

## Определение тяжелых металлов в мидии *Mytilus galloprovincialis* Lamarck методом ИСП-АЭС

\*З.А. Темердашев, И.Ю. Елецкий, А.А. Каунова, И.Г. Корпакова

Кубанский государственный университет,  
350040, Российская Федерация, Краснодар, ул. Ставропольская, 149

\*Адрес для переписки: Темердашев Зауаль Ахлоович, E-mail: temza@kubsu.ru

Поступила в редакцию 11 апреля 2017 г., после исправления – 3 июня 2017 г.

В работе рассмотрены аналитические аспекты, требующие решения при изучении распределения тяжелых металлов, которые могут быть использованы как биоиндикаторы загрязнения водной экосистемы, в моллюсках. В качестве объекта анализа выбраны двустворчатые моллюски мидия *Mytilus galloprovincialis* Lamarck различных возрастных групп, отобранные с коллекторов, расположенных в бухте Инал (Черное море), установленных на расстоянии 10 и 500 м от береговой зоны. Рассмотрены достоинства и недостатки методов сухого озоления, традиционной кислотной минерализации и СВЧ-минерализации проб, которые должны обеспечить полное удаление всех органических компонентов образца, постоянство содержания аналитов, а также перевод их в форму, подходящую для последующего спектрального анализа. Изучены операционные характеристики спектрометра с индуктивно связанной плазмой (скорости потоков аргона и подачи анализируемого раствора в высокотемпературную зону плазмы, мощность высокочастотного генератора), а также влияние микро- и макрокомпонентов на аналитические сигналы элементов и оптимизированы условия определения тяжелых металлов (As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, V, Sr, Zn и Mn) методом АЭС-ИСП в черноморской мидии. Изучено распределение тяжелых металлов в мягких и скелетных тканях моллюсков в зависимости от их возраста и места обитания. Сделан вывод, что мидия в Черном море накапливает Fe, Zn, Sr в более значительной степени, чем другие металлы. Распределение металлов в тканях моллюсков разных размерно-возрастных групп показывает на снижение концентраций большинства элементов, за исключением V, Sr и Fe, в раковинах с увеличением возраста особи. С увеличением размеров моллюсков в мягких тканях снижается содержание Mn, Cu, а с увеличением возраста животных содержание Zn, Co, Cd, As в их тканях возрастает.

**Ключевые слова:** двустворчатые моллюски, мидия *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, пробоподготовка, определение тяжелых металлов, ИСП-АЭС

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2017, vol. 21, no. 2, pp. 116-124

DOI: 10.15826/analitika.2017.21.2.009

## Determination of heavy metals in *Mytilus galloprovincialis* Lamarck mussels using the ICP-AES method

\*Z.A. Temerdashev, I.I. Eletsii, A.A. Kaunova, I.G. Korpakova

Kuban State University, Russian Federation, 350040, Krasnodar, Stavropolskaya st., 149

\*Corresponding author: Zauval A. Temerdashev, E-mail: temza@kubsu.ru

Submitted 11 April 2017, received in revised form 03 June 2017

This paper considers analytical aspects that need to be solved when studying the distribution of heavy metals in mollusks that can be used as bioindicators of the aquatic ecosystem pollution. Bivalve *Mytilus galloprovincialis* Lamarck mollusks of various age groups picked from the mussel collectors located in the Inal Bay (the Black Sea) at distances of 10 and 500 m from the coastal zone were selected as the objects of the analysis. The advantages and disadvantages of the acid mineralization methods, dry ashing and microwave mineralization of the samples were considered to ensure the complete removal of all organic components of the sample, the consistency of the analytes content, and their translation into a form suitable for the subsequent spectral analysis. The operational characteristics of an ICP spectrometer (the flow rates

of argon and the feed of the solution to be analyzed into a high-temperature plasma zone, the power of a high-frequency generator) as well as the influence of micro- and macro-components on the analytical signals of the elements were studied, and the conditions for the determination of heavy metals (As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, V, Sr, Zn, Mn) by the ICP-AES method in the Black Sea mussels were optimized. The distribution of heavy metals in soft and skeletal tissues of the mussels depending on their age and their habitat was examined. It was concluded that the mussels from the Black Sea accumulate Fe, Zn, Sr to a greater extent than the other metals. The distribution of metals in the mussels' bodies of different size-age groups indicates a decrease in the concentration of most elements in their shells with an increase in the age of the organism with the exception of V, Sr, and Fe. The content of Mn, Cu decreases in the soft tissues with the increasing mollusk size, and the content of Zn, Co, Cd, As increases with the age of the animal.

**Keywords:** bivalve mollusks, mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, sample preparation, determination of heavy metals, ICP-AES

## ВВЕДЕНИЕ

Большинство работ по исследованию состояния водных экосистем основывается на отборе определенного количества проб водной среды, донных отложений, гидробионтов с последующим химическим анализом. Такие исследования позволяют получить информацию о концентрации определяемых компонентов в отдельных точках отбора в конкретный момент времени, а полученные данные характеризуют качество объекта исследований непосредственно в момент оценки. На способности моллюсков быстро реагировать на появление в среде различных загрязняющих веществ основана широко применяемая в разных странах система биоконтроля «Mussel watch» [1]. Она включает в себя традиционный химический мониторинг, основанный на измерении концентраций тяжелых металлов, нефтяных углеводородов и радиоактивных элементов в мидиях. Условия и перечень определяемых компонентов значительно зависят от переноса водных масс, фенологических и сезонных явлений.

В то же время в водоемах обитают на поверхности дна малоподвижные животные, в частности, моллюски, которые, являясь активными фильтраторами, могут накапливать в своем теле различные вещества, в том числе тяжелые металлы, причем такое накопление осуществляется в течение всего жизненного цикла. Располагая данными о накоплении тяжелых металлов в теле моллюсков, особенно в створках, можно судить о качестве среды в водоеме [2-7] не только в период съемки, но и за период жизни моллюска. Моллюски рода *Mytilus* – мидии – широко распространены в Мировом океане [7-10]; в Черноморско-Азовском бассейне обитает черноморская мидия *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, они являются признанными индикаторами антропогенного загрязнения прибрежных вод Мирового океана, а также применяются в системе биологического контроля качества среды [11]. Это малоподвижный организм, который после завершения личиночной стадии оседает и прикрепляется к субстрату (донному отложению, осадку и др.) биссусовыми нитями. Мидии являются активным фильтратором, моллюски разных размеров фильтруют воду в объеме от 0.5 до 7.5 л/час и более.

Ряд авторов [2, 3, 12-16 и др.] изучали распределение тяжелых металлов в мидиях, проводили

экспериментальные исследования по определению особенности моллюсков концентрировать тяжелые металлы в организме. Возможность использования мидии в качестве биоиндикатора загрязнения водной среды ограничивается необходимостью корректного определения металлов и других загрязняющих компонентов в анализируемой среде, что может значительно повлиять на качество, достоверность и интерпретацию результатов. В большинстве опубликованных исследований использовался ограниченный перечень металлов, определенных методами пламенной (ПААС) и электротермической атомно-абсорбционной спектроскопии (ЭТААС), энерго-дисперсионного рентгенофлуоресцентного анализа и атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-АЭС) [2, 3, 5, 6, 12-23]. По российскому сектору Азово-Черноморского бассейна проводились исследования учеными Института биологии южных морей им. А.О. Ковалевского [24, 25] и Южного федерального университета, которые включали изучение сезонной динамики Cd, Cu, Fe, Ni, Pb и Zn в мягких тканях и раковинах двустворчатых моллюсков *Mytilus galloprovincialis* Lam. из Казачьей бухты Черного моря [24], накопление ртути мягкими тканями и раковинами этих мидий в зависимости от индивидуального возраста моллюсков в акваториях мыса Тарханкут и Карадагского природного заповедника (г. Ялта) [25], особенности биоаккумуляции железа и марганца мидиями разного размера [26]. С точки зрения корректности организации и проведения процедуры анализа к этим исследованиям имеются замечания, связанные с методиками пробоподготовки и проведением анализа исследуемых объектов.

Полученная таким образом информация носит отрывочный характер и не в полной мере позволяет объективно оценить уровень загрязнения акватории исследуемой экосистемы, т.к. в мидии тяжелые металлы накапливаются не селективно, а комплексно. Лишь авторы [4] при проведении исследований привлекали сочетание методов ПААС, ЭТААС и масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС) при определении большего перечня элементов. В настоящей работе нами проведена оптимизация условий определения тяжелых металлов в мидии *Mytilus galloprovincialis* Lamarck методом ИСП-АЭС на примере акватории Азово-Черноморского бассейна.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ И ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

**Объекты исследования.** В качестве объекта анализа использовались двустворчатые моллюски *Mytilus galloprovincialis* Lamarck различных возрастных групп, отобранные на мидийных коллекторах, расположенных в бухте Инал (Черное море) на расстоянии 10 и 500 м от уреза воды. Образцы моллюсков отбирали в соответствии с требованиями ГОСТ Р 51592-2000, очищали от обрастаний, промывали проточной водой и замораживали для сохранения тканей.

Сложность анализа объектов определяется компонентным составом морской воды, в условиях которой находятся испытуемые моллюски, а также наличием большого объема биоматрицы. Примерное содержание основных компонентов в морской воде по данным [27] представлено в табл. 1.

**Материалы и методики исследований.** Все используемые в работе реактивы и растворители имели квалификацию не ниже «х.ч.», а также государственные стандартные образцы состава металлов ГСОМ № 7781-2000 (Cr), 8113-2002 (Fe), 8210-2002 (Cu), 7784-2000 (Co), 7773-2000 (Cd), 7785-2000 (Ni), 8211-2002 (Zn), 7778-2000 (Pb), 7762-2000 (Mn), 7789-2002 (Ba), 8365-2004 (V), 7783-2000 (Sr), 7343-96 (Hg), 7769-2000 (Zn) и ГСО 7772-2000 (Ca).

**Подготовка проб.** Перед проведением анализа отобранные образцы мидий размораживали, протирали поверхность створок спиртом, профлампированным скальпелем разрезали замыкательный мускул моллюсков, раскрывали створки и извлекали мягкие ткани вместе с мантийной жидкостью, высушивали при температуре 40 °С до постоянной массы.

**Подготовка к анализу створок.** Основным компонентом створок является карбонат кальция (неорганическая матрица), поэтому при их пробоподготовке к анализу методом ИСП-АЭС достаточно проведения мокрой кислотной минерализации. Для этого створки мидий, высушенные при 40 °С до постоянной массы, измельчали в фарфоровой ступке. Для проведения мокрой кислотной минерализации навески створок (1 г) помещали в конические колбы, добавляли 10 мл 5 М HNO<sub>3</sub> и нагревали смесь

**Таблица 1**

Содержание основных компонентов в морской воде [27]

**Table 1**

Content of the main components in sea water [27]

Компонент	Концентрация, моль/кг воды
Cl <sup>-</sup>	0.546
Na <sup>+</sup>	0.469
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.0283
Mg <sup>2+</sup>	0.0528
Ca <sup>2+</sup>	0.0103
K <sup>+</sup>	0.0102
Br <sup>-</sup>	0.000844
Sr <sup>2+</sup>	0.000091

на электроплитках при слабом кипении до влажных солей. После охлаждения и выщелачивания осадка 5 мл 2 %-ого HNO<sub>3</sub> полученный раствор переносили в колбы на 50 мл и доводили до метки раствором 2 %-ной HNO<sub>3</sub> для последующего ИСП-АЭС-анализа.

**Подготовка к анализу мягких тканей моллюсков.** В отличие от створок, прямое спектроскопическое определение металлов в биологических образцах, особенно в мягких тканях моллюсков, невозможно без удаления мешающей органической матрицы [28]. При анализе такого рода объектов применяются методы традиционной кислотной минерализации в открытых сосудах (далее – кислотная минерализация), сухого озоления и микроволновой кислотной подготовки проб в автоклавах (далее – микроволновая пробоподготовка), которые должны обеспечить полное удаление всех органических компонентов образца, постоянство содержания аналитов, а также перевод их в форму, подходящую для последующего спектрального анализа.

Можно было предположить, что наиболее предпочтительным является метод сухого озоления биопроб, позволяющий без использования дополнительных реактивов получить аналитический концентрат, свободный от органической матрицы и пригодный для анализа методом ИСП-АЭС. Метод сухого озоления биопроб достаточно хорошо изучен при определении металлов [20, 21, 29-31]. В [29, 30] при определении мышьяка техникой гидридов предлагается проводить разрушение органической матрицы методом сухого озоления, затем золу растворить в HNO<sub>3</sub> с разбавленной HCl, добавить тетрагидроборат натрия с последующим определением аналита. Проведенное сравнительное исследование по определению ЭТААС и индуктивно связанной атомно-эмиссионной спектроскопии (ИСП-АЭС) показало, что последний является наиболее подходящим методом для определения мышьяка в морепродуктах [30].

Авторами [31] исследованы помехи, возникающие в процессе пробоподготовки с последующим определением мышьяка в мидии методом ИСП-АЭС, по результатам которых ими рекомендуется мокрое озоление с азотной кислотой после предварительного сухого озоления, что повышает разложение анализируемой матрицы, а добавка химического модификатора MgO–Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> стабилизирует мышьяк в пробе. С другой стороны, сопоставительный анализ, проведенный авторами [20, 21], показал, что при сухом озолении наблюдаются значительные потери легколетучих элементов.

Авторы [32] на основе статистического моделирования рассчитали и провели экспериментальную апробацию подготовки биоткани к анализу для дальнейшего определения металлов методом ИСП-АЭС с использованием способа кислотной минерализации. Изучено влияние концентраций HNO<sub>3</sub>, HCl и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (их соотношений) на процесс кислотного растворения анализируемых образцов, установлены оптимальные их соотношения (19, 18 и 63 % об. HNO<sub>3</sub>,

HCl и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> соответственно). В оптимизированных условиях на примере анализа стандартного образца вешенки показаны удовлетворительные данные по подготовке биопроб к многоэлементному анализу. Также в [6, 33, 34] описываются различные схемы пробоподготовки с применением кислотной минерализации испытуемых образцов. Всех их объединяет минерализация проб кислотой, преимущественно концентрированной азотной, при повышенных температурах. В зависимости от набора определяемых элементов минерализация может проходить в несколько стадий. Нужно отметить, что такие длительные процедуры подготовки проб к анализу, а также применение нескольких методов определения металлов в испытуемом образце (ПААС, ЭТААС, метод холодного пара и др.), значительно увеличивают время и усложняют процедуру анализа.

В работе [33] приводятся результаты сопоставительного анализа сухого и кислотного методов разложения большого перечня биологических объектов, а также микроволновой пробоподготовки, из которых наиболее оптимальные результаты получены при использовании микроволновой подготовки проб. Анализ вышеперечисленных способов пробоподготовки показывает, что применение сухого озоления для вскрытия моллюсков весьма трудоемкий процесс (авторы [29] предлагают загружать муфельные печи и проводить разложение проб в течение ночи), при этом, ввиду высокого содержания органической матрицы, приходится проводить ее разрушение с использованием концентрированной азотной кислоты. Проблемным становится также сохранение всех определяемых металлов в анализируемой системе.

С учетом анализа литературных данных [21, 33, 34] и результатов проведенных нами экспериментов в качестве способа пробоподготовки нами была выбрана схема с применением микроволновой подготовки проб. Подготовку образцов мягких тканей моллюсков к анализу методом ИСП-АЭС проводили с использованием системы микроволновой подготовки проб Ethos 1 (Milestone, Италия). Проводилась оптимизация условий микроволновой минерализации (выбор объема и концентрации азотной кислоты, времени кислотной экстракции) и навески образца мягкой ткани мидии (табл. 2). С учетом проведенных экспериментов и рекомендаций разработчиков микроволновой системы для биообъектов нами предлагается следующая схема микроволновой подготовки проб: навеску (0.15 г) образца мягкой ткани мидии, предварительно высушенную и растертую в порошок, помещают в автоклав, добавляют 6 мл 70 %-ой азотной кислоты «ос.ч.» (ГОСТ 11125-84), 3 мл бидистиллированной воды и запускают программу для минерализации. После завершения программы и остывания автоклава до комнатной температуры его содержимое переносят в колбу вместимостью 50 мл и доводят объем бидистиллированной водой до метки. Как видно из табл. 2, время микроволновой подготовки пробы составляет 30 минут. Та-

Таблица 2

Программа СВЧ-минерализации мягких тканей мидии

Table 2

Microwave mineralization program for the mussels' soft tissues

Этап	Время, мин	Мощность, Вт	Температура, °С
1	4.5	1100	80
2	3.5	1100	165
3	4	1100	205
4	16	1000	205

кая схема микроволновой подготовки проб во многом согласуется с предлагаемыми авторами [21, 33, 34] условиями пробоподготовки мидий с последующим детектированием методами ИСП-АЭС, ААС, ИСП-МС и она максимально оптимальна для широкого круга определяемых элементов.

С учетом аналитических возможностей современных спектральных методов анализа можно заключить, что для скрининга и определения более широкого спектра элементов в моллюсках предпочтительнее применить ИСП-АЭС или ИСП-МС. Авторами [35] изучены возможности проведения микроэлементного анализа биологического материала человека с применением ПААС, ЭТААС, ИСП-АЭС и ИСП-МС. Было сделано заключение, что для клинических задач, где требуется анализ только одного или нескольких элементов, использование ПААС может быть достаточно, в случае потребности более высокой чувствительности требуется ЭТААС. Исходя из перечня аналитов, подлежащих определению (As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, V, Sr, Zn, Mn), а также уровней их содержания в испытуемых образцах (для As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, V, Sr, Mn на уровне 0.05–10, а Fe и Zn от 0.1 до сотен мкг/г сухого вещества), нами в качестве метода анализа был выбран метод ИСП-АЭС. Применение микроволновой подготовки проб (30 минут) вкупе с возможностями ИСП-АЭС анализа позволяет существенно сократить длительность анализа, а также достигнуть высокой воспроизводимости получаемых результатов.

**ИСП-АЭС определение металлов.** Выбор определяемых элементов был сделан с учетом анализа литературных данных и проведенных нами экспериментальных исследований [4, 35]. В исследуемых пробах моллюсков определяли 14 элементов (As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, V, Sr, Zn, Mn) методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой с использованием спектрометра iCAP-6500 (Thermo Scientific, США).

**Изучение операционных характеристик ИСП-спектрометра при определении элементов.** Было исследовано влияние некоторых операционных характеристик спектрометра (скорости потоков аргона, скорость подачи анализируемого раствора, мощность высокочастотного генератора) на величину аналитических сигналов определяемых элементов на модельных растворах и растворах исследуемых

образцов, для чего осуществляли варьирование одного из операционных параметров при постоянстве остальных. Так, мощность высокочастотного генератора изучали в диапазоне 1000-1350 Вт с шагом 50 Вт, скорость потока распылителя – 0.3-0.8 л/мин с шагом 0.1 л/мин, скорость промежуточного потока – 0.3-0.9 л/мин с шагом 0.1 л/мин, скорость охлаждающего потока – 11-13 л/мин с шагом 1 л/мин.

Зависимость интенсивности спектральных линий определяемых элементов от мощности генератора для большинства из них имела возрастающий характер, за исключением щелочных и щелочно-земельных металлов, для которых варьирование данного параметра не привело к значимым изменениям их аналитических сигналов. В качестве рабочего значения была выбрана мощность генератора в 1150-1200 Вт, т.к. при таком ее значении достигается оптимальное соотношение между процессами атомизации и ионизации элементов.

При увеличении скорости потока аргона, несущего аэрозоль, наблюдается увеличение АС с достижением максимума при 0.5–0.6 л/мин в случае образцов минерализатов, причем положение максимума не зависит от наличия матрицы пробы. При более высоких значениях этого параметра происходит снижение интенсивности спектральных линий всех определяемых компонентов.

При использовании промежуточного потока аргона скоростью 0.3-0.4 л/мин были получены максимальные аналитические сигналы (АС) элементов, а изменение расхода охлаждающего потока аргона не привело к значимому изменению в интенсивности сигналов определяемых элементов.

На основе проведенных измерений оптимальными операционными характеристиками и параметрами спектрометра были выбраны:

- мощность высокочастотного генератора – 1150 Вт;
- скорость распылительного потока аргона – 0.5 л/мин;
- скорость промежуточного потока аргона – 0.3 л/мин;
- скорость охлаждающего потока аргона – 12 л/мин.

При ИСП-АЭС определении всех заявленных элементов, за исключением стронция и ванадия, были использованы их наиболее чувствительные аналитические линии (табл. 3), свободные от спектральных наложений. Для Sr и V были выбраны вторичные длины волн ввиду наличия спектральных наложений. Присутствие матричных компонентов может существенно изменить характер и величину АС других элементов, поэтому было изучено взаимное влияние микро- и макрокомпонентов, подготовленных к анализу образцов на модельных растворах, содержащих их переменные количества. В случае анализа растворов, моделирующих содержание элементов в анализируемом объекте после СВЧ-кислотной минерализации, содержание As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, V, Sr, Mn на уровне 0.05–10 мкг/г сухого вещества не изменяет аналитические сигналы элементов. Подобные зависимости были получены для элементов в присутствии Fe и

Таблица 3

Выбранные спектральные линии для определения элементов

Table 3

Selected spectral lines for determining the elements

Определяемый элемент	Длина волны, нм	Определяемый элемент	Длина волны, нм
Cd	214.438	Mn	257.61
As	189.042	Ni	231.604
Ba	455.403	Pb	220.353
Cr	267.716	Sr*	421.552
Cu	324.754	V*	292.402
Fe	259.940	Zn	213.856
Hg	194.227	Co	238.892

Примечание: \* – вторичная аналитическая линия элемента.

Zn от 0,1 до 10 мкг/г сухого вещества, однако при их больших содержаниях отмечается увеличение интенсивностей линий Ba, V, Sr на 15–20 %. В модельных растворах экстрактов присутствие Ca (100 мг/дм<sup>3</sup>) не вызывает значимых изменений АС элементов. Большие же его содержания, по-видимому, приводят к смещению равновесия ионизации в плазме, что проявляется в уменьшении на 15–40 % интенсивностей ионных линий элементов, отмечено также подавление сигналов ряда элементов в модельных растворах. Для нивелирования матричных неспектральных влияний со стороны макрокомпонентов при анализе образцов нами предложено проводить градуировку спектрометра с использованием стандартных растворов элементов с добавкой Fe и Zn в количестве 100 мг/дм<sup>3</sup>, а при анализе створок – Ca в количестве 500 мг/дм<sup>3</sup>.

Правильность данной схемы определения металлов была доказана с использованием ГСО металлов методом «введено-найденно» и методом добавок (табл. 4).

Таблица 4

Оценка правильности определения некоторых металлов в анализируемых СВЧ-экстрактах из мягких тканей моллюсков

Table 4

Assessment of the determination correctness of some metals in the analyzed microwave extracts from the soft tissues of the mollusks

Элемент	Метод «введено-найденно» (концентрация добавленного металла – 10 мкг/л)		Метод добавок, мкг/л
	Проба	Проба + добавка	
Ni	1.3 ± 0.3	11.5 ± 0.7	1.4
Co	0.49 ± 0.07	10.7 ± 0.9	0.46
Cd	1.71 ± 0.05	12.6 ± 0.7	1.79
Pb	0.34 ± 0.06	10.7 ± 0.9	0.31
Hg	< 0.05	9.2 ± 0.8	< 0.05

Таблица 5

Распределение металлов в теле мидий *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, мкг/г<sub>сух</sub> ( $n = 3, p = 0.95$ )

Table 5

Distribution of metals in the bodies of "Mytilus galloprovincialis Lamarck" mussels,  $\mu\text{g/g}_{\text{dry wt.}}$  ( $n = 3, p = 0.95$ )

Объект анализа	Удаленность от берега	Возраст, месяцев	Металлы						
			As	Ba	Cd	Co	Cr	Cu	Fe
Мягкие ткани	10 м	15	1.86 ± 0.03	4.8 ± 0.1	1.9 ± 0.3	0.47 ± 0.03	0.48 ± 0.05	4.6 ± 0.1	206 ± 5
		20	2.66 ± 0.04	5.0 ± 0.1	2.7 ± 0.5	0.69 ± 0.02	0.39 ± 0.01	4.7 ± 0.1	173 ± 4
	500 м	20	2.33 ± 0.09	3.2 ± 0.1	2.4 ± 0.1	0.57 ± 0.05	0.32 ± 0.03	4.6 ± 0.1	57 ± 1
		> 30	3.3 ± 0.1	2.9 ± 0.2	3.4 ± 0.1	0.69 ± 0.03	0.36 ± 0.01	4.5 ± 0.1	74 ± 2
Створки	10 м	15	0.024 ± 0.002	11.4 ± 0.6	0.0072 ± 0.0001	< 0.1	< 0.1	0.69 ± 0.06	4.6 ± 0.4
		20	0.023 ± 0.002	11.6 ± 0.4	0.0072 ± 0.0004	< 0.1	< 0.1	0.72 ± 0.03	12.6 ± 0.6
	500 м	20	0.023 ± 0.001	9.4 ± 0.1	0.0057 ± 0.0005	< 0.1	< 0.1	0.49 ± 0.01	3.8 ± 0.1
		> 30	0.017 ± 0.001	8.5 ± 0.7	0.0048 ± 0.0007	< 0.1	< 0.1	0.34 ± 0.04	1.9 ± 0.2
Объект анализа	Удаленность от берега	Возраст, месяцев	Металлы						
			Mn	Ni	Hg	Pb	Sr	V	Zn
Мягкие ткани	10 м	15	6.01 ± 0.09	1.36 ± 0.02	< 0.05	0.53 ± 0.05	15.3 ± 0.2	2.3 ± 0.1	106 ± 2
		20	5.71 ± 0.08	1.83 ± 0.02	< 0.05	0.44 ± 0.08	13.7 ± 0.4	3.4 ± 0.1	123 ± 2
	500 м	20	2.09 ± 0.09	1.19 ± 0.05	< 0.05	0.39 ± 0.09	13.5 ± 0.5	2.9 ± 0.1	128 ± 5
		> 30	2.11 ± 0.11	1.14 ± 0.02	< 0.05	0.47 ± 0.09	17.5 ± 0.6	2.8 ± 0.1	196 ± 9
Створки	10 м	15	6.01 ± 0.09	< 0.1	< 0.05	< 0.1	605 ± 7	0.024 ± 0.001	0.61 ± 0.07
		20	3.59 ± 0.11	< 0.1	< 0.05	< 0.1	768 ± 9	0.040 ± 0.001	0.61 ± 0.09
	500 м	20	3.29 ± 0.08	< 0.1	< 0.05	< 0.1	748 ± 8	0.028 ± 0.002	0.49 ± 0.02
		> 30	3.11 ± 0.21	< 0.1	< 0.05	< 0.1	740 ± 7	0.020 ± 0.002	0.36 ± 0.05

**Анализ испытываемых образцов.** После оптимизаций условий пробоподготовки испытываемых образцов и ИСП-АЭС определения металлов проводился анализ образцов мидий разных возрастных групп, отобранных из мест с разной удаленностью от источников антропогенного загрязнения, результаты представлены в табл. 5. Анализ полученных данных позволяет сделать вывод, что мидии в Черном море накапливают Fe, Zn, Sr в более значительной степени, чем другие металлы. Наблюдаются более высокие содержания элементов (кроме бария и стронция) в мягких тканях мидий, чем в скелетных. Распределение металлов в образцах мидий разных размерно-возрастных групп указывает на снижение концентраций большинства элементов в раковинах, за исключением V, Sr, Fe, с увеличением возраста особей. С увеличением размера моллюсков в мягких тканях снижается содержание Mn, Cu, а с увеличением возраста животного содержание Zn, Co, Cd, As возрастает. Полученные нами закономерности достаточно удовлетворительно коррелируют с литературными данными по Черному морю [2, 12, 36].

### Благодарности

Исследования проводились в рамках выполнения проекта Минобрнауки РФ (№ 4.2612.2017/ПЧ) с использованием научного оборудования ЦКП

«Эколого-аналитический центр» Кубанского государственного университета.

### Acknowledgements

The research was carried out within the framework of the project of The Ministry of Education of the Russian Federation (Project № 4.2612.2017/ПЧ) using the scientific equipment of the TsKP Ekologo analiticheskii Tsentr (Environmental Analysis Center) of the Kuban State University.

### ЛИТЕРАТУРА

- Goldberg's proposal of «the Mussel Watch»: Reflections after 40 years / J. W. Farrington [et al.] // Marine Pollution Bulletin. 2016. V. 110. P. 501-510.
- Bat L., Öztekin H.C. Heavy metals in mytilus galloprovincialis, Rapana venosa and Eriphia verrucosa from the Black Sea coasts of Turkey as bioindicators of pollution // Walailak Journal of Science and Technology. 2016. V. 13, № 9. P. 715-728.
- Partial characterization of proteins from mussel Mytilus galloprovincialis as a biomarker of contamination / S. Gorinstein [et al.] // Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 2005. V. 49, № 4. P. 504-510.
- Trace Elements in Mediterranean Mussels Mytilus galloprovincialis from the South African West Coast / J. Bezuidenhout [et al.] // Ecological Chemistry and Engineering S. 2015. V. 22, № 4. P. 489-498.
- Regoli F., Orlando E. Accumulation and subcellular distribution of metals (Cu, Fe, Mn, Pb and Zn) in the Mediterranean mussel Mytilus galloprovincialis during a field trans-

- plant experiment // *Marine Pollution Bulletin*. 1994. V. 28, № 10. P. 592-600.
6. Phillips D.J.H., Rainboow P.S. Barnacles and mussels as biomonitors of trace elements: a comparative study // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1988. V. 49. P. 83-93.
  7. Casasa S., Bacherb C. Modelling trace metal (Hg and Pb) bioaccumulation in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, applied to environmental monitoring // *Journal of Sea Research*. 2006. V. 56, № 2. P. 168-181.
  8. Cubero-Leon E., Ciocan C.M. Mussels: Ecology, Life Habits and Control // In: *Mussels as a tool to monitor pollution (Book Chapter)*. 2013. P. 77-99.
  9. Schöne B.R., Krause Jr.R.A. Retrospective environmental biomonitoring – Mussel Watch expanded // *Global and Planetary Change*. 2016. V. 144. P. 228-251.
  10. The conceptual basis of the biomarker approach / M.N. Depledge [et al.] // In: *Biomarker – Research and application in the assessment of environmental health*, 1983. P. 15-29
  11. Бурдин К.С., Крупина М.В., Савельев И.Б. Моллюски рода *Mytilus* как возможные показатели содержания тяжёлых и переходных металлов в морской воде // *Океанология*. 1979. Т. 19, № 6. С. 1038-1044.
  12. Relationship between seawater pollution and qualitative changes in the extracted proteins from mussels *Mytilus galloprovincialis* / Sh. Gorinstein [et al.] // *Science of the Total Environment*. 2006. V. 364. P. 251-259.
  13. Karafistan A., Ormanci H.B. Metal concentrations in *Mytilus galloprovincialis* from southern Dardanelles, Turkey // *Environmental Science. ESAIJ*. 2010. V. 5, № 3. P. 201-204.
  14. The trace elements in the raft cultivated mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) from Sinop Peninsula, in the southern Black Sea / S.T. Culha [et al.] // *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2008. V. 7, № 12. P. 1618-1623.
  15. Bakan G., Özkoç H.B. An ecological risk assessment of the impact of heavy metals in surface sediments on biota from the mid-Black Sea coast of Turkey // *International Journal of Environmental Studies*. 2007. V. 64, № 1. P. 45-57.
  16. Andreev G., Simeonov V. Interphase Distribution and Accumulation of Elements in the Marine Environment of the Black Sea // *Toxicological & Environmental Chemistry*. 1992. V. 36, № 1-2. P. 99-104.
  17. Biomonitoring of heavy metals and arsenic on the east coast of the Middle Adriatic Sea using *Mytilus galloprovincialis* / V. Orescanina V. [et al.] // *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. 2006. V. 245, № 2. P. 495-500.
  18. Heavy metals monitoring in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Apulian coast (Southern Italy) / L. Spada [et al.] // *Medit. Mar. Sci.*, 2013. V. 14, № 1. P. 99-108.
  19. ICP-AES analysis of metal content in shell of mussel *Mytilus galloprovincialis* from Croatian coastal waters / S. Rončević [et al.] // *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 2010. V. 90, № 8. P. 620-632.
  20. Карякин А.В., Грибовская И.Ф. Эмиссионный спектральный анализ объектов биосферы. М.: Химия. 1979. 207 с.
  21. Зырин Н.Г., Обухов А.И. Спектральный анализ почв, растений и других биологических объектов. М.: Изд-во Моск. ун-та. 1977. 334 с.
  22. Rouane-Hacene O., Belhouari B., Boutiba Z. Trace element concentrations (Zn, Cu, Pb and Cd) in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Oran Harbour (Oran Bay, Algerian west coast) // *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*. 2012. V. 2, № 9. P. 446-452.
  23. Maanan M. Biomonitoring of Heavy Metals Using *Mytilus galloprovincialis* in Safi Coastal Waters, Morocco // *Environmental Toxicology*. 2007. V. 22, N 5. P. 449-538.
  24. Козинцев А. Ф. Сезонная динамика содержания тяжёлых металлов в мидии (*Mytilus galloprovincialis*) из бухты казачья Чёрного моря // *Морской экологический журнал*. 2006. Т. 5, № 4. С. 41-47.
  25. Концентрация ртути в воде, донных отложениях и мидии *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* LAM. на шельфе Крыма (Черное море) / В.И. Рябушко [и др.] // *Морской экологический журнал*. 2005. Т. 4, № 3. С. 79-87.
  26. Доценко И.В. Биоаккумуляция железа и марганца и оценка их осаждения черноморской мидией (*MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* LAM.) в Азовском море и на шельфе Черного моря // *Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки*. 2006. № 4. С. 84-89.
  27. Хорн Р. Морская химия (структура воды и химия гидросферы). Пер. с англ. М.: Мир. 1972. 400 с.
  28. Subramanian K.S. Determination of metals in biofluids and tissues: sample preparation methods for atomic spectroscopic techniques // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 1996. V. 516 № 3. P. 291-319.
  29. Barnes RM. Progress in inductively coupled plasma analytical spectroscopy // *Journal of testing and evaluation*. 1984. V. 126 № 4. P. 194-202.
  30. Ybañez N., Cervera M.L., Montoro R. Determination of arsenic in dry ashed seafood products by hydride generation atomic absorption spectrometry and a critical comparative study with platform furnace Zeeman-effect atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry // *Analytica Chimica Acta*. 1992. V. 2586 № 1. P. 61-71.
  31. Inductively coupled plasma atomic emission spectrometric determination of arsenic in mussel products. Interference study / M.L. Cervera [et al.] // *Fresenius J Anal. Chem.* 1993. V. 347, P. 58-62.
  32. Statistical mixture design development of digestion methods for Oyster tissue using inductively coupled plasma optical emission spectrometry for the determination of metallic ions / R.M.W. Nano [et al.] // *Talanta*. 2009. V. 80. P. 559-564.
  33. Altundag H., Tuzen M. Comparison of dry, wet and microwave digestion methods for the multi element determination in some dried fruit samples by ICP-OES // *Food Chem. Toxicol.* 2011. V. 49, № 11. P. 2800-2807.
  34. Кубракова И.В., Торпченнова Е.С. Микроволновый нагрев как средство повышения эффективности аналитических операций (обзор) // *Заводская лаборатория. Диагностика материалов*. 2007. Т. 73, № 5. С. 3-14.
  35. Evaluation of methods for trace-element determination with emphasis on their usability in the clinical routine laboratory / B.J. Bolann [et al.] // *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 2007. V. 67, № 4. P. 353-356.
  36. Presence of trace metals in aquaculture marine ecosystems of the northwestern Mediterranean Sea (Italy) / S. Squadrone [et al.] // *Environmental Pollution*. 2016. V. 215. P. 77-83.

## REFERENCES

1. Farrington J. W., Tripp B.W., Tanabe Sh., Subramanian A., Sericano J.L., Wade T.L., Knap A.H. Edward D. Goldberg's proposal of "the Mussel Watch": Reflections after 40 years. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, vol. 110, no. 1, pp. 501-510. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.05.074.
2. Bat L., Öztekin H.C. Heavy metals in *mytilus galloprovincialis*, *Rapana venosa* and *Eriphia verrucosa* from the Black Sea

- coasts of Turkey as bioindicators of pollution. *Walailak Journal of Science and Technology*, 2016, vol. 13, no. 9, pp. 715-728.
3. Gorinstein S., Jung S.-T., Moncheva S., Arancibia-Avila P., Park Y.-S., Kang S.-G., Goshev I., Trakhtenberg S., Namiesnik J. Partial characterization of proteins from mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of contamination. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2005, vol. 49, no. 4, pp. 504-510. doi: 10.1007/s00244-004-0238-2.
  4. Bezuidenhout J., Dames N., Botha A., Frontasyeva M.V., Goryainova Z.I., Pavlov D. Trace Elements in Mediterranean Mussels *Mytilus galloprovincialis* from the South African West Coast. *Ecological Chemistry and Engineering S*, 2015, vol. 22, no. 4, pp. 489-498. doi: 10.1515/eces-2015-0028.
  5. Regoli F., Orlando E. Accumulation and subcellular distribution of metals (Cu, Fe, Mn, Pb and Zn) in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* during a field transplant experiment. *Marine Pollution Bulletin*, 1994, vol. 28, no. 10, pp. 592-600. doi.org/10.1016/0025-326X(94)90360-3.
  6. Phillips D.J.H., Rainboow P.S. Barnacles and mussels as biomonitors of trace elements: a comparative study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1988, vol. 49, pp. 83-93.
  7. Casasa S., Bacherb C. Modelling trace metal (Hg and Pb) bioaccumulation in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, applied to environmental monitoring. *Journal of Sea Research*, 2006, vol. 56, no. 2, pp. 168-181. doi.org/10.1016/j.seares.2006.03.006.
  8. Cubero-Leon E., Ciocan C.M. Mussels as a tool to monitor pollution. *Mussels: Ecology, Life Habits and Control*. New York, Nova Science Publ., 2013. P. 77-99.
  9. Schöne B.R., Krause Jr R.A. Retrospective environmental biomonitoring – Mussel Watch expanded. *Global and Planetary Change*, 2016, vol. 144, pp. 228-251. doi: 10.1016/j.gloplacha.2016.08.002.
  10. Depledge M.N., Amaral-Mendes J.J., Daniel B., Halbrook R.S., Cloepper-Sams P., Moore M.N., Peacall D.P. The conceptual basis of the biomarker approach. In: *Biomarker – Research and application in the assessment of environmental health*. Heidelberg, Springer, 1983. P.15-29.
  11. Burdin K.S., Krupina M.V., Savel'ev I.B. [Molluscs of the *Mytilus* genus as possible indicators of the content of heavy and transition metals in sea water]. *Okeanologiya* [Oceanology], 1979, vol. 19, no. 6, pp. 1038-1044 (in Russian).
  12. Gorinstein Sh., Moncheva S., Toledo F., Arancibia-Avila P., Trakhtenberg S., Gorinstein A., Goshev I., Namiesnik J. Relationship between seawater pollution and qualitative changes in the extracted proteins from mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Science of the Total Environment*, 2006, vol. 364, pp. 251-259. doi:10.1016/j.scitotenv.2005.06.013.
  13. Karafistan A., Ormanci H.B. Metal concentrations in *Mytilus galloprovincialis* from southern Dardanelles, Turkey. *Environmental Science ESAIJ*, 2010, vol. 5, no. 3, pp. 201-204.
  14. Culha S.T., Celik M.Y., Culha M., Karayucel I., Gundogdu A. The trace elements in the raft cultivated mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) from Sinop Peninsula, in the southern Black Sea. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2008, vol. 7, no. 12, pp. 1618-1623.
  15. Bakan G., Özkoç H.B. An ecological risk assessment of the impact of heavy metals in surface sediments on biota from the mid-Black Sea coast of Turkey. *International Journal of Environmental Studies*, 2007, vol. 64, no. 1, pp. 45-57. doi: 10.1080/00207230601125069.
  16. Andreev G., Simeonov V. Interphase Distribution and Accumulation of Elements in the Marine Environment of the Black Sea. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 1992, vol. 36, no. 1-2, pp. 99-104. doi: 10.1080/02772249209357831.
  17. Orescanina V., Lovrencica I., Mikelica L., Barisica D., Matasinb Z., Lulica S., Pezeljc D. Biomonitoring of heavy metals and arsenic on the east coast of the Middle Adriatic Sea using *Mytilus galloprovincialis*. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. 2006, vol. 245, no. 2, pp. 495–500. doi.org/10.1016/j.nimb.2005.11.050.
  18. Spada L., Annicchiarico C., Cardellicchio N., Giandomenico S., Di Leo S. Heavy metals monitoring in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Apulian coast (Southern Italy). *Medit. Mar. Sci.*, 2013, vol. 14, no. 1, pp. 99-108. dx.doi.org/10.12681/mms.323.
  19. Rončević S, Svedružić L.P., Smetiško J., Medaković D. ICP-AES analysis of metal content in shell of mussel *Mytilus galloprovincialis* from Croatian coastal waters. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 2010, vol. 90, no. 8, pp. 620–632. doi: 10.1080/03067310903410956.
  20. Kariakin A.V., Gribovskaia I.F. *Emissionnyi spektral'nyi analiz ob'ektov biosfery* [Emission spectral analysis of biosphere objects]. Moscow, Khimiia Publ., 1979. 207 p. (in Russian).
  21. Zyrin N.G., Obukhov A.I. *Spektral'nyi analiz pochv, rastenii i drugikh biologicheskikh ob'ektov* [Spectral analysis of soils, plants and other biological objects]. Moscow, Izdatel'stvo Moskovskogo universiteta Publ., 1977. 334 p. (in Russian).
  22. Rouane-Hacene O., Belhaouari B., Boutiba Z. Trace element concentrations (Zn, Cu, Pb and Cd) in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Oran Harbour (Oran Bay, Algerian west coast). *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 2012, vol. 2, no. 9, pp. 446-452.
  23. Maanan M. Biomonitoring of Heavy Metals Using *Mytilus galloprovincialis* in Safi Coastal Waters, Morocco. *Environmental Toxicology*, 2007, vol. 22, no. 5, pp. 449-538. doi: 10.1002/tox.20301.
  24. Kozintsev A. F. [Seasonal dynamics of the content of heavy metals in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the bay of the Cossack Black Sea]. *Morskoi ekologicheskii zhurnal* [Marine ecological journal], 2006, vol. 5, no. 4, pp. 41-47 (in Russian).
  25. Riabushko V.I., Kozintsev A. F., Kostova S.K., Parchevskaia D.S., Shinkarenko V.K. [Concentration of mercury in water, bottom sediments and mussels MYTILUS GALLOPROVINCIALIS on the shelf of the Crimea (Black Sea)]. *Morskoi ekologicheskii zhurnal* [Marine ecological journal], 2005, vol. 4, no. 3, pp. 79-87 (in Russian).
  26. Dotsenko I.V. [Bioaccumulation of iron and manganese and assessment of their deposition by the Black Sea mussel (MYTILUS GALLOPROVINCIALIS LAM.) in the Sea of Azov and on the shelf of the Black Sea]. *Izvestiia vysshikh uchebnykh zavedenii. Severo-Kavkazskii region. Estestvennye nauki* [News of higher educational institutions. The North Caucasus region. Natural Sciences], 2006, no. 4, pp. 84-89 (in Russian).
  27. Khorn R. *Morskaja khimiia (struktura vody i khimiia gidrosfery)* [The structure of Water and the Chemistry of Hydrosphere]. Moscow, Mir, 1972. 400 p. (in Russian).
  28. Subramanian K.S. Determination of metals in biofluids and tissues: sample preparation methods for atomic spectroscopic techniques. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 1996, vol. 51, no. 3, pp. 291-319. doi.org/10.1016/0584-8547(95)01425-X.
  29. Barnes RM. Progress in inductively coupled plasma analytical spectroscopy. *Journal of testing and evaluation*, 1984, vol. 12, no. 4, pp. 194-202.
  30. Ybañez N., Cervera M.L., Montoro R. Determination of arsenic in dry ashed seafood products by hydride genera-

- tion atomic absorption spectrometry and a critical comparative study with platform furnace Zeeman-effect atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 1992, vol. 258, no. 1, P. 61-71, doi.org/10.1016/0003-2670(92)85198-F.
31. Cervera M. L., Navarro A., Montoro R., Gomez J. Inductively coupled plasma atomic emission spectrometric determination of arsenic in mussel products. Interference study. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1993, vol. 347, pp. 58-62, doi: 10.1007/BF00326045.
32. Nano R.M.W., Bruns R.E., Ferreira S.L.C., Baccan N., Cadore S. Statistical mixture design development of digestion methods for Oyster tissue using inductively coupled plasma optical emission spectrometry for the determination of metallic ions. *Talanta*, 2009, vol. 80, pp. 559–564, doi:10.1016/j.talanta.2009.07.025.
33. Altundag H., Tuzen M. Comparison of dry, wet and microwave digestion methods for the multi element determination in some dried fruit samples by ICP-OES. *Food Chem. Toxicol.*, 2011, vol. 49, no. 11, pp. 2800-2807, doi.org/10.1016/j.fct.2011.07.064.
34. Kubrakova I.V., Toropchenova E.S. Microwave heating for enhancing efficiency of analytical operations (review). *Inorganic Materials*, 2008, vol. 44, no. 14, pp. 1509-1519. doi: 10.1134/S0020168508140069.
35. Bolann B.J., Rahil-Khazen R., Henriksen H., Isrenn R., Ulvik R.J. Evaluation of methods for trace-element determination with emphasis on their usability in the clinical routine laboratory. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 2007, vol. 67, no. 4, pp. 353-356. doi:10.1080/00365510601095281.
36. Squadrone S., Brizio P., Stella C., Prearo M., Pastorino P., Serracca L., Ercolini C., Abete M.C. Presence of trace metals in aquaculture marine ecosystems of the northwestern Mediterranean Sea (Italy). *Environmental Pollution*, 2016, vol. 215, pp. 77-83. doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.096.