

تأثير الأشعة فوق البنفسجية على النمو وصبغات التركيب الضوئي والمحتوى

البروتيني في الطحالب الخضراء المزرقمة أنبينا *Anabaena sp*

د. سعيد حميد محمد عدال

تأثير الأشعة فوق البنفسجية على النمو وصبغات التركيب الضوئي والمحتوى البروتيني في الطحالب الخضراء المزرقمة أنبينا *Anabaena sp*

د. سعيد حميد محمد عدال

كلية التربية الأساسية/جامعة ديالى

الخلاصة

تقوم الطحالب الخضراء المزرقمة من نوع الأنبينا *Anabaena sp* بتثبيت كمية كبيرة من النيتروجين الجوي الغازي وتحويله إلى الأمونيوم NH_4 الذي يدخل في تصنيع البروتين ضمن السلسلة الغذائية. لقد تم عزل هذا النوع من الطحالب من بعض البرك الضحلة القريبة من المناطق الساحلية في ليبيا، وجرى دراسة تأثير الأشعة فوق البنفسجية ذات النمط والتردد (uv-B:-285-320nm) على النمو وصبغات التركيب الضوئي والمحتوى البروتيني في هذه الطحالب. وقد بينت نتائج معدلات النمو إلى أن *Anabaena sp* شديدة الحساسية اتجاه أشعة UV-B حيث لوحظ موت جميع الخلايا بعد التعرض لهذه الأشعة لمدة 150 دقيقة، كما تبين تحلل صبغات التركيب الضوئي خاصة الفايكوسيانين Phycocyanin في الخلايا الطحلبية بفعل تأثير الأشعة. كما لوحظ أن المحتوى البروتيني لخلايا ينخفض بشكل متزامن مع ازدياد فترة التعرض لهذه الأشعة.

كلمات مفتاحية: طحلب الأنبينا، أشعة فوق بنفسجية، صبغات التركيب الضوئي، محتوى بروتيني

المقدمة

تعمل طبقة الأوزون (O_3) الجوي على منع وصول الأشعة فوق البنفسجية من نمط (uv-B:-285-320nm) ذات التأثير الضار بالكائنات الحية إلى الأرض. إلا أن ازدياد التآكل في طبقة الأوزون في العقد الأخيرين بسبب انطلاق المزيد من غازات الكلور و الفلور و الكربون (CFCs) (12) أدى إلى وصول المزيد من هذه الأشعة وظهور تأثيرها المدمر على العديد من الكائنات الحية على سطح الأرض (10). وللأسف فإن معدل التآكل في طبقة الأوزون لا يزال مرشحاً للازدياد. وتشير التقديرات إلى أنه مع توقف انبعاث جميع أشكال الغازات الملوثة لن يكون بمقدور طبقة الأوزون أن تتعافى و ترمم نفسها قبل عام 2065(13).

تعتبر الطحالب الخضراء المزرقمة إحدى مجموعات الأحياء الدقيقة في الأراضي الرطبة (نباتات مائية) و تقوم بالتركيب الضوئي وتحرر الأوكسجين اللازم لتنفس الكائنات الحية (20،22). كما أنها تكتسب أهمية بالغة في دورة النتروجين كونها تستطيع تثبيت غاز النتروجين من الجو مباشرة، حيث تقوم بتثبيت حوالي 35 مليون طن من هذا الغاز سنوياً (9،11) وتحويله إلى أشكال كيميائية قابلة للامتصاص والاستخدام من قبل النباتات الراقية، لذا يشار إليها في كثير من الأحيان كمخصبات حيوية طبيعية للتربة (16) وتقوم الطحالب الخضراء المزرقمة بفضل احتوائها على نوعين من الانزيمات وهي نترات و نترتيد ريدوكتيز بتحويل النتروجين في النهاية إلى أمونيوم (NH_4) الذي يعد المركب النتروجيني الجاهز للدخول مباشرة في عمليات الأيض الحيوي و إنتاج البروتينات في الخلايا الحية.

لقد تبين أن زيادة معدلات الأشعة فوق البنفسجية أدى- وما يزال- إلى حدوث أضرار مضاعفة لدى العديد من الكائنات الحية، على الرغم من أن عدداً من هذه الكائنات (كالطحالب الخضراء المزرقمة) تقوم بتصنيع الأصبغة الواقية (كالميكوسبورين شبيهه الاحماض الامينية MYcosporine-like amino acids (MASS) و سيكتونيمين

تأثير الأشعة فوق البنفسجية على النمو وصبغات التركيب الضوئي والمحتوى

البروتيني في الطحالب الخضراء المزرقفة *Anabaena sp*

د. سعيد حميد محمد عبدال

(Scytonemin) التي تعمل على امتصاص الأشعة فوق البنفسجية من نمط (UV-A، UV-B) والتقليل من تأثيرها المدمر على الخلايا، حيث لوحظ أن هذه الأصبغة تتركز في الطبقة المخاطية أو خلايا الغمد التي تحيط بخلايا هذه النباتات وأن تعرض الخلايا لهذه الأشعة يعمل على تحفيز صنع هذه الأصباغ (18،19).

تتجلى الاثار السلبية للأشعة فوق البنفسجية بأشكال عديدة لدى الكائنات الحية مثل تقطيع سلاسل المادة النووية (DAN) (7) ، تخريب العديد من البروتينات البنائية أو الانزيمية ومنها انزيمات الأيض النيتروجيني (6،8) وتناقص كمية CO_2 المثبت وبالتالي تناقص انتاجية النبات (18)، وتحطيم العديد من الأصباغ المساهمة في التركيب الضوئي وخاصة تلك الموجودة في الفايكوبليينات Phycobillin لدى الأحياء الدقيقة ذوات التركيب الضوئي (19) .

الهدف من البحث

يهدف البحث إلى دراسة تأثير الأشعة فوق البنفسجية على النمو وصبغات التركيب الضوئي والمحتوى البروتيني في طحلب (*Anabaena sp*) التي تنمو طبيعياً على التربة الرطبة وفي المستنقعات الضحلة ، حيث تعمل على اغناء التربة بالمركبات النيتروجينية مما يساهم في نمو النباتات الراقية بشكل أفضل ، ويعمل على ازدهار الغطاء النباتي في تلك التربة أو في محيط تلك المستنقعات.

الأجهزة والمواد المستعملة

تم الحصول على طحالب *Anabaena sp* من بعض المستنقعات الضحلة القريبة من المناطق الساحلية في ليبيا في شهر أيلول عام 2009 حيث كانت البرك و المنخفضات في اوج تعرضها لضوء الشمس خلال العام. وجرى العزل عن طريق غسل العينات الطحلبية عدة مرات بالماء المقطر . ثم جرى توزيعها على أطباق بتري تحتوي على 1.5% من وسط الاجار تحت شروط معقمة ، تم حفظها في الحاضنة لمدة 10 أيام في درجة حرارة 25م° شدة اضاءة (14 واط/م²). ثم بعد ذلك اختيار بعض المستعمرات المعزولة وتم نقلها بواسطة إبرة العزل وتحت شروط معقمة الى دورق زجاجي حاوي محلول نمو مغذ للعالمين (14). جرى حفظ الدورق في الحاضنة لمدة 7 أيام ثم جرى بعد ذلك ترسيب العينة (10min;1500RPM). وحل الراسب بقليل من السائل المغذي. بعد ذلك تم توزيع المزيج الكثيف على أطباق بتري حاوية على الأجار بنفس الطريقة السابقة، وفحصت الاطباق مجهرياً، فوضعت اشارات على خلايا *Anabaena sp* المعزولة التي نمت بعد 7 ايام من الحفظ معطية مستعمرات. ثم تحت شروط معقمة نقلت المستعمرات النقية قبل اجراء التجارب عليها الى دوارق خاصة (اوعية ارلنماير) حاوية على 40% من حجمها على محلول النمو المعقم(محلول الاوعية في الحاضنة تحت نفس الشروط السابقة ثم تم اجراء جميع التجارب اللاحقة على العينات الطحلبية بعد 4ايام من نقلها الى الدوارق الخاصة وتضمنت التجارب مايلي:-

أ- تعريض الطحالب للأشعة فوق البنفسجية ، حيث تم توزيع العينات (2- 5x 10⁴ خلية/مل) في أطباق بتري ووضعت الأطباق على جهاز هزاز Shaker لمنع تراكم الخلايا فوق بعضها ، ثم جرى تعريضها للأشعة فوق البنفسجية المنتجة من نمط (UV-b) الصادرة عن شمعة نيون UV خاصة (UV-B Lamp ; output at 320nm ; Philips) (10).

ب- تحديد نسب المستعمرات الحية والمحتوى البروتيني:- حيث تم اخذ 0.05مل من محلول الخلايا المعرضة في اطباق بتري للأشعة فوق البنفسجية وذلك بفترات زمنية محددة، ثم جرى توزيعها على اطباق بتري الحاوية على الاجار وبعد يومين تم ملاحظة وتعداد المستعمرات الحية الموجودة على الاجار لاجل تحديد نسبة الخلايا الحية المتبقية بعد التعرض للأشعة فوق البنفسجية وتحديد المحتوى البروتيني الكلي للخلايا وفق طريقة (3) .

تأثير الأشعة فوق البنفسجية على النمو وصبغات التركيب الضوئي والمحتوى

البروتيني في الطحالب الخضراء المزرقفة *Anabaena sp*

د. سعيد حميد محمد عبدال

ج- تحديد كميات الاصبغ ومعدلات الامتصاص الضوئي:- فقد تم تحديد شدة الامتصاص الضوئي وكمية الاصبغ باستخدام جهاز مقياس الطيف (1) حيث تم ترسيب الخلايا بعد تعريضها لفترات محددة للأشعة فوق البنفسجية، ثم جرى حلها بالماء المقطر وتعبئتها في خلايا كوارتيزية سعة 2 مل . بعدها تم قياس شدة الامتصاص الضوئي بقياس الطيف للعينة عند أمواج ضوئية مختلفة (200-700 nm)

النتائج

ا-النمو و المحتوى البروتيني:- تم تحديد معدلات النمو عن طريق قياس المحتوى البروتيني الكلي في خلايا الانابينا الذي يعتبر عاملا محددًا ومؤشرا رئيسيا على النمو وانتاجية النبات (15, 17) لقد أظهرت النتائج ان النمو كان متمثلا في اليومين الاولين لدى جميع انواع خلايا الانابينا المعرضة والغير معرضة للأشعة، واعتبارا من اليوم الثالث ظهر التباين في النمو باختلاف الجرعات المعرضة لها العينات، حيث بلغ معدل النمو في اليوم الخامس حوالي 50% (مقارنة بالخلايا غير المعرضة للأشعة) عند الخلايا التي تم تعريضها لمدة (1 ساعة)، وبلغ حوالي 15% عند الخلايا التي تعرضت لمدة (2 ساعة)، كما في الجدول (1). وكان معدل النمو في الفترة ما بين اليومين السابع والتاسع عند الخلايا التي تعرضت للأشعة لمدة (2 ساعة) منخفضة وشبه مستقرة عند 20% (تركيز مستوى النمو)، بينما استمرت الخلايا التي تعرضت للأشعة لمدة (1 ساعة) بمعدل نمو اعلى خلال نفس الفترة.

ب- نسب المستعمرات الحية:- كان جرى تعريض العينات الطحلبية للأشعة فوق البنفسجية (UV-B) لفترات زمنية مختلفة، ثم يجري بعدها مباشرة تعداد المستعمرات الحية التي استطاعت تحمل فترة التعريض حيث يظهر الجدول (2) ان 70% من المستعمرات التي جرى تعريضها للأشعة لمدة (0.5 ساعة) استمرت حية واستطاعت تحمل فترة التعريض، و50% من المستعمرات استمرت حية بعد التعريض للأشعة لمدة (1 ساعة) و 10% بعد (1.5 ساعة) تعريض للأشعة، بينما لم يبق أكثر من 5% من المستعمرات بعد التعريض لمدة (2 ساعة) متواصلة. وكانت جميع المستعمرات تموت بعد التعريض للأشعة لمدة (2.5 ساعة).

ت- معدلات الامتصاص الضوئي :- لقد أظهرت الخلايا انخفاض عاما في معدلات الامتصاص الضوئي بعد تعريضها للأشعة فوق البنفسجية (UV-B)، و الجدول (3) يوضح معدلات الامتصاص بوجود 4 قمم امتصاص رئيسية في المجال المرئي عند الامواج الضوئية 435 , 485 , 620 , 670 نانو متر، وتبين انه مع ازدياد فترة تعرض العينات للأشعة ينخفض معدل امتصاصها للضوء بشكل حاد، ولكن بالمقارنة بين القمم الامتصاصي الاربعة يتضح انه يحدث انخفاض كبير وملحوظ عند الموجة ذات الطول الموجي 620 نانومتر، وهي الموجة التي يكون فيها امتصاص صبغات الفايكوسيانين للضوء كبيرا، وفي هذا اشارة واضحة الى تأثر هذه الصبغات وتحطمتها بفعل الأشعة فوق البنفسجية بشكل اكبر بكثير من تأثر بقية صبغات التركيب الضوئي مثل كلوروفيل أ (Chlorophyll a) حيث الامتصاص الاكبر عند (435 , 670 نانو متر) والكاروتينويدات Carotenoids يكون الامتصاص الاكبر عند (485 نانومتر).

جدول (1) يبين معدل نمو عينات طحالب *Anabaena sp* متمثلة بكمية البروتين الكلي مقاسا بالميكروجرام/مل في الوسط السائل بعد التعرض للأشعة فوق البنفسجية (UV-B) لمدة 1 ساعة أو 2 ساعة.

كمية البروتين (مايكرو جرام / مل) / يوم					فترة التعرض للأشعة (ساعة)
1	3	5	7	9	
4	30	80	125	150	0
4	6	45	60	70	1
4	5	15	30	30	2

تأثير الأشعة فوق البنفسجية على النمو وصبغات التركيب الضوئي والمحتوى

البروتيني في الطحالب الخضراء المزرقفة أنبينا *Anabaena sp*

د. سعيد حميد محمد عدال

جدول (2) يبين النسبة المئوية لمستعمرات *Anabaena sp* الحية بعد تعرضها للأشعة فوق البنفسجية (UV-B) لفترات زمنية مختلفة.

مدة التعرض للأشعة (ساعة)						النسبة المئوية للمستعمرات الحية التعرض للأشعة
2.5	2	1.5	1	0.5	0	
% 100	% 100	% 100	% 100	% 100	% 100	بدون التعرض Control
% 1	% 5	% 10	% 50	% 70	---	التعرض لـ UV-B

جدول (3) يبين معدلات الامتصاص الضوئي لخلايا *Anabaena sp* بعد تعريضها لأشعة (UV-B) لفترات زمنية مختلفة.

مدة التعرض (ساعة) / شدة الامتصاص					الطول الموجي (نانومتر)
3 ساعة	2 ساعة	1 ساعة	0 ساعة		
0.10	0.14	0.14	0.15	250	
0	0	0.02	0.07	300	
0.05	0.05	0.07	0.10	350	
0.12	0.12	0.14	0.18	400	
0.16	0.17	0.18	0.23	435	
0.11	0.11	0.14	0.18	450	
0.05	0.06	0.07	0.10	500	
0.03	0.03	0.04	0.07	550	
0.02	0.04	0.05	0.13	600	
0.02	0.02	0.03	0.07	650	
0.06	0.06	0.07	0.13	700	
0	0	0	0	750	

تأثير الأشعة فوق البنفسجية على النمو وصبغات التركيب الضوئي والمحتوى

البروتيني في الطحالب الخضراء المزرققة أنيبينا *Anabaena sp*

د. سعيد حميد محمد عدال

المناقشة

تبين نتائج الدراسة بأن طحالب الأنابينا *Anabaena sp* تعد شديدة الحساسية عند الأشعة فوق البنفسجية من نمط (UV-B)، وهي أكثر حساسية باتجاه هذه الأشعة من بقية أجناس الطحالب الخضراء المزرققة مثل النوستوك *Nostic sp* (5)، وربما يعود ذلك إلى غياب الغمد المخاطي عند *Anabaena sp* الموجودة عند *Nostic sp*، حيث تبين أن هذا الغمد يحتوي على مجموعة من الصبغات الواقية من أشعة (UV-B) كالكسكيتونمين (Scytonemin) (19).

تحمل أشعة (UV-B) طاقة عالية، ويعتقد كثير من الباحثين أن التأثير الأولي لهذه الأشعة على الخلايا يظهر في تحطيم بعض البروتينات التركيبية للغشاء البلازمي، مما يؤدي إلى إحداث خلل في نفاذية هذا الغشاء (2,21)، وتموت جميع الخلايا عندما تكون فترات التعرض لهذه الأشعة طويلة، ويعزى الموت في هذه الحالة إلى تحطم وتوقف عدد كبير من العمليات الحيوية في الخلايا بشكل متزامن (8,2).

تؤكد هذه الدراسة على تأثير صبغة phycocyanin وتحطيمها في طحالب الأنابينا بفعل (UV-B) بشكل أشد من بقية صبغات البناء الضوئي كالكلوروفيلات والكاروتينويدات وهذا متوافقاً مع دراسات (4) على أنواع أخرى من الطحالب الخضراء المزرققة كطحلب كربتوموناس *Cryptomonas sp* (7). حيث تعمل الجرعات العالية من أشعة (UV-B) على أكسدة هذه الصبغات ضوئياً، الأمر الذي يؤدي إلى شحوبها وتحطيمها، كما يمكن أن تعمل هذه الأشعة للحيلولة دون البناء الحيوي للكلوروفيل والصبغات الكاروتينية. وتشير نتائج الدراسة الحالية إلى تثبيط عملية بناء البروتين في خلايا *Anabaena sp* بفعل أشعة (UV-B)، حيث لوحظ ازدياد معدلات انخفاض في المحتوى البروتيني الكلي للخلايا بشكل متزامن ومتوازي مع ازدياد فترة التعرض للأشعة.

الاستنتاجات

إن الاستمرار في تآكل طبقة الأوزون سيؤدي إلى زيادة معدلات أشعة (UV-B) الشمسية الواصلة إلى سطح الأرض، التي ستؤثر سلباً على الطحالب الخضراء المزرققة مثل *Anabaena sp* بشكل خاص، الأمر الذي سينعكس سلباً على إنتاجية وجود هذه الطحالب التي تعتبر شديدة الأهمية في السلسلة الغذائية، ولا يقتصر التأثير السلبي على هذه الطحالب وغيرها من الكائنات الدقيقة بل انه امتد ويمتد تدريجياً إلى المحيط الحيوي من النباتات والحيوانات التي تعيش فيه هذه الطحالب، الأمر الذي سيؤدي في النهاية إلى تهديد وجود الإنسان ذاته. لذا لا بد من العمل على المستوى العالمي لمنع انبعاث الغازات الملوثة كغازات الكلوروفلوروكاربون (CFCs) حتى نفسح المجال أمام طبقة الأوزون لترميم نفسها ولو بعد عدة عقود، بحيث تعود قادرة على حماية الأرض من هذه الأشعة المدمرة، وحتى نؤمن لأطفالنا بيئة يمكنهم فيها الاستمرار بالحياة.

References

- 1- Bradford , M .A. (1976)Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein-dye binding. *Analyt . Biochem .Vol .72,248-254.*
- 2- CALDWELL , M(1981) . PLANT response to solar ultraviolet radiation . *encyclopedia of plant physiology .Vol 12A ,169-197 .*
- 3- Chapman ,H ,D ,and PRATT ,P ,F .(1961),Method of analysis of soil ,plant and water.Univ of California,Division of agric science U,S,A.
- 4- DONKOR,V,HAEDER .D.P(1991)Effects of solar and ultra violet radiation on motility, photomovement and pigmentation in filamentous, gilding cyanobacteria,*FEMS Microbiol, ecol,vol 86, 168.*
- 5- GARCIA-PICHEL,F,CASTENHOLZ,R,W.(1991)Characterisation and biological implication of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment .*J.Phycol.vol.27,395-409.*
- 6- GARCIA-SANCHEZ,M,J,FERNADEZ,J,A,NIELL,F,X.(1993)Biochenical and physiological responses of *Gracillaria tenuistipitata* under two different nitrogen tretments,*physiol,plant,vol.88, 631-637.*
- 7- HAEBERLEiN,A,HAEDER,D,p.(1992)UV effects on photosynthetis oxygen production and chromoprotein composition in a freshwater flagellate *CryptomonaA.AETA protozool,vol,31, 85-92.*
- 8- HAEDER,D,P,WORREST,R,C.(1992)Effects of enhanced solar-ultraviolet radiation on aquatic ecosystems. *Photochem, photobiol, vol, 53, 717-725.*
- 9- HAEDER,D,PWORREST,R,C,KUMAR,H,D.(1989)Aquatric ecosystems.UNEP Environmental effects panel Report,39-48.
- 10-KLISCH,M,HAEDER,D,P.0(2001)(Effects of UV radiation on phytoplankion. Trends in photochemistry&photobiology,VOL8, 137-143.
- 11- KUHLEBUSCH,I,A,LOBERT,J,M,CRUTZEN.P,J,WARNECK,P. 199), (1991)olecular nitrogen emissions from dentritification biomass burning.*Nature, VOL,351 ,135-137.*
- 12- LUBIN,D,JENSEN,E,H.(1995),effects of clouds and stratospheric ozone depletion on ultraviolet radiation trends,*Nature,VOL377, 701-713.*
- 13- MADRONICH ,R,L,MCKENIZIE,L,O, BIORN,M,CALDWELL,M(1998) Changes in piologically active ultraviolet radiation reaching the earth's surface.*j.photochem.photobio.VOL,46, 5-19.*
- 14- Marashing&skoog(1962),essential element need to preparation media *Of tissue cultuehundbook.newyork.USA.*
- 15- PARKER,B,C,HEISKELL,L,E,THOMPSON,W,J.(1987). Non-biogenic fixed nitrogen in antractica and some ecological implications.*nature. VOL271 ,651- 652.*
- 16- SINHA,R,P,HAEDER,D,P,(1996),photobiology and ecophysiology of rice field cyanobacteria.*photochem.photobiol.VOL,64, 887- 896.*

تأثير الأشعة فوق البنفسجية على النمو وصبغات التركيب الضوئي والمحتوى

البروتيني في الطحالب الخضراء المزرقة *Anabaena sp*

د. سعيد حميد محمد عيادل

- 17- SINHA,R,P,KRYWULT,M,HAEDER,D,(1998),Effects of ultraviolet monochromatic PAR wavebond on nitrat reductase activity and pigmentation in a rice field cyanobacterium, *Anabaena sp*, *Aeta, hydrabiol*, VOL,40, 105 - 112.
- 18- SINHA,R,P,KLISCH,M ,VAISHAMPAYAN,A,HAEDER,D,P(1999)Biochemical and spectroscopic characterization of the cynobacterium . *Lyngba sp.* inhabiting mango(*Managifera indica*) trees presence of an ultraviolet-absorbing pigment,*Scytonemin*.*J. acta, protozool*,VOL,38, 291-298.
- 19- SINHA,R,P,AMBASHT,N,K,SINHA,J,KLISHA,M,HAEDER,D,P.(2003)UV-B -Induced synthesis of mycosporine- like amino acids in three stains of *nodularia*(cyanobacteria).*j.photochem.photobiol.vol*,71, 51-58.
- 20- STEWART ,W(1981) ,Dsome aspects of structure and function in N_2 – Fixing cyanobacteria. *Annu.rev.J.Microbiol.VOL* ,34 , 497 –536.
- 21- Tevini,m,termura,a,h.(1989)uv-b Effects on terrestrial plants *photochem.photobiol*,vol,50,487-497.
- 22- VENKATARAN,G,S.(1981)Blue- green algae aossible remedy to nitrogen scarcity.*curr.Sci.VOL*.50 ,253-256.

Effect of UV radiation on growth;photosynthesis pigments; and protein contents in blue green algae *Anabaena sp*.

Dr.Saeed .H. Abidal

University of Diyala Basic Education College / Science Department

Abstract

The Blue green algae (cyanobacterium) *Anabaena sp* can fix aconsider able amount of atmospheric nitrogen and convert it to ammonium (NH_4) that can be used in protein synthesis and the food chain . This *Anabaena* was isolated from some pond near the coast of the Libyan ; and was tested for the effects of ultraviolet radiation(UV-B ; 285 ; 320 nm)on photosynthetic pigments

; growth and protein contents . Growth patterns of the cell treated with UV-B revealed that *Anabaena sp* was very sensitive to this radiation . complete killing of all cells occurred after 150 min of UV-B exposure .Pigments content; particularly phycocyanin , severely decreased following UV-B irradiation in all cells tested. The protein contents of the cells treated with UV-B showed a remarkable decrease with increase in UV-B exposure time .