**ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОТХОДОВ ГРИБОВОДСТВА
В БИОРЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО НАЗНАЧЕНИЯ**

Г. В. Ильина, доктор биол. наук, профессор; С. А. Сашенкова, канд. биол. наук, доцент;
Д. Ю. Ильин, канд. биол. наук, доцент

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Пензенский государственный аграрный университет», Россия,
т. (8412) 62-81-51, e-mail: g-ilyina@yandex.ru

В работе рассматриваются возможности использования органических субстратов после культивирования на них мицелиальных культур ксилотрофных базидиомицетов для биоремедиации почв, загрязненных полифенольными соединениями и тяжелыми металлами. Показано снижение в 0,9-3 раза показателя интегральной токсичности почв под действием мицелиально-субстратных комплексов (отходов грибоводства и биотехнологий). Изучена динамика содержания гумуса в почвенных образцах в результате внесения в качестве удобрения отходов производства вешенки устричной (*Pleurotus ostreatus*). Установлено, что содержание гумуса в опытных вариантах увеличилось на 0,08-0,14 %. При этом использование отходов грибоводства в качестве удобрений позволило повысить урожайность яровой пшеницы «Тулайковская 10» на 10,7-29,5 %.

Ключевые слова: биоремедиация почв, ксилотрофные базидиомицеты, мицелиальные культуры, отходы грибоводства, интегральная токсичность.

Введение

Почва – важнейший природный ресурс, обеспечивающий существование биосферы и человека как ее части. Ничто не может заменить почвенный покров, который создавался миллионы лет. Вместе с тем, в результате хозяйственной деятельности разрушение почвы, снижение ее плодородия и загрязнение приобретают глобальные масштабы. Так, источником загрязнений сельскохозяйственных угодий являются минеральные удобрения, ядохимикаты, некоторые из которых содержат в своём составе фенольные, хлорорганические соединения, ртуть и другие тяжёлые металлы, которые накапливаются в почве, ухудшая ее качество. Поэтому восстановлению продуктивности нарушенных земель и улучшению условий окружающей среды уделяется особое внимание, что находит подтверждение в большом количестве литературных источников, посвященных этой проблеме [3, 6, 12].

Одним из эффективных методов, позволяющих восстановить почвенное плодородие и снизить уровень загрязнения, является биоремедиация. Использование для этих целей биологических технологий является более предпочтительным вследствие своей экологической безопасности, достаточно высокой эффективности и низкой себестоимости. Поэтому разработка и внедрение в практику сельского хозяйства технологий биоремедиации почв, загряз-

ненных токсичными химическими веществами является актуальным направлением исследований [12, 13].

В литературе рассматриваются два основных подхода к биоремедиации почв с помощью микроорганизмов: биостимуляция – с использованием аборигенной микрофлоры на территории, подвергшейся загрязнению, и биодополнение – с внесением в почву биопрепаратов микроорганизмов способных к деградации загрязнителя [12].

Ксилотрофные базидиомицеты, обладая богатым комплексом неспецифических ферментов – полифенолоксидаз, способны разрушать поллютанты фенольной природы, в том числе их хлорированные производные [16]. Ферментативную активность этих грибов используют для очистки почвы от разливов нефти, в промышленности для отбеливания лигнинсодержащих материалов. Кроме того, поверхность мицелия, благодаря структуре хитина, входящего в состав клеточных оболочек, способна сорбировать соединения тяжелых металлов [7]. Поэтому проведение исследований по использованию ксилотрофных грибов для улучшения структуры почв является целесообразным и актуальным направлением как в теоретическом, так и прикладном аспектах.

Кроме того, при культивировании грибов в грибоводстве и биотехнологиях образуются отходы (отработанный субстрат с

мицелием), которые можно было бы использовать в качестве биодополнения для санирования загрязненных почв и поддержания их плодородия. Например, только в Пензенской области ежегодно образуется, по разным данным, от 60 до 100 тонн отходов грибного производства.

Целью настоящей работы была оценка возможности использования отходов грибного производства – отработанного мицелия ксилотрофных грибов в качестве биоремедианта антропогенно нарушенных почв в пределах Пензенской области.

В ходе проведения исследований решались следующие задачи:

- изучить интегральную токсичность почв в местах, подвергшихся выраженному

вариативному антропогенному воздействию, в частности, загрязнению тяжелыми металлами и галогенированными фенольными соединениями;

- отобрать виды и штаммы ксилотрофных базидиомицетов, обладающих максимальным ферментным потенциалом;

- изучить деструктивный, в отношении ксенобиотиков, потенциал ферментативных комплексов, имеющих в коллекции штаммов видов грибов – ксилотрофов, перспективных в грибоводстве;

- с использованием маркерного соединения изучить динамику содержания фенольного вещества в модельных субстратах под воздействием ферментов мицелия;

- изучить динамику интегральной ток-

Рис. 1. Содержание загрязнителей в отобранных почвенных образцах $p > 0,05$, планки погрешностей – ошибка средней

Оценка токсичности вытяжек из отобранных образцов

Место взятия пробы почвы	Тест-объект (методика)		Оценка тестируемой пробы
	<i>Daphnia magna</i>	<i>Escherichia coli</i>	
Золотоотвал ТЭЦ	7,3±2,9 шт.	61,2±0,3 у. е.	Оказывает острое токсическое действие. Проба сильно токсична
МПУ р-н ст. Леонидовка	8,7±3,5 шт.	65,3±12,9 у. е.	
Автоматгистраль М5	8,3±3,3 шт.	61,2±0,3 у. е.	
Ст. Никоново	2,3±0,8 шт.	4,5±0,3 у. е.	Проба не токсична

сичности антропогенно нарушенных почв под воздействием используемого отхода – отработанного мицелиально-субстратного комплекса ксилотрофных грибов;

- изучить влияние внесения отходов грибоводства на почвенное плодородие и урожайность яровой пшеницы «Тулайковская 10».

Методы и материалы

Изучение влияния антропогенной деятельности предполагало оценку интегральной токсичности почв на загрязненных территориях. Были отобраны образцы почвы [2] на следующих территориях Пензенской области:

- лесное сообщество, сформированное на золоотвале ТЭЦ г. Пенза;
- место прежнего уничтожения химического оружия в окрестностях ст. Леонидовка Пензенского района (МПУ);
- лесополоса, расположенная вдоль оживленной автомагистрали М5 «Москва-Самара» (в пределах 30 м от дорожного полотна);
- лесной массив близ ст. Никоново Городищенского района (контроль).

Предварительно был проведен химический анализ почв с помощью метода хроматографии. При проведении исследования использовались методики определения токсичности почв с помощью биотестирования, включенные в Федеральный реестр [10]. При этом использовались тест-объекты *Escherichia coli* и *Daphnia magna* из соответствующих методик: ПНД Ф Т 16.1:2.3:3.8-04; ПНД Ф Т 14.1:2.3:4.11-04 и ФР.1.39.2007.03222, ПНД Ф Т 14.1:2.4.12-06 [8, 9].

На следующем этапе были отобраны виды грибов, обладающие не только полифенолоксидазной активностью, но и распространенные в культуре по причине перспективности в биотехнологии [5, 15]. Вешенка *Pleurotus ostreatus* – лидер среди культивируемых съедобных грибов, в мире накапливается огромное количество мицелия на органическом субстрате – отходах ее производства. Трутовик лакированный *Ganoderma lucidum* – мировой лидер среди лекарственных грибов, траметес разноцветный *Trametes versicolor* культивируют в качестве продуцента биологически активных веществ, на основе которых создан препарат – трамелан [14, 15]. Из множества штаммов этих видов в результате длительного скрининга отобраны культуры с максимальной ферментативной активностью, которые и стали объектами исследований.

Культуры выращивали на лигноцеллюлозных субстратах, а после полного обрас- тания вносили мицелиально-субстратный комплекс в образцы испытуемых почв из расчета 20 г/кг почвы. Далее образцы вы- держивали в модельных условиях в течение 1,5 лет, причем каждые полгода проводили оценку интегральной токсичности [10].

Показатель интегральной токсичности, по которому можно судить о степени нару- шенности почвы получали путем биотести- рования образцов. Это быстрый воспроиз- водимый способ, не требующий химическо- го анализа, но дающий представление об опасности таких почв [1].

Для подтверждения нашего предполо-

Рис. 2. Содержание 2,4 дихлорфеноксиуксусной кислоты в модельных субстратах (мг/кг) под воздействием ферментов мицелия после 12 месяцев культивирования

Влияние отходов грибного производства на содержание гумуса в почве, %

Вариант опыта	Содержание гумуса			
	Исходное значение	Первый год	Второй год	Третий год
Контроль (без удобрений)	2,60	2,60	2,59	2,58
Внесение отходов грибного производства 4 т/га	2,62	2,71	2,73	2,70
Внесение отходов грибного производства 5 т/га	2,59	2,70	2,72	2,69
Внесение отходов грибного производства 6 т/га	2,61	2,72	2,75	2,73
НСР ₀₅ , ед.	0,06	0,03	0,05	0,04

жения о том, что причиной снижения интегральной токсичности служит именно деструкция галогенизированных полифенолов ферментами мицелия параллельно был проведен модельный опыт. С использованием маркерного соединения (2,4 дихлорфеноксиуксусная кислота) изучена динамика содержания этого вещества в модельных субстратах под воздействием ферментов мицелия. Это вещество применяется в качестве гербицида. Для этого вносили в стерильные питательные субстраты грибов 2,4 Д в количестве 10 мг/кг сухого субстрата в расчете на действующее вещество. Затем ежемесячно, по мере развития мицелия, отмечали динамику содержания модельного токсиканта в субстрате. Контроль представлял собой стерильный субстрат, в который не вносили культуру гриба, но добавили аналогичную концентрацию модельного соединения.

С использованием отходов грибного производства ООО «Ботаник», расположенного в р. п. Лунино Пензенской области, которые представляют собой соломенную резку, частично ферментированную мицелием гриба вешенки, был проведен полевой опыт по следующей схеме:

1. Без удобрений (контроль);
2. Отход грибного производства 4 т/га (эквивалентный 12 т/га навоза по углероду);
3. Отход грибного производства 5 т/га (эквивалентный 15 т/га навоза по углероду);

4. Отход грибного производства 6 т/га (эквивалентный 18 т/га навоза по углероду);

Площадь делянки 5 м², повторность опыта четырехкратная, варианты в опыте размещены методом рендомизированных повторений [4]. На делянках выращивалась яровая пшеница «Тулайковская 10».

Почва в районе опыта серая лесная суглинистая, содержание гумуса не превышает 2,6 %, что соответствует характеристикам почв такого типа [11].

Результаты

Хроматографическое исследование отобранных образцов почв выявило присутствие галогенизированных полихлорфенолов во всех изученных образцах почв, но в разных количествах. Максимальная концентрация обнаружена в образце почвы, отобранной близ ст. Леонидовка. Этот же образец содержал повышенную концентрацию мышьяка 4,5 мг/кг при ПДК в почве до 2 мг/кг (рис.1).

Такое состояние объясняется тем, что в этом районе начиная с 1950 годов, производилось уничтожение трофейного химического оружия путем его химической дезактивации с применением хлорсодержащих агентов (отсюда галогенизация). Сами же фенолы широко распространены в лесной почве и являются результатом жизнедеятельности растений. По содержанию других поллютантов лидировал образец с золоотвала ТЭЦ (рис. 1).

Рис. 3. Снижение интегральной токсичности образцов почв при внесении мицелиально-субстратных комплексов грибов

Влияние отходов грибного производства на урожайность яровой пшеницы
«Тулайковская 10»

Вариант опыта	Урожайность, т/га	Отклонение от контроля	
		т/га	%
Без удобрений (контроль)	2,34	-	-
Внесение отходов грибного производства 4 т/га	2,59	0,25	10,7
Внесение отходов грибного производства 5 т/га	2,87	0,53	22,6
Внесение отходов грибного производства 6 т/га	3,03	0,69	29,5
НСР ₀₅ , т/га	0,16	-	-

Все разнообразие поллютантов определило токсичность – интегральный показатель степени нарушенности почвы. Полученные результаты, представленные в таблице 1, свидетельствуют, что вытяжки из всех почвенных образцов, кроме контроля, оказывают острое токсическое действие на тест-объекты.

С помощью длительного культивирования мицелия отобранных для эксперимента штаммов ксилотрофных базидиомицетов на субстратах с использованием маркерного соединения (2,4 дихлорфеноксиуксусной кислоты) установлено, что все штаммы достоверно снижают содержание маркерного соединения в субстрате. Причем наибольшую активность проявил штамм траметеса разноцветного (*T. versicolor*) (рис. 2). Это коррелирует с обнаруженной у данного штамма наиболее выраженной, чем у других изученных культур, полифенолоксидазной активностью [5].

Нами установлено постепенное снижение интегральной токсичности образцов почв при внесении в них мицелиально-субстратных комплексов грибов при помощи тест-объекта *Escherichia coli*. Отмечено снижение токсичности под действием всех изученных культур, однако наибольшую активность в плане ремедиации вновь проявил штамм траметеса разноцветного (*T. versicolor*) (рис. 3).

Учитывая большие объемы отработанного субстрата вешенки, образующиеся в грибоводстве, следует отметить, что используемый штамм (*P. ostreatus*) можно рассматривать в качестве биоремедианта, так как отмечено достоверное снижение токсичности, хотя и менее интенсивное по сравнению с другими исследуемыми видами ксилотрофных базидиомицетов (рис. 3).

В состав мицелиально-субстратного комплекса, помимо ферментативно активного и сорбирующего поллютанты мицелия, входит непосредственно, масса соломы, также содержащая питательные компоненты и способная улучшить структуру почвы и повышать ее плодородие. Так как в соломе содержится около 95 % органиче-

ского вещества, ценного для повышения плодородия, и с пятью тоннами соломы возвращается 20-25 кг азота, 5-7 кг фосфора, 60- 90 кг калия [11].

Изучая динамику содержания гумуса, в экспериментальные образцы почвы в качестве биоремедианта внесли мицелиально-субстратный комплекс – отход после выращивания вешенки устричной. Использование данного вида объясняется тем, что в практическом смысле воспроизведение такого приема ремедиации в естественных условиях могут обеспечить только объемы отходов гриба, который широко культивируется в промышленных условиях.

Результаты трехлетнего полевого опыта показывают, что содержание гумуса в почвах без внесения удобрений, существенно не изменяясь, имеет тенденцию к снижению, тогда как использование отходов грибоводства в качестве удобрений позволяет поддерживать и несколько увеличивать на 0,08-0,14 % содержание гумуса в почве (табл. 2).

Внесение удобрения в виде отхода грибного производства способствовало достоверному повышению урожайности яровой пшеницы (табл. 3). Максимальная урожайность наблюдалась в варианте с нормой 6 т/га, где она составила 3,03 т/га, что выше, чем на контроле, на 0,69 т/га или 29,5 %.

Заключение

Мицелиально-субстратные органические комплексы – отходы производства грибов ксилотрофов – при внесении их в почвы, характеризующиеся повышенной интегральной токсичностью, достоверно снижают данные показатели. В качестве биоремедианта почв, загрязненных полифенольными соединениями можно рекомендовать отходы культивирования вешенки устричной *Pleurotus ostreatus*.

Отходы производства лекарственных грибов траметеса разноцветного *Trametes versicolor* и трутовика лакированного *Ganoderma lucidum* также могут быть перспективными в плане биоремедиации при наличии такого производства и достаточного количества образующихся отходов.

Кроме того использование органических отходов грибного производства позволяет улучшить структуру почвы, позитивно влияя на содержание гумуса в её пахотном слое. Установлено достоверное повышение урожайности яровой пшеницы «Тулайковская 10» при внесении отходов грибопродукта в качестве удобрений. Наибольший эффект получен на варианте с нормой

внесения отходов 6 т/га.

Таким образом, использование отходов грибного производства обеспечивает как природоохранный эффект в плане биоремедиации загрязненных почв сельскохозяйственного назначения, так и агрономический – в плане поддержания почвенного плодородия и повышения урожайности сельскохозяйственных культур.

Литература

1. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: учебное пособие для студ. высш. учеб. заведений / О. П. Мелехова, Е. И. Сарапульцева, Т. И. Евсеева [и др.] – 3-е изд. – Москва: Академия, 2010. – 288 с.
2. ГОСТ 28168-89. Почвы. Отбор проб. [Электронный ресурс] URL: <http://docs.cntd.ru/document/gost-28168-89> (дата обращения 26.09.19)
3. Домрачева, Л. И. Использование организмов и биосистем в ремедиации территорий / Л. И. Домрачева // Теоретическая и прикладная экология. – 2009 – № 4. – С. 4–16.
4. Доспехов, Б. А. Методика полевого опыта / Б. А. Доспехов. – Москва: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
5. Даниляк, Н. И. Ферментные системы высших базидиомецетов / Н. И. Даниляк, В. Д. Семичаевский, Л. Г. Дудченко. – Киев: Наукова думка, 1989. – 279 с.
6. Качмазов, Д. Г. Биоремедиация загрязненных почв / Д. Г. Качмазов // Международный научно-исследовательский журнал. – 2017 – № 12 (66), – 3. – С. 107–109. [Электронный ресурс] URL: <https://research-journal.org/agriculture> (дата обращения 26.09.19)
7. Куликова, Н. А. Использование базидиальных грибов в технологиях переработки и утилизации техногенных отходов: фундаментальные и прикладные аспекты (обзор) / Н. А. Куликова, О. И. Кляйн, Е. В. Степанова, И. В. Королева // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47. № 6. – С. 619–634.
8. ПНД Ф Т 16.1:2.3:3.8-04. Количественный химический анализ почв. [Электронный ресурс] URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200082146> (дата обращения 26.09.19)
9. ПНД Ф Т 14.1:2.3:4.11-04. Токсикологические методы анализа. [Электронный ресурс] URL: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293767/4293767837.htm> (дата обращения 26.09.19)
10. ФР.1.39.2007.03222, ПНД Ф Т 14.1:2.4.12-06. Биологические методы контроля. [Электронный ресурс] URL: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293842/4293842234.htm> (дата обращения 26.09.19)
11. Швецова, Л. К. Гумусное состояние и азотный фонд основных типов почв при длительном применении удобрений: автореферат диссертации доктора биологических наук / Л. К. Швецова. – Москва, 1988 – 48 с.
12. Янкевич, М. И. Биоремедиация почв: вчера, сегодня, завтра / М. И. Янкевич, В. В. Хадеева, В. П. Мурыгина // Биосфера: междисциплинарный научный и прикладной журнал. – 2015. – № 7. – С. 199–208.
13. Янин, Е. П. Ремедиация территорий, загрязненных химическими элементами: общие подходы, правовые аспекты, основные способы (зарубежный опыт) / Е. П. Янин // Проблемы окружающей среды и природных ресурсов. – 2014. – № 3. – С. 3–105.
14. Stalpers, J. A. Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture // Bearn: Stul. Mycol. – 1978. – № 16. – 248 p.
15. Suki, C. Croan Conversion of conifer wastes into edible and medicinal mushrooms / C. Croan Suki // Forest products journal. – 2004. – V. 54. – № 2. – P. 68-76.
16. Muller, H. W. Effect of phenolic compounds on cellulose degradation by same white-rot basidiomycetes / H. W. Muller, Trosch., K. D. Kulbe // FEMS Microbiol. Letters. – 1988. – V. 49. – № 1. – P. 87-93.

STUDIES OF THE POSSIBILITY OF USING MUSHROOM WASTE IN BIOREMEDIATION OF AGRICULTURAL SOILS

G. V. Ilyina, Doctor of Biological Sciences, professor; S. A. Sashenkova, Candidate of Biological Sciences, assistant-professor; D. Yu. Ilyin, Candidate of Biological Sciences, assistant-professor

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Penza State Agrarian University», Russia, t. (8412) 62-81-51, e-mail: g-ilyina@yandex.ru

The paper considers the possibilities of using organic substrates after cultivation mycelial cultures of xylophilic basidiomycetes for bioremediation of soils contaminated with polyphenolic compounds and heavy metals. A 0.9-3-fold decrease in the integral soil toxicity indicator under the influence of mycelial-substrate complexes (mushroom cultivation and biotechnology waste) was shown. The dynamics of the humus content in soil samples as a result of introducing oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*) as a fertilizer was studied. It was found that the content of humus in the experimental variants increased by 0.08-0.14 %. At the same time, the use of mushroom cultivation waste as fertilizers made it possible to increase the yield of spring wheat «Tulaykovskaya 10» by 10.7-29.5 %.

Key words: bioremediation of soils, xylophilic basidiomycetes, mycelial cultures, mushroom waste, integral toxicity.

References:

1. Biological environmental control: bioindication and bioassay: a training manual for students of institutes of higher education / O. P. Melekhova, E. I. Sarapultseva, T. I. Evseeva [et al.] - 3rd ed. - Moscow: Academia, 2010. - 288 p.
2. GOST 28168-89. Soils. Sample selection. [Electronic resource] URL: <http://docs.cntd.ru/document/gost-28168-89> (accessed September 26, 19)
3. Domracheva, L. I. The use of organisms and biosystems in the remediation of territories / L. I. Domracheva // Theoretical and Applied Ecology. - 2009 - No. 4. - p. 4-16.
4. Dospekhov, B. A. Methods of field experience / B. A. Dospekhov. - Moscow: Agropromizdat, 1985. - 351 p.
5. Danilyak, N. I. Enzymatic systems of higher basidiomycetes / N. I. Danilyak, V. D. Semichaevsky, L. G. Dudchenko. - Kiev: Naukova Dumka, 1989. - 279 p.
6. Kachmazov, D. G. Bioremediation of contaminated soils / D. G. Kachmazov // International Research Journal. - 2017 - No. 12 (66), - 3. - p. 107-109. [Electronic resource] URL: <https://research-journal.org/agriculture> (accessed September 26, 19)
7. Kulikova, N. A. The use of basidiomycetes in technologies for processing and utilization of technogenic wastes: fundamental and applied aspects (review) / N. A. Kulikova, O. I. Klein, E. V. Stepanova, I. V. Korolyova // Applied Biochemistry and Microbiology. - 2011. - V. 47. No. 6. - p. 619-634.
8. PND F T 16.1: 2.3: 3.8-04. Quantitative chemical analysis of soils. [Electronic resource] URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200082146> (accessed September 26, 19)
9. PND F T 14.1: 2: 3: 4.11-04. Toxicological analysis methods. [Electronic resource] URL: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293767/4293767837.htm> (accessed September 26, 19)
10. FR.1.39.2007.03222, PND F T 14.1: 2: 4.12-06. Biological control methods. [Electronic resource] URL: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293842/4293842234.htm> (accessed September 26, 19)
11. Shvetsova, L. K. Humus state and nitrogen fund of the main types of soils with prolonged use of fertilizers: abstract of the dissertation of the doctor of biological sciences / L. K. Shvetsova - Moscow, 1988 - 48 p.
12. Yankevich, M. I. Soil bioremediation: yesterday, today, tomorrow / M. I. Yankevich, V. V. Kha-deeva, V. P. Murygina // Biosphere: an interdisciplinary scientific and applied journal. - 2015. - No. 7. - p. 199-208.
13. Yanin, E. P. Remediation of territories contaminated with chemical elements: general approaches, legal aspects, basic methods (foreign experience) / E. P. Yanin // Problemy okruzhayushchej sredy i prirodnih resursov. - 2014. - No. 3. - P. 3-105.
14. Stalpers, J. A. Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture // Bearn: Stul. Mycol. - 1978. - № 16. - 248 p.
15. Suki, C. Croan Conversion of conifer wastes into edible and medicinal mushrooms / C. Croan Suki // Forest products journal. - 2004. - V. 54. - № 2. - P. 68-76.
16. Muller, H. W. Effect of phenolic compounds on cellulose degradation by same white-rot basidiomycetes / H. W. Muller, Trosch., K. D. Kulbe // FEMS Microbiol. Letters. - 1988. - V. 49. - № 1. - P. 87-93.