

Arkadiusz TELESIŃSKI, Mirosław ONYSZKO, Maciej PŁATKOWSKI, Michał STREK

WPŁYW ZASOLENIA NA AKTYWNOŚĆ DEHYDROGENAZ W ODNIESIENIU DO EKOLOGICZNEGO ZNACZENIA SKAŻENIA GLEBY

EFFECT OF SALINITY ON DEHYDROGENASES ACTIVITY WITH REFERENCE TO ECOLOGICAL IMPORTANCE OF SOIL POLLUTION

Katedra Fizjologii Roślin i Biochemii, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Abstract. The aim of this study was to determine dehydrogenases activity in the soil with the addition of NaCl in different concentrations and to identify whether the observed changes to be considered dangerous, tolerated, or insignificant for soil ecosystem. The study was carried out on samples of loamy sand, sandy loam and sandy clay loam. The aqueous NaCl solutions were introduced to soil in the doses of: 0; 0.05; 0.50; 5.00; 50.00 mmol · kg⁻¹. Dehydrogenases activity was measured spectrophotometrically in 1, 3, 7, 14, 28, 56 and 112 day of incubation. The results are indicated in the graphs of ecological hazard zones (Domsch et al. 1983). The presence in soil of sodium chloride caused inhibition of dehydrogenases activity. The observed inhibition level of these enzymes was greatest in loamy sand and decreased with organic carbon and clay fraction ≤ 0.002 mm. Soil salinity with largest doses of NaCl (5.00 and 50.00 mmol · kg⁻¹), in relation to ecological significance of soil contamination could turn into its degradation.

Słowa kluczowe: dehydrogenazy, gleba, zasolenie.

Key words: dehydrogenases, salinity, soil.

WSTĘP

Zasolenie gleby spowodowane jest nadmierną koncentracją w glebie łatwo rozpuszczalnych soli nieorganicznych, w wyniku czego roztwór glebowy w stosunku do potrzeb rośliny zawiera zbyt wiele kationów, takich jak: Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺ oraz różnych anionów (Munns 2002; Kozłowski i in. 2004). Najbardziej szkodliwe dla środowiska jest zasolenie związane z jonami sodu (Azam i Ifzal 2006). Następuje wówczas nagromadzenie sodu w kompleksie sorpcyjnym, zwiększa się stan dyspersji gleby, jej zdolność do pęcznienia, natomiast zmniejsza się przepuszczalność wodna gleb. Na skutek braku równowagi jonowej, gleby w stanie wilgotnym są grząskie i nieprzepuszczalne, a w czasie suszy ulegają zaskorupieniu i są trudne do uprawy (Cieśla i Dąbkowska-Naskręt 1984).

Zasolenie gleb w Polsce jest związane z głównie czynnikami antropogenicznymi i powstaje na obszarach, na których utwory glebowe mają bezpośredni kontakt z solą lub wodami zasolonymi (Telesiński 2012). Antropogenicznymi źródłami zasolenia gleb są przede

wszystkim składowiska i hałdy odpadów przemysłu sodowego oraz odpadów hutniczych i paleniskowych, stosowanie soli w celu odśnieżania oraz przeciwdziałania oblodzeniu, nawadnianie upraw wodą czerpaną z zasolonych zbiorników wodnych oraz nadmierne nawożenie mineralne (Rietz i Haynes 2003; Siddikee i in. 2011).

Bardzo dobrym wskaźnikiem zmian zachodzących w glebie jest jej aktywność enzymatyczna (Bielińska 2001). Aktywne dehydrogenazy katalizują utlenianie związków organicznych przez odłączenie od nich elektronów i protonów (Kobus 1995). Określenie aktywności dehydrogenazowej może być odbiciem zmian w populacji drobnoustrojów, jak i potencjału oksydoredukcyjnego gleby (Brzezińska 2002).

Ocena ujemnego wpływu ksenobiotyków na środowisko jest trudna, a określenie stopnia nasilenia i czasu trwania negatywnych zmian dla ekosystemu glebowego może przysparzać wiele problemów (Wienhold i in. 2004). Słuszna wydaje się zatem koncepcja zaproponowana przez Domscha i in. (1983), w myśl której wszystkie zmiany w metabolizmie składników glebowych wywołane przez środki chemiczne można porównać ze zmianami wywołanymi u mikroorganizmów przez naturalne warunki stresowe. Wszystkie zmiany danego procesu trwające powyżej 60 dni z nasileniem 50% w stosunku do gleby kontrolnej, należy uznać za niebezpieczne, pozostałe traktowane są jako tolerowane bądź pomijalne (Nowak i in. 2003).

Celem podjętych badań było określenie jak kształtuje się aktywność dehydrogenaz w glebie z dodatkiem NaCl w różnym stężeniu oraz określenie, czy zaobserwowane zmiany należy uznać za niebezpieczne, tolerowane, czy mało znaczące dla ekosystemu glebowego.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na próbkach pobranych z poziomu ornoпрóchnicznego:

- a) gleb brunatno-rdzawych na terenie RSD Lipnik (gleba 1),
- b) czarnych ziem Równiny Gumienieckiej (gleba 2),
- c) czarnych ziem Równiny Pyrzyckiej (gleba 3).

Skład granulometryczny oraz właściwości fizykochemiczne użytych w doświadczeniu gleb przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka gleb użytych w doświadczeniu
Table 1. Characteristics of soils used in experiment

| Właściwości Properties | Gleba 1 – Soil 1 | Gleba 2 – Soil 2 | Gleba 3 – Soil 3 |
|-----------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| Frakcje granulometryczne Granulometric fractions | | | |
| 2,00 ≥ d > 0,05 mm | 75% | 47% | 53% |
| 0,05 ≥ d > 0,002 mm | 23% | 48% | 19% |
| d ≤ 0,002 mm | 2% | 5% | 28% |
| Grupa granulometryczna Granulometric grup | pg – LS | gl – SL | gpi – SCL |
| C _{org} | 0,87% | 1,09% | 3,38% |
| N _t | 0,04% | 0,25% | 0,62% |
| pH w – pH in: | | | |
| H ₂ O | 6,59 | 7,09 | 7,47 |
| 1 M KCl | 6,36 | 6,81 | 7,13 |

Pobrane z terenu próbki doprowadzono do stanu powietrznie suchego, a następnie przesiano przez sito o średnicy oczek 2 mm. Części ziemiste materiału glebowego podzielono na jednokilogramowe naważki i doprowadzono ich wilgotność do poziomu 60% kapilarnej pojemności wodnej. Dla każdej gleby materiał doświadczalny podzielono następnie na trzy serie, w zależności od rodzaju gleby. W każdej serii czynnikami zmiennymi były:

- a) dawka NaCl w $\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ suchej masy gleby: 0 (kontrola); 0,05; 0,50; 5,00; 50,00;
- b) czas inkubacji gleby w dniach: 1., 3., 7., 14., 28., 56. i 112.

Ilość wprowadzonych do gleby, wraz z NaCl, kationów sodu i anionów chlorkowych podano w tabeli 2.

Tabela 2. Ilość wprowadzonych do gleby kationów sodu i anionów chlorkowych
Table 2. Amount of introduced sodium cations and chloride anions into soil

| Ilość NaCl Amount of NaCl | | Ilość Na ⁺ Amount of Na ⁺ | | Ilość Cl ⁻ Amount of Cl ⁻ | |
|-----------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------------|--|----------------------------------------------------|--|
| $\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. | $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. | $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. | | | |
| 0,05 | 2,92 | 1,15 | | 1,77 | |
| 0,50 | 29,20 | 11,50 | | 17,70 | |
| 5,00 | 292,00 | 115,00 | | 177,00 | |
| 50,00 | 2920,00 | 1150,00 | | 1770,00 | |

s.m. – suchej masy – dry matter.

Próbki gleby dokładnie wymieszano z roztworami NaCl i przechowywano w szczelnie zamkniętych workach polietylenowych w temperaturze 20°C w ciemności. Aktywność dehydrogenaz [EC 1.1.1.x] (Enzyme nomenclature 1992) oznaczono spektrofotometrycznie przy użyciu spektrofotometru UV-1800 firmy Shimadzu, zgodnie z procedurą opisaną przez Thalmanna (1968), stosując jako substrat chlorek 2,3,5-trifenyloctetrazolu (TTC).

Wszystkie analizy wykonano w trzech powtórzeniach. Otrzymane wyniki opracowano statystycznie za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji w układzie kompletnej randomizacji. Czynnikiem pierwszym była dawka NaCl, a drugim dzień doświadczenia. Analizy wykonano niezależnie dla każdego rodzaju gleby. Do oceny istotności różnic zastosowano test Tukeya przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Rzeczywiste wartości aktywności przeliczono w stosunku do aktywności enzymów w glebie kontrolnej (przyjmując ją za 100%) i podano jako procent inhibicji. Wyniki zmian aktywności dehydrogenaz przedstawiono na zaproponowanych przez Domscha i in. (1983) wykresach ekologicznych stref zagrożenia. Na wykresach zaznaczono obszary ekologicznego zagrożenia: wartości pomijalne – w niewielkim stopniu zmniejszające aktywność katalityczną enzymów, tolerowane – w dużym stopniu wpływające na aktywność enzymów, ale nie powodujące ich unieczynnienia, krytyczne – mające najbardziej ujemny wpływ na ekosystem glebowy i mogące doprowadzić do jego degradacji.

WYNIKI I DISKUSJA

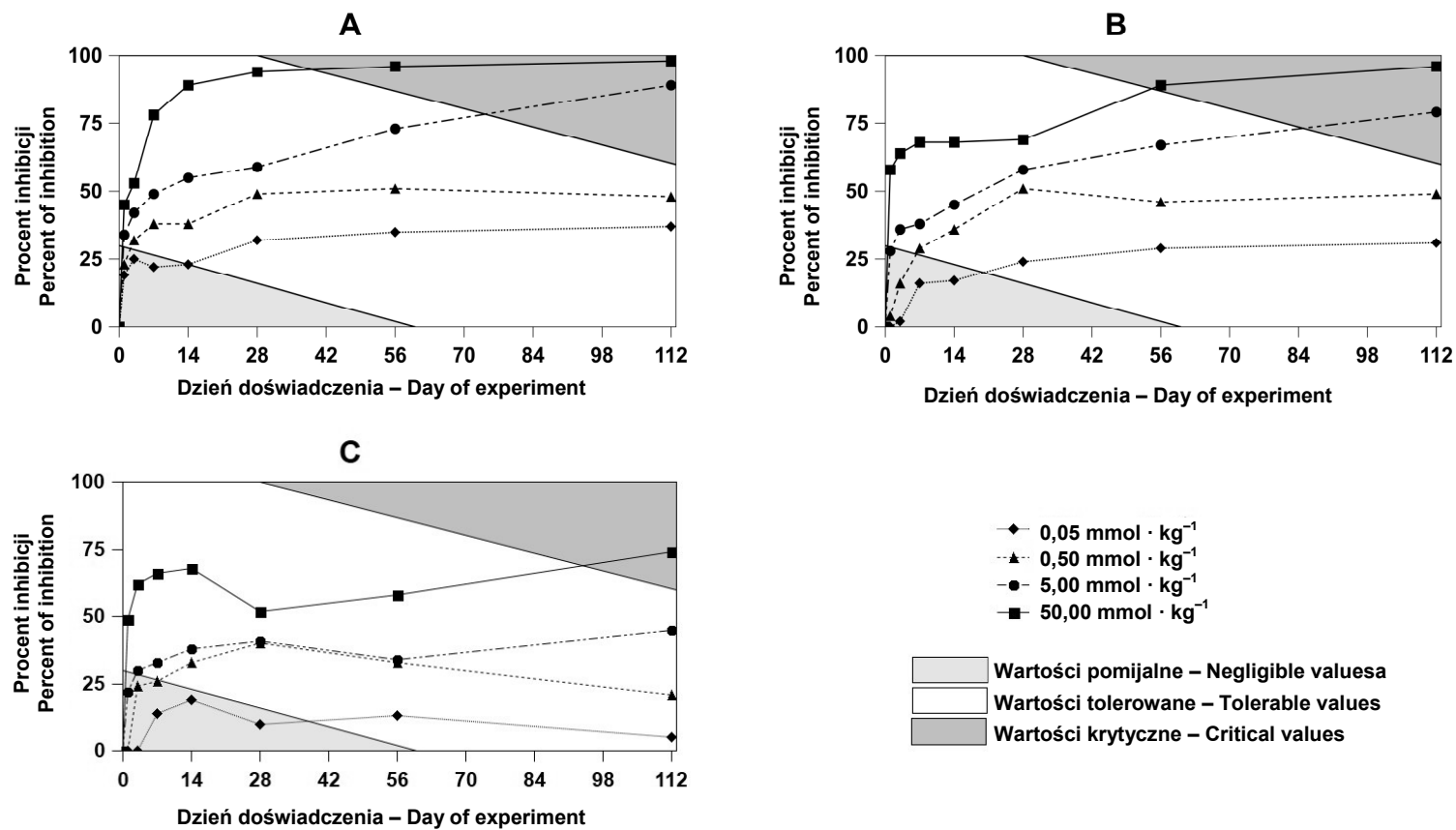
Aktywność dehydrogenaz w glebach z dodatkiem NaCl zwiększała się wraz ze wzrostem zawartości w glebie węgla organicznego, jak i frakcji iłu $\leq 0,002$ mm. W glebie 1 (pg) wahała się ona w zakresie od 0,43 do 0,62 $\mu\text{g TPF} \cdot (\text{g s.m. gleby} \cdot \text{h})^{-1}$, w glebie 2 (gl) – od 2,12 do

2,71 $\mu\text{g TPF} \cdot (\text{g s.m. gleby} \cdot \text{h})^{-1}$, a w glebie 3 (gpi) – od 5,04 do 5,64 $\mu\text{g TPF} \cdot (\text{g s.m. gleby} \cdot \text{h})^{-1}$. Wprowadzenie do gleby chlorku sodu spowodowało istotne zmiany aktywności dehydrogenaz we wszystkich rodzajach gleb. Zaobserwowany efekt zależny był zarówno od dawki soli, jak i dnia doświadczenia (tab. 3).

Tabela 3. Aktywność dehydrogenaz w glebach z dodatkiem NaCl, $\mu\text{g TPF} \cdot (\text{g s.m. gleby} \cdot \text{h})^{-1}$
Table 3. Dehydrogenases activity in soil treated with NaCl, $\mu\text{g TPF} \cdot (\text{g d.w. soil} \cdot \text{h})^{-1}$

| Dawka NaCl NaCl dose (l) | Dzień doświadczenia – Day of experiment (II) | | | | | | | |
|--------------------------------|----------------------------------------------|------|------|------|----------------|----------------|------|-----------|
| | 1 | 3 | 7 | 14 | 28 | 56 | 112 | \bar{x} |
| Gleba 1 (pg) – Soil 1 (LS) | | | | | | | | |
| 0 | 0,43 | 0,50 | 0,59 | 0,58 | 0,62 | 0,61 | 0,52 | 0,55 |
| 0,05 | 0,35 | 0,38 | 0,46 | 0,45 | 0,42 | 0,40 | 0,33 | 0,40 |
| 0,50 | 0,27 | 0,34 | 0,37 | 0,36 | 0,32 | 0,30 | 0,27 | 0,32 |
| 5,00 | 0,18 | 0,29 | 0,30 | 0,26 | 0,25 | 0,16 | 0,06 | 0,22 |
| 50,00 | 0,09 | 0,24 | 0,13 | 0,06 | 0,04 | 0,02 | 0,01 | 0,08 |
| \bar{x} | 0,26 | 0,35 | 0,37 | 0,34 | 0,33 | 0,30 | 0,24 | 0,31 |
| NIR _{0,05} | | | | | I = 0,024 | II = 0,018 | | |
| LSD _{0,05} | | | | | I × II = 0,026 | II × I = 0,036 | | |
| Gleba 2 (gl) – Soil 2 (SL) | | | | | | | | |
| 0 | 2,58 | 2,35 | 2,43 | 2,29 | 2,15 | 2,12 | 2,14 | 2,29 |
| 0,05 | 2,71 | 2,30 | 2,04 | 1,90 | 1,63 | 1,51 | 1,48 | 2,31 |
| 0,50 | 2,48 | 1,97 | 1,73 | 1,47 | 1,27 | 1,14 | 1,09 | 1,59 |
| 5,00 | 1,86 | 1,50 | 1,51 | 1,26 | 0,90 | 0,70 | 0,45 | 1,17 |
| 50,00 | 1,08 | 0,85 | 0,78 | 0,73 | 0,67 | 0,23 | 0,09 | 0,63 |
| \bar{x} | 2,66 | 1,80 | 1,70 | 1,53 | 1,32 | 1,14 | 1,05 | 1,60 |
| NIR _{0,05} | | | | | I = 0,123 | II = 0,131 | | |
| LSD _{0,05} | | | | | I × II = 0,173 | II × I = 0,227 | | |
| Gleba 3 (gpi) – Soil 3 (SCL) | | | | | | | | |
| 0 | 5,04 | 5,04 | 5,17 | 5,14 | 5,12 | 5,11 | 5,14 | 5,11 |
| 0,05 | 5,64 | 5,14 | 4,45 | 4,16 | 4,61 | 4,45 | 4,88 | 4,76 |
| 0,50 | 5,44 | 3,83 | 3,83 | 3,44 | 3,07 | 3,42 | 4,06 | 3,87 |
| 5,00 | 3,93 | 3,53 | 3,46 | 3,19 | 3,02 | 3,37 | 2,83 | 3,33 |
| 50,00 | 2,57 | 1,92 | 1,76 | 1,64 | 2,46 | 2,15 | 1,34 | 1,98 |
| \bar{x} | 4,53 | 3,89 | 3,73 | 3,52 | 3,66 | 3,70 | 3,65 | 3,81 |
| NIR _{0,05} | | | | | I = 0,105 | II = 0,139 | | |
| LSD _{0,05} | | | | | I × II = 0,188 | II × I = 0,214 | | |

Dodatek chlorku sodu do piasku gliniastego (gleba 1) we wszystkich dawkach spowodował inhibicję aktywności dehydrogenaz, która pogłębiała się wraz ze wzrostem stężenia soli. Największe zahamowanie aktywności dehydrogenaz w glebie 1 (pg) stwierdzono w ostatnim terminie pomiarów i wynosiło ono odpowiednio przy dawce 0,05, 5,00 i 50,00 $\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ – 37%, 89% oraz 98%. Jedynie w glebie po aplikacji NaCl w dawce 0,50 największą inhibicję odnotowano w 56. dniu doświadczenia (51%). Zaobserwowana inhibicja w piasku gliniastym zawierającym NaCl w dawce 5,00 $\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ w 112. dniu doświadczenia oraz w dawce 50,00 $\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ w 56. i 112. dniu doświadczenia znajdowała się na wykresach ekologicznych stref zagrożenia Domscha i in. (1983) w obszarze wartości krytycznych, co świadczy o tym, że stopień zasolenia zagrażał funkcjonowaniu mikroflory glebowej (rys. 1A).



Rys. 1. Stopień inhibicji dehydrogenaz w piasku gliniastym (A), glinie lekkiej (B) i glinie piaszczysto-ilastej (C) spowodowanych chlorkiem sodu w odniesieniu do ekologicznego znaczenia skażenia gleby

Fig. 1. The range of dehydrogenases inhibition in loamy sand (A), sandy loam (B) and sandy clay loam (C) developed by sodium chloride with reference to ecological importance of soil pollution

Dodatek chlorku sodu do gliny lekkiej (gleba 2) w dawce $0,05 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ w 1. dniu doświadczenia wywołał około 5-procentową stymulację aktywności dehydrogenaz glebowych. W kolejnych dniach doświadczenia w glebie 2 (gl) zawierającej NaCl w tym stężeniu odnotowano inhibicję aktywności tej grupy enzymów. Wyższe dawki NaCl ($0,50\text{--}50,00 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$) w trakcie trwania całego doświadczenia wywołały spadek aktywności dehydrogenaz w stosunku do gleby kontrolnej. W większości terminów stwierdzone zahamowanie aktywności dehydrogenaz mieściło się w zakresie wartości pomijalnych, bądź tolerowanych. Jednak przy dawce NaCl $5,00 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ w 112. dniu doświadczenia oraz przy dawce NaCl $50,00 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ w 56. i 112. dniu doświadczenia inhibicja aktywności dehydrogenaz znajdowała się w obszarze wartości krytycznych, co może świadczyć o znaczących zaburzeniach w metabolizmie gleby (rys. 1B).

W glinie piaszczysto-ilastej (gleba 3) w początkowym okresie trwania doświadczenia po aplikacji chlorku sodu w najniższych dawkach ($0,05 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ w 1. i 3. dniu doświadczenia; $0,50 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ w 1. dniu doświadczenia) stwierdzono niewielką, nieprzekraczającą 15%, stymulację aktywności dehydrogenaz. W pozostałych przypadkach aktywność oznaczanej grupy enzymów była niższa niż w glebie kontrolnej, jednak otrzymane wyniki mieściły się w zakresie wartości pomijalnych, bądź tolerowanych. Jedynie w ostatnim terminie pomiaru (112. dzień doświadczenia) w glebie zawierającej NaCl w dawce $50,00 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ odnotowano inhibicję aktywności dehydrogenaz w zakresie wartości krytycznych (rys. 1C).

Otrzymane wyniki wykazują, że zasolenie gleby, zwłaszcza przy wysokich dawkach NaCl, znacząco wpływa na procesy metaboliczne zachodzące w glebie. Dostępne dane literaturowe wykazują, że wśród enzymów glebowych: najbardziej wrażliwymi na zasolenie są oksydoreduktazy, a wśród nich dehydrogenazy (Ahmad i Khan 1988, Shi i in. 1994, Telesiński 2012). Warto podkreślić, że negatywne oddziaływanie zasolenia na aktywność enzymatyczną gleby zależy zarówno od dawki chlorku sodu, jak i właściwości enzymu (Frankenberger i Bingham 1982). Zmiany aktywności dehydrogenaz, jak i innych enzymów glebowych, wynikają przede wszystkim z osmotycznego odwadniania komórek drobnoustrojów, w wyniku czego do środowiska glebowego uwalniane są enzymy podatne na lizę w środowisku zewnątrzkomórkowym (Rietz i Haynes 2003). Ważnym aspektem obecności w roztworze glebowym jonów Na^+ i Cl^- jest zjawisko wysalania białek enzymatycznych. W wyniku tego procesu następuje odciąganie wody hydratacyjnej z powierzchni cząsteczek białkowych. Pozbawione otoczki wodnej enzymy ulegają wytrąceniu, tracąc swoją aktywność biologiczną (Ahmad i Khan 1988). Wysalanie powoduje także zmiany konformacyjne centrum aktywnego enzymu (Frankenberger i Bingham 1982). Garcia i Hernandez (1996) podają natomiast, że aktywność hydrolaz (β -glukozydazy, proteazy oraz fosfataz) w glebie nawadnianej wodami zasolonymi w większym stopniu była hamowana niż aktywność dehydrogenaz i katalazy.

PODSUMOWANIE

Obecność w glebie chlorku sodu spowodowała inhibicję aktywności dehydrogenaz. Zaobserwowany stopień zahamowania aktywności tych enzymów był największy w piasku gliniastym i zmniejszał się wraz ze wzrostem zawartości węgla organicznego, jak i frakcji iltu $\leq 0,002 \text{ mm}$. Zasolenie gleby największymi dawkami NaCl ($5,00$ i $50,00 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$), w odniesieniu do ekologicznego znaczenia skażenia gleby, może prowadzić do jej degradacji.

PIŚMIENNICTWO

- Ahmad I., Khan K.M.** 1988. Studies on enzymes activity in normal and saline soils. Pak. J. Agric. Res. 9 (4), 506–508.
- Azam F., Ifzal M.** 2006. Microbial populations immobilizing NH_4^+ -N and NO_3^- -N differ in their sensitivity to sodium chloride salinity in soil. Soil Biol. Biochem. 38 (8), 2491–2494.
- Bielińska E.J.** 2001. Enzymatic activity as an indicator of soil transformations under the influence of orchard use. Pol. J. Soil Sci. 34 (2), 89–97.
- Brzezińska M.** 2002. Significance of soil enzymes in nutrient transformation. Acta Agrophys. 65, 5–23.
- Cieśla W., Dąbkowska-Naskręt H.** 1984. Właściwości zasolonych gleb w sąsiedztwie Janikowskich Zakładów Sodowych na Kujawach. Rocz. Glebozn. 35, 139–149.
- Domsch K.H., Jagnow G., Anderson T.-H.** 1983. An ecological concept for the assessment of side-effects of agrochemicals on soil microorganisms. Res. Rev. 86, 65–105.
- Enzyme nomenclature.** 1992. NC-IUBMB. ED. E.C. Webb. San Diego, Acad. Press.
- Frankenberger W.T., Bingham F.T.** 1982. Influence of salinity on soil enzyme activities. Soil Sci. Soc. Amer. J. 46 (6), 1173–1177.
- Garcia C., Hernandez T.** 1996. Influence of salinity on the biological and biochemical activity of colciotird soil. Plant Soil 178(2), 255–263.
- Kobus J.** 1995. Biologiczne procesy a kształtowanie żyzności gleby. Zesz. Probl. Postęp. Nauk Rol. 421a, 209–219.
- Kozłowski S., Goliński P., Zielewicz W., Lembicz M., Rogowski A.** 2004. Zmiany składu chemicznego mannicy odstającej (*Puccinellia distans* L. Parl.) w świetle oddziaływania zasolenia jako czynnika antropogenicznego. Ann. UMCS, Sec. E 59 (4), 1965–1976.
- Munns R.** 2002. Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell Environ. 25 (2), 239–250.
- Nowak J., Kłódka D., Telesiński A.** 2003. Ocena oddziaływania trzech herbicydów: Solar 200 EC, Lontrel 300 SL, Mustang 306 SE na aktywność biologiczną gleby na podstawie jej aktywności fosfatazowej. Zesz. Probl. Postęp. Nauk Rol. 492, 233–239.
- Rietz D.N., Haynes R.J.** 2003. Effect of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity. Soil Biol. Biochem. 35 (9), 845–854.
- Shi W., Cheng M., Li C., Ma G.** 1994. Effect of Cl^- on behavior of fertilizer nitrogen, number of microorganisms and enzyme activities in soils. Pedosphere 4 (4), 357–364.
- Siddikee M.A., Tipayno M.A., Kim K., Chung J., Sa T.** 2011. Influence of varying of salinity-sodicity stress on enzyme activities and bacterial population of Coastal soils of Yellow Sea, South Korea. J. Microbiol. Biotechnol. 21 (4), 341–346.
- Telesiński A.** 2012. Wpływ zasolenia na wybrane biochemiczne wskaźniki żyzności gleby. Woda-Śr.-Obsz. Wiej. 12, 1 (37), 209–217.
- Thalman A.** 1968. Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität im Boden mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). Landwirtsch. Forsch. 21, 249–258.
- Wienhold B.J., Andrews A.A., Karlen D.L.** 2004. Soil quality: a review of the science and experiences in the USA. Environ. Geochem. Health 26, 89–95.

