(1):7-12.

[11] 李爱杰.水产动物营养与饲料学[M].北京:中国农业出版社,1996:171.

[12] 李建武,萧能赓,余瑞元,等.生物化学实验原理和方法[M].北京:北京大学出版社,1997:174-176.

[13] 钱云霞,王国良,邵健忠.鱼类的非特异性免疫调节[J].宁波大学学报(理工版),2000,13(1):95-99.

[14] Dunier M,Siwicki A K,D. Effects of organophosphorus insecticides:Effects of trichlorfon and dichlorvos on the immune response of carp (*Cyprinus carpio*). Ⅲ *In vitro* effects on Lymphocyte proliferation and phagocytosis and *in vivo* effects on humoral response[J]. Ecotoxicol Environ Saf,1991,22:79-87.

[15] 杨先乐.鱼类免疫学研究的进展[J].水产学报,1989,13(3):271-280.

[16] 刘树青,江晓路,牟海津,等.免疫多糖对中国对虾血清溶菌酶、磷酸酶和过氧化物酶的作用[J].海洋与湖沼,1999,33(3):278-283.

[17] Møyner,Røed,K H,Sevatdal S,*et al.* Changes in non-specific immune parameters in Atlantia salmom,*Salmon salar* L,induced by *Aeromonas salmobicida* infection[J]. Fish and Shellfish Immunol,1993,3:253-265.

[18] Stwinar M P,Rolf E E,Børre R. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon(*Salmon salar* L.) macrophages treated with yeastβ-glucan and bacterial lipopolysaccharide[J]. Fish and Shellfish Immunology,2001,11:23-27.

[19] 王宏田,张培军.重组酵母菌对牙鲆非特异性免疫能力的影响[J].海洋与湖沼,2000,31(6):631-634.

[20] Anderson D P,Siwicki A K. Duration of protection against *Aeromonas salmonicida* in brook trout immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion[J]. Prog Fish Cult,1994,56:258-261.

[21] Siwicki A K,Anderson D P,Rumsey G L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis[J]. Vet Immunol Immunopathpol,1994,41:125-139.

[22] Matsuyma H,Mangindaam R E P,Yano T. Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against Streptococcus sp. infection on yellowtail(*Seriola quinqueradiata*)[J]. Aquaculture,1996,101:197-203.

[23] Lemaire P,Mattews A,Forlin L,*et al.* Stimulation of oxyradical production of hepatic microsomes of flounder(*Platichthys flesus*) and Perch (*Perca fluviatilis*) by model and pollutant xenobiotics[J]. Arch Environ Contam Toxicol,1994,26:191-200.

[24] 曹淑华,查向东.超氧化物歧化酶研究综述[J].安徽农业科学,2003,31(4):599-601.

[25] 方中允.自由基与酶[M].北京:科学出版社,1994:156-160.

[26] Peter L D,Livingston D R. Antioxdant enzyme activities in embryologic and early larval stages of turbot[J]. J Fish Biol,1996,49:996-997.

[27] 唐学玺,张培玉.蒽对黑鲷超氧化物歧化酶活性的影响[J].水产学报,2000,24(3):217-220.

[28] Marikovsky M,Ziv V,Nevo N. Cu/Zn superoxide dismutase plays important role in immune response[J]. Immunol, 2003,170(6):2993-3001.

[29] 姚翠鸾,王维娜,王安利.水生动物体内超氧化物歧化酶的研究进展[J].海洋科学,2003,27(10):18-21.

[30] 李桂峰,康裕财,孙际佳,等.酵母多糖对赤眼鳟非特异性免疫机能的影响[J].中山大学学报(自然科学版),2003,42(4):55-58.

[31] 简纪常,叶剑敏,吴灶和.溶藻弧菌脂多糖对石斑鱼免疫功能的影响[J].水生生物学报,2004,28(1):103-105.

[32] 王镜岩,朱圣庚,徐长法(主编).生物化学(第三版,下册)[M].北京:高等教育出版社,2002:143-144.

[33] 余瑞兰,聂湘平,魏泰莉,等.分子氨和亚硝酸盐对鱼类的危害及其对策[J].中国水产科学,1999, 6(3): 73-77.

[34] 李湘鸣,罗方妮,方企圣.臭氧对大鼠和小鼠血液中某些生化指标的影响[J].中国公共卫生学报,1993,12(6):340-342.

[35] Ossi R,Tapani L,Palvi P,*et al.* Glutathione-dependent defence system and monooxygenase enzyme activities in Arctic charr *Salvelinus alpinus*(L.) exposed to ozone[J]. Aquaculture,2000,185:219-233.

[36] Slater T F,Mickle P L. Oxygen free radicals and tissue damage[J]. Excerpta Medica Amsterdam,1979,143.

[37] Voaden M J,Hussain A A,Lalji K. Photochemical damage in the albino rat retina:oral taurine has no effect on DNA and protein loss from severly damaged photoreceptor cells[J]. J Neurochem,1984,42:582.