

## Selezione di funghi terrestri in presenza di NaCl

MARIA LUISA BRUZZONE (\*) e OLGA VALLOCCHIA (\*\*)

*Laboratori di Chimica Biologica*

**Riassunto.** — Nel presente lavoro si è studiata la tolleranza ad alte concentrazioni di NaCl di specie fungine isolate da terra di giardino. Nel campione esaminato si è visto che gli organismi dotati di una maggiore plasticità nei confronti dell'aumentata concentrazione salina ambientale sono i penicilli e gli aspergilli tra cui alcuni ceppi sono in grado di crescere anche a concentrazioni pari o superiori al 20 % di NaCl (p/v).

**Summary** (*Selection of terrestrial fungi in the presence of NaCl*). — In the present work we studied the sodium chloride tolerance of terrestrial fungi selected from a sample of soil.

The penicillia and aspergilli were found notably the most resistant to germinate in the presence of 20 % or more of NaCl.

### INTRODUZIONE

Molti studi sono stati pubblicati sulla alofilia di funghi che vivono in acque marine o salmastre (JOHNSON & SPARROW, 1961). Al contrario, pochi sono gli studi relativi alla tolleranza ad alte concentrazioni saline, da parte di funghi terrestri. I lavori precedenti riguardano, in ogni caso, il diverso comportamento ed adattamento ad alte concentrazioni saline di organismi scelti opportunamente tra i differenti gruppi tassonomici (TRESNER & HAYES, 1971). Allo scopo si è sempre fatto capo a collezioni di laboratorio. Si è potuto così stabilire che, incrementando la salinità di un ambiente, i Basidiomiceti sono meno resistenti degli Ascomiceti, ma le loro forme imperfette (Deuteromiceti) sembrano essere dotate di una maggiore plasticità nei confronti delle mutate condizioni ambientali (alte concentrazioni di NaCl).

Nel presente lavoro si è voluto studiare la capacità di adattamento al NaCl di funghi terrestri, isolati da campioni di terra.

(\*) Borsista dei Laboratori di Chimica Biologica.

(\*\*) Ospite dei Laboratori di Chimica Biologica.

## MATERIALI E METODI

I microorganismi studiati sono stati selezionati da terra di giardino, utilizzando terreni con alte concentrazioni di NaCl.

Come terreno base per le prove è stato utilizzato il Czapek Dox (CLUTTERBUCK *et al.*, 1932), sia solido che liquido. Ai terreni di coltura è stato aggiunto NaCl in concentrazioni crescenti (10, 15, 20, 25 % p/v).

Le piastre sono state incubate a 24°C ed osservate in tempi diversi (5, 10, 20 giorni).

La classificazione dei ceppi è stata fatta, secondo i metodi classici (RAPER & THOM, 1949; RAPER & FENNEL, 1965), utilizzando i seguenti terreni: Czapek's-agar, agar malto e agar fieno.

Per l'osservazione al microscopio ottico si è usato il metodo di colorazione con il *blue cotton* (HARRIGAN & McCANCE, 1966).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Partendo dallo stesso terreno di campionamento sono stati isolati, secondo i metodi sopra descritti, 19 ceppi così distinti: *Aspergillus* 9, *Penicillium* 9 e *Cladosporium* 1.

Nel genere *Penicillium*, la maggior parte delle specie in grado di crescere su terreni ad alta concentrazione salina appartenevano alla sezione *Asimmetrica-lanata* (Tab. 1). Si è notato tuttavia che, nell'ambito della stessa sezione, organismi appartenenti alla stessa serie (è il caso del *Penicillium camemberti* Thom) potevano presentare una diversa tolleranza al NaCl. In un caso, la crescita veniva inibita da una concentrazione di NaCl superiore al 15 % (p/v), nell'altro la tolleranza era incrementata, potendo il ceppo

TABELLA I

Tolleranza al cloruro di sodio per le diverse sezioni del genere *Penicillium*

SEZIONE	Serie	N. di specie	NaCl %			
			10	15	20	25
<i>Monoverticillata</i> . .	<i>P. frequentans</i>	1	—	—	—	1
<i>Asimmetrica lanata</i> .	<i>P. commune</i>	4	—	—	4	—
	<i>P. camemberti</i>	2	—	1	1	—
<i>Vellutina</i> . . . . .	<i>P. brevi-compactum</i>	1	—	—	1	—
<i>Biverticillata</i> . . . .	<i>P. purpurogenum</i>	1	1	—	—	—

crescere anche su terreni contenenti il 20 % di NaCl (p/v). Si è, inoltre, osservato che, mentre nell'ambito della sezione *Asimmetrica-lanata*, la quale, nel campione esaminato, raggruppava il maggior numero di specie, c'era una certa uniformità di comportamento, nelle altre tre sezioni, rappresentate ciascuna da un solo organismo, si registrava un comportamento piuttosto eterogeneo. Il *Penicillium frequentans* Westling, ad esempio, appartenente alla sezione *Monoverticillata*, era, tra i *Penicillium*, l'unico organismo in grado di vivere e sporificare a concentrazioni pari al 25 % di NaCl (p/v). In ogni caso i risultati ottenuti si sono dimostrati in accordo con i dati precedenti di TRESNER & HAYES (1971) ottenuti, peraltro, facendo una indagine su ceppi di collezione. I loro risultati, infatti, dimostravano che proprio alla sezione *Monoverticillata* appartenevano i *Penicillium* più resistenti alle alte concentrazioni di NaCl (25 % p/v).

Per ciò che riguarda il genere *Aspergillus* (Tab. 2) anche qui, come nel caso dei *Penicillium*, nell'ambito di uno stesso gruppo si è notata una diversa tolleranza alle alte concentrazioni saline. È il caso del gruppo *Aspergillus cervinus* Massee e del gruppo *Aspergillus glaucus* Link. Anche qui, i dati trovati si sono dimostrati in accordo con quelli riportati da TRESNER & HAYES (1971), con la sola eccezione del gruppo *Aspergillus ustus* Bain, per il quale si è riscontrata una maggiore tolleranza alle alte concentrazioni di sale. In ogni caso, le eventuali difformità nei risultati potrebbero essere ascritte alla diversa impostazione dei due lavori. In questo lavoro, infatti, si è operata una selezione naturale per la tolleranza ad alte concentrazioni saline, mentre nello studio precedente di TRESNER & HAYES (1971) si è studiato il comportamento dei diversi gruppi tassonomici a diverse concentrazioni di NaCl.

TABELLA 2

Tolleranza al cloruro di sodio per i diversi gruppi del genere *Aspergillus*

GRUPPO	N. di specie	NaCl %			
		10	15	20	25
<i>A. cervinus</i> . . . . .	2	—	1	1	—
<i>A. glaucus</i> . . . . .	2	—	1	1	—
<i>A. niger</i> . . . . .	1	—	1	—	—
<i>A. ustus</i> . . . . .	1	—	—	—	1
<i>A. versicolor</i> . . . . .	2	—	1	1	—
<i>A. wentii</i> . . . . .	1	—	1	—	—

Dai dati sopra riportati si è dimostrato che, negli isolamenti effettuati, le specie capaci di sopportare alte concentrazioni di NaCl, per lo più, appartenevano ai generi *Penicillium* ed *Aspergillus*; un solo *Cladosporium* infatti è stato trovato. Il limite di tolleranza di quest'ultimo era del 15 % di NaCl (p/v).

I terreni contenenti alte concentrazioni di NaCl producevano spesso alterazioni fisiologiche e conseguentemente morfologiche sui microorganismi esaminati. Si è osservato, ad esempio, che, in tutti i ceppi esaminati, l'aumento della concentrazione salina produceva un rallentamento della velocità di crescita. La sporificazione in genere non subiva modificazioni; tuttavia, spesso, si è registrato un cambiamento del colore dei conidi. Collateralmente all'aumento del sale nel terreno di coltura (vedi Materiali e Metodi), si è notata all'esame macroscopico una diminuzione graduale nella produzione di essudati e pigmenti esogeni. Si potrebbe pensare che l'aumento della pressione osmotica impedisca o diminuisca qualsiasi produzione di materiale esogeno, a salvaguardia del mantenimento delle funzioni vitali dell'organismo stesso. L'ambiente particolare creato dall'incremento del NaCl nel terreno in due soli casi (*A. glaucus* e *P. frequentans*) ha indotto la formazione di forme sessuate. Per il *P. frequentans* questa, addirittura, sembra l'unica forma di sopravvivenza a concentrazioni del 25 % di NaCl (p/v), non essendo l'organismo più in grado di produrre ife conidiofore. Si potrebbe quindi postulare l'uso di terreni ad alta concentrazione salina per individuare sperimentalmente un eventuale ciclo sessuale nei funghi. È noto del resto l'uso di terreni particolari per indurre la comparsa, in laboratorio, di forme sessuate (PONTECORVO, 1953; LINDEGREN, 1953).

Si ringrazia il Prof. Antonio Tonolo e la Dott.ssa Laura Volterra per gli utili suggerimenti prestati nel corso di questo lavoro. Si ringrazia inoltre il Sig. Giuseppe Ignazzitto per la collaborazione tecnica.

Ricevuto il 1° febbraio, 1974.

Accettato il 12 ottobre, 1974.

#### BIBLIOGRAFIA

- CLUTTERBUCK, P. W., R. LOVELL & H. RAISTRICK, 1932. *Biochem. J.*, **26**, 1907.  
 HARRICAN, W. F. & M. E. McCANCE, 1966. *Laboratory Methods in Microbiology*, Academic Press, London.  
 JOHNSON, T. W., Jr. & F. K. SPARROW, Jr., 1961. *Fungi in oceans and estuaries*, Hafner Publishing Co., Darien, Conn.  
 LINDEGREN, C. C., 1953. *J. Genet.*, **51**, 625.  
 PONTECORVO, G., 1953. *Advan. Genet.*, **5**, 142.  
 RAPER, K. B., & D. I. FENNEL, 1965. *The Genus Aspergillus*, Williams Wilkins Co., Baltimore.  
 RAPER, K. B. & C. THOM, 1949. *A Manual of the Penicillia*, Williams Wilkins Co., Baltimore.  
 TRESNER, H. D. & J. A. HAYES, 1971. *Appl. Microbiol.*, **22**, 210.

## Azione inibitoria svolta dalle radiazioni visibili sulla carie sperimentale del ratto

GIANFRANCO PROIETTI (\*), CLAUDIO BOSI, MARIA CHIARA MURA (\*\*)  
e FRANCO TAGGI (\*\*\*)

*Laboratori di Elettronica e Laboratori di Chimica*

**Riassunto.** — Gli AA., riprendendo gli studi di Sognaess e Stern sull'effetto del trattamento con laser delle superfici smaltate dei denti, hanno usato come sorgente dei « LED » allo scopo di eliminare gli effetti nocivi collaterali, tipici di tali sorgenti. Tali componenti hanno permesso di condurre per la prima volta esperimenti *in vivo*, mostrandosi estremamente efficaci nella prevenzione della carie indotta nel ratto.

**Summary** (*Effects of the visible radiations on the preventing experimentally induced caries in the rat*). — Many preceding works have demonstrated that the treatment *in vitro* with laser of the teeth' enameled surfaces lowers their ionic permeability. The AA. have continued these works to verify a likely cariostatic effect of these treatments; to this purpose another radiant source, the L.E.D. (Light Emitting Diode) has been used. The use of this device has permitted for the first time to verify *in vivo* the cariostatic effect of this treatment.

For this purpose the teeth' enameled surfaces of many rats, that have been submitted to cariogenic diet have been radiated. The statistic test of the experimental data shows a noticeable effect versus the experimental induced caries.

### INTRODUZIONE

Anche l'odontoiatria si è interessata allo studio delle possibili applicazioni del laser (PECK & PECK, 1967; STERN, 1971), in particolare come mezzo per la prevenzione della carie (STERN, 1970).

STERN *et al.* (1965) osservarono che se la superficie dello smalto veniva trattata *in vitro* con un laser al rubino, acquistava una maggiore resi-

---

(\*) Assistente per la odontoiatria e la stomatologia presso l'ospedale regionale specializzato « G. Eastman » - Roma.

(\*\*) Borsista dei Laboratori di Elettronica.

(\*\*\*) Borsista dei Laboratori di Chimica.

stenza all'azione degli agenti demineralizzanti. Proseguendo nell'indagine, osservarono, mediante un particolare artificio tecnico, che anche *in vivo* le radiazioni del laser avevano la capacità di rendere la superficie smaltea del dente più resistente alla carie (STERN & SOGNAES, 1972).

I laser usati avevano tuttavia dei notevoli effetti collaterali: l'irradiazione con quello a rubino provocava infatti, per effetto dell'azione termica, degli ampi crateri irregolari sulla superficie smaltea (STERN & SOGNAES, 1965; GORDON, 1966). Fu usato perciò nelle successive esperienze un laser a CO<sub>2</sub>, che, a parità di densità di energia, produceva solo dei microscopici pori.

I metodi sperimentali usati da tali AA. richiedevano inoltre apparecchiature ingombranti e delicate, che rendevano problematica, se non addirittura impossibile l'irradiazione smaltea degli animali da esperimento, e che non lasciavano intravedere la possibilità di una facile e sicura applicazione clinica futura.

La moderna tecnologia dei semiconduttori ha messo a disposizione da qualche tempo delle sorgenti luminose, i LED (diodi emettitori di luce), che, pur non fornendo luce coerente, presentano tuttavia caratteristiche piuttosto interessanti, quali la monocromaticità, discreti livelli energetici di emissione, facilità di modulazione, estrema compattezza e bassi costi.

Con queste sorgenti, e precisamente con LED emittenti nell'infrarosso, sono state eseguite sperimentazioni *in vitro* e sono state osservate significative diminuzioni dell'assorbimento dello ione F<sup>-</sup> da parte della superficie smaltea di denti umani. Questo fatto lascia ragionevolmente supporre che la condizione di luce coerente non sia essenziale (PROIETTI & BOSI, 1974).

Lo stesso risultato si ottiene, anche dal punto di vista quantitativo, se si usano LED che emettono nel rosso anziché nell'infrarosso, fatto questo che conferma che tale effetto è legato solo alla soglia energetica. La diminuita permeabilità nei confronti dello ione F<sup>-</sup> si può probabilmente attribuire al fatto che la struttura cristallina dello smalto dentario, sotto l'azione della radiazione ottica incidente, si riorganizza in una configurazione più stabile, che renderebbe la superficie del dente più refrattaria all'azione di eventuali agenti cariogeni.

Per verificare l'attendibilità di tale ipotesi, si è deciso di passare ad una serie di esperienze *in vivo* su ratti sottoposti a dieta cariogena, i cui molari erano stati preventivamente irradiati con LED emittenti nel rosso.

#### MATERIALI E METODI

Allo scopo di controllare la variabilità biologica dei ratti, si è deciso di programmare l'esperienza secondo uno schema a blocchi randomizzati (LISON, 1961).

Il piano dell'esperimento prevede un totale di trentadue ratti maschi di ceppo Wistar, selezionati in base all'età da stabulari e nidiate diversi, che sono stati raggruppati in modo da ottenere blocchi omogenei. A tale scopo i ratti sono stati scelti in quattro stabulari situati presso diversi centri di ricerca, che provvedono all'allevamento, da numerose generazioni, di propri ceppi.

Nell'ambito di ogni nidiate si è provveduto all'estrazione casuale e alla marcatura di quattro soggetti da sottoporre ai vari trattamenti, assegnati anche questi in base a randomizzazione (LINDER, 1953).

Lo schema completo delle suddivisioni in gruppi appare in Tab. 1, dalla quale risulta anche che all'interno di ogni stabulario esiste una replicazione completa dei trattamenti.

TABELLA 1

Quadro dei risultati sperimentali: è riportato il numero di centri carioidi, calcolati secondo il metodo di Keyes

	STABULARI							
	A		B		C		D	
	Nidiate		Nidiate		Nidiate		Nidiate	
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>
1 - Gruppo di controllo a dieta normale . . . . .	2	1	0	1	0	2	0	0
2 - Gruppo di controllo a dieta cariogena . . . . .	8	6	10	9	11	10	9	10
3 - Gruppo irradiato 300 s. + dieta cariogena . . . . .	2	3	2	1	1	1	3	4
4 - Gruppo irradiato 600 s. + dieta cariogena . . . . .	2	2	1	3	0	2	2	1

I ratti appartenenti al Gruppo 1 (controllo a dieta normale), sono stati alimentati *ad libitum* per tutta la durata dell'esperienza con dieta normale di stabulario (pellets); quelli del Gruppo 2 (controllo a dieta cariogena), sono stati invece alimentati con dieta cariogena di Keyes. I ratti appartenenti ai Gruppi 3 e 4, previa anestesia con Nembutal, sono stati sottoposti ad irraggiamento delle arcate mascellari *una tantum* con luce rossa, rispettivamente per trecento e seicento secondi, e quindi posti anch'essi a dieta cariogena di Keyes, contemporaneamente ai soggetti del Gruppo 2.

A scopo precauzionale ogni ratto è stato custodito separatamente dagli altri in gabbia singola, in modo da conservare l'individualità delle varie flore batteriche buccali. Ogni gabbia è stata quindi etichettata in rapporto

agli stabulari d'origine ed al tipo di ~~trattamento~~, sia dietetico che fisico, cui è stato sottoposto il ratto.

La forma particolare della superficie da irradiare nel modo più uniforme possibile ed il piccolo spazio a disposizione per effettuare tale operazione, pongono dei limiti ben precisi all'elemento radiante. Dato che i LED attualmente in commercio non soddisfano nella loro forma standard queste esigenze, per questo esperimento si è dovuto progettare e realizzare un opportuno diffusore.

In un primo tempo si è adottata come sorgente radiante il LED MV 5080 della Monsanto, inserito in un diffusore realizzato in perspex, che si adattasse alle arcate mascellari del ratto (Fig. 1 e 2).

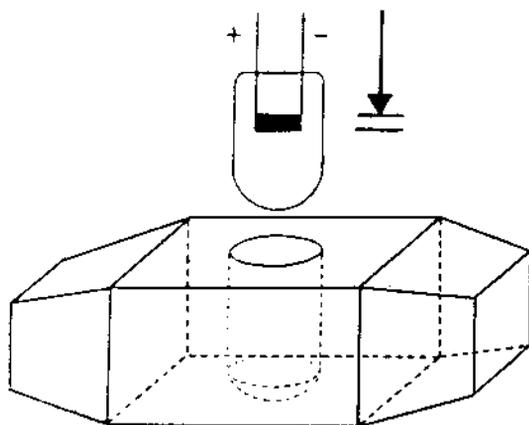


Fig. 1. — Schema del diffusore con l'elemento emittente.

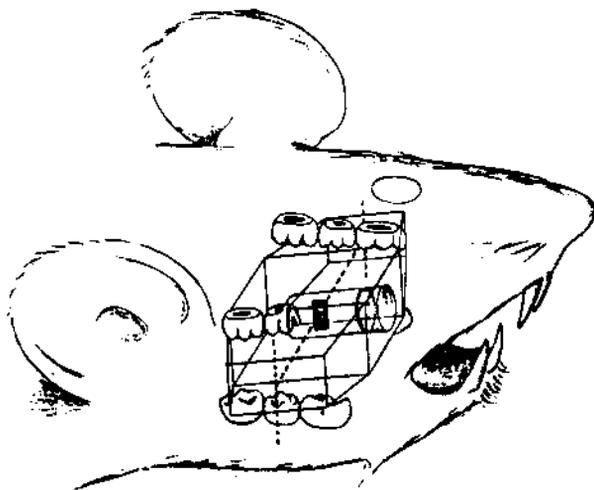


Fig. 2. — Schema di sistemazione del diffusore nella cavità orale del ratto.

Alcune misure hanno però mostrato che l'uniformità di illuminazione non raggiungeva livelli soddisfacenti, per cui è stato realizzato un nuovo complesso emettitore-diffusore molto più efficace, facendo uso questa volta dell'array di LED MV 5040, sempre della Monsanto. Le dimensioni geometriche di tale componente sono mostrate in Fig. 3, unitamente alle sue caratteristiche elettro-ottiche, mentre le Fig. 4 e 5 mostrano l'aspetto finale dell'elemento radiante.

Ogni diodo del complesso è alimentato da una corrente costante di 20 mA, ed in queste condizioni la potenza totale irradiata è di  $50/\mu\text{W}$ . Ogni diodo

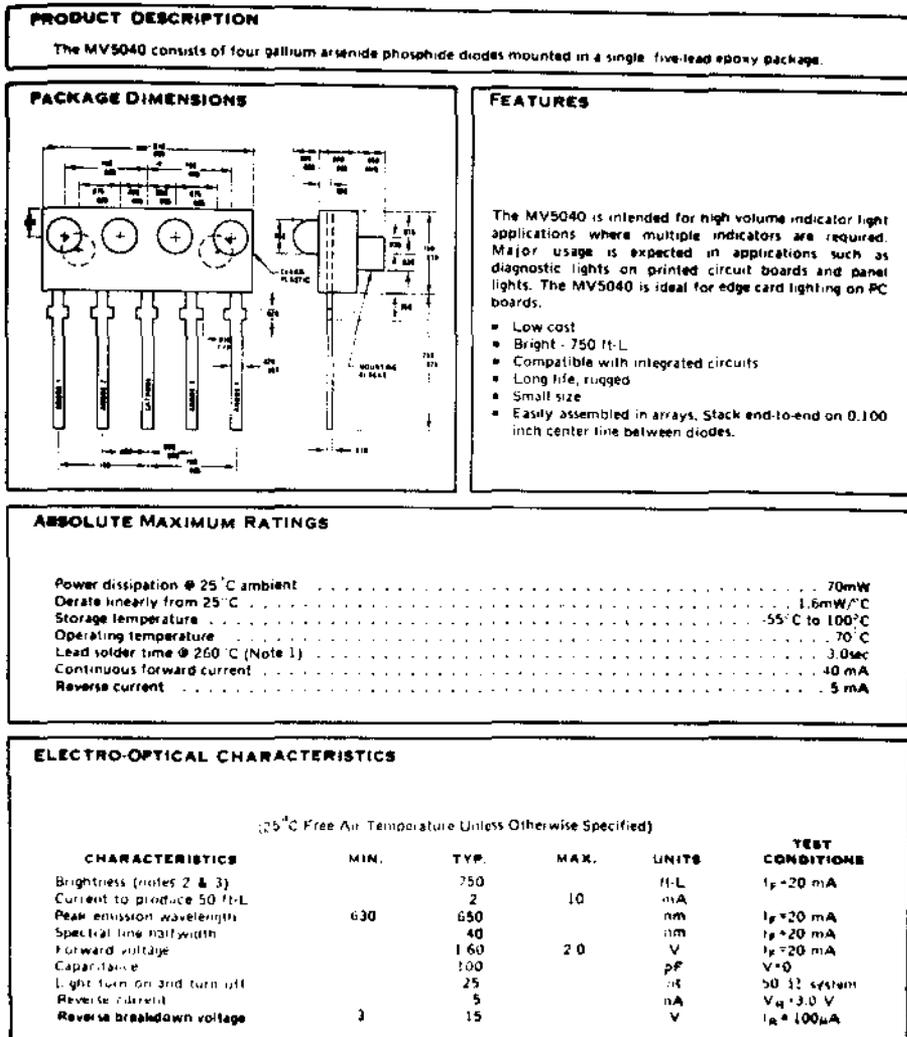


Fig. 3. — Caratteristiche meccaniche ed ottiche dell'array di diodi usato per l'emettitore.

forma uno *spot* di circa 2 mm di diametro sulla superficie irradiata, per cui, considerando le caratteristiche geometriche di emissione, si ottiene una densità di energia di circa 2,5 mJ·mm<sup>2</sup> e 5 mJ·mm<sup>2</sup>, rispettivamente per tempi di irraggiamento di 300 e 600 secondi.

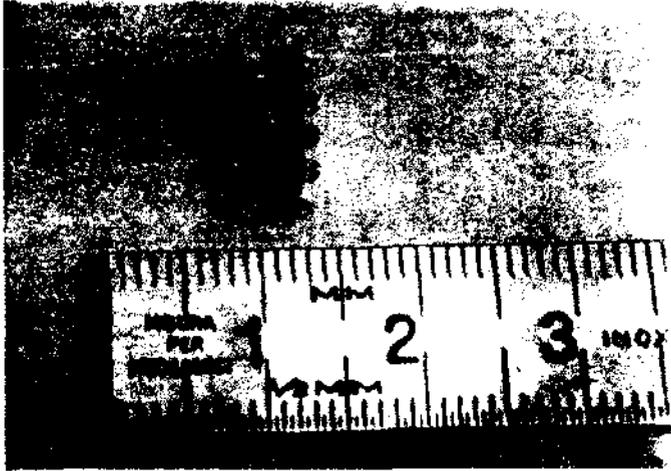


Fig. 4. — Vista di profilo del complesso emettitore-diffusore.

Dopo 34 giorni dall'inizio dell'esperimento i ratti, previa anestesia eterica mortale, sono stati decapitati, sono state prelevate le mascelle superiori ed inferiori, liberate dai tessuti molli e sezionate longitudinalmente.

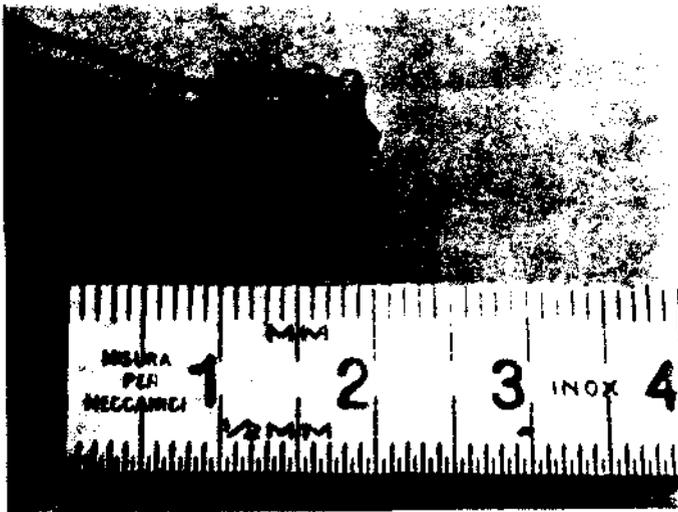


Fig. 5. — L'emettitore-diffusore con i collegamenti elettrici completi.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati della conta dei centri di carie, eseguita secondo il metodo di KEYES (1958), sono riportati in Tab. 1.

Da questa tabella si osserva che i ratti dei Gruppi 3 e 4 presentano sistematicamente un numero inferiore di processi cariosi rispetto a quelli del Gruppo 2, e che le zone cariose appaiono sempre nei solchi e mai nelle superfici, dove è avvenuto l'irraggiamento. Il controllo in microscopia ottica delle superfici smaltée irradiate, rivela che non esistono effetti collaterali che danno luogo ad alterazioni morfologiche visibili.

La natura dei dati raccolti non consente un'analisi classica dello schema di programmazione adottato, e quindi, per l'elaborazione di questi dati si è impiegata una tecnica non parametrica: l'analisi della varianza bivalente per ranghi di Friedman per campioni dipendenti (SIEGEL, 1966). I conteggi, convertiti in ranghi, sono riportati sotto forma matriciale in Tab. 2.

TABELLA 2

Tabella dei ranghi relativa ai conteggi osservati

NIDIALE	GRUPPI			
	1	2	3	4
A <sub>1</sub> . . . . .	2	4	2	2
A <sub>2</sub> . . . . .	1	4	3	2
B <sub>1</sub> . . . . .	1	4	3	2
B <sub>2</sub> . . . . .	1,5	4	1,5	3
C <sub>1</sub> . . . . .	1,5	4	3	1,5
C <sub>2</sub> . . . . .	2,5	4	1	2,5
D <sub>1</sub> . . . . .	1	4	3	2
D <sub>2</sub> . . . . .	1	4	3	2
R <sub>j</sub>	11,5	32	19,5	17

Il test utilizzato per decidere della presenza di differenze significative tra i gruppi, ovvero per misurare l'effetto sperimentale dei trattamenti, è in questo caso il  $\chi^2$  di Friedmann (che si distribuisce approssimativamente come il  $\chi^2$  a  $K - 1$  gradi di libertà), definito come:

$$\chi^2 = \frac{12}{NK(K+1)} \sum_{j=1}^k j R_j^2 - 3N(K+1)$$

dove  $K$  è il numero dei gruppi,  $N$  quello dei blocchi e  $R_j$  è la somma dei ranghi relativa al gruppo  $j$ -esimo.

Il test effettuato su tutti i gruppi rivela una differenza altamente significativa tra i quattro a confronto ( $\chi^2_{\text{oss.}} = 16,9$ ;  $P < 0,001$ ). Lo stesso test ripetuto con i dati relativi ai soli Gruppi 1 (controllo dieta normale), 3 (irradiati 300 s. + dieta di Keyes) e 4 (irradiati 600 s. + dieta di Keyes), non mostra differenze significative ( $\chi^2_{\text{oss.}} = 4,15$ ;  $P < 0,15$ ).

Questi risultati sembrano indicare, accanto alla reale cariogenicità della dieta di Keyes nei ratti utilizzati, un effetto cariainibitore del trattamento sperimentato. I dati clinico-sperimentali raccolti confermano per la prima volta *in vivo* che un agente fisico può determinare nello smalto una probabile modificazione di stato tale da renderlo più resistente all'attacco di un ambiente acido derivante dalla dieta cariogena impiegata.

Attualmente sono in corso ricerche per appurare, mediante analisi cristallografica, la natura di queste modificazioni eventuali, e per verificare se gli effetti cariainibitori sono permanenti.

Gli AA. desiderano ringraziare i signori Renzo Bastianelli, Spartaco Bedini, Atos Corradini, Quinto Di Luzio, Franco Gramenzi e Vincenzo Rizzottolo per la preziosa collaborazione.

Ricevuto il 10 aprile 1974.

Accettato il 6 maggio 1974.

#### BIBLIOGRAFIA

- GORDON, T. E. Jr., 1966. *J. Dent. Res.*, **45**, 372.  
 KEYES, P. H., 1958. *J. Dent. Res.*, **37**, 1077.  
 LINDER, A., 1953. *Planen und Auswerten von Versuchen*, Birkhäuser, Bâle, 1953.  
 LISON, L., 1961. *Statistica applicata alla biologia sperimentale*, Ambrosiana, Milano.  
 PECK, S. & H. PECK, 1967. *J. Prosth. Dent.*, **17**, 194.  
 PROIETTI, G. & C. BOSI, 1974. *Ann. Stomatol.*, **23**, 326.  
 SIEGEL, S., 1966. *Statistica non parametrica*, Ed. OS, Firenze.  
 STERN, R. H., 1970. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **168**, 642.  
 STERN, R. H., 1971. *Plenum Press*, New York.  
 STERN, R. H., R. F. SOGNAES & F. GOODMAN, 1965. *J. Amer. Dent. Ass.*, **73**, 838.  
 STERN, R. H. & R. F. SOGNAES, 1965. *J. Dent. Calif. Ass.*, **33**, 328.  
 STERN, R. H. & R. F. SOGNAES, 1972. *J. Amer. Dent. Ass.*, **85**, 1087.