**پانزدهمین کنگره علوم خاک ایران**
۶ تا ۸ شهریور ۱۳۹۶ محور مقاله: بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک

# بررسی عملکرد باکتری *Staphylococcus gallinarum* ATHH41 تجزیه‌کننده تولوئن به صورت آزاد و تثبیت شده بر روی نانولوله کربنی

فاطمه حیدرنژاد[۱*]، مهران هودجی[۲]، مهدی شهریاری نور[۳]، آرزو طهمورث پور[۴]

[۱*] دانشجوی دکتری گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان(خوراسگان)، [۲] استاد گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان(خوراسگان)، [۳] استادیار گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت و [۴] دانشیار میکروبیولوژی گروه علوم پایه دندانپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان(خوراسگان)

## چکیده

این تحقیق به منظور تثبیت باکتری تجزیه‌کننده تولوئن به‌وسیله نانولوله‌کربنی به عنوان راه حلی برای مشکل جداسازی و امکان استفاده مجدد اجرا گردید. ابتدا اقدام به عامل‌دار کردن نانولوله‌کربنی چندجداره (MWCNTs) و سپس اقدام به تثبیت باکتری به‌وسیله نانولوله‌کربنی گردید. بهینه‌سازی درصد تجزیه تولوئن با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) صورت گرفت. برای حصول اطمینان از استقرار باکتری در سطح نانولوله‌کربنی از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) استفاده شد. طرح آماری RSM در شرایط بهینه pH، دمای انکوباسیون و غلظت اولیه تولوئن راندمان تجزیه حدود ۷۰/۷۳ درصد پیش‌بینی نمود و راندمان تجزیه ۶۸/۰۱ درصدی تولوئن در شرایط بهینه حاصل شد. همچنین راندمان تجزیه ۹۵/۶۸ درصد توسط باکتری تثبیت‌شده با نانولوله‌کربنی در شرایط بهینه حاصل شد. با توجه به نتایج می‌توان دریافت که باکتری تثبیت‌شده توسط نانولوله‌کربنی روشی مناسب و دوستدار محیط زیست برای پاک‌سازی آلاینده‌های هیدروکربنی آروماتیک است.

واژه های کلیدی: تجزیه بیولوژیکی، تثبیت باکتری استافیلوکوکوس گالیناروم ATHH41، روش سطح پاسخ، نانولوله کربنی.

## مقدمه

مدتهاست که مواد نفتی و مشتقات آن در اثر حمل و نقل یا ذخیره‌سازی موجب آلودگی آب و خاک می‌شوند (عبدالسلام[۱] و همکاران، ۲۰۰۹). در این میان هیدروکربن‌های مونوآروماتیک (بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و ایزومرهای زایلن)، موجود در بسیاری از فرآورده‌های نفتی، از جمله تولوئن تهدیدی برای سلامت و محیط زیست محسوب می‌شوند (سینگ[۲] و همکاران، ۲۰۰۹). با توجه به اثرات سمی و سرطان‌زایی تولوئن و ورود آن به آب‌های آزاد و زیرزمینی که زندگی آبزیان، انسان و سایر موجودات را تهدید می‌کند، ضرورت جداسازی میکروارگانیسم‌هایی که قادر به تجزیه زیستی این ترکیب هستند، مشخص می‌شود. به علت آن که اصلاحات ژنتیکی و بهبود فعالیت باکتری، قادر به حل مشکل امکان استفاده مجدد از سلول‌ها در فرآیند توسعه صنعتی نیست، تثبیت‌کردن سلول‌ها به عنوان راهی برای حل مشکل جداسازی میکرواورگانیسم و امکان استفاده مجدد از آن، در چند سال اخیر مورد توجه قرار گرفته است. تثبیت‌کردن سلول‌ها باعث پایداری و مقاومت بیشتر آن‌ها در برابر نوسانات محیطی (مثل مواد سمی، دما، pH) نسبت به سلول‌های آزاد می‌شود (دورسان و تپه[۳]، ۲۰۰۵). در سال‌های اخیر به استفاده از مواد نانو به عنوان جاذب و تجزیه‌کننده مواد سمی و مضر از پساب‌ها و هوا توجه زیادی شده است (یانگ[۴] و همکاران ۲۰۰۶). مقایسه جاذب‌های مختلف نشان می‌دهد که نانولوله‌های‌کربنی نسبت به سایر جاذب‌ها در حذف ترکیبات آلی و حفاظت از محیط زیست پتانسیل بیشتری دارند (آیوالیوتی[۵] و همکاران، ۲۰۱۰). ظرفیت جذب بالای نانولوله‌های‌کربنی در حذف آلاینده‌های آلی به علت ساختار متخلخل این نانولوله‌ها و وجود مقادیر زیادی از گروه‌های عامل سطحی در آن‌ها

[1] Abd-Elsalam et al
[2] Singh et al.,
[3] Dursun and Tepe
[4] Yang et al.,
[5] Aivalioti et al.,

است. مکانیسم جذب تولوئن توسط نانولوله‌های کربنی عمدتاً ناشی از واکنش بینابینی گیرندگی الکترون و دهندگی الکترون بین حلقه آروماتیک تولوئن و گروه‌های کربوکسیلیک سطحی موجود برروی نانولوله‌های‌کربنی است (دی‌ملو[1] و همکاران، ۲۰۱۰).

در این مطالعه بر آن هستیم تا از طریق باکتری‌های مقاوم به تولوئن تثبیت شده توسط نانولوله کربنی، آن را به یک فیلتر مناسب برای حذف تولوئن تبدیل نمائیم.

## مواد و روش‌ها

طراحی آزمایش

هنگامی که عوامل و روابط زیادی روی متغیر پاسخ تأثیر داشته باشند، روش سطح پاسخ[2] (RSM) یکی از ابزارهای موثری است که با کمترین منابع و داده‌های کمی، و با طرح آزمایشی مناسب همزمان چندین متغیر را تعیین می‌کند (مایرز[3] و همکاران، ۲۰۱۶). طرحی مرکب از ۳ متغیر مستقل pH، دمای انکوباسیون و غلظت اولیه تولوئن تشکیل گردید. برای هر فاکتور نسبت به صفر مقادیری تعیین گردید که به آن‌ها مقادیر کد شده اتلاق می‌گردد. با استفاده از این ۳ فاکتور و ۵ سطح کد شده ( $+\alpha$، ۱ +، ۰ ، ۱ -، $-\alpha$)، با استفاده از نرم افزار Design-Expert 7.1 ۲۰ آزمایش طراحی گردید. هدف بهینه‌کردن متغیر پاسخ به‌گونه‌ای است که رابطه درستی بین متغیرهای مستقل (pH، دمای انکوباسیون و غلظت اولیه تولوئن) و متغیر پاسخ (درصد تجزیه تولوئن) برقرار شود.

بررسی تجزیه تولوئن در شرایط آزمایشگاهی

غلظتی معادل با ۰/۵ مک فارلند از باکتری استافیلوکوکوس گالیناروم[4] سویه ATHH41 در محیط کشت اختصاصی[5] (MSM) شامل: $NaNO_3$ 4g، $KH2PO_4$ 1.5g، $Na_2HPO_4$ 0.5g، $MgSO_4.7H_2O$ 0.2g، $FeSO_4.H_2O$ 0.0011g، $CaCl_2$ 0.01g، حاوی 100 میلی‌گرم در لیتر تولوئن تهیه گردید. ۱۰ میکرولیتر از آن به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت MSM مایع تلقیح گردید مقادیر مختلف pH، دمای انکوباسیون و غلظت اولیه تولوئن تنظیم شد و به مدت ۲۴ ساعت و با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه انکوبه شد. سپس نمونه‌ها با سرعت 6000 rpm و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید به مایع رویی ۱ میلی‌لیتر هگزان اضافه و به شدت تکان داده شد تا تولوئن موجود در محیط کشت در آن حل گردید. در پایان از فاز رویی که حاوی هگزان و تولوئن بود برای اندازه‌گیری میزان تولوئن در طول موج 262 نانومتر استفاده شد (وانگ و همکاران، ۲۰۰۸).

تعیین صحت مدل سطح پاسخ

برای حصول اطمینان از صحت شرایط بهینه پیش‌بینی شده توسط روش سطح پاسخ، پس از تعیین بهترین مقادیر (طی پیش‌بینی نرم افزار) تجزیه تولوئن توسط باکتری در شرایط بهینه مجدداً به طور تجربی مورد آزمایش قرار گرفت و نتایج حاصله با نتایج پیش‌بینی شده مورد مقایسه قرار گرفت.

عامل‌دار کردن نانولوله کربنی

نانولوله کربنی چندجداره[6] (MWCNT) از شرکت پیشگامان نانومواد ایرانیان در مشهد وارد کننده نانومواد از کمپانی آمریکاییUS Research Nanomaterials تهیه شد. قطر داخلی نانولوله کربنی ۱۰-۵ نانومتر، قطر خارجی ۳۰-۲۰ نانومتر، سطح ویژه ۱۱۰< مترمربع بر گرم و درجه خلوص بالای ۹۸ درصد می‌باشد. جهت عامل‌دار کردن نانولوله‌های کربنی، مقدار ۱ گرم از آن به ۶۰ میلی‌لیتر مخلوط اسید نیتریک (۱۵/۶ مولار) و اسید سولفوریک (۱۴/۸ مولار) (با نسبت حجمی ۳ به ۱)،

[1] DE Mello et al.,
[2] Response Surface Methodology
[3] Myers et al.,
[4] *Staphylococcus gallinarum*
[5] Minimal Salt Medium
[6] Multiwalled Carbon Nanotube

اضافه و به مدت ۳ ساعت با استفاده از اولتراسونیک پراکنده‌سازی گردید (ژانگ[1] و همکاران، ۲۰۱۱). سپس مخلوط را با صافی ۰/۴۵ میکرون نیترات سلولزی فیلتر کرده پس از آن، مواد اسیدی با عملیات شستشو با آب مقطر و استفاده از سانتریفوژ با سرعت ۹۰۰۰ دور دردقیقه خارج شد تا pH خنثی حاصل شود. در نهایت نانو لوله‌های عامل‌دار شده جمع‌آوری و در ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱۲ ساعت در آون خشک گردید (پان[2] و همکاران، ۲۰۰۷).

تجزیه تولوئن توسط باکتری تثبیت شده توسط نانولوله کربنی

سوسپانسیونی از نانولوله‌های کربنی کربوکسیله با مقدار ۰/۰۵ گرم در لیتر آب مقطر استریل تهیه شد. برای پخش بهتر نانولوله کربنی به مدت ۳۰ دقیقه اولتراسونیک گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون نانولوله کربنی کربوکسیله به ۱۰ میلی‌لیتر MSM انتقال داده شد. شرایط بهینه pH، دمای انکوباسیون و غلظت اولیه تولوئن تنظیم گردید. بعد از انکوبه شدن در ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت، در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید پس از عبور از صافی ۰/۴۵ میکرون نیترات سلولزی برای اندازه‌گیری میزان تولوئن در طول موج ۲۶۲ نانومتر با اسپکتروفتومتر استفاده شد.

آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

برای حصول اطمینان از استقرار باکتری در سطح نانولوله‌کربنی از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) استفاده شد.

## نتایج و بحث

بهینه‌سازی متغیرهای موثر بر تجزیه تولوئن با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM)

به منظور بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر تجزیه تولوئن از طراحی آزمایش‌ها با روش سطح پاسخ (RSM) استفاده گردید و سطوح بهینه هر پارامتر تعیین شد. آزمایش‌های بهینه طراحی شده RSM و تجزیه تولوئن به عنوان سطوح پاسخ در جدول ۱ آورده شده است. نتایج نشان داد که حداکثر میزان تجزیه تولوئن توسط باکتری *استافیلوکوکوس گالیناروم* سویه ATHH41 در pH برابر ۷، دمای انکوباسیون ۳۰ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۷۰۰ میلی‌گرم در لیتر تولوئن مشاهده گردید و تجزیه تولوئن معادل ۶۹/۷۳ درصد بوده است.

**جدول ۱- نتایج آزمایش‌های بهینه طراحی شده باکتری *استافیلوکوکوس گالیناروم* سویه ATHH41 در RSM**

| شماره آزمایش | pH | دمای انکوباسیون | غلظت اولیه تولوئن | تجزیه تولوئن(٪) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | (°C) | ($mg.l^{-1}$) | مقادیر تجربی | مقادیر پیش‌بینی شده |
| ۱ | ۷ | ۳۰ | ۱۹۵/۴۶ | ۶۰/۷۰ | ۶۰/۴۰ |
| ۲ | ۶ | ۲۵ | ۴۰۰ | ۴۸/۰۲ | ۴۷/۹۰ |
| ۳ | ۸ | ۲۵ | ۴۰۰ | ۵۷/۱۵ | ۵۷/۱۴ |
| ۴ | ۶ | ۳۵ | ۴۰۰ | ۵۹/۱۷ | ۶۰/۳۶ |
| ۵ | ۸ | ۳۵ | ۴۰۰ | ۶۷/۹۶ | ۶۷/۵۲ |
| ۶ | ۷ | ۲۱/۵۹ | ۷۰۰ | ۵۴/۹۴ | ۵۵/۳۸ |
| ۷ | ۵/۳۲ | ۳۰ | ۷۰۰ | ۵۱/۲۳ | ۵۰/۲۲ |
| ۸ | ۷ | ۳۰ | ۷۰۰ | ۶۹/۶۴ | ۶۹/۲۲ |
| ۹ | ۷ | ۳۰ | ۷۰۰ | ۶۹/۷۲ | ۶۹/۲۲ |
| ۱۰ | ۷ | ۳۰ | ۷۰۰ | ۶۹/۷۳ | ۶۹/۲۲ |
| ۱۱ | ۷ | ۳۰ | ۷۰۰ | ۶۹/۵۰ | ۶۹/۲۲ |
| ۱۲ | ۷ | ۳۰ | ۷۰۰ | ۶۸/۳۰ | ۶۹/۲۲ |
| ۱۳ | ۷ | ۳۰ | ۷۰۰ | ۶۸/۳۹ | ۶۹/۲۲ |
| ۱۴ | ۸/۶۸ | ۳۰ | ۷۰۰ | ۶۵/۳۹ | ۶۶/۲۱ |
| ۱۵ | ۷ | ۳۸/۴۱ | ۷۰۰ | ۶۴/۵۴ | ۶۳/۹۱ |
| ۱۶ | ۶ | ۲۵ | ۱۰۰۰ | ۵۵/۳۱ | ۵۵/۸۹ |

[1] Zhang et al.,
[2] Pan et al.,

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ۱۷ | ۸ | ۲۵ | ۱۰۰۰ | ۶۸/۸۰ | ۶۷/۷۴ |
| ۱۸ | ۶ | ۳۵ | ۱۰۰۰ | ۵۵/۵۰ | ۵۵/۶۶ |
| ۱۹ | ۸ | ۳۵ | ۱۰۰۰ | ۶۵/۱۸ | ۶۵/۴۳ |
| ۲۰ | ۷ | ۳۰ | ۱۲۰۴/۵۴ | ۶۵/۲۵ | ۶۵/۳۶ |

تجزیه زیستی تولوئن در شرایط بهینه pH، دمای انکوباسیون و غلظت اولیه تولوئن

بهینه سطوح متغیرهای مورد آزمایش برای حداکثر درصد تجزیه تولوئن براساس مدل رگرسیون به وسیله روش سطح پاسخ (RSM) پیش‌بینی شد. بهترین شرایط پیش‌بینی شده توسط باکتری در جدول ۲ آورده شده است. لذا آزمایشی بر این اساس انجام شد و درصد تجزیه تولوئن در شرایط واقعی تعیین گردید نتایج در جدول ۲ مشاهده می‌گردد.

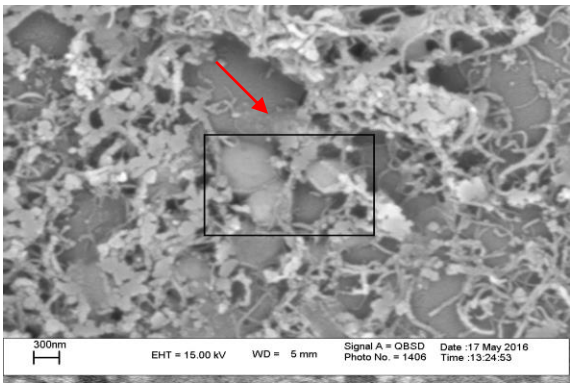
**جدول ۲- شرایط بهینه تجزیه تولوئن پیش‌بینی شده توسط روش سطح پاسخ (RSM)**

| | pH | دمای انکوباسیون (°C) | غلظت اولیه تولوئن ($mg.l^{-1}$) | تجزیه تولوئن(٪) مقدار تجربی | تجزیه تولوئن(٪) مقدار پیش‌بینی شده |
|---|---|---|---|---|---|
| *Staphylococcus gallinarum* ATHH41 | ۷/۶۸ | ۳۱/۷۳ | ۶۳۶/۰۴ | ۶۸/۰۱ | ۷۰/۷۳ |

بررسی عامل‌دار کردن نانولوله کربنی

تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی باکتری تثبیت شده توسط نانولوله کربنی

باکتری تثبیت شده توسط نانولوله کربنی را در شرایط ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تولوئن توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM مشاهده گردید. شکل ۱ نشان می‌دهد که سلول‌های باکتری در میان نانولوله به دام افتاده است که می‌توان آن را با توجه به فعل و انفعالات سلول‌های باکتری با سطوح خارجی نانولوله دانست. همچنین هیچ تغییر مهمی در مرفولوژی سلول-های باکتریایی پس از انکوباسیون توسط نانولوله کربنی وجود نداشت. تصاویر SEM نشان می‌دهد که خوشه‌های نانولوله کربنی بدون هیچ آسیبی به دیواره سلولی باکتری می‌چسبند. عدم تغییر ساختار باکتری تثبیت شده توسط نانولوله کربنی پس از جذب تولوئن در این تحقیق از مزایای روش اصلاحی به کار برده شده است که در سایر تحقیقات (کلنگی‌خواه[1] و همکاران، ۲۰۱۲) نیز به آن اشاره شده است.

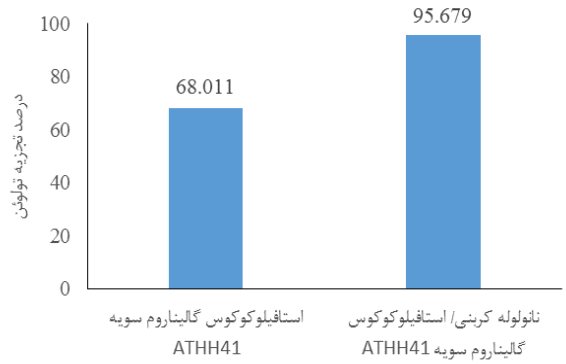



**شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانولوله کربنی/ باکتری استافیلوکوکوس گالیناروم سویه ATHH41**

[1] Kolangikhah et al.,

راندمان تجزیه تولوئن در شرایط بهینه توسط باکتری تثبیت شده توسط نانولوله کربنی

حذف ۶۳۶/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر تولوئن به‌وسیله سلول‌های آزاد و تثبیت شده *استافیلوکوکوس گالیناروم سویه ATHH41* با مقادیر مختلف نانولوله‌کربنی تحت شرایط بهینه pH ۷/۶۸ و دمای انکوباسیون ۳۱/۷۳ درجه سانتی‌گراد طی مدت ۲۴ ساعت و ۱۵۰ دور در دقیقه انکوباسیون صورت گرفت. نتایج مقایسه راندمان تجزیه تولوئن توسط باکتری و باکتری تثبیت شده توسط نانولوله‌کربنی در شکل ۲ در شرایط بهینه pH، دمای انکوباسیون، غلظت اولیه تولوئن و مقدار نانولوله‌کربنی ارائه شده است. تولوئن، در pH برابر۷/۶۸، درجه حرارت ۳۱/۷۳ درجه سانتی‌گراد و غلظت اولیه ۶۳۶/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر، ۶۸٪/۰۱ توسط سلول‌های آزاد و ۹۵/۶۸٪ توسط سلول‌های تثبیت شده *استافیلوکوکوس گالیناروم سویه ATHH41* تجزیه گردید. مقایسه راندمان تجزیه تولوئن توسط باکتری و باکتری تثبیت شده توسط نانولوله‌کربنی نشان می‌دهد که راندمان تجزیه توسط باکتری تثبیت شده توسط نانولوله کربنی بیشتر است.




**شکل ۲- مقایسه درصد حذف تولوئن توسط سلول‌های آزاد و سلول‌های تثبیت شده *استافیلوکوکوس گالیناروم سویه ATHH41* توسط نانولوله کربنی**

## منابع

Abd-Elsalam H.E., Hafez E.E., Hussain A.A., Amany G.A. and Hanafy A.A. 2009. Isolation and identification of three-ring polyaromatic hydrocarbons (anthrancene and phenanthrene) degrading bacteria. American-Eurasian Journal of Agriculture and Environment Science, 5(1): 31-38.

Aivalioti M., Vamvasakis I. and Gidarakos E. 2010. BTEX and MTBE adsorption onto raw and thermally modified diatomite. Journal of Hazardous Materials, 178(1): 136-143.

DE Mello J.M., De Lima Brandao H., De Souza A.A., Da Silva A. and Ulson S.M. 2010. Biodegradation of BTEX compounds in a biofilm reactor-modeling and simulation. Journal of Petroleum Science and Engineering, 70(1): 131-139.

Dursun A.Y. and Tepe O. 2005. Internal mass transfer effect on biodegradation of phenol by ca-alginate immobilized Ralstonia eutropha. Journal of Hazardous Materials, 126(1): 105-111.

Kolangikhah M., Maghrebi M., Ghazvini K. and Farhadian N. 2012. Separation of Salmonella typhimurium bacteria from water using MWCNTs arrays. International Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 8(1): 3-10.

Myers R.H., Montgomery D.C. and Anderson-Cook C.M. 2016. Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. 4th edition. John Wiley and Sons.

Pan X., Fan Z., Chen W., Ding Y., Luo H. and Bao X. 2007. Enhanced ethanol production inside carbon-nanotube reactors containing catalytic particles. Nature Materials, 6(7): 507-511.

Singh A., Sar P. and Bennett G.N. 2009. Isolation and characterization of benzene degrading bacteria from gasoline contaminated water. Clean Technology, 15: 286-289.

Yang K., Wang X., Zhu L. and Xing B. 2006. Competitive sorption of pyrene, phenanthrene, and naphthalene on multiwalled carbon nanotubes. Environmental Science and Technology, 40(18): 5804-5810.

Zhang L., Petersen E.J. and Huang Q. 2011. Phase distribution of 14C-labeled multiwalled carbon nanotubes in aqueous systems containinig model solids: Peat. Environmental Science & Technology, 45(4): 1356-1362.

# Evaluation Performance of Toluene Degradation Bacteria *Staphylococcus gallinarum* ATHH41 as Free and Immobilized by Carbon Nanotubes

F. Heydarnezhad[1*], M. Hoodaji[2], M. Shahriarinour[3], A. Tahmourespour[4]

[1*] Ph.D. Student of Soil Biology and Biotechnology, Soil Science Department, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University. Email: fatemehheydarnezhad@yahoo.com
[2] Professor of Soil Science, Soil Science Department, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University.
[3] Assistant professor of Microbiology, Basic Sciences Department, Rasht Branch, Islamic Azad University.
[4] Associated professor of Microbiology, Basic Medical Sciences Department, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University.

## Abstract

Present study was designed to immobilize toluene degrading bacteria by carbon nanotubes as a solution to the separation and reuse problems. In this study, multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) functionalized and then the bacteria was immobilized by MWCNTs. To ensure the stabilization of bacteria in the carbon nanotube scanning electron microscopy were used. RSM design at optimum condition of pH, incubation temperature and initial toluene concentration, predict toluene degradation efficiency of about 70.73 percent and toluene degradation efficiency of 68.01 percent by bacteria was obtained under optimum conditions. The degradation efficiency of 95.68 percent by immobilized bacteria with carbon nanotubes was obtained under optimum conditions. According to the results, the use of immobilized bacteria by carbon nanotubes was suitable and environmentally friendly method, for biodegradation of aromatic.

**Keywords:** Biodegradation, Immobilization of *Staphylococcus gallinarum* ATHH41 bacteria, Response surface methodology, Carbon nanotube.