

УДК 574.64, 594.124, 591.341.2

ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ (Cu, Co, Cd) НА РАННЕЕ РАЗВИТИЕ *MYTILUS EDULIS* (MOLLUSCA; BIVALVIA)

© 2019 г. Д. М. Саидов^{а, *}, И. А. Косевич^б

^аВсероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (“ВНИРО”),
Россия, 107140, Москва, ул. Верхняя Красносельская, 17

^бМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Россия, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: daniyalsaidov@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.02.2018 г.

После доработки 25.05.2018 г.

Принята к публикации 09.06.2018 г.

Оценено влияние ионов тяжелых металлов (Cu, Cd и Co) на раннее развитие беломорской *Mytilus edulis* в остром (72 ч) эксперименте в совокупности с оценкой влияния комбинаций абиотических факторов среды: температуры – 8, 12 и 16°C и солености – 14, 19 и 24‰. Построенные обобщенные линейные модели (GLM) показали статистически значимое влияние изученных факторов на количество D-велигеров во всех сериях эксперимента. Полученные данные свидетельствуют о синергизме между факторами концентрация и соленость и антагонизме между фактором температура и факторами концентрация и соленость. Зависимости доза-эффект для меди и кобальта описываются логистическими кривыми с верхним пределом, а для серии кадмия – кривой Вейбулла с верхним пределом.

Ключевые слова: *Mytilus*, *Bivalvia*, биотестирование, токсикология, тяжелые металлы, эмбриональное развитие, D-велигер

DOI: 10.1134/S0367059719010074

Эмбриональное и личиночное развитие считаются наиболее уязвимыми фазами жизненного цикла гидробионтов в отношении воздействия токсических веществ. Чувствительность личинок к влиянию тяжелых металлов на 2–3 порядка превосходит таковую у взрослых особей [1]. Поэтому эмбриональные и личиночные стадии развития гидробионтов часто используют в токсикологических исследованиях [2–7 и др.], в том числе личинок двустворчатых моллюсков рода *Mytilus* [4, 8–12].

Принимая во внимание, что виды рода *Mytilus* обитают в широком диапазоне температур и соленостей, особое значение следует уделять возможному взаимодействию влияния токсиканта при различных комбинациях абиотических факторов среды. Однако исследований, посвященных анализу комплексного влияния температуры, солености и токсикантов, опубликовано мало [13, 14].

Задачей настоящей работы была оценка влияния ионов тяжелых металлов, температуры и солености на раннее развитие *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) в остром эксперименте.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве тест-системы было выбрано раннее развитие (первые 72 ч после оплодотворения) *M. edulis*. Взрослые особи мидий для эксперимента были собраны в окрестностях Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова МГУ (66°34' с.ш., 33°08' в.д.). В качестве критерия воздействия использовано количество личинок, достигших стадии D-велигера (рис. 1а, 1б).

Для стимуляции нереста в мантийную полость каждой особи вводили около 1 мл 0.5 М раствора KCl. Оплодотворение проводили путем смешивания мужских и женских гамет в естественной фильтрованной (40 µm) морской воде при температуре 10–12°C. Зародыши помещали в экспериментальные емкости только после начала дробления, которое свидетельствовало об успешном оплодотворении.

В работе было испытано воздействие повышенных добавленных концентраций ионов тяжелых металлов (Cu²⁺ – 3, 10, 20 мкг/л; Co²⁺ – 10, 30, 100 мкг/л; Cd²⁺ – 100, 200, 400 мкг/л) при разных температурах (8, 12 и 16°C) и соленостях. В эксперименте испытаны три варианта солености: нормальная соленость Белого моря (24‰–100%),

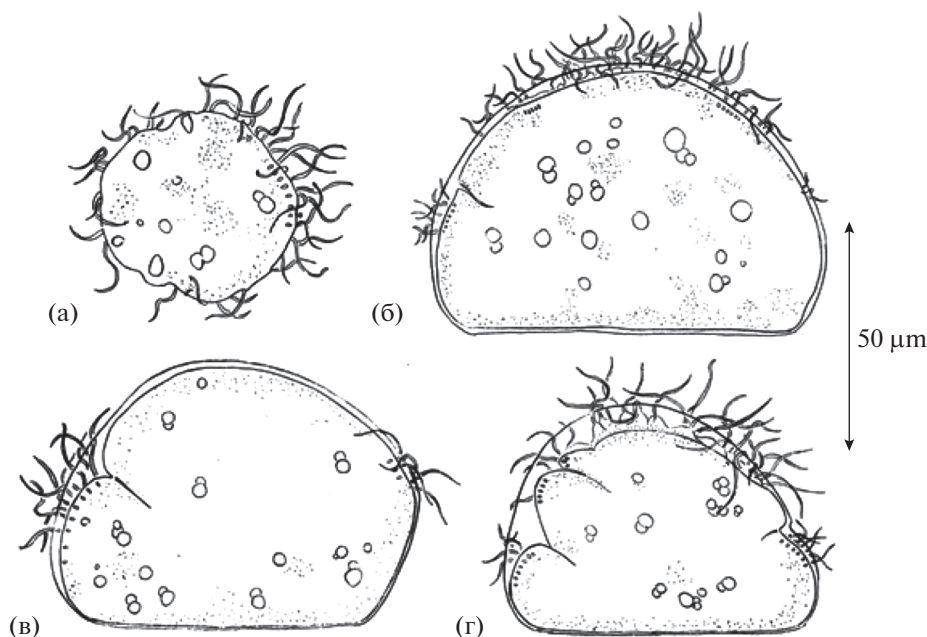


Рис. 1. Различные типы личинок, встреченные при анализе результатов экспериментов по влиянию ионов тяжелых металлов на раннее развитие *Mytilus edulis*: а – ресничная личинка; б – D-велигер; в, г – аномальные личинки с недо-развитой раковиной при 12°C (в) и 16°C (г).

слабое опреснение (19‰–80%) и сильное опреснение (14‰–60%). Контроль солености осуществляли рефрактометром TMC V2. Для приготовления растворов использовали следующие соли тяжелых металлов: $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и CdCl_2 . Добавление растворов солей тяжелых металлов и колебания солености не вызывали существенного изменения pH морской воды, которое на всем протяжении эксперимента оставалось в пределах 7.8–8.1.

Эксперименты в трех повторностях проводили в 12-луночных пластиковых плашках. Для всех анализов учетной единицей (повтором) принят единичный эксперимент серии (лунка плашки). В каждом повторе использовали потомство одной пары взрослых особей. Общий объем среды в каждой лунке плашки составлял 4 мл. Плотность посадки яйцеклеток в каждую лунку не превышала 200 экз/мл. Отбор проб объемом 500 мкл из каждой лунки проводили через 48 и 72 ч. Отобранные пробы фиксировали формалином.

Обработку проб осуществляли методом фотоучета. Пробу фотографировали под микроскопом Axioplan 2 Imaging (Zeiss), оснащенного фотокамерой AxioCam HRm (Zeiss). Статистический анализ проведен в R [15] с использованием дополнительных пакетов: “MASS” ver. 7.3-47 [16], “drc” ver. 3.0-1 [17], “margins” ver. 0.3.0 [18], “ggplot2” ver. 2.2.1 [19].

Для анализа полученных результатов были построены обобщенные линейные модели (GLM) с группировкой по длительности. В качестве ана-

лизируемой переменной выбрано количество D-велигеров, добавочными переменными выступали соленость, концентрация и температура, статистическими весами – общее количество личинок в пробе.

Регрессионный анализ и расчет значений EC_{50} проводили с использованием пакета “drc”. Выбор модели осуществлен исходя из наименьших значений байесовского информационного критерия (BIC) и информационного критерия Акиаке (AIC).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие до стадии D-велигера наблюдали только при температуре более 12°C и солености выше 14‰. При 8°C развитие сильно замедлилось: даже через 72 ч все личинки еще не имели раковины. Аналогичную ситуацию наблюдали при сильном понижении солености – при 14‰ лишь незначительная доля личинок имела раковину. Поэтому для моделирования были выбраны лишь по два уровня температуры (12 и 16°C) и солености (19 и 24‰). Результаты GLM моделирования приведены в табл. 1.

Согласно анализу построенных моделей, факторы длительность, температура и соленость оказали статистически значимое положительное влияние, а фактор концентрации – значимое негативное влияние на количество D-велигеров (рис. 2). Значение краевого эффекта солености минимально из всех факторов, оказывающих по-

Таблица 1. Результаты моделирования влияния всех исследованных факторов на раннее развитие *M. edulis*

Факторы		Коэфф.	SE	Z-критерий	Pr(> z)
48 часов					
Длительность (св. член)	Общ.	1.6665	0.0539	30.9290	2.00E-16
Соленость	Общ.	0.4001	0.0708	5.6550	1.56E-08
Температура	Общ.	0.4747	0.0704	6.7440	1.54E-11
Концентрация	Cd	-0.0044	0.0002	-17.4980	2.00E-16
	Co	-0.0175	0.0010	-16.7510	2.00E-16
	Cu	-0.1342	0.0053	-25.4880	2.00E-16
Соленость + температура	Общ.	-0.2453	0.0731	-3.3580	7.86E-04
Концентрация + соленость	Cd	-0.0003	0.0003	-1.0990	2.72E-01
	Co	-0.0016	0.0012	-1.3900	1.65E-01
	Cu	0.0017	0.0064	0.2680	7.88E-01
Концентрация + температура	Cd	0.0013	0.0003	4.4990	6.83E-06
	Co	0.0025	0.0012	2.1450	3.20E-02
	Cu	0.0218	0.0064	3.4170	6.32E-04
72 часа					
Длительность (св. член)	Общ.	2.2322	0.0609	36.6690	2.00E-16
Соленость	Общ.	0.4057	0.0800	5.0730	3.92E-07
Температура	Общ.	0.3643	0.0772	4.7160	2.40E-06
Концентрация	Cd	-0.0018	0.0003	-6.1510	7.69E-10
	Co	-0.0114	0.0012	-9.7840	2.00E-16
	Cu	-0.1183	0.0050	-23.6670	2.00E-16
Соленость + температура	Общ.	-0.3181	0.0791	-4.0230	5.76E-05
Концентрация + соленость	Cd	-0.0001	0.0003	-0.3840	7.01E-01
	Co	-0.0052	0.0014	-3.8320	1.27E-04
	Cu	0.0049	0.0059	0.8290	4.07E-01
Концентрация + температура	Cd	-0.0019	0.0003	-5.6450	1.66E-08
	Co	-0.0009	0.0014	-0.6600	5.09E-01
	Cu	-0.0086	0.0059	-1.4510	1.47E-01

Условные обозначения: Коэфф. — значения коэффициента фактора; Общ. — общие для всех металлов; SE — стандартное отклонение; полужирным выделено — статистически значимое влияние на количество D-велигеров.

ложительное влияние. При понижении солености до 19‰ среди раковинных личинок можно выделить два типа — типичные D-велигеры и велигеры с измененным строением раковины. Такие велигеры имеют характерную форму (см. рис. 1в, 1г), меньшие размеры и асимметричную раковину. Данные личинки присутствуют как в контроле, так и в среде с добавленными концентрациями металлов.

Вероятно, появление аномальных личинок происходит в первую очередь в ответ на опреснение. Так как через 72 ч эти личинки и раковины подобного типа в пробах уже не обнаруживаются, то можно предположить, что незначительное опреснение лишь несколько замедляет начальные стадии раннего развития *M. edulis*. Это приводит к появлению на вторые сутки недоразвитых

D-велигеров, которые затем превращаются в типичные D-велигеры.

Негативное влияние понижения солености согласуется с данными других авторов. Опреснение до 65% (с 35 до 25‰) оказывает негативное влияние на развитие как *M. trossulus*, так и *M. galloprovincialis*: доля D-велигеров снижается с 81.80% в контроле до 36.15% при 25‰ [12, 14]. В ряде работ также отмечено появление личинок с аномальным строением раковины [1, 14, 20], однако формы, наблюдаемые в настоящей работе, имеют иное строение, которое также различается в зависимости от температуры развития (см. рис. 1в, 1г).

Понижение солености до 14‰ привело к существенному угнетению раннего развития *M. edulis*. Это согласуется с тем, что виды рода *Mytilus* практически отсутствуют в водоемах с со-

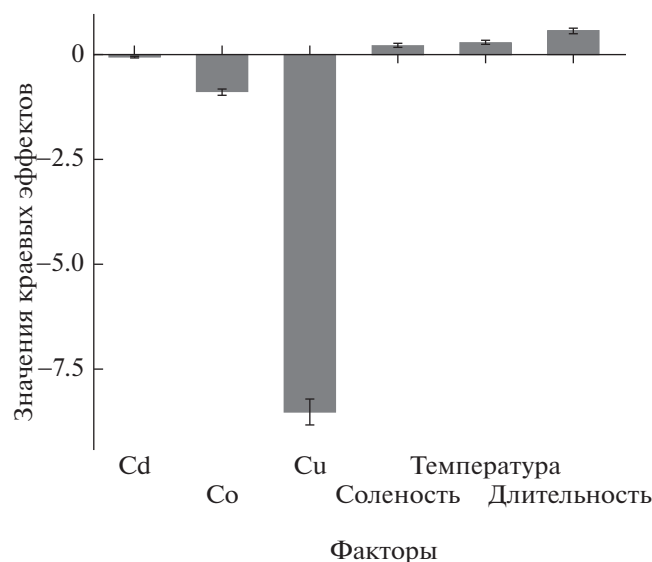


Рис. 2. Диаграмма значений краевых эффектов факторов модели на общее количество D-велигеров. Вертикальные отрезки обозначают интервал 1.96 стандартного отклонения.

леностью ниже 15‰ — Азовское море, Каспийский бассейн. Комплексный молекулярно-генетический анализ популяций видов рода *Mytilus* Балтийского и Северного морей показал, что наиболее опресненные части Балтийского моря заселяет *M. trossulus*, а не *M. edulis*, как считалось ранее [21, 22].

Величина краевого эффекта температуры больше, чем у солености (см. рис. 2), что говорит о большем влиянии повышения температуры на количество D-велигеров. Интересно, что при 16°C и солености 19‰ количество велигеров с аномальным строением раковины, характерного для эксперимента при 12°C, минимально (рис. 3). Вполне вероятно, что повышение температуры до 16°C ускоряет развитие, компенсируя задержку, вызванную снижением солености до 19‰.

Согласно результатам моделирования, только фактор концентрация оказал значимый негативный эффект на общее количество D-велигеров. Негативный эффект металлов ослабевает в ряду $Cu > Co > Cd$ (см. рис. 2), что подтверждает исходные данные о токсичности исследуемых ионов металлов [4, 7].

Изменение длительности эксперимента положительно сказывается на количестве D-велигеров — свободный член модели с ростом длительности до 72 ч растет. При этом значение краевого эффекта длительности максимально среди факторов, что свидетельствует о большом положительном влиянии увеличения длительности эксперимента с 48 до 72 ч (см. рис. 2).

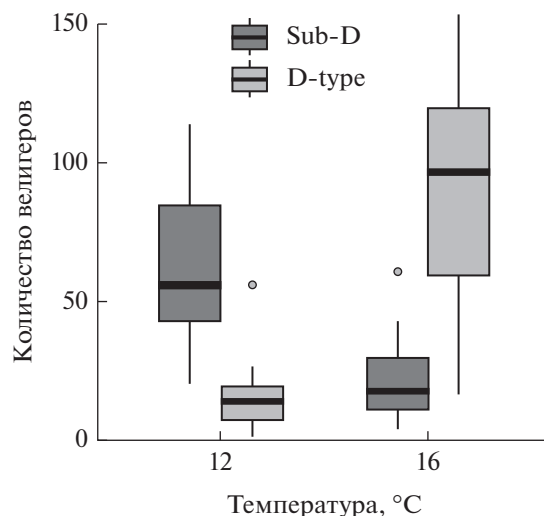


Рис. 3. Диаграмма размаха количества D-велигеров (D-type) и личинок с аномальной раковиной (Sub-D) в 48-часовых экспериментах при 12 и 16°C и солености 19‰. Медиана выделена полужирным, коробка ограничивает межквартильный размах, точки представляют выпадающие значения.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФАКТОРОВ

Начнем рассмотрение с динамики воздействия температуры, концентрации и солености.

Несмотря на понижение коэффициента концентрации на третьи сутки (см. табл. 1), значимых изменений краевых эффектов тяжелых металлов не отмечено. Возможно, изменение настолько невелико, что изученной выборки недостаточно, чтобы значимо подтвердить снижение. Значение краевого эффекта солености с ростом длительности эксперимента остается неизменным, а температуры — снижается практически до нуля (рис. 4а). Интересно, что значения краевых эффектов температуры и солености при отсутствии влияния тяжелых металлов (контрольная группа личинок) и под их влиянием (опытная группа) показывают различную динамику (рис. 4б, 4в).

Значения краевых эффектов солености контрольной и опытной групп на вторые сутки соизмеримы и сохраняют свое воздействие и на третьи сутки, повторяя общую динамику (см. рис. 4а, 4б), в то время как значения краевых эффектов температуры значимо отличаются. Однако на третьи сутки в опытной группе температура сохраняет значимый эффект, а в контрольной становится незначимым (рис. 4в). Видимо, дополнительный стрессовый фактор в виде увеличения концентрации тяжелых металлов повышает относительное влияние температуры только на момент 48 ч и полностью нивелирует ее влияние на момент 72 ч.

Взаимодействие температура + соленость значимо для всего эксперимента. Каждый фактор оказывает положительное влияние, особенно на

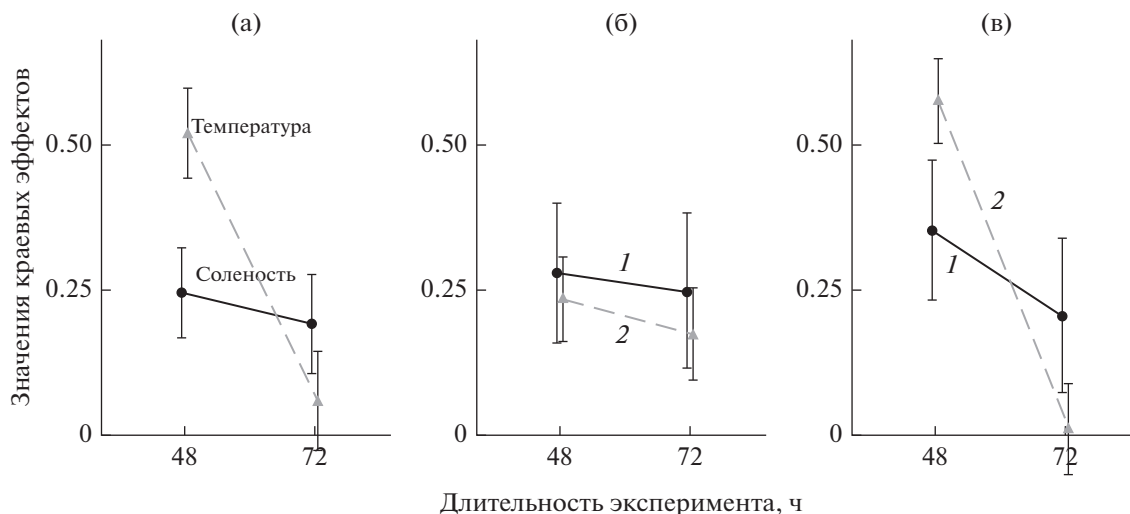


Рис. 4. Краевые эффекты солености и температуры: а — динамика значений для модели в целом; б, в — динамика значений эффектов солености (б) и температуры (в) при отсутствии (1) и при наличии влияния тяжелых металлов (2).

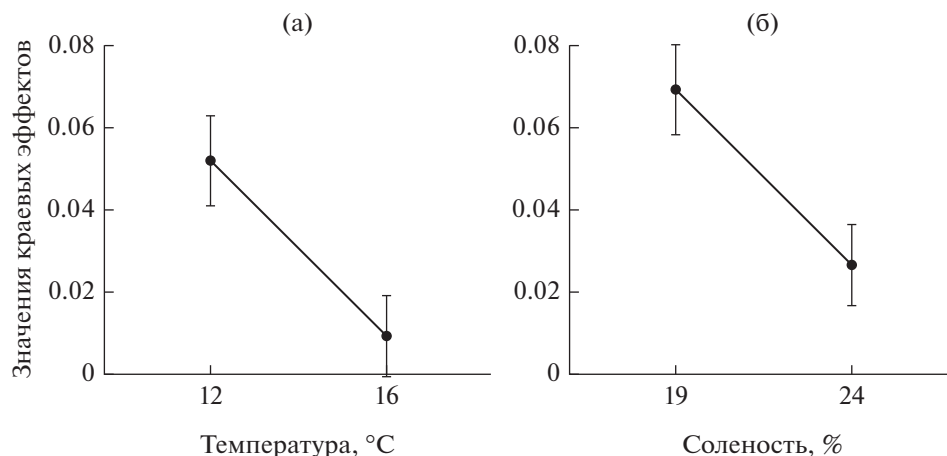


Рис. 5. Взаимосвязь эффектов солености (а) и температуры (б). Вертикальные отрезки обозначают интервал 1.96 стандартного отклонения.

вторые сутки. Однако при одновременном росте температуры и солености их совокупный положительный эффект падает. Из рис. 5 видно, что положительный эффект солености снижается при увеличении температуры, и наоборот.

Взаимодействие концентрация + соленость значимо проявляется только для кобальта при длительности 72 ч, и эффект его крайне незначителен. Изменение коэффициента концентрации в меньшую сторону достоверно и свидетельствует об увеличении общего негативного влияния концентрации при изменении солености. При этом интересно, что максимальное влияние концентрации наблюдается при нормальной солености (см. рис. 6а).

Взаимодействие концентрация + температура значимо проявляется на вторые сутки для всех металлов и оказывает положительный эффект — при повышении температуры коэффициент концентрации снижается. На третьи сутки совместное влияние значимо только для серии кадмия, а влияние меняется на противоположное: повышение температуры увеличивает эффект концентрации (см. табл. 1). При оценке значений краевых эффектов значимые различия наблюдаются только для серии меди, и далее на графике 6б тоже медь: на вторые сутки влияние при 12 и 16°C отличается статистически значимо, а на третьи сутки различие нивелируется (рис. 6б).

Учитывая положительное влияние температуры и длительности, а также антагонизм концентрации и температуры, можно заключить, что от-

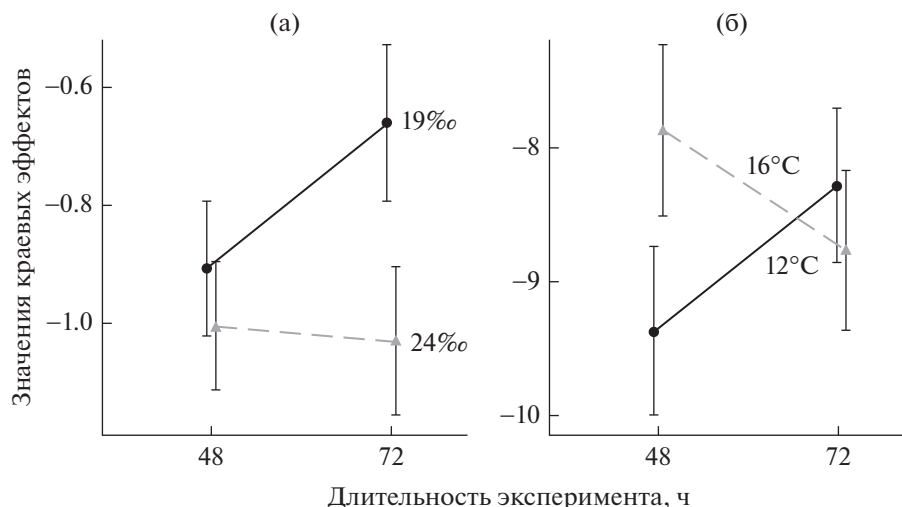


Рис. 6. Динамика значений краевых эффектов концентрации кобальта при разных соленостях (а) и меди при разных температурах (б). Вертикальные отрезки обозначают интервал 1.96 стандартного отклонения.

меченная многими авторами [4, 9] закономерность увеличения токсичности при увеличении длительности эксперимента в данной работе не выявлена.

РЕГРЕССИОННЫЙ АНАЛИЗ

В результате регрессионного анализа получены соответствующие значения EC_{50} для условий, приближенных к естественным — 12°C и 24‰. Согласно анализу, зависимости доза—эффект для серий меди и кобальта наилучшим образом описывают трехпараметрические логистические кривые с верхним пределом (LL.3u), а для серии кадмия — трехпараметрическая кривая Вейбулла с верхним пределом (W.3u).

Расчетные значения EC_{50} ионов меди для беломорской мидии (17.35 ± 0.74 мкг/л) оказались выше значений, полученных для *M. edulis* другими авторами [4, 9], которые составляют от 4 до 10.8 мкг/л. Понижение значений EC_{50} при снижении солености (до 19‰) наблюдается только на вторые сутки, что согласуется с отмеченным многими авторами повышением чувствительности ранних стадий развития при понижении солености [1, 14]. Большие значения EC_{50} у *M. edulis* в Белом море, чем у *M. edulis* из акваторий с океанической соленостью, могут свидетельствовать о том, что наибольшее значение имеет именно кратковременное снижение солености, нежели исходная разность условий местообитания популяций.

Влияние ионов кобальта на эмбриональное развитие изучено только для небольшого числа гидробионтов [2, 6, 23, 24]. Эксперименты по воздействию кобальта на эмбриональное и раннее постэмбриональное развитие двустворчатых мол-

люсков проведены нами впервые. Расчетные значения EC_{50} , полученные нами (146.22 ± 51.30 мкг/л), практически идентичны EC_{50} для ранних стадий развития морского ежа *Dendraster excentricus* — 73–147 мкг/л [2] и EC_{50}/LC_{50} для интенсивности бесполого размножения и выживания молоди актинии *Aiptasia pulchella* — 85–154 мкг/л [24].

Расчетные значения EC_{50} для ионов кадмия (461.66 ± 160.00 мкг/л) коррелируют со значениями EC_{50} для других двустворчатых моллюсков и видов рода *Mytilus* и даже ниже них [4, 8, 9]. Более низкие EC_{50}/LC_{50} среди беспозвоночных показаны для интенсивности бесполого размножения и выживаемости молоди актинии *A. pulchella* — 27–185 мкг/л [24] и краба *Cancer magister* — 247 мкг/л [4].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ результатов эксперимента позволяет утверждать, что все изученные факторы оказали статистически значимый эффект на раннее развитие *M. edulis*, который выражается в изменении количества D-велигеров на вторые и третьи сутки.

Между изученными факторами наблюдаются как синергетические — концентрация и соленость, так и антагонистические взаимодействия — концентрация и температура; температура и соленость. Интересным фактом остается различие динамики влияния температуры у контрольной и опытной групп личинок (см. рис. 6).

Анализируя полученные регрессии, были рассчитаны эффективные концентрации для изученных тяжелых металлов: $EC_{50}(Cu^{2+}) = 17.35 \pm 0.74$ мкг/л; $EC_{50}(Co^{2+}) = 146.22 \pm 51.30$ мкг/л; $EC_{50}(Cd^{2+}) = 461.66 \pm 160.00$ мкг/л.

Учитывая положительное влияние повышения температуры, солености и длительности, неоднозначную динамику влияния температуры, антагонистическое взаимодействие концентрации и температуры, оптимальным для биотестирования (с точки зрения чувствительности метода и оценки влияния) является проведение острого эксперимента при нормальной солености (24‰), температуре 12°C и длительности 48 ч.

Выражаем благодарность Беломорской биологической станции МГУ им. Н.А. Перцова за предоставление лаборатории для осуществления работы; Т.А. Самойловой, профессорам А.И. Азовскому и Л.В. Полищуку — за помощь в анализе результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. His E., Beiras R., Seaman M. The Assessment of Marine Pollution-Bioassays with Bivalve Embryos and Larvae // *Advances in Marine Biology*. 1999. V. 37. P. 1–178.
2. Rulon O. Effects of cobaltous chloride on development in the sand dollar // *Physiol. Zool.* 1956. V. 29. P. 51–63.
3. Nickless G., Stenner R., Terrille N. Distribution of cadmium, lead and zinc in the Bristol Channel // *Marine Pollut. Bull.* 1972. V. 3. № 12. P. 188–190.
4. Martin M., Osborn K.E., Billig P. et al. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae // *Marine Pollut. Bull.* 1981. V. 12. № 9. P. 305–308.
5. Kobayashi N. Marine ecotoxicological testing with echinoderms // *Ecotoxicological testing for the marine environment*. 1984. V. 1. P. 341–405.
6. Dave G., Xiu R. Toxicity of mercury, copper, nickel, lead and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *Brachydanio rerio* // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1991. V. 21. P. 126–134.
7. Spangenberg J.V., Cherr G.N. Developmental effects of barium exposure in a marine bivalve (*Mytilus californianus*) // *Environmental toxicology and chemistry*. 1996. V. 15. № 10. P. 1769–1774.
8. Calabrese A., Nelson D.A. Inhibition of embryonic development of the hard clam *Mercenaria mercenaria*, by heavy metals // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1974. V. 11. P. 92–97.
9. Малахов В.В., Медведева Л.А. Эмбриональное развитие двусторчатых моллюсков в норме и при воздействии тяжелых металлов. М.: Наука, 1991. 132 с.
10. Hoare K., Davenport J., Beaumont A.R. Effects of exposure and previous exposure to copper on growth of veliger larvae and survivorship of *Mytilus edulis* juveniles // *Marine ecology progress series*. 1995. V. 120. № 1. P. 163–168.
11. Ярославцева Л.М., Сергеева Э.П. Влияние ионов меди на ранние стадии развития тихоокеанской мидии *Mytilus trossulus* (Bivalvia) // *Биология моря*. 2005. Т. 31. № 4. С. 267–273.
12. Nadella S.R., Fitzpatrick J.L., Franklin N. et al. Toxicity of dissolved Cu, Zn, Ni and Cd to developing embryos of the blue mussel (*Mytilus trossulus*) and the protective effect of dissolved organic carbon // *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2009. Part C 149. P. 340–348.
13. Hrs.Brenko M., Calabrese A. The combined effects of salinity and temperature on larvae of the mussel *Mytilus edulis* // *Marine Biology*. 1969. V. 4. № 3. P. 224–226.
14. Hrs.Brenko M., Claus C., Bubic S. Synergistic effects of lead, salinity and temperature on embryonic development of the mussel *Mytilus galloprovincialis* // *Marine Biology*. 1977. V. 44. № 2. P. 109–115.
15. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2017.
16. Venables W.N., Ripley B.D. *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. New York: Springer-Verlag publ., 2002. 498 p.
17. Ritz C., Baty F., Streibig J.C., Gerhard D. Dose-response analysis using R // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 12. C. e0146021.
18. Leeper T.J. Margins: Marginal Effects for Model Objects. R package version 0.3.0. 2017.
19. Wickham H. *Elegant graphics for data analysis (ggplot2)*. New York: Springer-Verlag publ., 2009. 213 p.
20. Courtright R.C., Breese W.P., Krueger H. Formulation of a synthetic seawater for bioassays with *Mytilus edulis* embryos // *Water Research*. 1971. V. 5. № 10. P. 877–888.
21. Väinölä R., Strelkov P. *Mytilus trossulus* in Northern Europe // *Marine Biology*. 2011. V. 158. Issue 4. P. 817–833.
22. Väinölä R., Hvilsom M. Genetic divergence and a hybrid zone between Baltic and North Sea *Mytilus* populations (Mytilidae: Mollusca) // *Biological J. of the Linnean Society*. 1991. № 43. P. 127–148.
23. Шевцова С.Н. Эффекты воздействия сульфата кобальта на эмбриональное развитие большого прудовика (*Lymnea stagnalis*) // *Экологический вестник*. 2010. № 4 (14). С. 125–134.
24. Howe P.L., Reichelt-Brushett A.J., Clark M.W. Effects of Cd, Co, Cu, Ni and Zn on asexual reproduction and early development of the tropical sea anemone *Aiptasia pulchella* // *Ecotoxicology*. 2014. V. 23. P. 1593–1606.