

磁修饰酵母对直接大红染料的生物吸附

吴琦, 单志, 沈茂, 李双江, 陈惠

四川农业大学生命科学与理学院, 雅安 625014

摘要: 本研究采用水相合成的纳米级铁磁流体对灭活酿酒酵母细胞进行磁修饰, 获得了具有良好磁响应的酵母。傅立叶变换红外光谱分析表明, 该修饰酵母在 Fe-O 特征峰 581 cm^{-1} 处的吸收明显加强。透射电镜观察表明, 纳米磁性颗粒单个或成团聚集在酵母细胞表面。在本实验条件下, $160\text{ }\mu\text{L}$ 磁修饰酵母对 1 mL 浓度为 0.4 mg/mL 直接大红染料吸附率达 100%; 8 min 达到吸附平衡; 在 70% 乙醇中, 染料脱吸附率为 99.18%。由于磁修饰酵母吸附力强, 吸附速度快, 易于磁分离, 是一种有前景的水溶性染料生物吸附剂。

关键词: 酿酒酵母, 磁修饰, 直接大红, 生物吸附

Biosorption of direct scarlet dye on magnetically modified *Saccharomyces cerevisiae* cells

Qi Wu, Zhi Shan, Mao Shen, Shuangjiang Li, and Hui Chen

College of Life Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

Abstract: We prepared the nano-sized magnetic fluid in aqueous phase solution to modify the killed yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*). Subsequently, the yeast cells with good magnetic response was obtained. The infrared spectroscopy analysis showed that the modified yeast cells increased obviously the absorption at the Fe-O characteristic peak of 581 cm^{-1} . Moreover, the transmission electron microscopy picture indicated the magnetic nanoparticles presented individually or aggregately on the yeast cell surface. Under the experimental conditions, the magnetically labeled yeast with $160\text{ }\mu\text{L}$ showed the adsorption percentage up to 100% in 1 mL direct scarlet dye solution with the concentration of 0.4 mg/mL , and arrived at the adsorption equilibrium within 8 min . Besides, the adsorbed dyes can be eluted in 70% alcohol with a desorption percentage of 99.18%. Because of the strong adsorption capacity, the high adsorption speed and easy of magnetic separation, the magnetically modified yeast cells are the promising biosorbent candidates for removal of water-soluble dyes.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, magnetic modification, direct scarlet, biosorption

大量的染料广泛用于纺织、化妆品、造纸、皮革、医药和食品等工业。每年约需要 70 万吨的 10 万种商用染料, 但估计约有 2%~50% 的染料以废水的方式被排放掉^[1]。其中含水溶性有机染料的废水具有污染物浓度高、色度深、含多种有机物成分且

具有毒性等特点^[2], 而且它们抗氧化性强和生物降解性差, 处理难度大。甚至很少量的染料($10\sim 50\text{ mg/L}$)就会影响水体的审美价值、水质透明度和气体溶解度^[3], 对水环境危害极大。直接大红 4BE 在染料和涂料工业广泛使用, 产生大量染料污水, 对其进行

Received: March 30, 2009; Accepted: August 18, 2009

Corresponding author: Qi Wu. Tel: +86-835-2886126; Fax: +86-835-2886136; E-mail: wuqi@yahoocn

脱色处理是治理直接大红 4BE 污水的主要手段。研究表明, 二氧化锰吸附法^[4]、二氧化氯催化氧化法^[5]、超声波/铁-炭微电解法^[6]等技术对印染废水中直接大红 4BE 均有一定的去除效果, 但其操作较为复杂或者成本较高, 更不能回收色素, 使得这些方法在应用上受到限制。

从上世纪 80 年代开始, 利用活的或灭活的微生物用于污水生物吸附和生物降解, 成为解决环境污染的一种可行的新型处理手段^[7-8]。Šafařík 等^[9]和 Aksu 等^[10]研究了酿酒酵母对不同色素的吸附机理, 优化了吸附条件, 发展出了从大体积污水中分离染料的技术工艺。但在分离后期, 仍然要采用传统的离心和筛漏等手段将细胞分离出来。近年来, 磁分离技术已广泛渗透到生物技术和环境技术等领域^[11-12]。磁性吸附能有效用于液体和悬浮物中各种物质的分离, 与传统的分离工艺相比具有诸多的优势: 吸附容量大, 吸附效率高, 制备成本低, 易于放大处理, 特别是其优良的磁响应性使得后期处理简单快速。因此, 如能将微生物细胞磁修饰后用于废污水处理去除异型生物质, 可以综合生物吸附和磁分离技术的优点, 在环境保护方面具有诱人的应用前景。近几年, 国外已有少量研究报道^[13], 但国内尚处于起步阶段。本研究采用直接混合方式对酿酒酵母细胞进行磁修饰, 比较了酵母、铁磁流体和磁修饰酵母对纺织和皮革工业广泛使用的红色染料直接红 4BE 的吸附效果, 为进一步的应用研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*), 由四川农业大学食品系刘书亮老师提供。

1.1.2 主要药品及培养基

纺织染料: 直接大红 4BE(直接红 28), 又称刚果红(congo red, $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$), 购自四川成都翟氏化工, 配制浓度为 1 g/L 母液, 自然 pH 6。

YPD 培养基: 液体培养基 (0.5 g 酵母膏、1 g 蛋白胨、2 g 葡萄糖, 溶于 100 mL 蒸馏水, 自然 pH); 固体培养基(同液体培养基, 另加入 1.8 g 琼脂)。

1.1.3 主要仪器

UNICO™ WFZ UV-2102C 紫外可见分光光度计(尤尼柯); 透射电镜 Hitachi-6010(日立); 傅立叶变换红外光谱仪 FTIR-8400S(岛津)。

1.2 方法

1.2.1 铁磁流体的制备

参照 Shan 等^[14]方法制备纳米级铁磁流体: 取 100 mL 新鲜配置的 NaOH 溶液(浓度 4 mol/L)倒入反应瓶中, 63°C 水浴通氮除氧 30 min。然后将 36 mL 的 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (浓度为 0.5 mol/L)和 20 mL 的 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (浓度为 0.5 mol/L)混匀后倒入反应瓶中, 转速 300 r/min, 反应 1 h, 待其冷却后停氮。所得磁流体用蒸馏水洗至近中性, 将其浓度调至 20 mg/mL。

1.2.2 酵母细胞的磁修饰及表征

从斜面上勾取酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)在 YPD 固体培养基上划线得单菌落, 挑取一环单菌落接种种子液, 30°C、200 r/min 培养过夜。按 5%的比例转接至扩大培养基, 30°C、200 r/min 培养 24~36 h。8000 r/min 离心 5 min 收获菌体, 用灭菌蒸馏水洗涤 5 次, 制成 $OD_{600}=60$ 的酵母悬液, 煮沸灭活 2 min, 4°C 保存。分别将 300 μ L 铁磁流体与 100、200、300、400、500、600 μ L 的酵母悬液室温混匀后, 静置 15 min。然后用磁分离架对菌体磁分离 20 min, 若测定其上清液与相同浓度酵母细胞悬液离心后(8000 r/min, 5 min)上清液的 OD_{600} 差异不显著($P>0.05$), 表明酵母完全被磁分离。

将酵母、铁磁流体和磁修饰酵母在 80°C 真空干燥 24 h, 经溴化钾压片, 用傅立叶变换红外光谱仪分析测定。另取少量磁修饰酵母液滴到涂炭铜网上, 待水分蒸发后置于透射电镜(TEM)观察。

1.2.3 磁修饰酵母对染料的吸附

直接大红在酸性环境中易于吸附, 在碱性环境中易于脱吸附, 经紫外-可见分光光度计扫描表明, 其特征吸收峰分别为 563 nm 和 504 nm。用 2 mmol/L 盐酸(或 NaOH)的溶液配置 1 g/L 浓度的直接大红母液, 然后用 2 mmol/L 盐酸(或 NaOH)稀释成不同梯度(0、10、20、40、60、80、100 mg/L), 在 563 nm(或 504 nm)测定其吸光度, 然后以浓度 C 为横坐标, 吸

光值 A 为纵坐标, 绘制其 $C-A$ 标准曲线。染料吸附率 $= (A_0 - A_1) / A_0 \times 100\%$, A_0 为吸附前的染料溶液吸光度, A_1 为吸附后的染料溶液吸光度; 染料脱吸附率 $= W_1 / W_0 \times 100\%$, W_1 为染料脱吸附量, W_0 为染料吸附量。

1) 吸附材料浓度对染料吸附率的影响: 向 400 μL 染料中加入 0.2 mol/L 盐酸 10 μL , 再分别加入 20、40、60、80、100、150、200、250 μL 的铁磁流体, 酵母悬液或磁修饰酵母, 用蒸馏水补足至 1 mL, 混匀后, 振摇吸附 30 min, 测定吸附率。

2) 吸附时间对染料吸附率的影响: 向 400 μL 染料中加入 0.2 mol/L 盐酸 10 μL , 再分别加入达到最大吸附率所需最小量的铁磁流体、酵母悬液或磁修饰酵母, 用蒸馏水补足至 1 mL, 混匀后, 振摇吸附, 并测定其吸附反应后 1、3、5、8、20、30 min 的染料吸附率, 确定吸附时间曲线。

3) 吸附材料的染料脱吸附率测定: 吸附条件同 2), 振摇吸附 30 min, 测定吸附材料吸附量。弃上清, 用浓度为 20%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 的碱性乙醇溶液 1 mL (含 0.2 mol/L 的 NaOH 20 μL) 振摇洗脱 20 min, 测定脱吸附率。

2 结果与分析

2.1 酵母细胞的磁修饰

酵母的磁化曲线见图 1。由图可知, 磁菌比 1 时, 磁修饰酵母液磁分离后与酵母液离心后的上清液 OD_{600} 差值趋近于 0, 差异不显著 ($P > 0.05$), 表明

酵母已被完全磁分离。因此, 按磁菌体积 1:1 的比例制作磁修饰酵母。磁修饰前后酵母细胞的磁分离效果见图 2。由图可知, 外磁场对酵母悬液没有任何影响, 仍保持浑浊状态; 而磁修饰酵母悬液产生明显的磁分离现象, 悬液变得澄清。

2.2 磁修饰酵母的红外光谱

酵母、铁磁流体和磁修饰酵母的红外光谱见图 3。由图 3 可知, 3 种样品在 3424 cm^{-1} 左右均有明显吸收峰, 说明其表面均富含羟基。在 581 cm^{-1} 处, 磁性纳米颗粒吸收强烈, 代表 Fe-O 的特征峰^[15]; 尽管酵母细胞在该波长附近也有一定吸收, 但经磁化后, 该吸收峰强度明显加强, 表明酵母细胞已被 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒所修饰。此外, 由于酵母细胞壁富含多糖 (占细胞壁干重 85%)、少量蛋白质、脂肪和矿物质等成分, 表面基团种类较多, 因此酵母细胞和磁修饰酵母的红外光谱吸收峰较多。

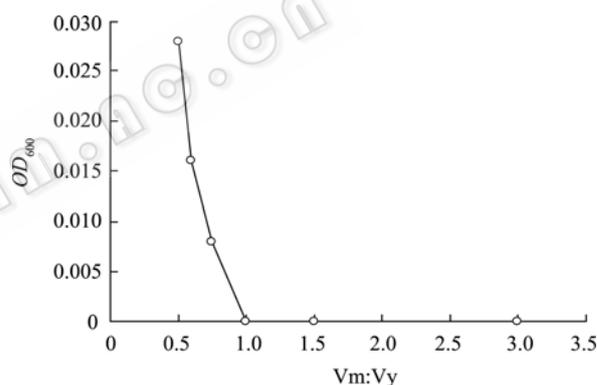


图 1 酵母细胞的磁修饰

Fig. 1 Yeast cells modified with magnetic fluid. Vm: volume of magnetic fluid; Vy: volume of yeast cells.

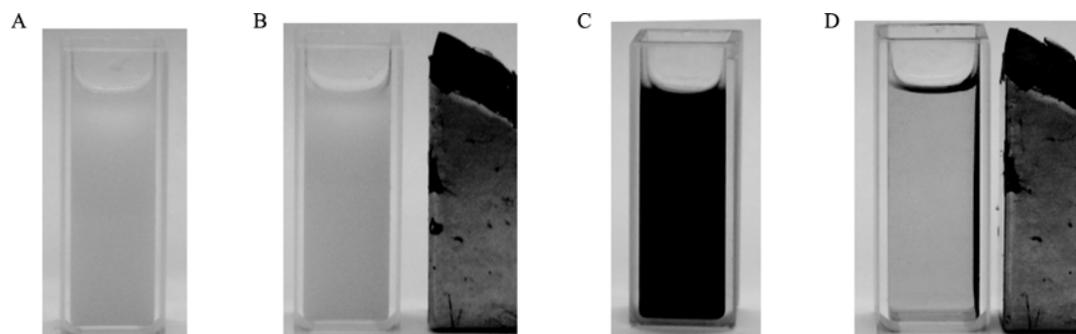


图 2 磁修饰酵母对外磁场的磁响应

Fig. 2 Response of magnetically modified yeast cells to external magnetic field. (A) Suspension of yeast cells. (B) A+external magnetic field. (C) Suspension of magnetically modified yeast cells. (D) C+external magnetic field.

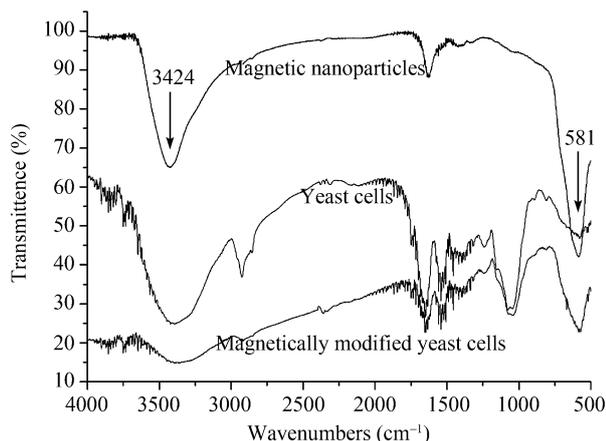


图3 磁修饰酵母的红外光谱

Fig. 3 Infrared spectroscopy of magnetically modified yeast cells.

磁修饰酵母的透射电镜图见图4。磁修饰酵母菌体完整,多数呈球形,细胞单个和成堆积聚。由于酵母细胞在磁化前经热处理灭活,细胞内容物变性皱缩,细胞壁作为结构性成分维持细胞形态,导致细胞壁和细胞膜分层明显。可清楚观察到在细胞壁上存在有大小较为均匀的磁性纳米颗粒,它们单个或成团聚集在酵母细胞表面,这与Azevedo等^[16]的报道相似。由于水相合成的磁性纳米粒子容易发生聚集,尽管在修饰前经过超声处理,透射电镜照片显示纳米磁性颗粒仍发生一定程度的聚集。

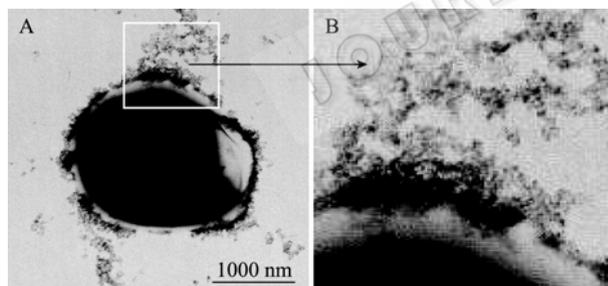


图4 磁修饰酵母的透射电镜图

Fig. 4 TEM of magnetically modified yeast cell.

2.4 磁修饰酵母对直接大红的吸附

2.4.1 吸附材料浓度对染料吸附率的影响

酵母、铁磁流体和磁修饰酵母浓度对染料吸附率的影响见图5。结果表明,在0.4 mg/mL染料浓度下,染料吸附率达到98%以上时的最低吸附剂用量分别为:酵母细胞200 μ L、铁磁流体100 μ L和磁修饰酵母160 μ L,其吸附率分别达到98.6%、99.89%和100%。160 μ L的磁修饰酵母是由各80 μ L的酵母

和铁磁流体组成,它们对色素吸附率分别为59.87%和95.45%,表明酵母细胞和铁磁流体复合后,不仅可实现吸附剂与溶液的磁分离,还具有对染料更高的吸附能力。

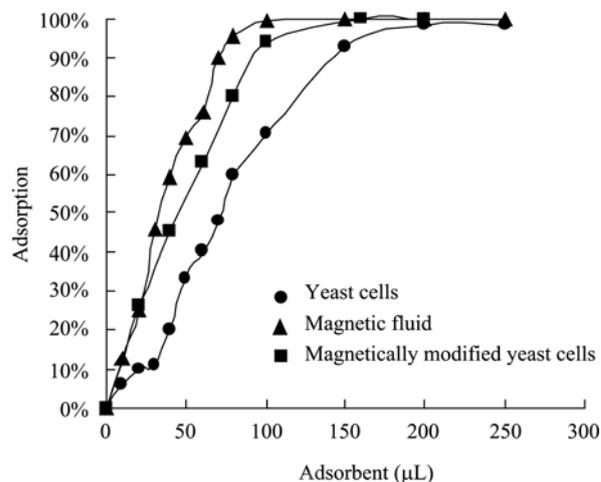


图5 吸附材料浓度对吸附率的影响

Fig. 5 Effects of adsorbent concentration on adsorption.

2.4.2 吸附时间对染料吸附率的影响

根据2.4.1的实验结果确定反应体系,测定3种吸附材料吸附色素的时间曲线,结果见图6。结果表明,细胞染料吸附率随时间延长而缓慢上升,吸附30 min后,吸附率仅为81.47%;而铁磁流体吸附1 min后,即进入吸附平衡期,色素吸附率高达99.46%,接近完全吸附;磁化菌吸附1 min后的吸附率也高达93.55%,8 min后,进入吸附平衡期,其色素吸附率高达99.64%,接近完全吸附。可见,磁修饰酵母不仅对染料的吸附能力强,而且染料吸附速度比酵母明显提高。

2.4.3 吸附材料的染料脱吸附率测定

三种吸附材料吸附平衡饱和后,在不同浓度的碱性乙醇溶液中的脱吸附率测定,结果见图7。结果表明,酵母、铁磁流体和磁修饰酵母在乙醇浓度分别为60%、80%和70%时,达到其最高脱吸附率,分别为55.17%、96.79%和99.18%。酵母细胞的脱吸附率最低,可能是由于吸附的染料进入细胞内而不易被重新释放造成的。铁磁流体和磁修饰酵母,可能是因为染料被吸附在吸附材料表面,而几乎没有进入内部。因此,在适当条件下,易于洗脱,二者染料的脱吸附率接近100%。

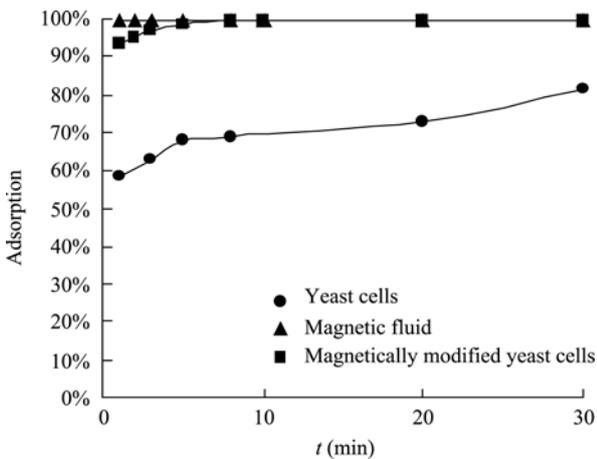


图 6 吸附材料的吸附时间曲线

Fig. 6 Adsorption time curve of adsorbents.

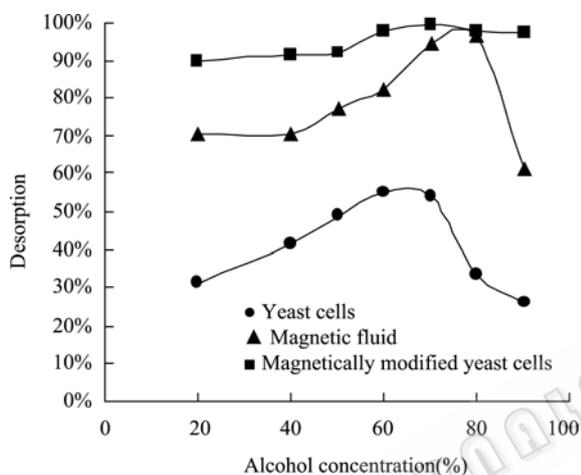


图 7 乙醇浓度对脱吸附作用的影响

Fig. 7 Effects of alcohol concentration on adsorbents' desorption.

3 讨论

作为一种有前景的吸附剂, 微生物可用于移除包括染料在内的各种类型有毒异型生物质。特别是, 已有研究将几种类型的酵母用于染料的生物吸附和生物降解。饲用酵母作为一种非致病性、廉价和易于利用的生物质资源, 在染料废污处理方面有显著的潜力。为了改进生物吸附的操作, 可对其进行简单的磁修饰。这些材料具有超顺磁性, 置于磁场时, 表现出磁学特性, 形成稳定的胶体悬浮液, 在无磁场时不容易沉降或聚集。普通的微生物细胞能被多种磁性纳米颗粒所修饰, 如铁磁流体在细胞表面的非特异性沉积^[17], 磁赤铁矿($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)或磁铁矿

(Fe_3O_4)颗粒与细胞表面的结合^[18-19], 免疫磁性(Immunomagnetic)纳米或微米颗粒在细胞表面形成顺磁性复合物^[20], 采用磁性载体的共价或交联固定^[21], 以及通过对磁性颗粒的诱捕形成具有生物相容性的聚合体^[22]。

Šafařík 等^[9,23]使用经高氯酸处理的纳米级铁磁流体作为磁性修饰剂, 在乙酸缓冲液中将 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒固定在酿酒酵母 (*Saccharomyces cereviside*)和脆壁克鲁维酵母(*Kluyveromyces fragilis*)细胞表面, 然后将磁化后的细胞用于染料吸附研究。而本实验将酿酒酵母和 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒按比例直接混合, 即得到磁修饰酵母, 简单快速, 减少了化学试剂的使用。而对于磁修饰细胞性质, 目前主要采用电镜观察和电子顺磁共振谱进行表征。Safarik 等^[23]、Yavuz 等^[24]和 Safarikova 等^[25]对酵母和小球藻(*Chlorella vulgaris*)细胞磁修饰后的分析均表明, 大量的铁磁流体集聚在单个细胞表面, 使得细胞表面相当粗糙, 整个复合体表现出较强的和对热稳定的超顺磁性。本研究结果与上述报道基本一致, 即磁修饰细胞增加了外表面积, 表现出较强的磁响应特性, 且通过红外光谱进一步证实其增加了来自于铁磁流体的 Fe-O 含量。可见, 磁修饰酵母的磁学行为由纳米磁性粒子决定, 而这种磁响应性质对其作为吸附剂对染料进行吸附和脱吸附的可控操作至关重要。

Šafařík 等^[16]研究认为, 即便是染料结构的微小变化, 都可能影响磁修饰酵母的吸附效果, 但仍对多种染料表现出较强的吸附能力, 如磁修饰酵母对苯胺蓝(Aniline blue)的吸附量最高可达 220 mg/g 磁修饰酵母干重。在本实验条件下, 磁修饰酵母对直接大红的吸附量最高可达 262 mg/g 磁修饰酵母干重, 也表现出对染料很强的吸附能力。此外, 本研究首次研究了磁修饰酵母对染料的吸附速度, 表明磁修饰酵母在 8 min 即达到吸附平衡, 较之其他类染料吸附剂, 大大缩短操作时间, 提高了污水处理效率, 这些特点非常有利于在工业上应用。

作为一种染料污水处理的新方法新手段, 使用酿酒业生产过程中能够产生的大量废酿酒酵母, 材料廉价、易于获得, 经磁性修饰后, 具有染料吸附

能力强、吸附平衡时间短、磁分离简单的优点。因此,磁性修饰微生物将改变传统的生物吸附,在水溶性染料废水处理和环境保护方面具有广阔的应用前景。

REFERENCES

- [1] Zollinger H. Azo dyes and pigments. Colour Chemistry: Synthesis, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments. New York: Wiley-VCH, 1987: 92–100.
- [2] Han CX, Cao M, Zhang BG. Progress of flocculation applied to dyeing wastewater treatment. *Ind Water Treat*, 2006, **26**(9): 73–76.
韩长秀, 曹梦, 张宝贵. 絮凝法在印染废水处理中的应用进展. *工业水处理*, 2006, **26**(9): 73–76.
- [3] Banat IM, Nigam P, Singh D, *et al.* Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. *Bioresource Technol*, 1996, **58**(3), 217–227.
- [4] Ma ZC, Jiang LH, Dong LL. Study on decolorization of direct red-containing wastewater by fresh MnO₂ adsorption. *Environ Prot Chem Ind*, 2002, **22**(1): 38–41.
马子川, 蒋兰宏, 董丽丽. 新生二氧化锰吸附法去除水中直接大红染料. *化工环保*, 2002, **22**(1): 38–41.
- [5] Wang CT, Wang Q, He QH, *et al.* A study on the treatment of direct scarlet dye wastewater by chlorine dioxide catalytic oxidation on active carbon carrier. *Dyes Color*, 2006, **43**(3): 49–52, 55.
王承涛, 王琼, 贺启环, 等. 活性炭载体下二氧化氯催化氧化直接大红染料废水研究. *染料与染色*, 2006, **43**(3): 49–52, 55.
- [6] Bai B, Chen ZH, Wang LP. Treatment of direct scarlet 4BE dye wastewater by the hybrid method of Fe/C microelectrolysis and ultrasound radiation. *Appl Chem Ind*, 2007, **36**(2): 130–133.
白波, 陈志红, 王莉平. 超声波/铁-炭微电解耦合处理直接大红 4BE 染料废水. *应用化工*, 2007, **36**(2): 130–133.
- [7] Fortaleza, Ceará Brazil. Biosorption: a solution to pollution? *Int Microbiol*, 2000, **3**: 17–24.
- [8] Aksu Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. *Process Biochem*, 2005, **40**(3/4): 997–1026.
- [9] Šafařík I, Ptáčková L, Šafaříková M. Adsorption of dyes on magnetically labeled baker's yeast cells. *Eur Cells Mater*, 2002, **3**(Suppl. 2): 52–55.
- [10] Aksu Z. Reactive dye bioaccumulation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem*, 2003, **38**(10): 1437–1444.
- [11] Safarik I, Safarikova M. Magnetic nanoparticles and biosciences. *Monatsh Chem*, 2002, **133**(6): 737–759.
- [12] Safarik I, Safarikova M. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *BioMagn Res Technol*, 2004, **2**(1): 7.
- [13] Safarik I, Safarikova M. Magnetically modified microbial cells: a new type of magnetic adsorbents. *China Particuol*, 2007, **5**(1/2): 19–25.
- [14] Shan Z, Yang WS, Zhang X, *et al.* Preparation and characterization of carboxyl-group functionalized superparamagnetic nanoparticles and the potential for bio-applications. *J Braz Chem Soc*, 2007, **18**(7): 1329–1335.
- [15] Manoharan C, Venkatachalapathy R, Dhanapandian S, *et al.* FTIR and Mössbauer spectroscopy applied to study of archaeological artefacts from Maligaimedu, Tamil Nadu, India. *Indian J Pure Ap Phy*, 2007, **45**(10): 860–865.
- [16] Azevedo RB, Silva LP, Lemos APC, *et al.* Morphological study of *Saccharomyces cerevisiae* cells treated with magnetic fluid. *IEEE T Magn*, 2003, **39**(5): 2660–2662.
- [17] Safarikova M, Ptackova L, Kibrikova I, *et al.* Biosorption of water soluble dyes on magnetically modified *Saccharomyces cerevisiae* sub sp. *uvarum* cells. *Chemosphere*, 2005, **59**(6): 831–835.
- [18] Dauer RR, Dunlop EH. High-gradient magnetic separation of yeast. *Biotechnol Bioeng*, 1991, **37**(11): 1021–1028.
- [19] Sze KF, Lu YJ, Wong PK. Removal and recovery of copper ion (Cu²⁺) from electroplating effluent by a bioreactor containing magnetite-immobilized cells of *Pseudomonas putida* 5X. *Resour Conserv Recy*, 1996, **18**(1/4): 175–193.
- [20] Safarik I, Safarikova M. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *J Chromatogr B*, 1999, **722**(1/2): 33–53.
- [21] Safarikova M, Atanasova N, Ivanova V, *et al.* Cyclodextrin glucanotransferase synthesis by semicontinuous cultivation of magnetic biocatalysts from cells of *Bacillus circulans* ATCC 21783. *Process Biochem*, 2007, **42**(10): 1454–1459.
- [22] Brady D, Nigam P, Marchant R, *et al.* Ethanol production at 45°C by *Kluyveromyces marxianus* IMB3 immobilized in magnetically responsive alginate matrices. *Biotechnol Lett*, 1996, **18**(10): 1213–1216.
- [23] Safarik I, Rego LFT, Borovska M, *et al.* New magnetically responsive yeast-based biosorbent for the efficient removal of water-soluble dyes. *Enzyme Microb Tech*, 2007, **40**(6): 1551–1556.
- [24] Yavuz H, Denizli A, Güngönes H, *et al.* Biosorption of mercury on magnetically modified yeast cells. *Separat Purif Technol*, 2006, **52**(2): 253–260.
- [25] Safarikova M, Pona BMR, Mosiniewicz-Szablewska E, *et al.* Dye adsorption on magnetically modified *Chlorella vulgaris* cells. *Fresen Environ Bull*, 2008, **17**(4): 486–492.