

生物表面活性剂对河道底泥重金属的淋洗效果比较

陈再, 陈维芳, 何飞飞, 曲妍

(上海理工大学 环境与建筑学院, 上海 200093)

摘要: 为了比较生物表面活性剂性质、活性剂浓度和淋洗时间等对河道底泥中重金属淋洗效果的影响。研究中选取了3种不同的生物活性剂即茶皂素、皂角苷和槐糖脂。研究表明:活性剂不同,淋洗效果不同;生物活性剂的胶束形成性质会影响淋洗效果;在3种活性剂中,临界胶束浓度低的槐糖脂淋洗效果最好;此外,活性剂浓度为8%时,淋洗效果已达到最佳。淋洗时间对淋洗效果的研究则证明:茶皂素、皂角苷和槐糖脂对重金属淋洗动力学过程可以用Elovich方程进行描述,淋洗过程为非均相扩散过程。研究中还分析了淋洗前后重金属形态,淋洗可以有效去除底泥中弱结合态(离子交换态和碳酸盐结合态)重金属,使得强结合态的重金属所占比例增加,从而降低重金属的生物有效性。

关键词: 生物表面活性剂; 茶皂素; 皂角苷; 槐糖脂; 淋洗; 重金属; 河道底泥

中图分类号: X131.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-643X(2017)06-0056-06

Comparison of biosurfactants for heavy metals washing from river sediment

CHEN Zai, CHEN Weifang, HE Feifei, QU Yan

(School of Environment and Architecture, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: In order to investigate the effects of biosurfactant properties, concentration and time on the removal of heavy metals from river sediment, three different bio-active agents, tea saponin, saponin and sophorolipid were selected for the study. Results indicate that washing efficiency varied among these biosurfactants. Critical micelle concentration (CMC) of biosurfactant had a significant effect on washing efficiency. Biosurfactant with the lowest CMC, i. e. sophorolipid, manifested the highest washing efficiency. In addition, washing efficiency reached its optimum at a concentration of 8%. Study on washing time to leaching effect showed that Elovich equation describe well the kinetics of washing by tea saponin, saponins and sophorolipid which means that heavy metal washing involved multi-phase diffusion. Forms of heavy metal before and after washing were also analyzed. Biosurfactant washing was effective in removing weakly-bound (ion exchangeable and carbonated-bound) heavy metal thus increased the proportion of strongly-bound ones and reduced the bioavailability of heavy metals.

Key words: biosurfactant; tea saponin; saponin; sophorolipid; washing; heavy metals; river sediment

1 研究背景

工业快速发展和人类频繁活动导致河流、湖泊等底泥受到重金属的严重污染^[1]。与有机污染物相比,重金属污染具有持久性、隐蔽性以及生物毒性等^[2-3]。目前,底泥重金属污染修复方法主要有固化/稳定法^[4]、植物法^[5]和淋洗法^[6]等。其中淋洗

法因其工艺简单、周期短、效率高受到越来越多地重视^[7]。选择合适的淋洗剂是淋洗法的关键。常用的淋洗剂主要有酸^[8]、螯合剂^[9]和生物表面活性剂^[10]等。

生物表面活性剂是来源于植物、动物或微生物等具有表面活性的一类物质。因其易生物降解、环境相容性好、二次污染少、在底泥或土壤重金属淋洗修复方面有广泛应用。时进钢等^[11]研究了铜绿假

收稿日期:2017-07-07; 修回日期:2017-07-20

基金项目:上海市自然科学基金项目(14ZR1428900);上海市科委能力建设项目(13230502300);教育部留学回国科研启动基金项目(SEM2013)

作者简介:陈再(1991-),男,湖北咸宁人,硕士研究生,研究方向为底泥资源化利用。

通讯作者:陈维芳(1972-),女,浙江诸暨人,博士,副教授,硕士生导师,主要从事水污染控制方面研究。

单胞菌产生的鼠李糖脂生物表面活性剂对沉积物中重金属的去除,Cd 和 Pb 的去除效率分别达到了 80.1% 和 36.5%。Hong 等^[12]研究了皂素对 3 种重金属污染的土壤的淋洗效果,Cu 和 Zn 的去除率分别达到 90% ~ 100% 和 85% ~ 98%。Mulligan 等^[13]比较了不同生物活性剂的淋洗能力,鼠李糖脂、莎梵婷和槐糖脂等对土壤中 Cu 的去除率分别为 65%、25% 和 15%;对 Zn 的去除率为 60%、65% 和 15%。

目前,许多土壤或底泥重金属淋洗修复主要集中在离子型生物表面活性剂。但离子型表面活性剂要克服静电斥力,与非离子型生物表面活性剂相比更难形成胶束^[14]。而非离子型生物表面活性剂有临界胶束浓度低、增溶作用强、低毒等优点,与离子型生物活性剂相比有一定优势。因此,本研究将探

讨 3 种植物源非离子型生物表面活性剂茶皂素、皂角苷和槐糖脂对河道底泥中重金属的淋洗效果,比较不同生物活性剂的淋洗能力和淋洗动力学。

2 材料与方法

2.1 实验材料

底泥来自上海黄浦江复兴岛支流河道。底泥去除杂物后自然风干、磨碎,过 100 目筛后于 4℃ 温度下保存。表 1 为底泥的基本性质。

生物表面活性剂茶皂素(纯度为 70%)、皂角苷(纯度为 80%)、槐糖脂(纯度为 98%) 则分别购自西安小草科技有限公司、湖北兴银河化工有限公司以及西安康诺化工有限公司;其他化学试剂如硝酸、醋酸铵等均为分析纯,生产自国药集团化学试剂有限公司。

表 1 底泥性质

pH	电导率/($\mu\text{s} \cdot \text{cm}^{-1}$)	有机质质量分数/%	Cu/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Cd/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Cr/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Pb/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)
6.65	447	4.5	309.4	331.5	288.6	513.4

2.2 实验方法

2.2.1 淋洗剂浓度对淋洗效果的影响 分别称取 5 g 河道底泥于 7 个 250 mL 锥形瓶中,加入 100 mL 初始 pH 为 5.0,浓度分别为 0、0.8%、2.0%、4.0%、5.0%、7.0% 和 8.5% (质量分数) 的茶皂素、皂角苷或槐糖脂溶液。混合液在回转式摇床连续振荡 24 h (25℃,150 rpm)后,离心分离。上清液经 0.45 μm 滤膜过滤后,用等离子体发射光谱仪(ICP - OES, optima8000PE, PerkinElmer 公司,美国)测定滤液中重金属 Cu、Cd、Cr、Pb 浓度。

2.2.2 淋洗时间对淋洗效果的影响 分别称取 5 g 河道底泥于 7 个 250 mL 锥形瓶中,加入 100 mL 初始 pH 为 5.0,浓度为 8% 的茶皂素、皂角苷或槐糖脂溶液。混合液分别振荡 0.25、1、2、6、12、24、48 h 后离心分离。上清液经 0.45 μm 滤膜过滤后测定滤液中重金属 Cu、Cd、Cr、Pb 浓度。

2.2.3 重金属形态分析 底泥中重金属的形态分布采用 Tessier^[15] 五步连续提取法测定,根据每一步提取剂的不同,底泥中重金属形态可分为离子交换态(F1):1 mol/L MgCl_2 (pH = 7.0);碳酸盐结合态(F2):1 mol/L NaAC (pH = 5.0);铁锰氧化物结合态(F3):0.04 mol/L 溶于乙酸的 $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ (体积浓度 = 25%);有机结合态(F4):0.02 mol/L HNO_3 , H_2O_2 (30%), 3.2 mol/L 溶于 HNO_3 (20%)

的 NH_4AC ;残渣态(F5): HNO_3 (65%), H_2O_2 (30%) 和 HF(40%) 混合液。

重金属形态分布百分比计算公式如下:

$$F = \frac{c \times v}{m \times h} \times 100\% \tag{1}$$

式中: m 为底泥样品的质量, g; c 为提取液中重金属浓度, mg/L; v 为提取液经定容后的体积, mL; h 为底泥重金属总量, mg/kg。

3 结果分析与讨论

3.1 淋洗前底泥重金属的形态分布

原底泥中浓度最高的有 4 种重金属为 Cu、Cd、Cr 和 Pb。因此,本研究中主要针对这 4 种金属。图 1 为淋洗前这 4 种金属在底泥中的形态分布。

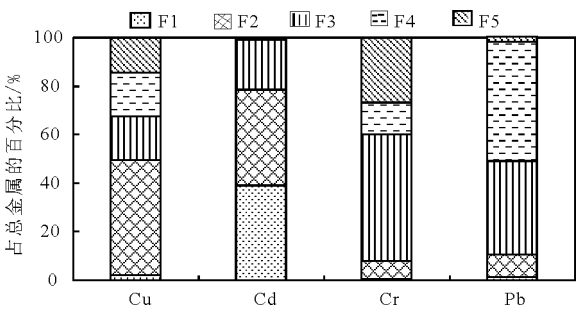


图 1 淋洗前底泥重金属的形态分布

由图 1 可知,不同重金属的形态分布不同。Cu

主要以碳酸盐结合态(F2)形式存在,占总 Cu 的 47.4%。Cd 则主要为离子交换态(F1)和碳酸盐结合态(F2),两者占总 Cd 的 78.4%。51.9% 的 Cr 则以铁锰氧化物结合态(F3)形式存在,其次为残渣态,占 26.7%。Pb 主要以铁锰氧化物结合态(F3)和有机结合态(F4)形式存在,分别占 38.5% 和 48.9%。重金属结合形态中,离子交换态(F1)和碳酸盐结合态(F2)属于弱结合态,这两组分重金属与土壤或底泥结合较弱,易被释放,而其余 3 种形态为强结合态。因此,本研究底泥中 Cu 和 Cd 以弱结合态为主,而 Cr 和 Pb 以强结合态为主。此外,重金属的毒性和生物有效性与重金属的形态分布有关^[16]。重金属的生物有效态主要是离子交换态与碳酸盐结合态。这些形态所占百分比越大,对环境的风险越大。根据重金属

生物有效态所占百分比大小,4 种重金属对环境的风险大小为: Cd > Cu > Pb > Cr。

3.2 淋洗剂浓度对重金属淋洗效果的影响

图 2 为不同浓度的茶皂素,皂角苷,槐糖脂对重金属淋洗效果。由图 2 可知,表面活性剂浓度低时,重金属的去除率随着浓度的增加而增加。但当活性剂浓度增至 8% 以上后,浓度增加,去除率增加变缓。表面活性剂对重金属的淋洗机理主要是通过底泥中重金属形成络合物,络合物从固相转移到液相,达到去除目的^[17]。淋洗剂浓度增加,重金属与淋洗剂的结合机会增多,重金属的去除效果提高。但达到一定浓度后,重金属与淋洗剂的结合基本达到饱和,浓度再增加,淋洗效果不再增加。从研究结果看,淋洗剂浓度为 8% 时,就基本达到最佳。

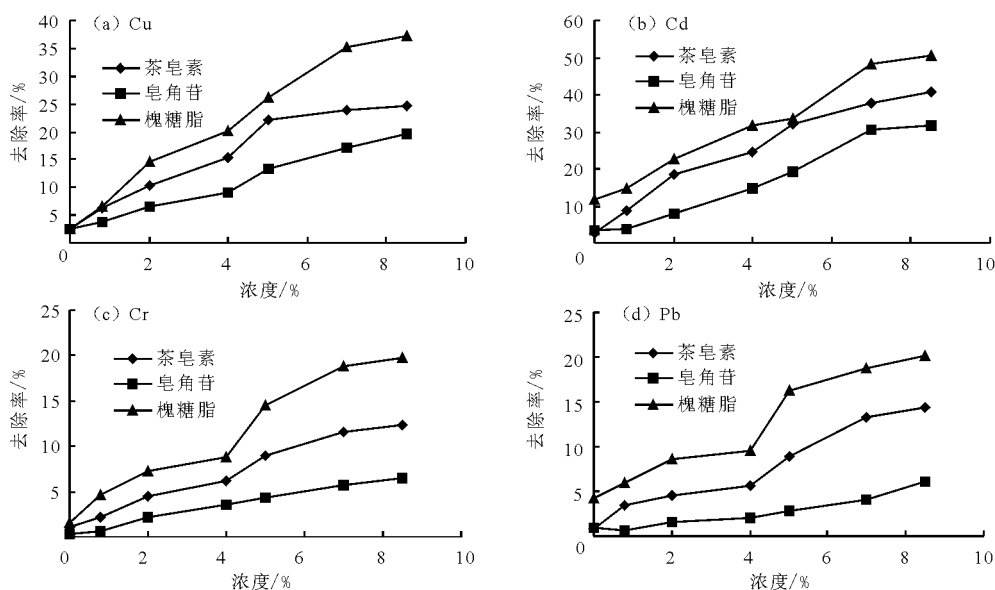


图 2 生物活性剂浓度对重金属去除效果的影响

活性剂不同,淋洗效果也不同。对 3 种生物表面活性剂比较得知,相同浓度下,槐糖脂对所有重金属的淋洗效果都要好于茶皂素,皂角苷最差。这可能与淋洗剂本身胶束形成性质有关,茶皂素,皂角苷和槐糖脂的临界胶束浓度分别为 0.53、0.50 和 0.047~0.070 g/L^[18]。临界胶束浓度低,说明在较低浓度下表面活性剂就开始形成胶束并解吸重金属^[19]。槐糖脂在低浓度下就开始形成胶束,这有助于重金属的淋洗,因此淋洗效果也最好。

此外,重金属不同,淋洗剂的淋洗效果也不同。3 种淋洗剂对 Cu 和 Cd 的去除效果均要好于 Cr 和 Pb。根据底泥中重金属分布形态(图 1),Cu 和 Cd 主要以弱结合态形式存在,Cr 和 Pb 则以强结合态为主。重金属的淋洗效果与重金属原始分布形态有

关,弱结合态金属更容易被淋洗。

3.3 活性剂对重金属淋洗的动力学研究

图 3 为淋洗时间对重金属去除效果的影响。3 种淋洗剂对重金属的淋洗速度都较快,淋洗在 6 h 内就已基本完成。淋洗时间再增加,重金属去除效果没有明显变化。Bermond 等^[20]研究表明,重金属的淋洗过程可分为两个阶段:快速解吸阶段和慢速解吸阶段。茶皂素和皂角苷的快速解吸阶段约为 6 h,6 h 后转变为慢速解吸阶段;槐糖脂对重金属的快速解吸阶段仅需 2 h,然后进入慢速解吸阶段。

研究中还对重金属的淋洗动力学进行探讨。Elovich、双常数和一级动力学方程是常用的描述底泥或土壤中重金属吸附/解吸动力学的方程^[21]:

Elovich 方程:

$$q_t = \frac{1}{\beta} \ln(\alpha\beta) + \frac{1}{\beta} \ln(t)$$

(2)

双常数方程:

$$q_t = at^b$$

(3)

一级动力学方程:

$$\ln q_t = \ln q_e + kt$$

(4)

式中: q_t 历时 t 重金属淋洗量,mg/kg; q_e 为平衡时重金属淋洗量,mg/kg; t 为淋洗时间,h; α 、 β 为 Elovich 方程的动力学参数,mg/kg · h、mg/kg; a 、 b 为双常数方程的动力学参数,mg/(kg · h) ^{b} 、kg/mg; k 为一级动力学方程的速率常数,h⁻¹。

Elovich 方程为经验式,用来描述溶质在溶液本体或界面处的扩散以及表面的活化与去活化作用等,多用于描述磷素吸附与解吸、磷矿石溶解、重金属吸附与解吸的动力学过程^[22]。方程的解吸常数 α 和 β 分别代表重金属的解吸速率, α 越大或 β 越小,重金属的解吸速率越大。

双常数方程也是经验式。主要用于磷、砷等含氧酸根和重金属的吸附与解吸动力学^[23]。双常数

方程的解吸参数 a 的物理意义为 1 h 时,淋洗剂对底泥中重金属的淋洗量。 a 越大,说明单位时间内该淋洗剂对重金属的淋洗量越多; b 的物理意义为实际吸附量达到 1 h 吸附量的 36.8% 时所需的时间对数的负倒数。 b 越小,说明需要的时间越短,解吸速率越快。另外, Garrido 等^[24] 研究发现,当 a 、 ab 增大,而 b 减小时,解吸速率加快。

一级动力学方程主要适用于由扩散机制控制的动力学过程,其中解吸速率常数 k 只是温度的函数,与反应物浓度无关^[25]。

表 2~4 列举了茶皂素,皂角苷和槐糖脂的重金属解吸动力学拟合结果。相关系数(R^2)表示数据与方程的拟合程度。根据相关系数,3 种淋洗剂对重金属的淋洗结果拟合程度均为: Elovich 方程 > 双常数方程 > 一级动力学方程。说明 Elovich 方程更适合用来描述底泥中重金属淋洗。根据 Elovich 方程,3 种淋洗剂对重金属淋洗过程为非均相扩散过程。这与底泥的复杂性和非均一性有关。

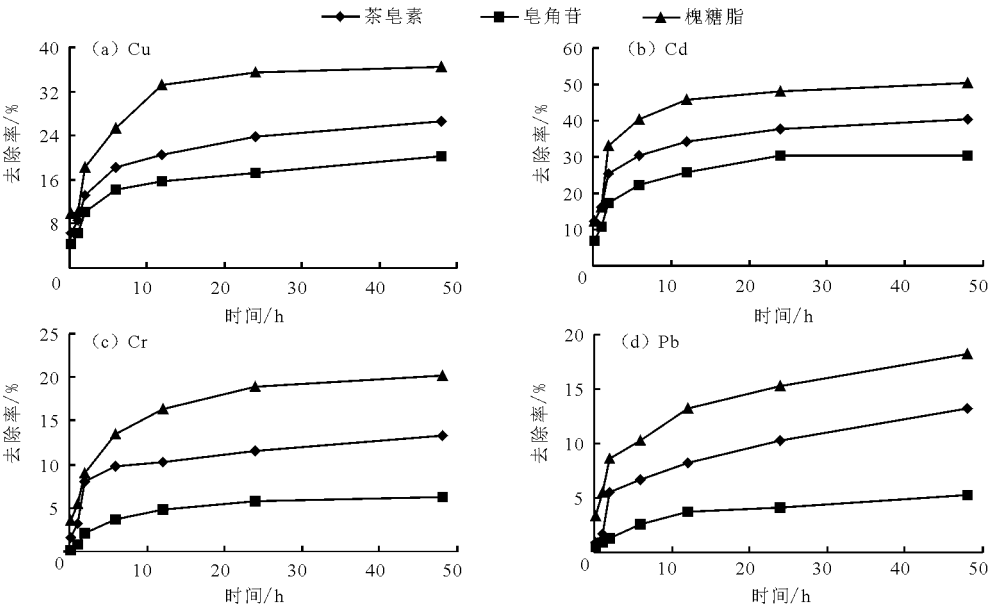


图 3 淋洗时间对重金属去除效果的影响

表 2 茶皂素对底泥重金属的解吸动力学参数

重金属	Elovich 方程			双常数方程				一级动力学方程		
	α	β	R^2	a	b	ab	R^2	q_e	k	R^2
Cu	3624.01	0.063	0.97	87.58	0.13	11.39	0.61	97.73	0.008	0.11
Cd	6125.86	0.032	0.94	165.50	0.13	21.52	0.66	185.58	0.008	0.15
Cr	73.33	0.860	0.93	21.94	0.30	6.58	0.85	29.07	0.019	0.46
Pb	97.15	0.420	0.92	71.04	0.20	14.21	0.70	85.90	0.012	0.17

表 3 皂角苷对底泥重金属的解吸动力学参数

重金属	Elovich 方程			双常数方程				一级动力学方程		
	α	β	R^2	a	b	ab	R^2	q_e	k	R^2
Cu	3828.44	0.094	0.95	35.97	0.094	3.38	0.85	37.85	0.007	0.48
Cd	4450.45	0.025	0.91	64.90	0.12	7.79	0.73	70.91	0.009	0.27
Cr	172.15	0.550	0.96	8.13	0.17	1.38	0.91	9.18	0.013	0.58
Pb	83.21	0.290	0.93	10.35	0.23	2.38	0.90	12.07	0.018	0.76

表 4 槐糖脂对底泥重金属的解吸动力学参数

重金属	Elovich 方程			双常数方程				一级动力学方程		
	α	β	R^2	a	b	ab	R^2	q_e	k	R^2
Cu	4010.34	0.012	0.92	47.31	0.13	6.31	0.66	52.71	0.008	0.15
Cd	5240.93	0.058	0.97	75.73	0.16	12.11	0.69	85.90	0.010	0.21
Cr	127.30	0.310	0.90	7.22	0.26	1.92	0.82	9.33	0.016	0.31
Pb	191.81	0.330	0.94	12.90	0.17	2.20	0.76	14.67	0.011	0.32

比较 Elovich 方程的解吸速率常数 α 和 β 。3 种淋洗剂对 Cu 和 Cd 的解吸速率常数 α 要明显高于 Cr 和 Pb。相反,Cr 和 Pb 的 β 值则相对较高。说明 Cu 和 Cd 的解吸或淋洗速率要明显高于 Cr 和 Pb。而这也可能是由于重金属的初始分布形态决定的。弱结合态的 Cu 和 Cd 能更快的被解吸。根据解吸速率常数,槐糖脂的解吸速率也要高于茶皂素和皂角苷。

3.4 淋洗后底泥重金属形态的变化

图 4 为经茶皂素、皂角苷和槐糖脂淋洗后底泥中 Cu、Cd、Cr、Pb 的形态分布。淋洗主要去除的是碳酸盐结合态(F2)的 Cu,茶皂素、皂角苷和槐糖脂淋洗后,底泥中碳酸盐结合态的 Cu 分别减少了

25%、14%和 39%。而 Cd 主要以离子交换态(F1)和碳酸盐结合态(F2)形式存在。淋洗后,两种形态的 Cd 总共分别减少了 53%、23%和 70%。Cr 和 Pb 主要为铁锰氧化物结合态、有机物结合态和残渣态。从淋洗后重金属形态分布可知,生物活性剂对铁锰氧化物结合态和有机物结合态的重金属也能有效进行去除。这两种结合态的 Cr 和 Pb 均有所降低,使得最强结合态的残渣态的比例增加。总之,经淋洗后,底泥中 Cu、Cd、Cr、Pb 的离子交换态和碳酸盐结合态大幅降低,重金属的生物有效性大大降低,对生态的毒性也降低。特别是 Cr 和 Pb,淋洗后基本没有离子交换态和碳酸盐结合态重金属存在,基本为强结合态。

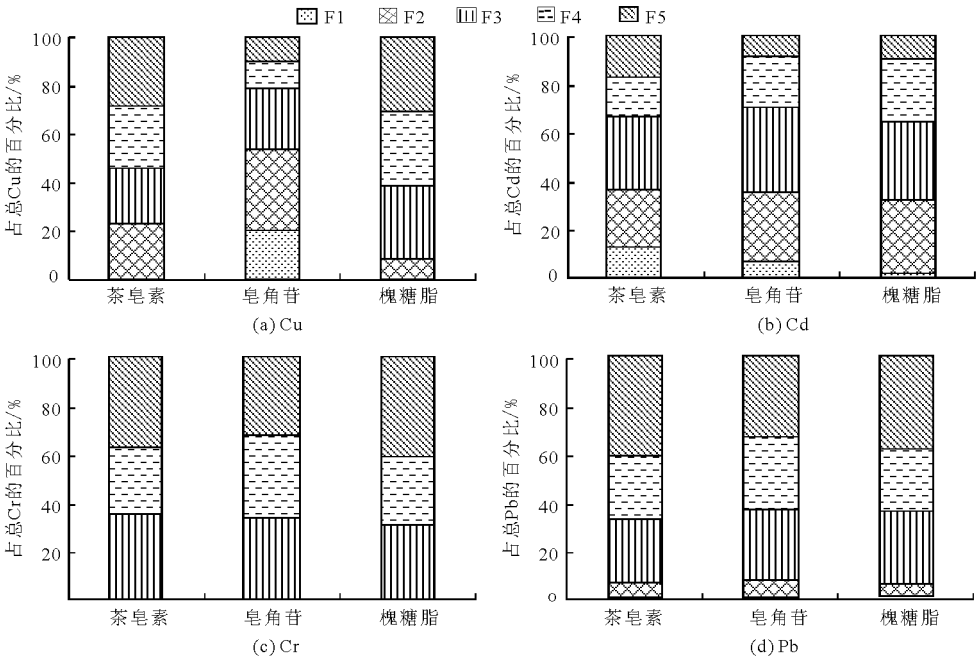


图 4 淋洗后底泥中重金属形态分布

4 结 论

(1) 生物活性剂能有效去除底泥中的重金属。但淋洗效率和淋洗速率跟重金属在底泥中的分布形态有关。弱结合态的重金属更易被淋洗。淋洗后底泥中重金属的生物有效性降低,生态毒性降低。

(2) 重金属的淋洗效果与淋洗液浓度,淋洗时间等有关。Elovich 方程能够很好地描述茶皂素、皂角苷和槐糖脂对重金属 Cu、Cd、Cr、Pb 的解吸动力学,说明淋洗过程为非均相扩散过程。

(3) 淋洗剂不同,淋洗效果也不同。3 种淋洗剂中,槐糖脂的重金属去除率和淋洗速率都是最佳。这可能与活性剂的胶束形成性质有关。

参考文献:

- [1] Mokhtar N F, Aris A Z, Praveena S M. Preliminary study of heavy metal (Zn, Pb, Cr, Ni) contaminations in Langat River Estuary, Selangor[J]. *Procedia Environmental Sciences*, 2015, 30:285 – 290.
- [2] Xu P, Zeng G M, Huang D L, et al. Adsorption of Pb(II) by iron oxide nanoparticles immobilized *Phanerochaete chrysosporium*: Equilibrium, kinetic, thermodynamic and mechanisms analysis[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2012, 203(5):423 – 431.
- [3] He Y, Men Bin, Yang Xiaofang, et al. Investigation of heavy metals release from sediment with bioturbation/bioirrigation[J]. *Chemosphere*, 2017, 184:235 – 243.
- [4] Kim H T, Lee T G. A simultaneous stabilization and solidification of the top five most toxic heavy metals (Hg, Pb, As, Cr, and Cd)[J]. *Chemosphere*, 2017, 178:479 – 485.
- [5] Gupta P, Diwan B. Bacterial exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies[J]. *Biotechnology Report*, 2017, 13(C):58 – 71.
- [6] 王蒙蒙, 吕文英, 姚琨, 等. 焦磷酸钾对铜污染土壤的淋洗修复[J]. *环境工程学报*, 2017, 11(2):1211 – 1216.
- [7] Dermont G, Bergeron M, Mercier G, et al. Soil washing for metal removal: A review of physical/chemical technologies and field applications[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 152(1):1 – 31.
- [8] Moon D H, Lee J R, Wazne M, et al. Assessment of soil washing for Zn contaminated soils using various washing solutions[J]. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2012, 18(2):822 – 825.
- [9] Leštan D, Luo C L, Li X D. The use of chelating agents in the remediation of metal-contaminated soils: A review[J]. *Environmental Pollution*, 2008, 153(1):3 – 13.
- [10] Mulligan C N. Environmental applications for biosurfactants[J]. *Environmental Pollution*, 2005, 133(2):183 – 198.
- [11] 时进钢, 袁兴中, 曾光明, 等. 鼠李糖脂对沉积物中 Cd 和 Pb 的去除作用[J]. *环境化学*, 2005, 24(1):55 – 58.
- [12] Hong K J, Tokunaga S, Kajiuchi T. Evaluation of remediation process with plant-derived biosurfactant for recovery of heavy metals from contaminated soils[J]. *Chemosphere*, 2002, 49(4):379 – 387.
- [13] Mulligan C N, Yong R N, Gibbs B F. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2001, 85(1–2):111 – 125.
- [14] Mao X, Jiang R, Xiao W, et al. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 285:419 – 435.
- [15] Tessier A, Campbell P G C, Bisson M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals[J]. *Analytical chemistry*, 1979, 51(7):844 – 851.
- [16] Samal K, Das C, Mohanty K. Eco-friendly biosurfactant saponin for the solubilization of cationic and anionic dyes in aqueous system[J]. *Dyes and Pigments*, 2017, 140:100 – 108.
- [17] Chen W J, Hsiao L C, Chen K. Metal desorption from copper(II)/nickel(II) – spiked kaolin as a soil component using plant-derived saponin biosurfactant[J]. *Process Biochemistry*, 2008, 43(5):488 – 498.
- [18] Jaedong S, Jeongmi L, Yongbum K, et al. Production and characterization of methyl ester sophorolipids with 22 – carbon – fatty acids[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(9):3170 – 3174.
- [19] Tippel J, Lehmann M, Von K R. Interfacial properties of Quillaja saponins and its use for micellisation of lutein esters[J]. *Food Chemistry*, 2016, 212:35 – 42.
- [20] Bermond A, Ghestem J P, Selim H M, et al. Kinetic study of trace metal EDTA – desorption from contaminated soils [M]//Heavy Metals Release in Soils. 2001:131 – 147.
- [21] Rupa T R, Tomar K P, Reddy D D, et al. Time – dependent zinc desorption in soils[J]. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 2000, 31(15–16):2547 – 2563.
- [22] Chen Z, Zeng B. Characteristics of micro-interface adsorption kinetics between sediments and Cu ions[J]. *International Journal of Sediment Research*, 2017, 32(1):82 – 89.
- [23] Liu C, Liang X, Liu J, et al. Desorption of copper ions from the polyamine – functionalized adsorbents: Behaviors and mechanisms[J]. *Adsorption Science & Technology*, 2016, 34(7–8):455 – 468.
- [24] Garrido T, Mendoza J, Arriagada F. Changes in the sorption, desorption, distribution, and availability of copper, induced by application of sewage sludge on Chilean soils contaminated by mine tailings[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2012, 24(5):912 – 918.
- [25] Chen W F, Zhang J H, Zhang X M, et al. Investigation of heavy metal (Cu, Pb, Cd, and Cr) stabilization in river sediment by nano-zero-valent iron/activated carbon composite[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(2):1460 – 1470.