

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ БАКТЕРИАЛЬНОГО ФЕРРИГИДРИТА ДОПИРОВАННОГО АЛЮМИНИЕМ НА НЕФТЕЗАГРЯЗНЕНИЕ

© 2018 М.Е. Баранов

Сибирский государственный университет науки и технологий имени академика М.Ф. Решетнева, Красноярск, Красноярский край, Россия

В статье рассматривается вопрос использования наночастиц бактериального ферригидрита ($5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) допированного алюминием (FeAl) для снижения фитотоксичности нефтезагрязнённого почвенного субстрата. Предлагается провести оценку антитоксического эффекта при повышенном загрязнении нефтепродуктами, сравнить уровень фитотоксичности (снижение всхожести и энергии прорастания тест-культуры *Lepidium sativum* L.). Определить оптимальные концентрации наночастиц для нейтрализации нефтепродуктов в почве.

Ключевые слова: почвенный субстрат, нефтезагрязнение, наночастицы, биотестирование, кресс-салат.

Поступила в редакцию: 25.05.2018

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время загрязнение нефтью и нефтепродуктами является самой актуальной проблемой техногенного загрязнения окружающей среды [1-6]. На сегодняшний момент существует набор термических, механических, физико-химических и биологических методов рекультивации нефтезагрязнённых территорий [7-10]. Однако все эти методы имеют свои недостатки и ограничения, поэтому в мире идёт постоянный поиск новых подходов к ликвидации нефтезагрязнений.

В последние годы стали появляться публикации, рассматривающие перспективы использования нанотехнологий и наноматериалов в качестве альтернативы традиционным методам очистки окружающей среды от поллютантов [11-14]. Настоящая работа посвящена изучению возможности использования наночастиц ферригидрита бактериального происхождения для ремедиации территории, подвергавшейся длительному загрязнению нефтепродуктами.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследования являлся почвенный субстрат на территории бывшей воинской части, расположенной в районе поселка памяти 13 Борцов, Емельяновского района Красноярского края. Объект представляет собой ровную площадку с размещёнными наземными и подземными емкостями для хранения нефтепродуктов. При ликвидации воинской части в период с 2004 по 2007 год на участке происходили аварийные разливы мазута, дизельного топлива и автобензина. Брошены бесхозные бочки, топливная арматура (рис. 1).

По данным специалистов службы по контролю в сфере природопользования администрации Красноярского края качество почвы земельного участка не соответствует ПДК и ОДК по нефтепродуктам (более в 700 раз). В 2011 году была проведена механическая рекультивация загрязнённой территории. Несмотря на проведённую рекультивацию, биотестирование с использованием кресс-салата *Lepidium sativum* L. показало высокую фитотоксичность почвенного субстрата, отобранного на рекультивированной территории. Максимальный уровень фитотоксичности (снижение

всхожести и энергии прорастания тест-культуры на 40-50% в сравнении с контролем) наблюдался в южной и северной областях восточной оконечности участка [15].



Рис. 1. – Проливы нефтепродуктов на исследуемом объекте (фото автора) [Spills of oil products on the investigated object (photo of the author)]

В экспериментах по снижению фитотоксичности почвенного субстрата использовали суспензию наночастиц допированного алюминием бактериального ферригидрита (FeAl). Данные частицы синтезируются гетеротрофными бактериями при выращивании на питательной среде, содержащей органические соли железа, размер частиц составляет преимущественно 2-5 нанометра [16]. Наночастицы использовали в виде устойчивого водного золя, полученного по технологии, описанной в патенте РФ на изобретение 2457074 [17].

Растения кресс-салата выращивали в пластиковых сосудах с почвенным субстратом весом 100 г, отобранным из участка с максимальной фитотоксичностью. Внесение наночастиц проводили однократно в виде смесей водного золя наночастиц с дистиллированной водой в концентрациях от 0,1 до 1,0 мл золя на 100 мл смеси. Контролем служили сосуды с тем же субстратом, в которые вносилась дистиллированная вода без наночастиц. В качестве дополнительного контроля использовали нетоксичный почвенный субстрат, отобранный из незагрязнённого участка ("чистый" контроль). В качестве показателей учитывали динамику прорастания семян и длины проростков. Статистическую значимость различий между опытными и контрольными вариантами по энергии прорастания и всхожести тест-культуры проверяли точным критерием Фишера для таблиц 2x2, значимость различий по длине проростков проверяли t-критерием [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Предварительные эксперименты показали, что использованные в исследовании наночастицы в указанном диапазоне концентраций сами по себе не оказывают статистически значимого влияния на энергию прорастания, всхожесть и ростовые показатели кресс-салата. В то же время на фоне остаточного нефтяного загрязнения наночастицы оказали статистически значимое стимулирующее влияние как на энергию прорастания и всхожесть, так и на ростовые характеристики кресс-салата. Это влияние выразилось в увеличении показателей всхожести и роста кресс-салата вплоть до значений, соответствующих "чистому" контролю или даже превышающих соответствующие

показатели в "чистом" контроле. При этом отмечено закономерное увеличение антитоксического эффекта при повышении концентрации наночастиц (табл. 1).

Таблица 1. – Влияние концентрации суспензии наночастиц ферригидрита на энергию прорастания и всхожесть кресс-салата на загрязнённом мазутом субстрате (контроль – незагрязнённый почвенный субстрат) [Influence of ferrihydrite nanoparticles suspension concentration on the germination energy and the emergence of cress on a fuel oil contaminated substrate (control - uncontaminated soil substrate)]

Концентрация наночастиц, мл золя на 100 мл смеси	Энергия прорастания, %	Значимость различий с контролем, р	Всхожесть, %	Значимость различий с контролем, р
0,0	36	<0,001	42	<0,001
0,1	34	<0,001	52	<0,001
0,2	40	<0,001	50	<0,001
0,3	38	<0,001	50	<0,001
0,4	50	<0,001	66	<0,001
0,5	66	нет	68	<0,001
0,6	50	<0,001	72	<0,01
0,7	72	нет	76	<0,05
0,8	76	нет	80	нет
0,9	82	нет	84	нет
1,0	84	нет	86	нет
Контроль	74	-	88	-

Как видно из представленных данных, по мере увеличения концентрации допированных алюминием наночастиц энергия прорастания и всхожесть тест-культуры возрастает вплоть до исчезновения статистически значимых различий с "чистым" контролем. На начальных стадиях прорастания кривая "эффект-доза" носит отчётливо нелинейный характер. При этом на высоких концентрациях наночастиц отмечается превышение показателей прорастания в сравнении с "чистым" контролем в 1,3-1,5 раза (рис. 2, 3).

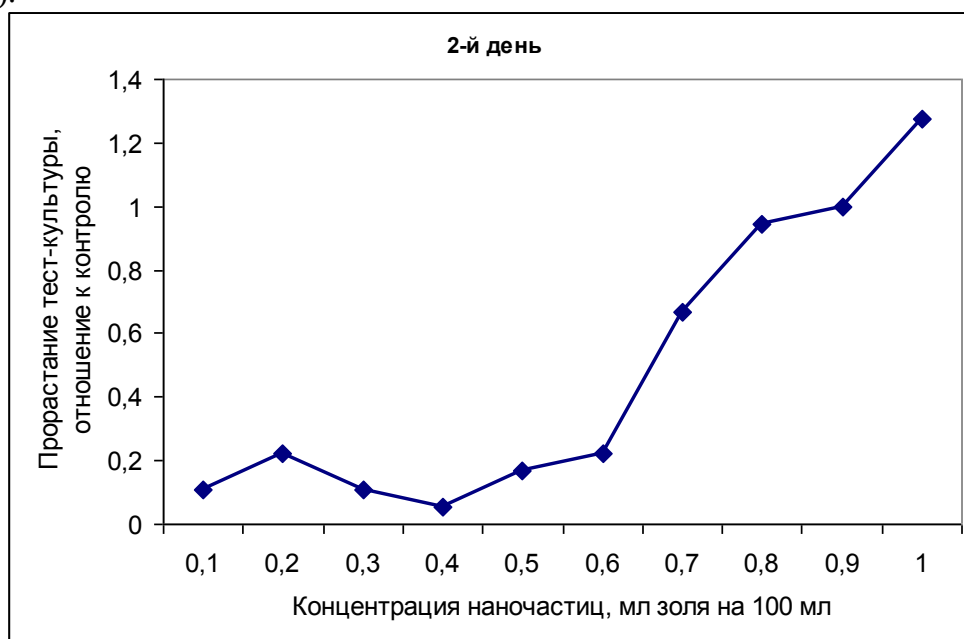


Рис. 2. – Влияние концентрации наночастиц ферригидрита на прорастание кресс-салата через 2 суток, отношение к аналогичному показателю в "чистом" контроле [Influence of ferrihydrite nanoparticles concentration on the germination of cress after 2 days, the ratio to the similar indicator in "pure" control]

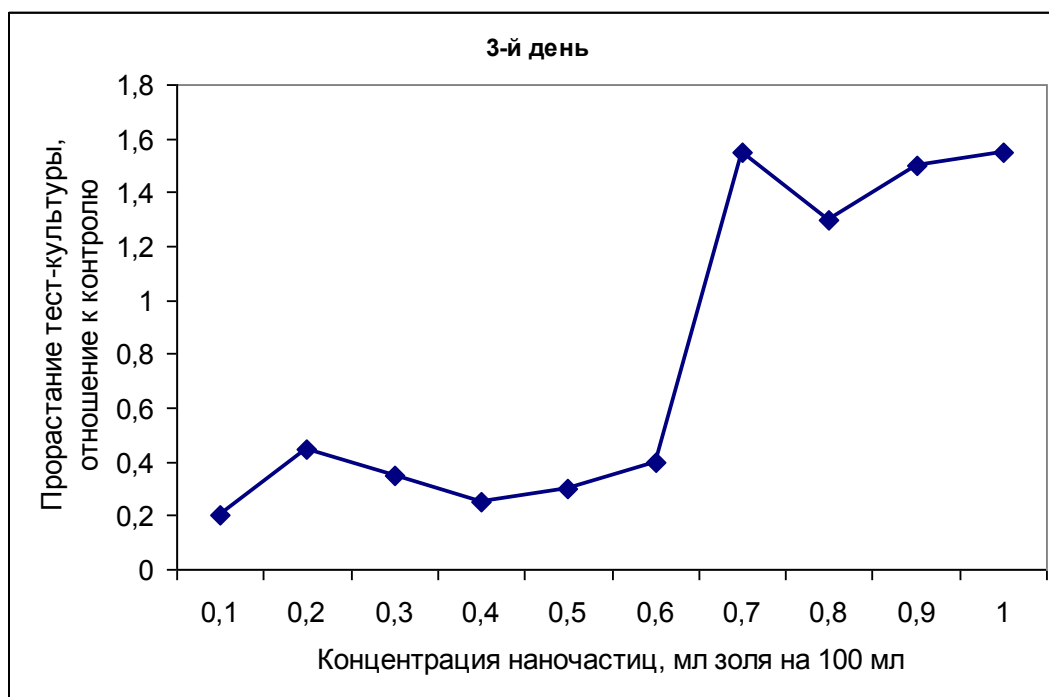


Рис. 3. – Влияние концентрации наночастиц бактериального ферригидрита на прорастание кресс-салата через 3 суток, отношение к аналогичному показателю в "чистом" контроле [Influence of bacterial ferrihydrite nanoparticles concentration on germination cress after 3 days, the ratio to the same indicator in the "clean" control]

На более поздних стадиях эксперимента происходит сглаживание кривой "эффект-доза" вплоть до приобретения ей линейного характера. Параллельно с этим нивелируются различия по прорастанию с "чистым" контролем (рис. 4, 5).

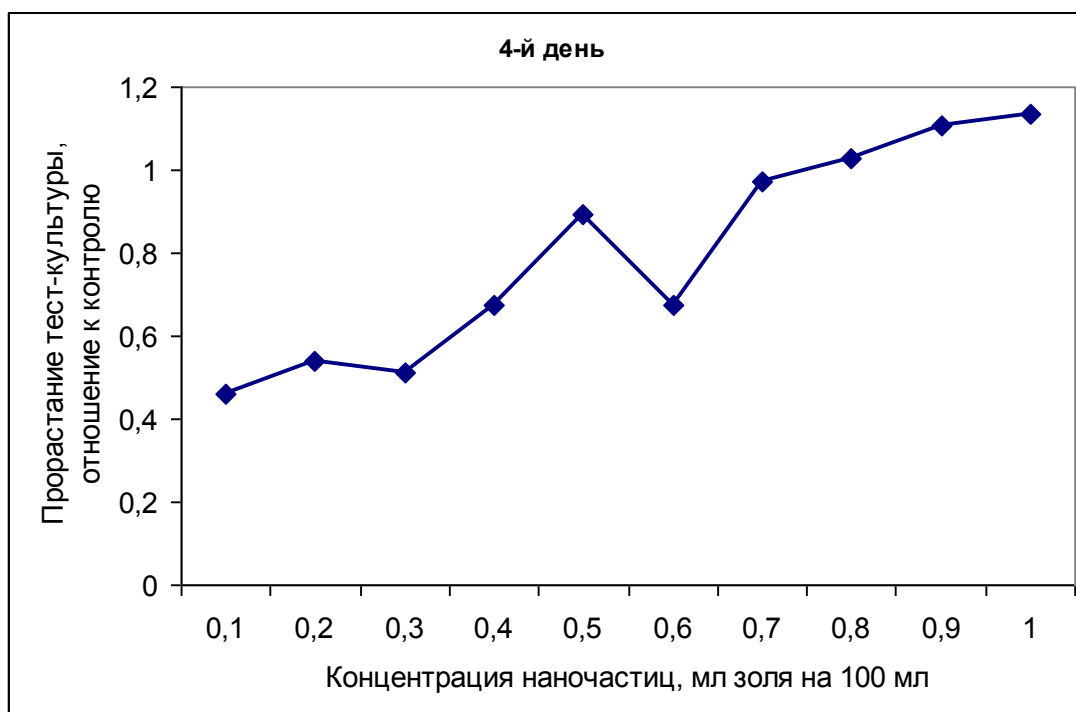


Рис. 4. – Влияние концентрации наночастиц бактериального ферригидрита на прорастание кресс-салата через 4 суток, отношение к аналогичному показателю в "чистом" контроле [Influence of bacterial ferrihydrite nanoparticles concentration on the germination of cress after 4 days, the ratio to the similar indicator in "pure" control]

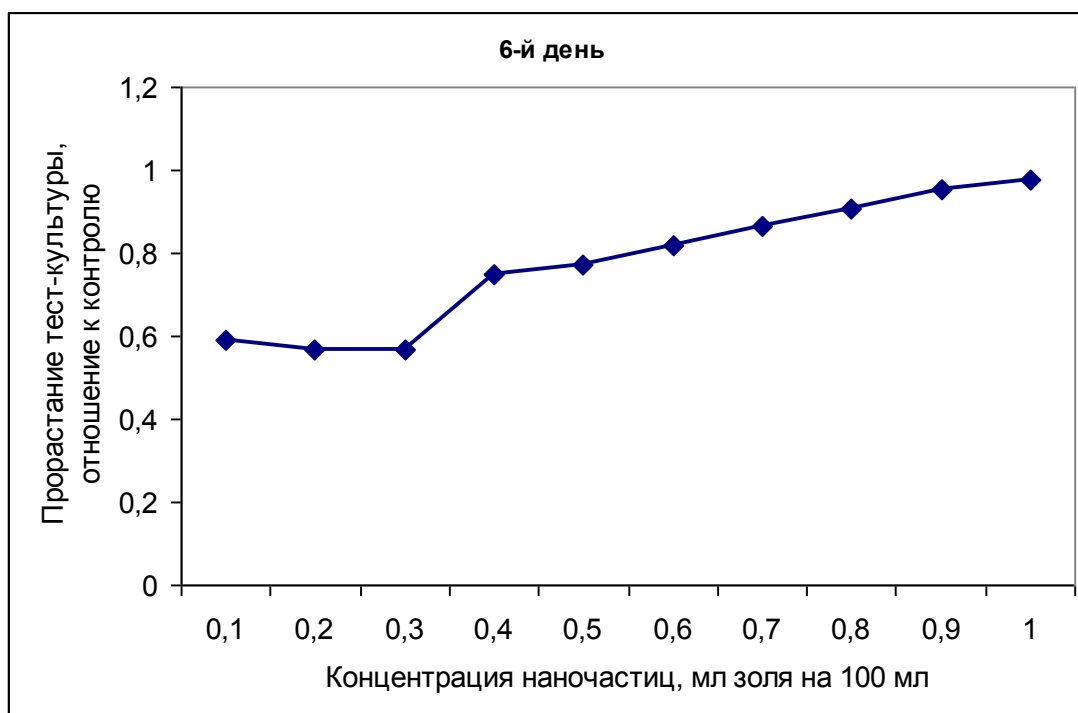


Рис. 5. – Влияние концентрации наночастиц бактериального ферригидрита на прорастание кресс-салата через 6 суток, отношение к аналогичному показателю в "чистом" контроле [Influence of bacterial ferrihydrite nanoparticles concentration on the germination of cress after 6 days, the ratio to the similar indicator in "pure" control]

В целом, можно констатировать, что в диапазоне концентраций 0,8 – 1,0 мл на 100 мл суспензии золь наночастиц, допированных алюминием, полностью устраняет определяемую по всхожести и энергии прорастания фитотоксичность загрязнённого нефтепродуктами субстрата. Концентрации ниже 0,7 мл на 100 мл также статистически значимо снижают фитотоксичность, однако полного устранения фитотоксичности субстрата не наблюдается.

Наряду со стимулированием прорастания, наночастицы бактериального ферригидрита, допированные алюминием, оказали существенное влияние на биометрические свойства проростков кресс-салата при выращивании на загрязнённом нефтепродуктами почвенном субстрате. Это влияние проявилось в статистически значимом ускорении роста в сравнении как с "грязным", так и с "чистым" контролем. Само по себе остаточное мазутное загрязнение не оказало статистически значимого влияния на ростовые параметры тест-культуры (рис.6).

В то же время внесение в загрязнённый субстрат суспензии наночастиц в концентрациях 0,7 мл золя на 100 мл и выше привело к статистически значимому ($p < 0,05$.. $p < 0,01$) увеличению скорости роста проростков, что проявилось в увеличении как средней, так и максимальной длины проростков, при этом стимулирующий эффект сохранялся в течение всего эксперимента (рис. 7, 8).

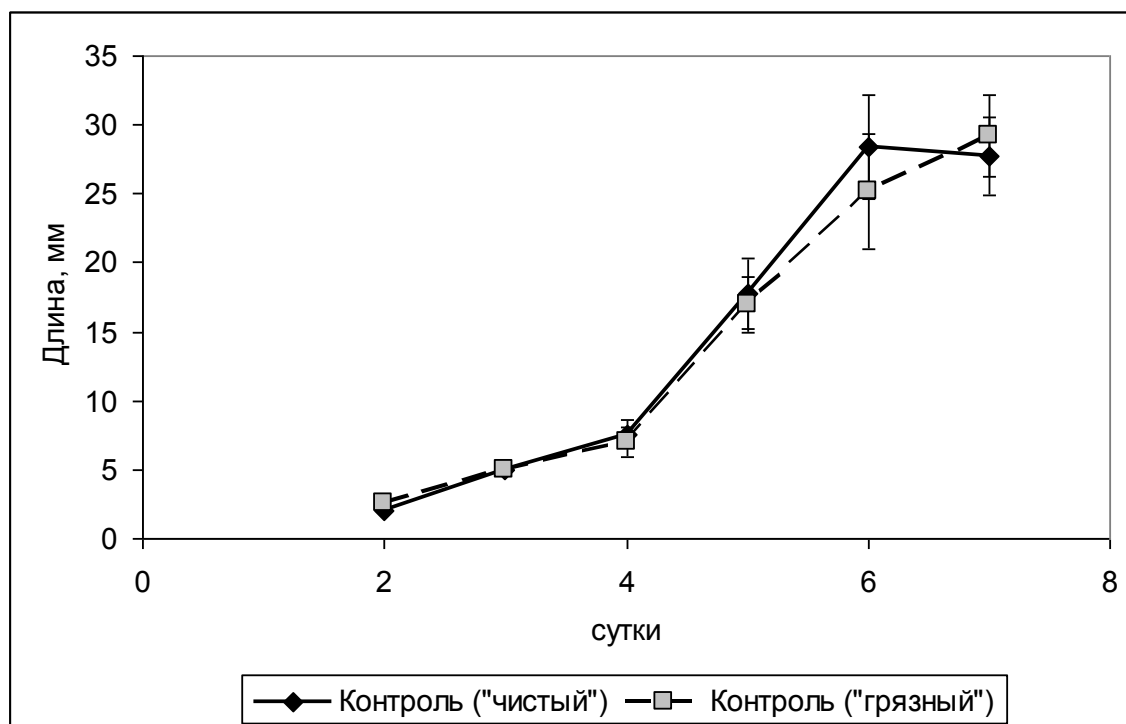


Рис. 6. – Динамика роста кресс-салата на загрязнённом субстрате в отсутствии биогенных наночастиц ферригидрита в сравнении с "чистым" контролем. Приведена средняя длина проростков и 95%-е доверительные интервалы [Growth dynamics of cress on the contaminated substrate in the absence of biogenic nanoparticles of ferrihydrite in comparison with "pure" control. The average length of seedlings and 95% confidence intervals]

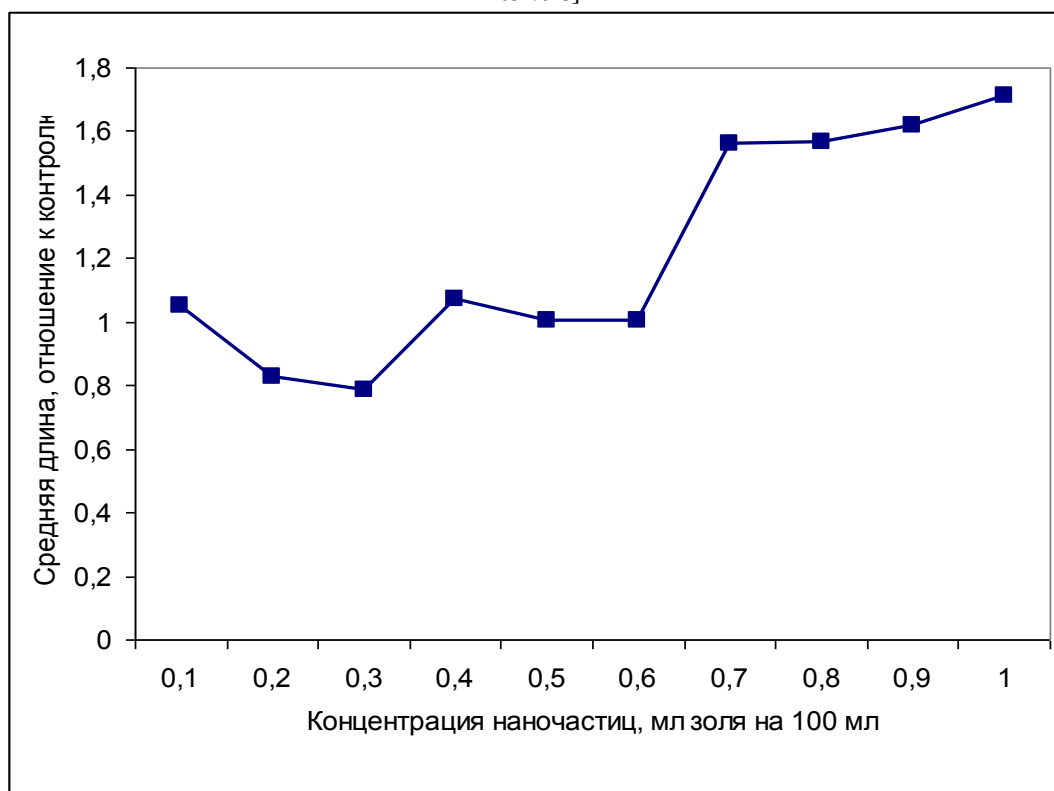


Рис. 7. – Влияние концентрации наночастиц бактериального ферригидрита на среднюю длину проростков через 3 суток после начала эксперимента, отношение к аналогичному показателю в "чистом" контроле [Influence of bacterial ferrihydrite nanoparticles concentration on the average length of seedlings 3 days after the start of the experiment, the ratio to the analogous indicator in "pure" control]

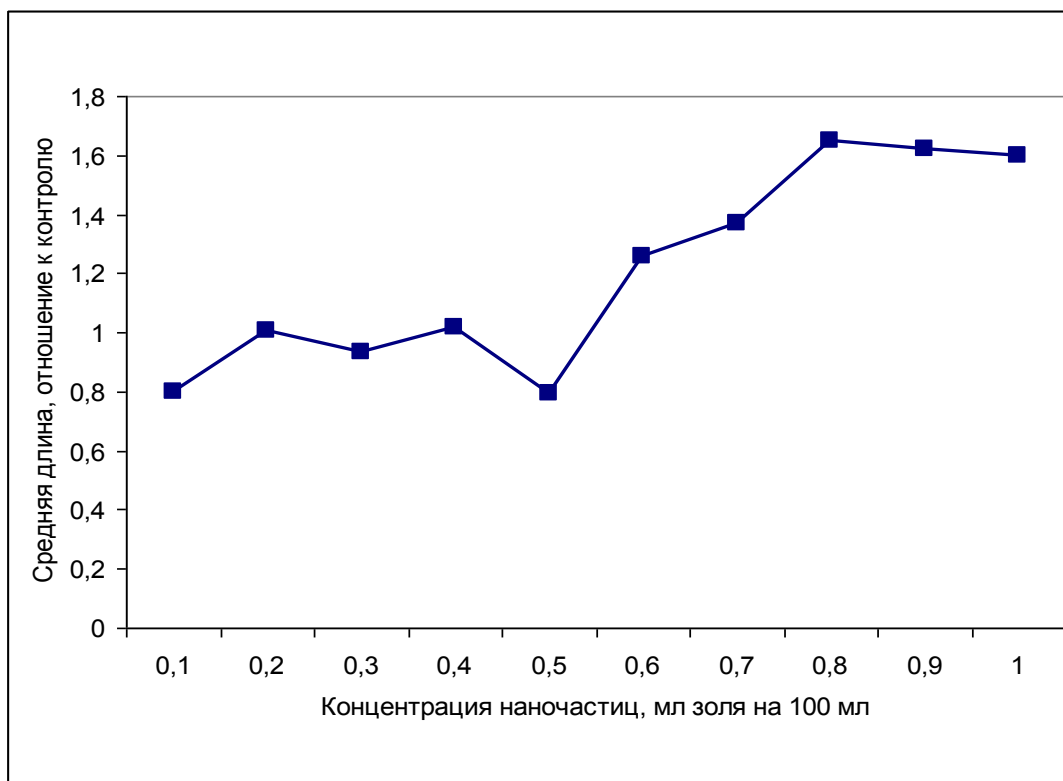


Рис. 8. – Влияние концентрации наночастиц бактериального ферригидрита на среднюю длину проростков через 6 суток после начала эксперимента, отношение к аналогичному показателю в "чистом" контроле [Influence of bacterial ferrihydrite nanoparticles concentration on the average length of seedlings 6 days after the start of the experiment, the ratio to the analogous indicator in "pure" control]

В отсутствии нефтяного загрязнения стимулирующий эффект наночастиц не отмечался. В качестве возможного механизма наблюдаемого эффекта можно предположить химическую трансформацию компонентов нефтяного загрязнения с участием наночастиц, приведшую к появлению соединений, обладающих рост-стимулирующим эффектом.

Наряду с абсолютными значениями биометрических показателей, важной характеристикой состояния живых организмов является вариация этих показателей. Наиболее широко используемыми в практике показателями вариации являются коэффициент вариации (отношению среднеквадратического отклонения к выборочному среднему) и коэффициент осцилляции (отношению размаха варьирования к выборочному среднему). Наши исследования показали, что само по себе нефтяное загрязнение не привело к изменениям показателей варьирования роста тест-культуры в сравнении с "чистым" контролем. В то же время добавление к загрязнённому субстрату наночастиц привело к снижению варьирования длины проростков, что стало заметно через 6 и более суток проращивания (рис. 9). Наблюдаемый эффект может быть связан как с увеличением дружности прорастания семян тест-культуры в присутствии наночастиц, так и с избирательным стимулированием проростков, отстающих в росте.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования показали, что допированные алюминием наночастицы бактериального ферригидрита не только снимают фитотоксичность нефтезагрязнённого почвенного субстрата, но и оказывают стимулирующий эффект на рост проростков на фоне загрязнения нефтепродуктами. Предположительно внесение наночастиц

способствует перестройке микробного сообщества в направлении увеличения сходства с сообществами лесных и лесостепных почв региона.

Концентрация наночастиц 0,8 – 1,0 мл на 100 мл суспензии золь наночастиц, полностью устраняет нефтезагрязнение в исследуемых образцах. Для применения изученного типа наночастиц в биологической рекультивации нефтезагрязненных почв необходимо провести полевой эксперимент.

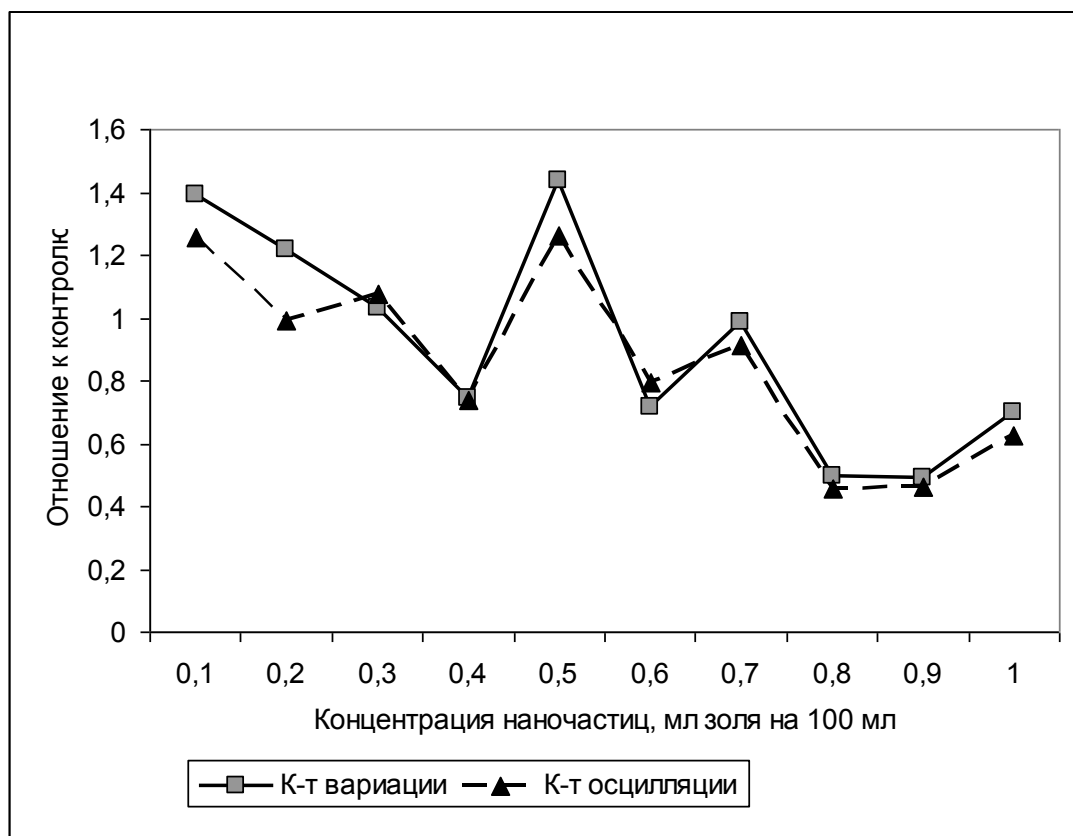


Рис. 9. – Влияние концентрации наночастиц бактериального ферригидрита на вариацию длины проростков через 6 суток после начала эксперимента, в % к аналогичным показателям в "чистом" контроле [Influence of bacterial ferrihydrite nanoparticles concentration on the variation in length of seedlings 6 days after the start of the experiment, in% to similar indicators in "pure" control]

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Карташев, А. и др.* Влияние нефтезагрязнений на надпочвенных и почвенных беспозвоночных животных [Текст] / А.Г. Карташев, Т.В. Смолина, А.Ю. Черданцев // Известия Томского политехнического университета. – 2006. – Т. 309, № 8. – С. 182–185.
2. *Исмаилов, Н.* Нефтяное загрязнение и биологическая активность почв. Добыча полезных ископаемых и геология природных экосистем [Текст] / Н. Исмаилов. – М.: Наука, 1982. – С. 238–244.
3. *Аветов, Н. и др.* Загрязнение нефтью почв таежной зоны западной Сибири [Текст] / Н.А. Аветов, Е.А. Шишконокова // Бюллетень Почвенного института им. В.В. Докучаева. – 2011. – № 68. – С. 45–53.
4. *Андресон, Р. и др.* Экологические последствия загрязнения нефтью [Текст] / Р.К. Андресон, А.Х. Мукатанов, Т.Ф. Бойко / Экология. – 1980. – № 6. – С. 21–25.
5. *Киреева, Н.А.* Влияние загрязнения нефтью на фитотоксичность серой лесной почвы / Н.А. Киреева, А.М. Мифтахова, Г.Г. Кузяхметов // Агрохимия. – 2001. – № 5. – С. 64–69.
6. *Назаров, А.* Влияние нефтяного загрязнения почвы на растения [Текст] / А.В. Назаров // Вестник пермского университета. – 2007. – Биология. – Вып. 5(10). – С. 135–138.

7. Миертус, С. и др. Справочник. Технологии восстановления почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами [Текст] / С. Миертус, Н.Ю. Гречищева, С.В. Мещеряков, Н.Г. Рыбальский, А.Р. Барсов – М.: РЭФИА, НИА-Природа, – 2001. – 185 с.
8. Матвеев, Ю. Технологии очистки территорий, загрязненных нефтепродуктами [Текст] / Ю. Матвеев // Поиски нефти, нефтяная индустрия и охрана окружающей среды: Труды первой Всероссийской конференции (17–22 апреля 1995г., ВНИГРИ, Санкт-Петербург). – СПб: ВНИГРИ, – 1995. –С. 127–132.
9. Лушников, С. и др. Очистка воды и почвы от нефти и нефтепродуктов с помощью культуры микробов-деструкторов [Текст] / С.В. Лушников, К.Н. Завгороднев, В.В. Бобер // Экология и промышленность России. – 1999. – №2. – С. 17–20.
10. Красавин, А. и др. Восстановление нарушенных земель с использованием бактериальных препаратов [Текст] / А.П. Красавин, А.Н. Хорошавин, И.В. Катаева // Вестн. с.-х. науки. – 1988. – № 10. – С. 64–68.
11. Pandey B. and Fulekar M.H. Nanotechnology: Remediation Technologies to clean up the Environmental pollutants. Research Journal of Chemical Sciences, Vol. 2(2), 90-96, (2012)
12. Swaranjit Singh Cameotra, Soniya Dhanjal. Environmental Nanotechnology: Nanoparticles for Bioremediation of Toxic Pollutants. Bioremediation Technology, 2010, pp. 348-374.
13. Bernd, N. 2010. Pollution Prevention and Treatment Using Nanotechnology. Nanotechnology. 2:1:1–15.
14. Gil-Lozano, C., Losa-Adams, E., F.-Dávila, A., Gago-Duport, L. (2014). Pyrite nanoparticles as a Fenton-like reagent for in situ remediation of organic pollutants. Beilstein Journal of Nanotechnology, 5, pp. 855–864.
15. ГОСТ 17.4.4.02-84. Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа [Текст]. – М.: Издательство стандартов, 1984. – С. 2–42.
16. Столяр, С. и др. Железосодержащие наночастицы, образующиеся в результате жизнедеятельности микроорганизмов [Текст] / С.В. Столяр, О.А. Баюков, Ю.Л. Гуревич и др. // Неорганические материалы. – 2006. – Т. 42. – № 7. – С. 1–6.
17. Ладыгина В.П. и др. Способ получения наночастиц ферригидрита. Патент РФ на изобретение № 2457074 Российская Федерация С1 МПК В22F9/24 [Текст] / К.В. Пуртов, С.В. Столяр, Р.С. Исхаков, О.А. Баюков, Ю.Л. Гуревич, К.Г. Добрецов, Л.А. Ищенко; Заявитель и патентообладатель Сибирский федеральный университет. – № 2011111266/02; заявл. 24.03.2011; опубл. 27.07.2012.
18. Справочник по вычислительным методам статистики [Текст] / Д. Поллард. – М.: Финансы и статистика, 1982. – 344 с.

REFERENCES

- [1] Kartashev A.G., Smolina T.V., Cherdantsev A.Yu. Vliyanie neftezagryazneniy na nadpochvennykh i pochvennykh bespozvonochnykh zhivotnykh [The Impact of Oil Pollution on Supersoil and soil Invertebrates]. Izvestiya Tomskogo politekhnicheskogo universiteta [Bulletin of Tomsk Polytechnic University], 2006, Vol. 309, №8, pp.182–185. (in Russian)
- [2] Kartashev A. Vliyanie neftezagryazneniy na nadpochvennykh i pochvennykh bespozvonochnykh zhivotnykh [The Impact of Oil Pollution on Supersoil and Soil Invertebrates]. M. 1982, pp. 238–244. (in Russian)
- [3] Avetov N.A., Shishkonakova E.A. Zagryaznenie neftyu pochv taezhnoy zony zapadnoy Sibiri [Oil Pollution of Soils of the Taiga Zone of Western Siberia]. Byulleten Pochvennogo instituta im. V.V. Dokuchaeva [Bulletin of Soil Institute by V.V. Dokuchaev], 2011, № 68. pp.45–53. (in Russian)
- [4] Andreson R.K., Mukatanov A.Kh., Boyko T.F. Ekologicheskie posledstviya zagryazneniya neftyu [Environmental Consequences of Oil Pollution]. Ekologiya [Ecology], 1980, №6, pp. 21–25. (in Russian)
- [5] Kireeva N.A., Miftakhova A.M., Kuzyakhmetov G.G. Vliyanie zagryazneniya neftyu na fitotoksichnost seroy lesnoy pochvy [The Impact of Oil Pollution on the Phytotoxicity of Grey Forest Soil]. Agrokimiya [Chemistry], 2001, № 5, pp. 64–69. (in Russian)
- [6] Nazarov A.V. Vliyanie neftyanogo zagryazneniya pochvy na rasteniya [The Effect of Oil Pollution of Soil on Plants]. Vestnik permskogo universiteta [Perm University Herald], 2007, Issue 5(10), pp. 135–138. (in Russian)
- [7] Miertus S., Grechishcheva N.Yu., Meshcheryakov S.V., Rybalskiy N.G., Barsov A.R. Spravochnik. Tekhnologii vosstanovleniya pochv, zagryaznennykh neftyu i nefteproduktami [Handbook. Technology of Restoration of Soils Contaminated with Oil and Oil Products]. M. Pub. REFIA, NIA-Priroda [The State Committee of Environmental Protection, NIA-Priroda], 2001, 185 p. (in Russian)
- [8] Matveev Yu. Tekhnologii ochistki territoriy, zagryaznennykh nefteproduktami [Technologies for Cleaning Areas Contaminated with Oil Products]. Poiski nefiti, neftyanaya industriya i okhrana okruzhayushchey sredy: Trudy pervoy Vserossiyskoy konferentsii [Oil Searches, Oil Industry and Environmental Protection: Proceedings of the First All-Russian Conference], Sankt-Peterburg. Pub. VNIGRI, 1995. pp. 127–132. (in Russian)
- [9] Lushnikov S.V., Zavgorodnev K.N., Bober V.V., Ochistka vody i pochvy ot nefiti i nefteproduktov s pomoshchyu kultury mikrobov-destruktorov [Purification of Water and Soil from Oil and Petroleum Products with the Help of Microbial Destructor Culture]. Ekologiya i promyshlennost Rossii [Ecology and Industry of Russia], 1999, №2, pp. 17–20. (in Russian)

- [10] Krasavin A.P., Khoroshavin A.N., Kataeva I.V. Vosstanovlenie narushennykh zemel s ispolzovaniem bakterialnykh preparatov [Restoration of Disturbed Lands with the Use of Bacterial Preparations]. Vestn. s.-kh. nauki [Bulletin of Agricultural Science], 1988, №10, pp. 64–68. (in Russian)
- [11] Pandey B. and Fulekar M.H. Nanotechnology: Remediation Technologies to clean up the Environmental pollutants. Research Journal of Chemical Sciences, Vol. 2(2), 90–96, (2012) (in English)
- [12] Swaranjit Singh Cameotra, Soniya Dhanjal. Environmental Nanotechnology: Nanoparticles for Bioremediation of Toxic Pollutants. Bioremediation Technology, 2010, pp 348-374 (in English)
- [13] Bernd, N. 2010. Pollution Prevention and Treatment Using Nanotechnology. Nanotechnology. 2:1:1–15 (in English)
- [14] Gil-Lozano, C., Losa-Adams, E., F.-Dávila, A., Gago-Duport, L. (2014). Pyrite nanoparticles as a Fenton-like reagent for in situ remediation of organic pollutants. Beilstein Journal of Nanotechnology, 5, pp. 855–864.
- [15] GOST 12038-84 Semena selskohozyajstvennykh kultur. Metody opredeleniya vskhozhesti [State Standard 12038-84. Seeds of Agricultural Crops. Methods for Determination of Germination]. M. Pub. «Izdatelstvo standartov», 1984, pp. 2–42. (in Russian)
- [16] Stolyar S.V., Bayukov O.A., Gurevich Yu.L. etc. Zhelezosoderzhashchie nanochastitsy, obrazuyushchiesya v rezultate zhiznedejatel'nosti mikroorganizmov [Iron-Containing Nanoparticles Formed as a Result of Microbial Activity]. Neorganicheskie materialy [Inorganic Materials], 2006, Vol. 42, №7, pp.1–6. (in Russian)
- [17] Purtov K.V., Stolyar S.V., Iskhakov R.S., Bayukov O.A., Gurevich Yu.L., Dobretsov K.G., Ishchenko L.A. Method for obtaining ferrihydrite nanoparticles. Patent of the Russian Federation for invention №2457074 Russian Federation C1 IPC B22F9/24; The applicant and the patent owner of Siberian Federal University. – №2011111266/02; claimed. 24.03.2011; publ. 27.07.2012. (in Russian)
- [18] Pollard D. Spravochnik po vychislitel'nym metodam statistiki [Handbook of Computational Methods of Statistics]. M. Pub. Finansy i statistika [Finance and Statistics], 1982, 344 p. (in Russian)

The Influence of Nanoparticles Bacterial Ferrihydrite Doped with Aluminum on Oil-Pollution

M.E. Baranov

*Reshetnev Siberian State University of Science and Technologies
31, Krasnoyarsky Rabochy Av., Krasnoyarsk, Krasnoyarsky kraj, Russia, 660037
e-mail: me_baranov@mail.ru*

Abstract – The paper discusses the use of bacterial ferrihydrite nanoparticles ($5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) doped with aluminum (FeAl) to reduce the phytotoxicity of an oil contaminated soil substrate. It is proposed to evaluate the antitoxic effect in case of increased contamination with oil products, compare the level of phytotoxicity (decrease in germination and germination energy of test culture *Lepidium sativum* L.) and to determine the optimal concentrations of nanoparticles to neutralize petroleum products in the soil.

Keywords: soil substratum, oil pollution, nanoparticles, biotesting, watercress.