

## 恶霉灵对蚯蚓的毒性效应及其蛋白含量的影响

王晓菲, 薛一, 刘长莉\* (东北林业大学生命科学学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

**摘要** [目的]研究恶霉灵(3-羟基-5-甲基异恶唑)对蚯蚓的毒性效应,及其对蚯蚓体内蛋白质含量的影响。[方法]采用滤纸接触法进行不同浓度恶霉灵对蚯蚓的毒害作用试验,并测定蚯蚓体内蛋白含量。[结果]蚯蚓在接触农药时有明显反应,染毒48 h恶霉灵对蚯蚓半致死浓度(LC<sub>50</sub>)为2.455 g/L,不同浓度农药处理结果存在显著差异( $P < 0.05$ )。各种浓度的恶霉灵处理24 h后,蚯蚓体内蛋白含量呈先升高后降低的趋势,处理48 h后呈现出升高、降低、再升高的变化。并且用同一个浓度处理24、48 h后,其体内蛋白质含量也存在显著差异( $P < 0.05$ )。[结论]恶霉灵对蚯蚓具有毒害作用,且受到的毒害程度随浓度和培养时间的增加而加重。蚯蚓在染毒后体内蛋白质的含量发生一定的变化。

**关键词** 恶霉灵;蚯蚓;滤纸接触法;毒性效应

**中图分类号** S171.5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)34-0095-04

## Toxicity Effects of Hymexazol and It's Impact on Protein Content of Earthworms

WANG Xiao-fei, XUE Yi, LIU Chang-li\* (College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

**Abstract** [Objective] The aim is to study the Hymexazol (3-hydroxy-5-methylisoxazole) toxicity effect on earthworms and its influence on the protein content of earthworms. [Method] Method of filter paper contact was used to study the toxicity effects of different concentrations of Hymexazol on earthworm, and the protein content of earthworms was determined. [Result] Earthworms had a significant response to pesticide exposure, and the lethal concentration (LC<sub>50</sub>) of 48 hours against earthworms was 2.455 g/L. In addition, there were significant differences with different concentrations of Hymexazol treatment ( $P < 0.05$ ). The total soluble protein content of earthworms increased first and then decreased after treating with various concentrations of Hymexazol for 24 hours. While they present increased, decreased and increased again after treating for 48 hours. There was also significant difference in protein content between 24 h and 48 h treated with the same concentration ( $P < 0.05$ ). [Conclusion] Hymexazol has a toxic effect on earthworms, and the degree of poisoning rose with increasing concentration and incubation time. And the total soluble content of the protein in the earthworm has a certain change after exposing.

**Key words** Hymexazol; Earthworms; Method of filter paper contact; Toxic effects

随着现代农业生产的发展,农药与化肥大量使用,带来巨大经济效益的同时,也严重污染破坏了土壤环境。蚯蚓是土壤中常见的杂食性环节动物之一,在生态环境保护中,蚯蚓能够改善土壤成分,提高土壤肥力,分解固体废物,调节土壤pH<sup>[1]</sup>。另外,土壤中有许多动物都是以蚯蚓为食,一旦土壤中的污染物积累在蚯蚓体内,这些污染物就会沿着食物链进行传递和富集<sup>[1-2]</sup>,从而可能对食物链中更高级的生物产生威胁<sup>[3]</sup>。因此,根据其生物学特性,蚯蚓常被用作测定土壤环境污染状况的模式生物之一<sup>[4-6]</sup>。

蛋白质是构成生物体细胞、组织的重要成分。在某些理化因素的作用下,蛋白质会发生变性,并且多数蛋白质的变性是不可逆的。研究表明,蚯蚓体内蛋白质含量的变化可以作为土壤毒理诊断指标之一<sup>[7]</sup>。恶霉灵是一种新型农药,其药效作用独特,在防治病害等方面具有高效、广谱、内吸性等特点,得到广泛应用,但目前关于恶霉灵是否对环境有害鲜有报道。为此,选取哈尔滨市周边地区,研究恶霉灵对当地蔬菜大棚中蚯蚓的毒性效应及其蛋白质含量的影响,为该地区农药污染的生态毒理检测和农业害虫的生物学防治提供理论依据,同时也为科学的评价这种农药的生态安全性奠定基础。

## 1 材料与方

**1.1 供试蚯蚓** 蚯蚓采集于哈尔滨周边的蔬菜大棚,选取

有明显环带、体重为300~500 mg、大小基本相同的健康成蚓进行试验。

**1.2 药品** 恶霉灵(批号为HNP37113-D4202),由威海韩孚生化药业有限公司生产。恶霉灵(hymexazol)又名绿亨一号、土菌消,为高效杀菌剂和土壤消毒剂,为白色可湿性粉剂。分子式为C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>;化学名称为3-羟基-5-甲基异恶唑;结构式见图1。

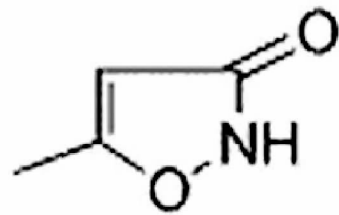


图1 恶霉灵结构式

Fig. 1 Structure formula of Hymexazol

**1.3 试剂** 蛋白测定试剂盒,南京建成生物工程研究所生产;考马斯亮兰贮备液,上海拜力生物科技有限公司生产;蛋白标准液,北京雷根生物技术有限公司生产。

**1.4 器材** 电冰箱(BCD-215ADL)购于海尔公司;离心机(DD-5M 低速台式离心机)购于上海珂准仪器有限公司;分光光度器(UV-9600)、玻璃比色皿、电子天平(CPA224S)购于上海菁华科技仪器有限公司;移液枪(10~100、20~200 μL)购于大龙兴创实验仪器(北京)有限公司;玻璃培养皿(直径15 cm,高2.5 cm)、中速滤纸(直径15 cm)、量筒(10 mL)、烧杯(50、100 mL)、离心管(10 mL)购于北京华兴科诺生物技术有限公司。

**基金项目** 黑龙江省自然科学基金项目(LC2016005)。

**作者简介** 王晓菲(1996—),女,山东青岛人,本科生,专业:环境科学。

\*通讯作者,副教授,博士,从事微生物方面的研究,

**收稿日期** 2017-09-08

## 1.5 方法

**1.5.1 污染物试验浓度设计。**在正式试验前进行预试验对农药浓度范围进行选择,确保所选污染物浓度染毒 48 h 对蚯蚓在最大致死浓度 ( $LD_{100}$ ) 和最小致死浓度 (mLD) 的范围内。然后在选取的浓度区间设置正式浓度梯度序列进行正式试验。恶霉灵选取浓度分别为 2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6 g/L。

**1.5.2 蚯蚓急性毒性试验。**进行预试验,采用滤纸接触法,找出浓度范围,并在此浓度范围内设置 2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6 g/L 7 个浓度梯度,进行蚯蚓毒性试验。

挑选出体型大小基本一致,有明显生殖环带的蚯蚓,用清水洗去表面泥土后放入底部有一层滤纸的 1 000 mL 烧杯中,并且喷洒少量的水,以保证湿润,之后用保鲜膜将烧杯口封住,并用解剖针孔扎使烧杯内部与外界保持空气流通,清肠 24 h<sup>[8]</sup>。

在直径 15 cm 的玻璃培养皿中放入 3 张滤纸,使滤纸刚好遮住皿底。用注射器取 10 mL 各浓度恶霉灵水溶液按照试验设计浓度分别均匀注入垫有 3 张滤纸的培养皿中,使滤纸全部浸湿并标好序号。每一浓度设置 3 组重复试验,并设置 1 个不含药物的空白对照组。

取清肠 24 h 后的蚯蚓冲洗干净,并用滤纸吸去表面水分。每个培养皿中放入 10 条蚯蚓,用保鲜薄膜封住,并用解剖针孔扎孔确保通气。将培养皿置于实验台上,在每个培养皿下铺一层棉花,在染毒 24 和 48 h 各计数 1 次,观察并记录中毒症状和死亡数目,对其头尾部机械刺激无反应认为死亡,48 h 后结束试验<sup>[8-9]</sup>。

**1.5.3 蚯蚓体内蛋白质含量的测定。**分别用 24、48 h 后蚯蚓的存活样品进行蛋白测定,首先准确称取存活样品的质量,按质量:体积 (mL) = 1:9 的比例加入 9 倍体积的生理盐水,然后冰水浴条件下机械匀浆,2 500 r/min,离心 10 min,取上清液用生理盐水按 1:9 稀释成 1% 组织匀浆,混匀,静置 10 min,按试剂盒说明方法用蒸馏水在 595 nm 处、1 cm 光径调零,取 3 支试管,分别添加 0.05 mL 蒸馏水 (空自管)、0.05 mL 0.563 g/L 标准液 (标准管)、0.05 mL 样品 (测定管),均加入然后依次测定各管吸光度值 (OD 值),根据测定值计算蛋白质浓度,具体计算公式如下:

$$\text{蛋白质浓度 (g/L)} = \frac{\text{测定 OD 值} - \text{空白 OD 值}}{\text{标准 OD 值} - \text{空白 OD 值}} \times \text{标准品浓度} \\ (0.563 \text{ g/L}) \quad (1)$$

**1.6 数据处理** 在计算机中输入染毒 24 和 48 h 蚯蚓的死亡数目和测定的蛋白质含量,应用简明统计 10.35 (Concise Statistics, CS10.35) 和 Microsoft Excel 进行数据处理。

## 2 结果与分析

**2.1 恶霉灵对蚯蚓毒理试验的结果** 经试验表明,蚯蚓与恶霉灵刚接触就表现出中毒现象:蚯蚓翻滚身体并发生卷曲身体,对接触敏感,部分爬到滤纸下面。24 h 后进行观察,发现蚯蚓活动逐渐减弱,身体变柔软,颜色变深,体液分泌量增加,有的抱成一团,高浓度下的蚯蚓出现个别环节肿大,个别

蚯蚓出现死亡现象;48 h 后观察时,个别蚯蚓身体出现断节,生殖环轻有渗血现象,并有黄色液体渗出 (图 2),而且死亡率随农药浓度的增大而升高。对照组蚯蚓正常,无中毒或死亡现象。



图 2 恶霉灵滤纸接触法蚯蚓中毒现象

Fig. 2 Intoxicating phenomenon of earthworms to Hymexazol by method of filter paper contact

由表 1 可以看出,染毒 24 h 后在恶霉灵浓度为 2.0 ~ 2.2 g/L,其对蚯蚓不产生致死效应,浓度为 2.3 ~ 2.6 g/L 蚯蚓出现个别死亡;当染毒 48 h,恶霉灵对蚯蚓有明显的致死效应,且死亡率随着农药浓度的增大而不断增加,当达到试验设计的最大浓度时,蚯蚓的死亡率达到 76.7%。

表 1 恶霉灵滤纸接触法蚯蚓死亡情况

Table 1 Mortality situation of earthworms to Hymexazol by method of filter paper contact

浓度 Concentration // g/L	24 h 死亡条数 Mortality number for 24 h // 条			48 h 死亡条数 Mortality number for 48 h // 条			死亡率 Mortality rate // %	
	I	II	III	I	II	III	24 h	48 h
2.0	0	0	0	0	0	1	0	3.3
2.1	0	0	0	1	0	0	0	3.3
2.2	0	0	0	2	1	1	0	13.3
2.3	0	1	0	1	3	2	3.3	20.0
2.4	1	1	0	4	5	3	6.7	40.0
2.5	0	2	2	5	7	5	13.3	56.7
2.6	2	0	2	8	8	7	13.3	76.7
CK	0	0	0	0	0	0	0	0

对表 1 中数据进行统计分析,以恶霉灵的浓度为横坐标,蚯蚓染毒 48 h 的死亡率为纵坐标 (图 3) 进行拟合,得到回归方程如下:

$$D = 126.32X - 260.07 \quad (r^2 = 0.9314, n = 7, P < 0.05) \quad (2)$$

式(2)中, $D$  为蚯蚓死亡率(%), $X$  为恶霉灵浓度 (g/L), $P$  为显著性水平, $r$  为相关系数, $n$  为试验处理数。根据方程计算出恶霉灵的半致死浓度 ( $LC_{50}$ ) 为 2.455 g/L。

**2.2 恶霉灵对蚯蚓蛋白质含量的影响** 利用 722 分光光度计在 595 nm 下测出吸光值,根据蛋白质计算公式计算出各浓度的样本中蛋白质的含量,如表 2 所示。用 Microsoft Excel 软件对试验数据进行处理,所得结果均为平均数  $\pm$  标准差,并用回归方程检验药品浓度与蛋白质含量的相关性。

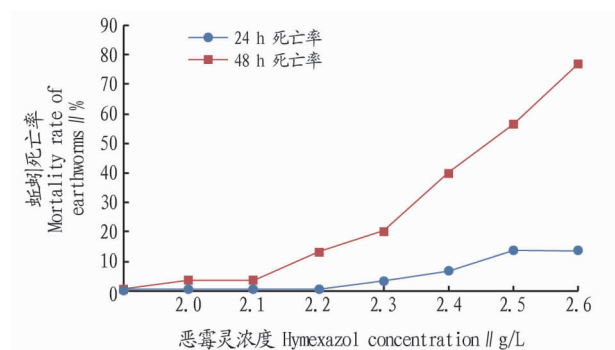


图3 恶霉灵在滤纸接触法各浓度条件下蚯蚓的死亡率

Fig.3 Mortality rate of earthworms to different concentration of Hymexazol by method of filter paper contact

表2 处理24、48 h 蚯蚓体内蛋白质含量

Table 2 Protein content of earthworms after 24 h and 48 h treated with the same concentration g/L

浓度 Concentration//g/L	蛋白质含量 Protein content	
	24 h	48 h
2.0	0.251 1	0.276 2
2.1	0.273 5	0.288 3
2.2	0.286 0	0.243 6
2.3	0.282 9	0.191 2
2.4	0.318 7	0.230 2
2.5	0.217 3	0.252 0
2.6	0.205 9	0.256 4
CK	0.186 6	0.186 6

从图4和图5可以看出,处理24 h后,农药浓度为2.6 g/L时蚯蚓体内蛋白质的含量最小,为0.205 9 g/L;其中最大值为0.318 7 g/L,所对应的浓度为2.4 g/L,恶霉灵浓度由低到高对应蛋白质含量呈现出先上升后下降的趋势;处理48 h后,浓度范围内蛋白质含量最小值和最大值含量分别为0.191 2、0.288 3 g/L,其对应的浓度分别为2.3、2.1 g/L,蛋白质含量呈升高、降低、再升高的趋势。

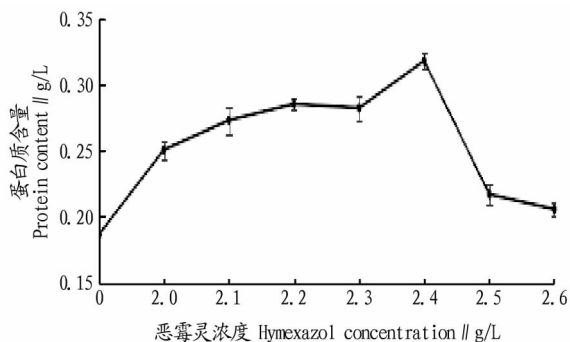


图4 恶霉灵处理24 h后蚯蚓体内蛋白含量

Fig.4 Protein content of earthworms after 24 h treated with Hymexazol

### 3 结论与讨论

**3.1 恶霉灵对蚯蚓毒性的影响** 采用滤纸分析法可以让蚯蚓与农药直接接触,成本低廉,操作简便,更直观的体现农药对土壤动物的毒性及危害<sup>[10]</sup>。试验结果显示,采用滤纸接触法试验24、48 h时,根据回归方程得出恶霉灵单一毒性试

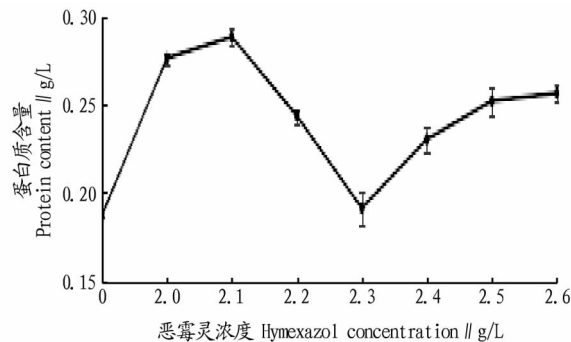


图5 恶霉灵处理48 h后蚯蚓体内蛋白含量影响

Fig.5 Protein content of earthworms after 48 h treated with Hymexazol

验蚯蚓的半致死浓度(LC<sub>50</sub>)为2.455 g/L,且对蚯蚓的毒害随着浓度的增加而上升。

同时蚯蚓对恶霉灵有一定的耐受限度,当农药浓度超过其耐受限度时,就会危害蚯蚓的健康和生存。恶霉灵对蚯蚓的作用机理是接触和内吸性多重作用,在试验中既可以通过接触由皮肤渗入蚯蚓体内使其对药品进行吸收,也可以通过食入途径进入到体内产生胃毒作用。而恶霉灵还是一种含氮杂环类杀菌剂,使蚯蚓不能正常生存生长甚至产生畸变,具体的影响还有待于进一步探索研究。

**3.2 恶霉灵对蚯蚓体内蛋白质含量的影响** 用不同浓度恶霉灵对蚯蚓处理24、48 h后,根据其体内蛋白质含量的测定结果,恶霉灵能使蚯蚓体内蛋白质含量增加,且不同浓度处理的结果有显著差异( $P < 0.05$ )。而且在同一个浓度处理24、48 h后的蚯蚓的体内蛋白质含量也存在显著差异( $P < 0.05$ )。在对蚯蚓染毒24 h时,蚯蚓体内蛋白质含量浓度呈现先升高再降低的变化,但总体蛋白质含量均比对照组有所增加,在浓度为2.4 g/L时出现最大值。对于这种现象,有研究表明,当生物体受到不利因素迫害时,机体内多种功能受损,内环境失衡,新陈代谢活动出现异常,会导致体内某些血浆蛋白含量改变,同时机体在应激状态下会产生一些急性应急蛋白,从而使体内蛋白质含量有所升高<sup>[11-12]</sup>。随着农药浓度的增大以及染毒时间的延长,可能因蚯蚓机体受到伤害的加重,机体多种功能高度受损,蛋白质的合成来源遭到破坏,因而影响蛋白质的合成<sup>[13]</sup>。在染毒48 h后,蚯蚓体内蛋白质含量浓度总体出现先升高后降低再升高的变化,在2.1 g/L时出现最大值。根据此变化曲线可看出,当浓度大于2.3 g/L时,蚯蚓体内蛋白质含量又出现随污染浓度的升高而增大的趋势,可能是蚯蚓机体在受到高浓度和长时间的污染后,自身功能受到损伤,内环境紊乱,代谢活动失调,同时机体内产生应激蛋白,使总蛋白质含量随浓度的升高而增大<sup>[14]</sup>。

蚯蚓机体内蛋白质含量增大或下降,均表示机体内系统功能紊乱。而生物体内蛋白质等大分子物质的变化往往是动态变化的过程,将蚯蚓作为污染暴露的生物标志物时还需要考虑多种其他因素的影响,恶霉灵对蚯蚓体内蛋白质影响比较复杂,可以进行土壤检测,并采用其他生物标志物进行

综合分析<sup>[15]</sup>,这都需要在今后的工作中继续研究和完善。

## 参考文献

- [1] DATTA S, SINGH J, SINGH S, et al. Earthworms, pesticides and sustainable agriculture: A review [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2016, 23 (9): 8227 - 8243.
- [2] 唐浩, 朱江, 黄沈发, 等. 蚯蚓在土壤重金属污染及其修复中的应用研究进展[J]. *土壤*, 2013, 45 (1): 17 - 25.
- [3] 高川. 咪唑啉酮类除草剂对土壤微生物和蚯蚓的毒性及其环境行为[D]. 南宁: 广西大学, 2013.
- [4] JOHNSTON A S A, HODSON M E, THORBEC P, et al. An energy budget agent-based model of earthworm populations and its application to study the effects of pesticides [J]. *Ecol Modell*, 2014, 280: 5 - 17.
- [5] SMÍDOVÁ K, HOFMAN J. Uptake kinetics of five hydrophobic organic pollutants in the earthworm *Eisenia fetida* in six different soils [J]. *J Hazard Mater*, 2014, 267: 175 - 182.
- [6] ZALLER J G, HEIGL F, RUESS L, et al. Glyphosate herbicide affects belowground interactions between earthworms and symbiotic mycorrhizal fungi in a model ecosystem [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 1 - 8.
- [7] WANG C X, ZHANG Q M, WANG F F, et al. Toxicological effects of dimethomorph on soil enzymatic activity and soil earthworm (*Eisenia fetida*) [J]. *Chemosphere*, 2017, 169: 316 - 323.
- [8] 徐冬梅, 王彦华, 王楠, 等. 铜、毒死蜱单一与复合暴露对蚯蚓的毒性作用[J]. *环境科学*, 2015, 36 (1): 280 - 285.
- [9] 朱江. PFOA 对赤子爱胜蚓的急性毒性效应[J]. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2015, 33 (5): 19 - 22.
- [10] 孙仕仙, 薛涛. 比较滤纸接触法和土壤法测定农药一乐果、杀虫双对蚯蚓的急性毒性试验[J]. *安徽农业通报*, 2010, 16 (13): 49 - 51.
- [11] 雷波, 刘定安, 黄树明, 等. 集成疗伤片对创伤患者血清急性期反应蛋白含量变化的影响[J]. *中医正骨*, 2005, 17 (1): 10 - 11.
- [12] 凌善锋. 农药敌敌畏对尼鳃肌肉中水溶性蛋白质的影响及分析[J]. *水产科学*, 2004, 23 (2): 20 - 21.
- [13] 孙仕仙, 傅本重, 李永梅, 等. 农药乐果和杀虫双污染对蚯蚓体内 SOD 和 AChE 活性的影响[J]. *中国农学通报*, 2012, 28 (24): 236 - 242.
- [14] 孙仕仙, 陶瑞, 张庆蛟, 等. 乐果和杀虫双污染对蚯蚓体内蛋白质含量的影响[J]. *江西农业大学学报*, 2012, 34 (2): 298 - 303.
- [15] 白桂芬, 曾小波. 敌百虫对蚯蚓体内 3 种抗氧化酶活性的影响[J]. *吉林农业科学*, 2013, 38 (1): 22 - 26.

(上接第 65 页)

川县、市辖区、土左旗、清水河县、托克托县、和林格尔县。

表 6 呼和浩特市各行政区水资源负载指数计算结果

Table 6 The calculation results of water resources load index in region of Hohhot City

序号 No.	行政区 Administrative Region	K	P//万人	G//亿元	W//亿 m <sup>3</sup>	C	负载指数级别 Load index level
1	土左旗	0.903 1	37.03	214.80	3.213	25.07	I
2	托克托县	0.920 0	20.69	236.42	1.984	32.43	I
3	和林格尔县	0.897 5	20.48	140.99	1.895	25.45	I
4	清水河县	0.890 0	14.42	64.42	1.682	16.13	I
5	武川县	0.925 2	17.55	78.25	3.503	9.79	II
6	市辖区	0.893 5	192.89	2159.17	3.662	157.46	I

(2) 负载指数法评价结果表明,除武川县水资源开发利用程度高、开发利用潜力小、承载力小外,其余 5 个行政区均为水资源开发利用程度很高、开发利用潜力很小、承载力很小。水资源承载力由高到低依次为武川县、清水河县、土左旗、和林格尔县、托克托县、市辖区。

(3) 通过 2 种方法的评价指标体系对比,改进的灰色关联法从水资源、经济、社会、生态环境等角度建立评价指标体系,综合性强。从二者评价结果来看,武川县承载力灰色关联法为较小,负载指数法为小,6 个行政区排序第一。武川县用水量虽然超出控制指标,但水资源开发利用程度低,相比其他 5 个行政区承载力最大,水资源仍有条件开发利用;市辖区承载力灰色关联法为较小,负载指数法为很小,6 个行政区排序最后,市辖区引黄二期工程很大程度上提高了水资源承载力。因此,改进的灰色关联法更具全面性、准确性。

## 4 结语

该研究围绕 2015 年呼和浩特市用水量对其所辖的旗县区进行水资源承载力评价,在满足评价指标体系及“三条红线”控制下,选取 11 个评价指标运用改进的灰色关联法定性计算水资源承载力状况,并利用负载指数法进行对比评价。由于负载指数法仅采用 3 个参数评价,指标数量少,评价结

论不够准确、全面。因此,以改进的灰色关联法计算结果为准。评价结果表明:呼和浩特市 6 个行政区水资源承载力较小,武川县承载力相对最大。今后若通过提高水资源承载力来支撑区域经济社会发展,必须从外流域引调水、提高用水效率等方面进行研究。

## 参考文献

- [1] 钱正英, 张光斗. 中国可持续发展水资源战略研究综合报告及各专题报告[M]. 北京: 中国水利水电出版社, 2001.
- [2] 陶洁, 左其亭, 薛会露, 等. 最严格水资源管理制度“三条红线”控制指标及确定方法[J]. *节水灌溉*, 2012 (4): 64 - 67.
- [3] 杨丹, 张昊, 管西柯, 等. 区域最严格水资源管理“三条红线”评价指标体系的构建[J]. *水电能源科学*, 2013, 31 (12): 182 - 185.
- [4] 吴书悦, 杨阳, 黄显峰. 水资源管理“三条红线”控制指标体系研究[J]. *水资源保护*, 2014, 30 (5): 81 - 85.
- [5] 刘晓, 刘虹利, 王红瑞, 等. 北京市水资源管理“三条红线”指标体系与评价方法[J]. *自然资源学报*, 2014, 29 (6): 1017 - 1028.
- [6] 延玮辰, 何俊仕, 董克宝, 等. 基于组合权重方法对蒲河流域水资源承载能力模糊综合评价[J]. *节水灌溉*, 2014 (7): 34 - 37, 41.
- [7] 李佳蕾, 刘国东, 李杰, 等. 改进的灰色关联模型在水质评价中的应用[J]. *水力发电*, 2011, 37 (12): 16 - 18.
- [8] 张薇, 韩宇舟. 负载指数法在辽河流域水资源承载力评价中的应用[J]. *水电能源科学*, 2010, 28 (11): 28 - 29, 139.
- [9] 李宁, 张文丽, 李经纬. “三条红线”约束下的鄂尔多斯市水资源承载力评价[J]. *中国农村水利水电*, 2016 (1): 8 - 11.