

Управление взаимодействием клеток квазимонохроматическим светом с различной пространственно-временной когерентностью

А.В.Будаговский, М.В.Маслова, О.Н.Будаговская, И.А.Будаговский

*На примере растений, грибов и бактерий рассмотрена возможность управления взаимодействием клеток, находящихся в конкурентных, антагонистических или паразитических отношениях. Для этого использовалось кратковременное (несколько секунд или минут) облучение красным (633 нм) квазимонохроматическим светом с различной пространственно-временной когерентностью. Показано, что функциональная активность в наибольшей степени увеличивается у тех клеток, размеры которых не превышают длины когерентности и радиуса корреляции светового поля. Таким образом, в случае существенно различающихся по размеру клеток возникает возможность повысить активность более мелких клеток, не стимулируя крупные: сравнительно низкокогерентное излучение ($L_{coh}, r_{cor} \leq 10$ мкм) способствует большему поражению крупных растительных клеток патогенными грибами, а воздействие света с меньшей статистической упорядоченностью ($L_{coh} = 4$ мкм, $r_{cor} = 5$ мкм) приводит к торможению роста колоний гриба *Fusarium microsega*, инфицированных бактерией рода *Pseudomonas*. Квазимонохроматическое излучение с достаточно высокой пространственно-временной когерентностью стимулировало все взаимодействующие виды (бактерии, грибы, растения). При этом в рассмотренных биоценозах равновесие смещалось в сторону организмов с наибольшей скоростью деления клеток либо организмов, способных лучше использовать свой адаптивный потенциал.*

Ключевые слова: квазимонохроматическое излучение, пространственно-временная когерентность, взаимодействие клеток, конкурентные отношения, антагонистические отношения, паразитические отношения, изменение динамического равновесия.

1. Введение

Жизнедеятельность биологических организмов происходит не обособленно, а в эволюционно сложившихся сообществах – биоценозах. В них могут возникать различные типы отношений, например симбиотические, метаболические, конкурентные, антагонистические, паразитические. В трёх последних случаях активное развитие одних видов приводит к подавлению других. На равновесие между ними влияет множество факторов, в том числе и свет. В этом контексте рассматривается, в основном, поражающее действие оптического излучения, например инактивация микроорганизмов в УФ диапазоне или термокоагуляция пигментированных клеток потоками фотонов высокой интенсивности [1–4]. Влиянию света с витальными, т.е. совместимыми с нормальной жизнедеятельностью параметрами на биоценозические взаимодействия уделено значительно меньше внимания.

В процессе эволюции живых организмов свет стал ими использоваться для выполнения двух важнейших функций: фотосинтетической (у фототрофов) и фоторегу-

ляторной [1,2]. Эти функции реализуются с помощью различных механизмов. Интенсивность фотосинтеза пропорциональна числу поглощённых квантов, т.е. количеству утилизированной хлоропластами энергии, в широком диапазоне длин волн. Фоторегуляторные процессы, наоборот, дозозависимы, обладают высокой чувствительностью и имеют сравнительно узкие спектры действия. Это позволяет согласовывать физиологическую активность клеток с периодическим изменением количества и качества естественной облучённости.

В биологических исследованиях принято рассматривать только энергетические параметры оптического излучения: длину волны, плотность мощности, длительность и периодичность воздействия. Вопрос о влиянии статистических (когерентных) свойств света на фоторегуляторные процессы долгое время оставался дискуссионным. Причиной разногласий служили результаты проведенных по одинаковым методикам экспериментов, в которых сравнивали стимулирующее действие квазимонохроматического излучения от лазерных и тепловых источников. У последних с помощью спектральных и пространственных фильтров вырезали сравнительно узкую линию с максимумом на длине волны генерации лазера. Такое излучение было названо «некогерентным», а лазерное – «когерентным». В большинстве экспериментов при облучении когерентным и некогерентным светом наблюдали одинаковый фотостимуляционный эффект, но в отдельных случаях он был существенно выше при использовании именно лазеров (подробный обзор см. в [5, 6]).

Для разрешения противоречия была проведена серия опытов, в которых умозрительная качественная оценка «когерентный–некогерентный» была заменена на количественную (посредством определения числовых значе-

А.В.Будаговский, О.Н.Будаговская. Федеральный научный центр им. И.В.Мичурина, Россия, Тамбовская обл., 393774 Мичуринск, ул. Мичурина, 30; Мичуринский госагроуниверситет, Россия, Тамбовская обл., 393760 Мичуринск, ул. Интернациональная, 101; e-mail: budagovsky@mail.ru

М.В.Маслова. Мичуринский госагроуниверситет, Россия, Тамбовская обл., 393760 Мичуринск, ул. Интернациональная, 101

И.А.Будаговский. Физический институт им. П.Н.Лебедева РАН, Россия, 119991 Москва, Ленинский просп., 53

Поступила в редакцию 3 июля 2016 г., после доработки – 17 ноября 2016 г.

ний радиуса корреляции и длины когерентности светового потока). Данные, полученные на различных биологических моделях (бактерии, грибы, растения) показали, что фотоиндуцированная реакция как прокариот, так и высших эукариот определяется степенью статистической упорядоченности действующего света независимо от его источника – лазерного или теплового [5, 6]. Наибольшую выраженность она приобретает, когда клетки полностью помещаются в объёме когерентности поля (определяемом радиусом r_{coh} пространственной и длиной L_{coh} временной когерентностей). Такие световые поля в рамках выбранного биологического масштаба – размера клетки – предложено считать высококогерентными. С этих позиций опосредованно выше противоречие устраняется. При использовании теплового источника с широкополосным светофильтром, обеспечивающим малую длину когерентности, стимуляционный эффект меньше лазерного. Когда у сформированного поля такого же источника длина когерентности превышает размер облучаемых клеток, то различия с лазерным светом не наблюдаются и в обоих случаях имеет место заметная фотоиндуцированная реакция. Естественно, что для этого необходимо выполнение и других условий: параметры облучения должны соответствовать спектру действия какой-либо из фоторегуляторных систем (фитохромной, криптохромной и т.п.), а сам организм должен быть компетентным, т.е. обладать возможностью повышения своей функциональной активности.

Представляет интерес применение установленной закономерности для управления ценотическим взаимодействием организмов. Если их клетки значительно (в 2–4 раза) различаются по размеру, то в таких биосистемах возникает возможность искусственного изменения динамического равновесия с помощью световых потоков с заданной пространственно-временной когерентностью. Экспериментальной проверке данного положения и посвящена настоящая работа.

2. Материалы и методы

Было проведено три серии опытов с биологическими моделями, в которых взаимодействие организмов имело различные формы. Влияние высококогерентного излучения на конкурентные и паразитические отношения исследовали на семенах овса (*Avena sativa* L.). Семена этого злака покрыты цветковыми чешуями, под которыми накапливаются споры грибов, преимущественно *Mucor* (мукор). Проросшие во влажной среде чешуи служат питательным субстратом. Семена овса с сапротрофной (не поражающей растения) микробиотой облучали излучением гелий-неонового лазера (632.8 нм) в течение четырех секунд при плотности мощности 0.75 Вт/м². Объём когерентности светового поля существенно превышал размеры всех клеток: $L_{\text{coh}}, r_{\text{coh}} \gg 1000$ мкм. Половину семян сразу же после облучения искусственно инфицировали патогеном – возбудителем корневой гнили *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. Семена проращивали в чашках Петри (по 20 штук на тонком слое влажной ваты) при температуре 22°C. Повторность опыта была десятикратной. О результатах облучения судили по количеству вегетирующих растений, сформировавшихся из семян на восьмой день культивирования.

Второй биологической моделью служили плоды яблони *Malus domestica* Borkh. В естественных условиях на их

поверхности находятся споры патогенных грибов *Penicillium expansum* Link, *Botrytis cinera* Pers., *Mucor racemosus* Fres. и др. Если сорта восприимчивы к инфекции, то происходит развитие болезнетворной микробиоты и поражение эпителиальных и паренхимных тканей, т.е. возникают взаимоотношения организмов по типу «хозяин – патоген». Наряду с этим могут иметь место и физиологические болезни, например загар и пухлость, являющиеся следствием нарушения метаболизма клеток.

Плоды подвергали кратковременному воздействию квазимонохроматического света с высокой или низкой когерентностью. В качестве источника излучения с высокой когерентностью использовали гелий-неоновый лазер. Лампа накаливания с системой светофильтров и формирующей оптикой служила источником света с низкой когерентностью. Статистические характеристики полей двух излучателей существенно различались. Длина когерентности и радиус корреляции лазерного пучка превышали 1000 мкм, а у сформированного потока излучения теплового источника эти параметры не превышали 10 мкм. Энергетические характеристики используемых пучков света устанавливали идентичными, ошибка была не более 5%. Длина волны в максимуме спектральной линии равнялась 633 нм, плотность мощности – 4 Вт/м², время воздействия составляло 20 с.

Облучение плодов проводили при температуре 18°C и фоновой освещённости 30–40 люкс, создаваемой рассеянным солнечным светом. Контрольные плоды находились в таких же условиях, но при этом их тщательно изолировали от квазимонохроматического излучения. На момент облучения средние размеры клеток эпидермальных и паренхимных тканей плода составляли 40–50 мкм, клеток патогенов (споры грибов) были равны 3–8 мкм. В каждом варианте опыта с облучением и без него использовали по 100–120 плодов, разделённых на четыре группы (повторности). Их хранили в течение 190 дней при температуре 4°C и относительной влажности 90%. Поражение плодов микробными и физиологическими заболеваниями оценивалось на основании видимых симптомов по стандартной методике [7].

В третьей серии экспериментов объектом облучения служили колонии гриба *Fusarium microcera* (средний размер клеток 10–12 мкм), инфицированные бактерией рода *Pseudomonas* (средний размер клеток 3–4 мкм). Их культивировали *in vitro* при 22°C в течение шести дней на картофельно-глюкозном агаре, содержащем 1% глюкозы и 1% агара. Часть препаратов обрабатывали квазимонохроматическим светом ($\lambda_{\text{max}} \approx 634$ нм) с относительно высокой ($L_{\text{coh}} = 135$ мкм, $r_{\text{coh}} = 18$ мкм) когерентностью. На другую часть воздействовали низкокогерентным излучением ($L_{\text{coh}} = 4$ мкм, $r_{\text{coh}} = 5$ мкм) с такими же энергетическими характеристиками. Заданные значения L_{coh} и r_{coh} формировали путём изменения ширины спектральной линии и углового размера источника, которым служила высокотемпературная лампа накаливания с системой светофильтров и апертурных диафрагм. В обоих случаях плотность мощности в зоне расположения биологических объектов составляла 1 Вт/м², длительность светового воздействия – 240 с. Контроль (необлученные биообъекты) находился при естественной освещённости 40 люкс и был оптически изолирован от прямого и рассеянного квазимонохроматического излучения. Повторность опытов четырёхкратная. О результатах облучения судили по площади и объёму колоний *Fusarium microcera*.

В проведённых экспериментах мощность и плотность мощности излучения регистрировались измерителем лазерного излучения VEGA (Ophir, Израиль) и калориметрическим измерителем ИМО-2Н («Эталон», Россия). Спектры пропускания инфракрасного и интерференционных светофильтров измерялись на спектрофотометре Analytik Jena Specord 250 Plus (Германия) с точностью 0.5 нм. Способ формирования квазимонохроматических пучков и количественная оценка их статистических параметров приведены в [5].

3. Результаты и их обсуждение

В эксперименте с семенами овса результат лазерного облучения существенно зависел от состояния экзогенной микробиоты. В воздушно-сухом состоянии споры грибов неактивны и взаимодействия с семенами не происходит. Во влажной среде споры прорастают, развивается мицелий, выделяя токсичные продукты своего метаболизма. Если среда культивирования ограничена, то в ней повышается концентрация токсинов и происходит ингибирование развития проростков. В условиях эксперимента всхожесть семян в присутствии сапротрофной микробиоты не превышала 91% (рис. 1, вариант опыта S). При кратковременном лазерном облучении (вариант опыта S + L) наблюдали ещё большее снижение количества жизнеспособных растений, до 78%. Вероятно, это связано со стимуляцией и опережающим ростом клеток грибов, что было заметно по ускорению развития мицелия. Сама же сапротрофная микробиота непосредственно на растения повлиять не могла, но привела к накоплению токсичных метаболитов вокруг семян. Таким образом, в замкнутой среде культивирования возникли конкурирующие за жизненное пространство отношения, динамическое равновесие в которых под действием высококогерентного света сдвинулось в сторону наиболее быстро делящихся клеток грибов.

Дополнительное заражение семян овса патогеном *Fusarium avenacium* значительно подавило развитие растений. В варианте опыта S + P число непроросших или с погибшими проростками семян в 3.4 раза превысило контрольный показатель (вариант опыта S) при уровне значимости нулевой гипотезы $\alpha < 0.01$. Краткое воздействие лазерного облучения существенно изменило развитие паразитических отношений в этом биоценозе. Выход вегетирующих растений в варианте опыта (S + L) + P увеличился, а число нефункциональных семян сократилось в

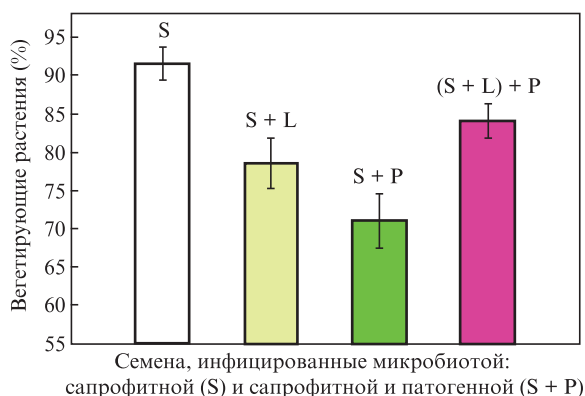


Рис. 1. Количество вегетирующих растений овса сорта Горизонт в культуре *in vitro* при различных действующих факторах.

сравнении с необлучённым вариантом (S + P) в 1.8 раза ($\alpha < 0.01$). Объяснить это можно тем, что жизнедеятельность патогена по цепи химической регуляции индуцировала иммунную реакцию хозяина, которая при лазерном облучении усиливалась. В результате возросшей антифунгальной активности облученных семян, выразившейся, например, в усилении синтеза фитоалексинов, была подавлена как патогенная, так и сапротрофная микробиота.

Как следует из полученных результатов, высококогерентный свет повлиял на взаимодействие компонентов динамической системы «сапротроф–хозяин–патоген». В случае конкурентных отношений равновесие сдвигалось в сторону организмов (сапротрофных грибов) с большей скоростью деления клеток, чем у проростков. При паразитарном контакте побеждал тот вид, у которого защитные механизмы были эффективнее. В данном варианте опыта иммунная реакция проростков овса ограничила экспансию патогена. Такой тип регуляции ценологических отношений является опосредованным вследствие неизбирательной стимуляции как растений, так и грибов светом с достаточно высокой пространственно-временной когерентностью. Для прямого управления взаимодействием крупных и мелких клеток необходимо изменять объём когерентности поля, что и было проделано в опытах с плодами яблони (вторая серия экспериментов).

Воздействие на сорт яблони Антоновка обыкновенная низкокогерентного излучения увеличило поражение плодов грибной инфекцией вдвое по сравнению с необлучёнными плодами, что указывает на возросшую активность сравнительно мелких клеток патогена. При этом развитие физиологических болезней осталось на уровне контроля и, следовательно, функциональная активность крупных клеток плодов не изменилась (рис. 2).

Высококогерентное излучение, наоборот, уменьшило микробное поражение с 12.8% до 7.1% (рис. 2, левая часть). Можно полагать, что в этом случае стимулировались не только клетки патогена, но и более крупные клетки хозяина, что подтверждается снижением уровня физиологических заболеваний с 13.1% в контрольном образце до 4.4% в опыте (рис. 2, правая часть). Таким образом, фотоиндуцированное увеличение функциональной активности клеток плодов привело не только к усилению их иммунной реакции, но и к общей стабилизации обменных процессов.

Аналогичный результат был получен и на другом сорте яблони – Синап северный. Кратковременное лазерное

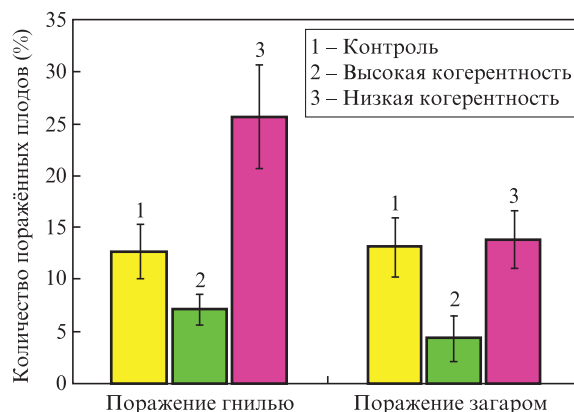


Рис. 2. Влияние степени когерентности квазимонохроматического излучения на поражение плодов Антоновки обыкновенной микробными (гниль) и физиологическими (загар) болезнями.

облучение в 1.7 раза снизило количество поражённых плодов в сравнении с интактным контролем. Воздействие низкокогерентного света, наоборот, увеличило этот показатель в 1.9 раза.

В экспериментах с плодами проходило прямое управление динамическим равновесием в биоценозе «хозяин – патоген» посредством оптических полей с различными объёмами когерентности. Изменение статистических свойств света достигалось применением двух источников – лазерного и теплового. Важно установить: будут ли наблюдаемые закономерности выполняться при использовании излучения одной природы?

Для ответа на этот вопрос световое поле с относительно высокой или низкой когерентностью получали от одного и того же источника – теплового. Квазимонохроматическому облучению с разной статистической упорядоченностью подвергали колонии гриба *Fusarium microcera*, инфицированные бактерией рода *Pseudomonas* (третья серия экспериментов). В таком микробиоценозе могут возникать сложные отношения. Гифы (нитевидные клеточные или многоклеточные образования, формирующие мицелий грибов) выделяют в окружающую среду продукты своего метаболизма (аминокислоты, пептиды, сахара и т. п.), привлекательные для бактерий [8, 9]. В результате они концентрируются вблизи и на поверхности гиф (рис.3). На этом этапе между клетками бактерии и гриба возникают метаболические отношения, выгодные для первых и безразличные для вторых, и оба вида организмов благополучно сосуществуют (рис.4,а, контроль).

Кратковременное воздействие низкокогерентного света привело к достоверному ($\alpha < 0.04$) угнетению колоний гриба (рис.4,б, вариант НК). Причина этого может быть связана с преимущественной фотостимуляцией более мелких клеток бактерий, следствием которой стала активная колонизация мицелия и его лизис – разложение (рис.4,а, вариант НК). Существовавшие между этими организмами метаболические отношения трансформировались в паразитические при смещении ценотического равновесия в пользу бактерии.

Идентичное по энергетическим параметрам высококогерентное излучение увеличило жизнеспособность колоний гриба, которые начали развиваться активнее, чем в необлучённом образце (рис.4,а,б, вариант ВК). Клетки обоих видов микроорганизмов полностью помещались в объёме когерентности поля и благодаря фотостимуляции могли повысить свою функциональную активность. У гри-

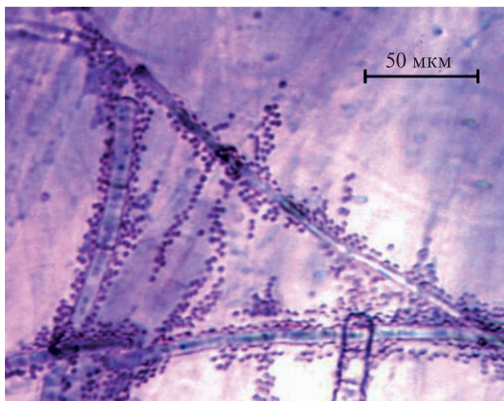


Рис.3. Локализация клеток бактерии рода *Pseudomonas* вокруг и на поверхности гиф гриба *Fusarium microcera*, развивающегося на искусственной питательной среде.

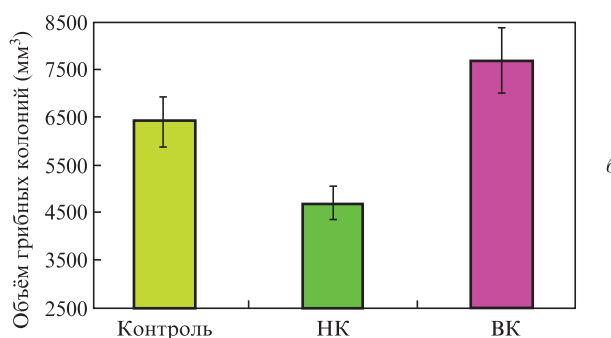
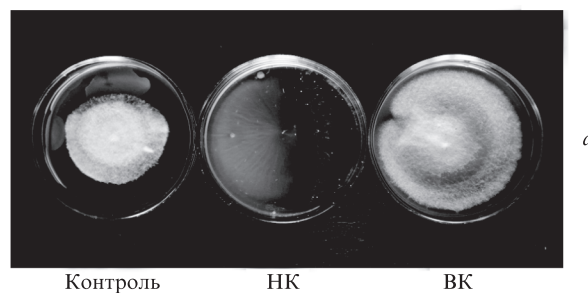


Рис.4. Внешний вид чашек с колониями гриба (типичная качественная картина) (а) и влияние когерентности квазимонохроматического света на развитие колоний гриба *Fusarium microcera*, инфицированных бактерией рода *Pseudomonas* (б). НК – низкая когерентность ($L_{coh} = 4$ мкм, $r_{cor} = 5$ мкм); ВК – высокая когерентность ($L_{coh} = 135$ мкм, $r_{cor} = 18$ мкм).

ба это проявляется в усилении синтеза веществ защитного действия (ферменты, антибиотики, лигнины и т. п.) [10, 11]. Повышение концентрации этих соединений тормозит размножение бактерий и снижает степень их паразитизма. Именно такая картина наблюдалась в эксперименте. Лизис мицелия заметно уменьшился в сравнении с вариантом НК (рис.4,а). Взаимоотношения между рассматриваемыми микроорганизмами вновь изменили свой характер и стали антагонистическими (с доминированием гриба). После кратковременного облучения микробиоценоза высококогерентным светом *Fusarium microcera* более эффективно использовал свой адаптивный потенциал, чем бактерия рода *Pseudomonas*. Таким образом, в зависимости от степени когерентности квазимонохроматического излучения теплового источника равновесие микробиоценоза изменялось по-разному.

4. Заключение

Проведенные исследования показали, что квазимонохроматическое излучение, в зависимости от своих статистических параметров, способно существенно влиять на жизнедеятельность бактерий, грибов и растений. Установив определённый объём когерентности поля, можно избирательно управлять взаимодействием клеток с различными размерами. В наибольшей степени стимулируются те клетки, размеры которых не превышают длины когерентности и радиуса корреляции действующего света, т. е. помещаются в его объёме когерентности. Это заставляет предположить, что фоторецепторные системы клеток обладают свойствами фазового детектора и способны реагировать на фотоны с определённой корреляцией фаз. Наиболее вероятными кооперативными системами с такими свойствами могут быть хромопротеиды, ассоциированные с биомембранами. Если во всём объёме

клетки пространственно-временная когерентность будет значительной, то структурно-функциональная перестройка произойдёт не в отдельных локусах, а во всём мембранном пуле, и фотоиндуцированная реакция станет наиболее выраженной. Такая закономерность и наблюдалась в экспериментах.

Для понимания возможной организации светочувствительной кооперативной системы в клетках необходим поиск простой модельной структуры. С этих позиций особый интерес представляет нематический жидкокристаллический полимер, легированный малым (менее 0.1% по весу) количеством красителя. Такие системы обладают очень высокой чувствительностью к воздействию световых полей [12]. Переориентация фрагментов полимерной цепи, обусловленная фотоиндуцированными конформационными переходами в молекулах красителя, происходит при плотностях мощности менее 0.1 Вт/м². Примерно такие же плотности мощности применялись в описанных выше экспериментах.

Полученные результаты могут быть использованы для биологической защиты растений в целях селективного повышения функциональной активности бактерий – антагонистов патогенных грибов. Представляет интерес применение низкокогерентного света для подавления пролиферации злокачественных опухолей посредством избирательной стимуляции более мелких, в сравнении с раковыми, клеток Т-лимфоцитов.

Для решения практических задач необходим источник квазимонохроматического излучения с изменяемым объёмом когерентности. Он должен работать в диапазоне длин волн, соответствующем спектру действия какой-либо из фоторегуляторных систем клеток, например фитохромной (600–690 нм). Из результатов большого числа экспериментов следует, что плотность мощности 0.1–10 Вт/м² будет достаточной для выраженного фотоиндуцированного ответа.

Диапазон изменения статистических параметров излучения можно определить исходя из оценки размера взаимодействующих клеток. Клетки многих бактерий имеют размер менее 5 мкм, а у растений он, как правило, превышает 20 мкм. Чтобы обеспечить варьирование длины когерентности красного (650 нм) квазимонохроматического света в этих пределах, необходимо ширину спектральной линии изменять от ~20 до 80 нм. Как показано в [13], фотоиндуцированная реакция в не меньшей степени зависит и от пространственной когерентности излучения.

Следовательно, радиус корреляции светового пучка и соответственно его угловые размеры также должны в несколько раз изменяться при сохранении заданной плотности мощности облучения.

Сложность заключается в том, что клетки одного вида не имеют строго определённого размера, а описывающие их геометрические параметры флуктуируют вокруг наиболее вероятных значений. Для избирательной стимуляции необходимо так изменять значения L_{coh} и r_{cor} , чтобы большинство мелких клеток полностью помещалось в объёме когерентности поля, а крупные – превышали его. При этом перестройку статистических параметров желательно проводить не дискретно, а плавно, чтобы получить максимальный эффект от управления взаимодействием биологических организмов. Создание квазимонохроматического источника света для таких целей может стать интересной проблемой в области квантовой электроники.

Авторы выражают искреннюю благодарность А.Н. Юшкову, Н.В.Борзых и М.Л.Дубровскому за оказанную помощь.

1. Конев С.В. *Фотобиология* (Минск: Из-во БГУ, 1979).
2. Bjoern L.O. (ed.) *Photobiology. The Science of Life and Light* (Springer, 2007, p. 695).
3. Рэди Дж. *Действие мощного лазерного излучения* (М.: Мир, 1974).
4. Scholz M., Dedic R. *Proc. WDS'12 Contributed Papers* (Prague: Matfyzpress, 2012, Part III, p. 46).
5. Будаговский А.В. *Квантовая электроника*, **35**, 369 (2005).
6. Будаговский А.В., Соловых Н.В., Будаговская О.Н., Будаговский И.А. *Квантовая электроника*, **45**, 351 (2015).
7. Франчук Е.П. *Товарное качество плодов* (М.: Агропромиздат, 1986).
8. Pion M., Spangenberg J.E., Simon A., Bindschedler S., Flury C., Chatelain A., Bshary R., Job D., Junier P. *Proc. R. Soc. B*, **280**, 20132242 (2013).
9. Schroeckha V., Scherlachb K., Nützmann H.-W., Shelest E., Schmidt-Heckd W., Schuemann J., Martine K., Hertweck C., Brakhage A.A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (August 25, 2009, vol. 106, No. 34, p. 14558).
10. Partida-Martinez LP, Monajembashi S., Greulich K.O., Hertweck C. *Curr Biol.*, **17**, 773 (2007).
11. Frey-Klett P., Burlinson P., Deveau A., et al. *Microbiol.Molec. Biol. Rev.*, **75** (4), 583 (2011).
12. Будаговский И.А., Золотко А.С., Очкин В.Н., Швецов С.А., Бобровский А.Ю., Бойко Н.И., Шибаев В.П. *Кр. сообщ. физ. ФИАН*, № 4, 22 (2016).
13. Budagovsky A.V., Solovykh N.V., Yankovskaya M.B., Maslova M.V., Budagovskaya O.N., Budagovsky I.A. *Phys. Rev. E*, **94** (1), 012411 (2016).