

## EFFECT OF THE BACTERIAL, MINERAL AND VITAMIN PREPARATION ON THE INHIBITION OF TOXIGENIC MILDEWS DEVELOPMENT IN THE PROCESS OF SILAGING OF MEADOW COVER

### Summary

*In the production conditions, in ecologic farms, the effect of the bacterial starter culture supplemented with the mineral and vitamin mix on the stimulation of development of lactic fermentation process and on inhibition of moulds development, including toxigenic ones, during the silaging of meadow grass, had been tested. The starter culture of the bacterial preparation comprised selected strains of the species as follows: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus brevis*; the mineral and vitamin additive comprised calcium, phosphorus, manganese, magnesium and zinc compounds and beta-carotene (allowed for application in ecologic production). Silages from meadow grass produced with the addition of the bacterial, mineral and vitamin preparation were characterised with higher quality, nutritive value, extended oxygen stability (up to 11 days) and the number of mildew units j.t.k. in 1 g of silage lower by two grades as compared to the silages produced without this preparation. The control (reference) silages were contaminated with moulds focuses which, after isolating and cleaning, were identified – according to their morphologic properties – as a toxigenic species *Aspergillus flavus*. On the basis of the model experiments in laboratory conditions it was stated that the isolated moulds *Aspergillus flavus* produced aflatoxin B<sub>1</sub> and total aflatoxins.*

## WPŁYW PREPARATU BAKTERYJNO-MINERALNO-WITAMINOWEGO W PROCESIE KISZENIA RUNI ŁĄKOWEJ NA HAMOWANIE ROZWOJU PLEŚNI TOKSYNOTWÓRCZYCH

### Streszczenie

*W warunkach produkcyjnych w gospodarstwach ekologicznych, badano wpływ bakteryjnej kultury starterowej uzupełnionej mieszanką mineralno-witaminową na stymulowanie procesu fermentacji mlekowej i hamowanie rozwoju pleśni w tym toksynotwórczych w czasie kiszenia runi łąkowej. W skład kultury starterowej preparatu bakteryjnego, wchodziły, wyselekcjonowane szczepy z gatunków: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus buchneri* i *Lactobacillus brevis*, w skład mieszanki mineralno-witaminowej wchodziły związki wapnia, fosforu, manganu, magnezu i cynku oraz beta-karoten (dopuszczone do stosowania w produkcji ekologicznej). Kiszonki doświadczalne z runi łąkowej wykonane z dodatkiem preparatu bakteryjno-mineralno-witaminowego, charakteryzowały się wyższą jakością, wartością pokarmową, wydłużoną stabilnością tlenową (do 11 dni) oraz o dwa rzędy wielkości niższą liczbą j.t.k pleśni w 1 g kieszonki w stosunku do kieszonki wykonanych bez dodatku tego preparatu. Kiszonki kontrolne porażone były ogniskami pleśni, które po wyizolowaniu i oczyszczeniu oznaczono, na podstawie ich cech morfologicznych, jako toksynotwórczy gatunek *Aspergillus flavus*. Na podstawie wyników, przeprowadzonych w warunkach laboratoryjnych, doświadczeń modelowych stwierdzono, że wyizolowane pleśnie *Aspergillus flavus* wytwarzają aflatoksynę B<sub>1</sub> i sumę aflatoksyn.*

### Wprowadzenie

Obecnie zwiększa się zapotrzebowanie konsumentów na żywność ekologiczną, co wywołuje potrzebę stosowania odpowiednich metod jej wytwarzania we wszystkich etapach cyklu produkcji. Uzyskanie żywności pochodzenia zwierzęcego, bezpiecznej dla zdrowia ludzi jest ściśle związane z jakością i stanem higieny pasz dla zwierząt.

Na podstawie danych z piśmiennictwa jak również wyników badań własnych, prowadzonych w latach od 2004 do 2006 w gospodarstwach ekologicznych wiadomo, że ruń łąkowa pochodząca z użytków zielonych, gdzie nie stosuje się nawożenia mineralnego, charakteryzuje się niedoborem makro i mikroelementów, a zwłaszcza wapnia, fosforu, magnezu i cynku, w stosunku do zapotrzebowania zwierząt, dla których ta pasza stanowi podstawę żywienia [3, 5, 17, 18].

Pasze objętościowe stosowane w postaci zielonek, siana lub kieszonki mogą stanowić 60% dawki pokarmowej dla bydła mięsnego i mlecznego.

Podstawowym sposobem konserwacji pasz objętościowych, do których należy ruń łąkowa jest proces kiszenia. Zachowanie czystego, nieskażonego środowiska naturalnego, wymaga wyeliminowania w rolnictwie, a zwłaszcza ekologicznym stosowania kwasów lub ich soli do poprawy procesu kiszenia pasz. W przypadku gospodarstw ekologicznych korzystne jest stymulowanie procesu kiszenia runi łąkowej naturalnymi preparatami bakteryjnymi, uzupełnionymi dodatkiem makro- i mikroelementów oraz beta-karotenu [18, 19]. Preparaty te zawierają wyselekcjonowane szczepy bakterii fermentacji mlekowej, które stosowane są jako biologicznie czynne substancje wspomagające naturalny przebieg fermentacji mlekowej [15, 18].

Kultury starterowe bakterii fermentacji mlekowej, wchodzące w skład nowej generacji preparatów, przeznaczonych do stymulowania procesu kiszenia pasz, charakteryzują się zdolnością do biosyntezy metabolitów o aktywności antybakteryjnej, oraz przeciwdziałają tlenowemu rozkładowi kieszonki, poprawiając ich jakość i stan higieniczny [6, 7, 8, 13].

Najnowsze wyniki badań Instytutu wskazują na hamujące działanie niektórych szczepów bakterii fermentacji mlekowej z rodzaju *Lactobacillus spp.*, stosowanych w procesie kiszenia, na rozwój pleśni, w tym toksynotwórczych [18, 19].

Ze względu na brak możliwości zabezpieczenia rosnących roślin przed inwazją pleśni wytwarzających mikotoksyny, konieczne jest opracowanie metod, które ograniczyłyby ich rozwój w czasie kiszenia. Obecnie rozwijają się badania zmierzające do ograniczania lub biodegradacji mikotoksyn w żywności i paszach przez wybrane mikroorganizmy w procesach biotechnologicznych, na przykład w procesie fermentacji mlekowej [2, 16].

## Cel

Celem badań była ocena wpływu preparatu bakteryjno-mineralno-witaminowego na hamowanie rozwoju pleśni, w tym wytwarzających aflatoksyny, w czasie kiszenia runi łąkowej, w gospodarstwach ekologicznych.

## Założenia badawcze

1. Ocena stopnia porażenia pleśniami kiszzonek z runi łąkowej, wytworzonych w gospodarstwach ekologicznych metodą tradycyjną bez dodatków preparatu bakteryjnego.
2. Określenie wpływu dodatku preparatu bakteryjnego i uzupełnionego mieszanką mineralno-witaminową do kiszenia runi łąkowej, na ograniczenie porażenia kiszzonek pleśniami w tym toksynotwórczymi.

## Wyniki

Badania nad opracowaniem metody produkcji kiszzonek z runi łąkowej o wysokiej jakości, uzupełnionych w makro i mikroelementy, stabilnych tlenowo, jak również nie porażonych pleśniami toksynotwórczymi, prowadzono w latach 2004-2006 w wybranych 4 gospodarstwach ekologicznych. Runi łąkowa do produkcji kiszzonek pochodziła z użytków zielonych, położonych na glebach lekkich VI klasy, wymagających nawożenia i wapnowania.

Mieszankę mineralno-witaminową stosowano w formie sypkiej w ilości 50 g/tonę kiszonych roślin, równolegle podawany był preparat bakteryjny w postaci oprysku w ilości 5 g/1 tonę zielonki, po rozpuszczeniu w wodzie. W 1 g preparatu zawarte było około  $2 \times 10^9$  j.t.k. (jednostek tworzących kolonie) bakterii fermentacji mlekowej.

Kiszonki z runi łąkowej o średniej zawartości suchej masy 36,7%, sporządzono w postaci sprasowanej w 400 kg balotach owiniętych folią kiszunkarską; bez dodatku preparatu oraz z zastosowaniem preparatu bakteryjno-mineralno-witaminowego.

Wyniki analizy dotyczącej jakości kiszzonek bez dodatku i z dodatkiem preparatu bakteryjnego i mieszanki mineralno-witaminowej uzupełniającej jego działanie przedstawiono w tab. 1.

We wszystkich gospodarstwach po upływie 6-tygodni kiszonki bez dodatku preparatu charakteryzowały się: pH – 5,2-5,4, oceną jakości mierną, zadawalającą lub dobrą, skażeniem pleśniami na poziomie od  $4 \times 10^4$  do  $2 \times 10^5$  liczby j.t.k. pleśni/g kiszonki oraz stabilnością tlenową od 3 do 4 dni.

Tab. 1. Ocena jakości kiszzonek z runi łąkowej wytworzonych bez i z dodatkiem preparatu bakteryjno-mineralno-witaminowego

Table 1. Quality evaluation of meadow cover silages made without and with additives of bacterial-mineral-vitamin preparation

Kiszonki: A-kontrolne B-doświadczalne	Sucha masa, %	pH	Zawartość kwasów organicznych, %			Ocena punktowa jakości kiszonki, wg skali Fliega-Zimmera	Liczba j.t.k. pleśni/g kiszonki	Stabilność tlenowa, dni
			mlekowego	octowego	masłowego			
<b>Gospodarstwo nr 1</b>								
A	36,4	5,4	0,35	0,52	0,15	35 mierna	$3 \times 10^4$	3-4
B	36,8	4,5	1,54	0,40	brak	95 bardzo dobra	$1 \times 10^2$	11
<b>Gospodarstwo nr 2</b>								
A	36,2	5,2	1,00	0,38	0,12	73 dobra	$3 \times 10^4$	3-4
B	37,0	4,7	1,81	0,40	0,01	100 bardzo dobra	$2 \times 10^2$	11
<b>Gospodarstwo nr 3</b>								
A	35,9	5,4	0,98	0,60	0,18	55 zadawalająca	$2 \times 10^5$	3-4
B	37,7	4,7	1,84	0,51	0,01	95 bardzo dobra	$1 \times 10^2$	11
<b>Gospodarstwo nr 4</b>								
A	36,3	5,3	1,08	0,53	0,10	68 dobra	$2 \times 10^5$	3-4
B	37,2	4,7	1,98	0,65	brak	95 bardzo dobra	$1 \times 10^2$	11

Oznaczenie zawartości kwasu L i D mlekowego, kwasu octowego i kwasu masłowego - metodą enzymatyczną (Test-UV Boehringer Mannheim) [9, 10, 11].

Ocena jakości wg skali Fliega-Zimmera [14].

Oznaczenie jednostek tworzących kolonie pleśni (j.t.k.) zgodnie z normą PN-ISO 7954: 1999.

Ocena stabilności tlenowej kiszzonek – metodą pomiarów zmian temperatury i pH w czasie przechowywania kiszonki w warunkach tlenowych w temperaturze pokojowej, wyrażona w dniach [19].

Pozytywny wpływ dodatku preparatu stymulującego proces kiszenia, zaznaczył się zwiększeniem poziomu kwasu mlekowego i obniżeniem poziomu kwasu masłowego w kiszonkach doświadczalnych, które charakteryzowały się: pH – 4,5-4,7, jakością bardzo dobrą, nieznacznym skażeniem pleśniami na poziomie od  $2 \times 10^2$  do  $5 \times 10^2$  liczby j.t.k. pleśni/g kiszonki, ponadto ich stabilność tlenowa wydłużyła się do 11 dni

W procesie kiszenia runi łąkowej działanie preparatu bakteryjnego, uzupełnionego mieszanką mineralno-witaminową, powoduje zachowanie, a nawet wzrost wartości pokarmowej, wyrażonej podwyższeniem w kiszonkach zawartości białka o 7% i obniżeniem zawartości włókna surowego o 8% ,w stosunku do materiału wyjściowego.

Wyniki średnie z trzech lat badań prowadzonych w gospodarstwach ekologicznych, przedstawiające wartość pokarmową zielonki z runi łąkowej, kiszonek bez dodatku i doświadczalnych z dodatkiem badanego preparatu, przedstawiono w tab. 2.

We wszystkich gospodarstwach ekologicznych, w których prowadzono doświadczenia, kiszonki kontrolne, wykonane bez dodatku preparatu, porażone były ogniskami pleśni. Pobrane z nich próbki pleśni poddano wielostopniowemu oczyszczaniu od innych drobnoustrojów tlenowych i beztlenowych, znajdujących się w kiszonym materiale roślinnym, w celu otrzymania czystych kultur, zgodnie z przyjętą metodyką mikrobiologiczną. Prowadzono hodowle pleśni stosując selektywne dla ich rozwoju podłoża Czapka i Sabourauda, a następnie określono cechy morfologiczne oczyszczonych jednorodnych kultur, przy zastosowaniu metod analizy makroskopowej i mikroskopowej. Wszystkie wyizolowane i oczyszczone kultury pleśni zidentyfikowano jako *Aspergillus flavus* według metod opisanych w kluczu do oznaczeń systematycznych [4].

Na rys. 1 przedstawiono obraz mikroskopowy (powiększenie 400x), wyizolowanej czystej kultury pleśni. Widoczne są konidiofory uformowane na końcach strzępek plechy, zakończone główkami konidialnymi charakterystycznymi dla gatunku *Aspergillus flavus*.

W celu potwierdzenia zdolności do syntezy aflatoksyn przez wyizolowane z kiszonej runi łąkowej pleśnie, wykonano w warunkach laboratoryjnych doświadczenie modelowe. Próbki czystych kultur pleśni, oznaczone numerami od 1-6, hodowano przez dwie doby w optymalnych warunkach (temperatura 30°C, podłoże Czapka) dla rodzaju *Aspergillus*. Po upływie tego czasu, oznaczano zawartość aflatoksyny B<sub>1</sub> i sumy aflatoksyn B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub>, wytwarzanych przez badane pleśnie i wydzielanych do podłoża

hodowanego przez badane pleśnie, przy użyciu testów immunoenzymatycznych ELISA.

Stwierdzono, że w optymalnych warunkach hodowli dla gatunku *Aspergillus flavus*, średnia zawartość w płynie po hodowlanym aflatoksyny B<sub>1</sub> wynosiła 4,35 ppb (µg/l), natomiast sumy aflatoksyn 13,78 ppb (µg/l). Uzyskane wyniki przedstawiono na rys. 2.

## Dyskusja wyników

Realizując cel pierwszego założenia badawczego, oceniono stopień skażenia pleśniami kiszonek, sporządzonych w postaci sprasowanej runi łąkowej, w 400 kg balotach owiniętych folią kiszonkarską; bez dodatku oraz z dodatkiem preparatu bakteryjno-mineralno-witaminowego.

We wszystkich gospodarstwach, w których prowadzono badania, kiszonki kontrolne zawierały średnio  $1,1 \times 10^4$  j.t.k. pleśni/lg, a ich jakość określano jako mierną, zadawalającą lub dobrą. W tych kiszonkach obserwowano występowanie pleśni, co wskazywałoby na błędy popełnione w procesie ich produkcji.

Na podstawie wyników badań cytowanych w literaturze i badań własnych, wiadomo, że kiszenie runi łąkowej z dodatkiem kultur starterowych bakterii fermentacji mlekowej, zawierających wyselekcjonowane szczepy homo i heterofermentatywnych bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, przyczynia się do zwiększenia jakości i stabilności tlenowej kiszonek, hamuje rozwój mikroorganizmów tlenowych: bakterii, drożdży i pleśni [1, 8, 13, 20].

Zgodnie z drugim założeniem badawczym, określono wpływ dodatku preparatu bakteryjnego uzupełnionego mieszanką mineralno-witaminową na ograniczenie rozwoju zarodników pleśni w czasie kiszenia runi łąkowej, a zatem obniżenie stopnia skażenia kiszonek pleśniami w tym toksynotwórczymi.

W kiszonkach doświadczalnych, sporządzanych w podobnych warunkach technicznych jak kiszonki kontrolne, nie obserwowano występowania ognisk pleśni. Ewentualne popełniane błędy przy produkcji tych kiszonek, zostały wyeliminowane w efekcie działania dodatku kultur starterowych bakterii fermentacji mlekowej, które hamowały rozwój mikroorganizmów tlenowych.

Wyselekcjonowane szczepy *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* i *Lactobacillus buchneri* wchodzące w skład kultury starterowej preparatu bakteryjnego wykazują zdolności biosyntezy enzymów poprawiających wartość pokarmową kiszonek oraz zdolność syntezy metabolitów hamujących rozwój pleśni [7, 8, 13, 20].

Tab. 2. Porównanie wartości pokarmowej zielonki oraz kiszonek wytworzonych bez i z dodatkiem preparatu bakteryjno-mineralno-witaminowego

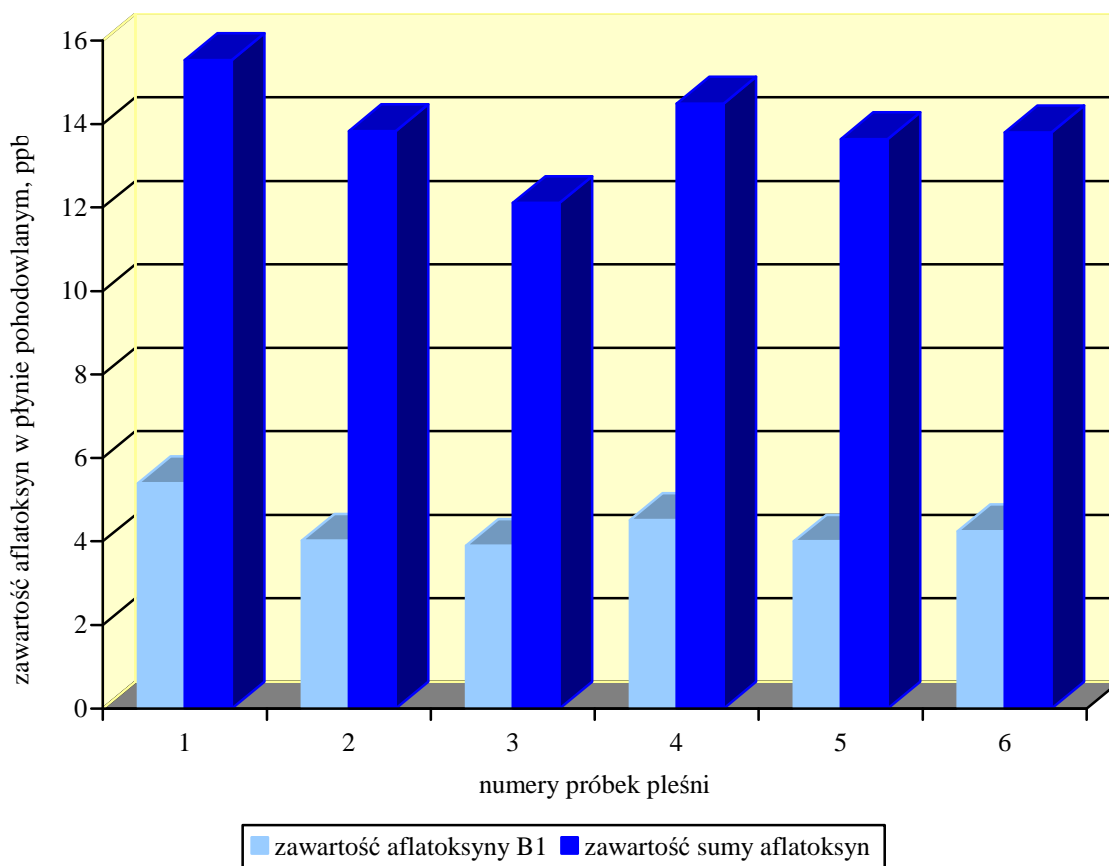
Table 2. Comparison of nutritional value of green fodder and silages made without and with additives of bacterial-mineral-vitamin preparation

Rodzaj paszy	Średnia zawartość suchej masy,%	Średnia zawartość w suchej masie,%		
		Białka ogólnego	włókna surowego	tluszczu surowego
Zielonki z runi łąkowej	36,8	14,2	26,4	3,0
Kiszonki bez dodatku preparatu	36,2	14,0	26,2	3,2
Kiszonki z dodatkiem preparatu bakteryjnego i mieszanki mineralno-witaminowej	37,2	15,2	24,2	3,3

Oznaczenie zawartości białka ogólnego, włókna surowego i tluszczu surowego – metodą analizy w bliskiej podczerwieni z zastosowaniem aparatu Infratec



Rys. 1. Obraz mikroskopowy (400x) konidioforów z główkami konidialnymi typowymi dla pleśni *Aspergillus flavus*  
 Fig. 1. Microscopic picture (400x) of conidiophores with conidial heads, typical for *Aspergillus flavus* mould



Oznaczenie zawartości aflatoksyny B<sub>1</sub> i sumy aflatoksyn B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> – metodą immunoenzymatyczną (testy-RIDASCREEN r-biopharm) [12]

Rys. 2. Zawartość aflatoksyny B<sub>1</sub> i sumy aflatoksyn w płynie po hodowli pleśni *Aspergillus flavus* wyizolowanych z kiszonek kontrolnych  
 Fig. 2. The content of aflatoxin B<sub>1</sub> and total aflatoxins in post mould culture liquid, isolated from control silages

Kiszonki z dodatkiem preparatu bakteriynego charakteryzowały się bardzo dobrą jakością ocenioną według skali Fliega-Zimmera, wyższą zawartością białka i niższą zawartością włókna oraz obniżoną o dwa rzędy wielkości zawartością j.t.k. pleśni w 1 g kiszonek, w stosunku do kiszonek kontrolnych.

Pleśnie wyizolowane z kiszonek kontrolnych, wykonanych bez dodatku preparatu, po oczyszczeniu od innych mikroorganizmów, zidentyfikowano na podstawie oznaczenia ich cech morfologicznych jako należące do gatunku *Aspergillus flavus*, o zdolności do wytwarzania aflatoksyn.

## Wnioski

1. W wyniku procesu kiszenia runi łąkowej, stymulowanego dodatkiem preparatu bakteryjnego i mieszanki mineralno-witaminowej, otrzymano kiszonki charakteryzujące się bardzo dobrą jakością – 95-100 punktów według skali Fliega-Zimmera, wydłużoną stabilnością tlenową do 11 dni i obniżoną ilością pleśni.
2. Wyizolowane z kiszonek kontrolnych pleśnie, zidentyfikowano na podstawie ich cech morfologicznych jako należące do gatunku *Aspergillus flavus*, o zdolności do wytwarzania aflatoksyn.
3. W wyniku 48 h hodowli wyizolowanych z kiszonek pleśni *Aspergillus flavus*, średnie zawartości w płynach pochodzących z hodowli aflatoksyny B<sub>1</sub> i sumy aflatoksyn wynosiły odpowiednio: 4,35 ppb (µg/l) i 13,78 ppb (µg/l).

Praca została wykonana w ramach badań prowadzonych na rzecz rolnictwa ekologicznego, dotowanych przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi.

## Literatura

- [1] Baranowski A., Richter W.: Występowanie mikotoksyn w kiszonkach. Przegląd Hodowlany, 4, 21-22, 2002.
- [2] Diaz D.F.: The Mycotoxin Blue Book, Nottingham, University Press. 2005.
- [3] Falkowski M., Kukułka I., Kozłowski S.: Właściwości chemiczne roślin. Skrypt Akademii Rolniczej w Poznaniu, Poznań 1990.
- [4] Fassati O.: Grzyby mikroskopowe w mikrobiologii technicznej. Wydawnictwa Naukowo Techniczne, Warszawa, 1983.
- [5] Karaś J.: Zielonki i ich konserwowanie. Pasze. Praca zbiorowa. Wydawnictwo Rozwój SGGW, Warszawa 1997.
- [6] Kung, L., Jr., and N. K. Ranjit.: The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. J. Dairy Sci. 84:1149-1155, 2001.
- [7] Kung, L., Jr., C. C. Taylor, M. P. Lynch, and J. M. Neylon.: The effect of treating alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 86:336-343, 2003.
- [8] Maki M.: The isolation and characterisation of a heterofermentative inoculant and its effect on silage quality and aerobic stability. Finnish Journal of Dairy Science, 53, 173, 1996.
- [9] Metoda enzymatyczna oznaczania kwasu octowego. Test-UV Boehringer Mannheim.
- [10] Metoda enzymatyczna oznaczania kwasu masłowego. Test-UV Boehringer Mannheim.
- [11] Metoda enzymatyczna oznaczania kwasu L(+) i D(-) mlekowego Test-UV Boehringer Mannheim.
- [12] Metoda immunoenzymatyczna oznaczania zawartości aflatoksyny B<sub>1</sub> i sumy aflatoksyn B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>. Testy-RIDASCREEN, r-biopharm.
- [13] Oude Elferink S.J.W.H., Driehuis F., Kroomean J., Gottschal J.C., Spoestra S.F.: *Lactobacillus buchneri* can improve the aerobic stability of silage via a novel fermentation pathway: the aerobe degradation of lactic acid to acetic and acid to 1,2 propanediol, Conference Proceedings The XII th International Silage Conference, 5-7 July, Uppsala Sweden, p. 266-267, 1999.
- [14] Podkówa W.: Nowoczesne metody kiszenia pasz. PWRiL. Warszawa, 1974.
- [15] Potkański A., Zielińska K.: Wpływ synergicznego działania LAB i enzymów na przemiany węglowodanów w czasie kiszenia pasz. I Międzynarodowa Konferencja Naukowa „Wykorzystanie bakterii mlekowych do otrzymywania produktów żywnościowych wysokiej jakości i o podwyższonej wartości odżywczej”, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, Warszawa, 2005.
- [16] Piotrowska M., Żakowska Z.: Uzdolnienia bakterii fermentacji mlekowej do biodegradacji mikotoksyn. II Szkoła Letnia „Bakterie fermentacji mlekowej – klasyfikacja, metabolizm, genetyka, wykorzystanie”, Cieschocinek, 51, 1998.
- [17] Ruszczyk Z.: Żywnienie zwierząt i paszoznawstwo. PWRiL, Warszawa 1985.
- [18] Stecka K.: Opracowanie metod sporządzania kiszonek dla gospodarstw ekologicznych. IBPRS, Warszawa (niepublikowane), 2004.
- [19] Zielińska K., Miecznikowski A., Suterska A.: Sprawozdanie z pracy pt.: Badanie wpływu szczepów *Lactobacillus plantarum* o zdolności do biosyntezy enzymów amylolytycznych i celulozytycznych, na trwałość tlenową kiszonych pasz. IBPRS, Warszawa (niepublikowane), 2000.
- [20] Zielińska K.J. Stecka K.M. Suterska A.M. Miecznikowski A.H.: Ekologiczna metoda kiszenia pasz objętościowych.; Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering, 51, 219, Poznań, 2006.