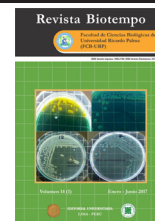




## Biotempo (Lima)



ORIGINAL ARTICLE/ ARTÍCULO ORIGINAL

### INFLUENCE OF THE VARIABLE MAGNETIC FIELD OF SINUSOIDAL WAVE OF (22 - 52) KHZ AND OF 100 MILLIGAUSS OF MAGNETIC INDUCTION ON THE GROWTH OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* USED LIKE PROBIOTIC IN FOODS

### INFLUENCIA DEL CAMPO MAGNÉTICO VARIABLE DE ONDA SINUSOIDAL DE (22 – 52) KHZ Y DE 100 MILIGAUSS DE INDUCCIÓN MAGNÉTICA, SOBRE EL CRECIMIENTO DE *LACTOBACILLUS PLANTARUM* UTILIZADO COMO PROBIÓTICO EN ALIMENTOS

Iván Ramírez Jiménez<sup>1</sup>; Juan Carlos Ramos Gorbeña<sup>1</sup> & Solange Tuñoque Félix<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Ricardo Palma – Facultad de Ciencias Biológicas – Laboratorio de Física Aplicada a la Biología, Lima, Perú.  
ivan.ramirezj@urp.pe

#### ABSTRACT

The cultures of *Lactobacillus plantarum* were exposed to alternating magnetic fields with synodal waveforms with frequencies of 22, 32, 42 and 52 KHz of 100 mG of magnetic induction. The microbiological test was used for counting in plates of mesophilic bacteria for 5 repetitions to then calculate the average Colony Forming Units (CFU·mL<sup>-1</sup>) and thus to estimate the influence exerted by the variable magnetic field of sinusoidal wave that were exposed in each test to the same intensity, different frequencies, and times of exposure. The results showed that it is possible to stimulate the growth of *L. plantarum* using magnetic fields in times of 180 and 270 seconds. The mean percentages of stimulation obtained in 80 microbiological tests gave values between 6 and 200%, but it was not the same with the exposure time of 90 seconds, and that in all the tests the results presented a marked inhibition of the growth of *L. plantarum*.

**Key words:** alternating magnetic fields – bacterial growth – *Lactobacillus plantarum*

#### RESUMEN

Los cultivos de *Lactobacillus plantarum* fueron expuestos a campos magnéticos alternos con formas de ondas sinodales con frecuencias de 22, 32, 42 y 52 KHz de 100 mG de inducción magnética. Se aplicó el ensayo microbiológico para el recuento en placas de bacterias mesófilas por 5 repeticiones, para luego calcular el promedio en Unidades Formadoras de Colonia (UFC·mL<sup>-1</sup>) y estimar la influencia que ejerce el campo magnético variable de onda sinusoidal que fueron expuestos en cada ensayo a una misma intensidad, diferentes frecuencias y tiempos de exposición. Los resultados mostraron que es posible estimular el crecimiento de *L. plantarum*, utilizando campos magnéticos en tiempos de 180 y 270 seg. Los porcentajes promedio de estimulación obtenidos en 80 ensayos microbiológicos nos dieron valores entre 6 y 200%, mas no fue lo mismo con el tiempo de exposición de 90 seg, que en todos los ensayos los resultados presentaron una acentuada inhibición del crecimiento de *L. plantarum*.

**Palabras clave:** Campos magnéticos alternos – crecimiento bacteriano – *Lactobacillus plantarum*

## INTRODUCCIÓN

El campo magnético puede provocar efectos dañinos o beneficiosos sobre los sistemas biológicos de todos los seres vivos. El uso de dicha radiación como tratamiento magnético puede aplicarse en la modalidad de campo magnético estático u oscilante, es decir, un campo magnético que oscila según la frecuencia de la corriente eléctrica que lo induce en KHz. Las frecuencias menores de 3 KHz se clasifican como frecuencias extremadamente bajas (Paunesku & Woloschak, 2007). Los efectos del tratamiento magnético sobre los microorganismos se clasifican en no observables, inhibitorios o estimulantes, dependiendo de la densidad del campo magnético (CM) expresada en teslas (T) o en gauss (G), así como de la frecuencia de la corriente eléctrica que lo induce, si es oscilante, y del tiempo de exposición (Barbosa *et al.*, 2000).

Los efectos de estimulación o inhibición de los campos magnéticos se han atribuido a cambios en la orientación de las proteínas, cambios en las biomembranas (lipídicas y plasmáticas), alteraciones del flujo de iones a través de la membrana plasmática y/o cambios en la estructura de las biomoléculas (Pothakamury *et al.*, 1993).

Para explicar dichos efectos se emplean varios mecanismos de forma individual o combinada, los cuales tienen en común el que actúan sobre las partículas cargadas y las moléculas de agua cuando se aplican en el medio de cultivo, y especialmente a nivel de membrana celular cuando inciden directamente sobre los sistemas biológicos (Zapata *et al.*, 2005).

En el caso de los efectos en los microorganismos, estos se relacionan no solo con su especie y su morfología (Fojt *et al.*, 2004; Fojt *et al.*, 2009), sino también con las características del medio de cultivo (líquido o sólido) en el que reciben el tratamiento magnético (Barbosa *et al.*, 2000). En ese sentido, se han estudiado más los efectos magnetobiológicos en medios de cultivo líquidos, utilizando técnicas indirectas como el recuento celular por densidad óptica o la cuantificación de un metabolito (Morrow *et al.*, 2007).

Los probióticos están incorporados en los alimentos funcionales con mayor frecuencia. Los microorganismos promotores de la salud desempeñan

un papel importante en la mejora gastrointestinal (Kailasapathy & Chin, 2000). *Lactobacillus plantarum* 299v se añade en muchos productos alimenticios, principalmente fermentados lácteos, debido a sus reconocidas propiedades de mejora del síndrome del intestino irritable (Niedzielin *et al.*, 2001) y la función endotelial vascular (Malik *et al.*, 2015). Sin embargo, las aplicaciones están limitadas por la viabilidad de los probióticos, que se ve afectada por las condiciones de procesamiento y almacenamiento y el medio ambiente gastrointestinal (Cook *et al.*, 2012). Con el fin de conferir un efecto funcional Alimentos probióticos deben contener un número adecuado de bacterias viables ( $>10^7$ UFC·g<sup>-1</sup> de alimento) para ejercer un efecto probiótico (Corona-Hernández *et al.*, 2013).

Es por ello, que para incrementar el conocimiento y su aplicabilidad, dos áreas de las ciencias biológicas, la física aplicada y la microbiología de los alimentos, se complementan para dar aplicación bioindustrial mediante el uso del campo magnético en el área de la biotecnología alimentaria y de salud; es así, que se viene trabajando sobre los efectos del campo magnético variable de onda sinusoidal sobre la multiplicación y viabilidad de un probiótico modulador del sistema digestivo en hombre y animales como es *L. plantarum* utilizando exposiciones variables de tiempos, con intensidades variables de miliGauss y de frecuencias en KHz.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la influencia del campo magnético variable de onda sinusoidal entre 22 a 52 KHz y de 100 miliGauss de inducción magnética, sobre el crecimiento de *L. plantarum* utilizado como probiótico en alimentos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Procedimiento microbiológico

La cepa de *Lactobacillus plantarum* fue adquirida de American Type Culture Collection (ATCC). Se procedió a la reactivación de la cepa de *Lactobacillus plantarum* URP69 en caldo de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) Rogosa marca Merck, se incubó a 37°C por 24 h. Luego del tiempo transcurrido se transfirió una asada a un tubo que contenía 5mL de caldo MRS y se incubó a 37°C durante 20 h para la obtención de un cultivo joven.

Los cultivos de *L. plantarum* URP69 para el recuento en placas de bacterias mesófilas denominadas Control (C) y experimental Onda Sinusoidal (S) tuvieron las mismas condiciones nutricionales y de temperatura para su desarrollo.

La determinación del recuento de *L. plantarum* URP69 se realizó mediante técnica de dilución en tubo y su respectiva siembra en agar MRS Rogosa mediante la metodología de disseminación en superficie de agar establecida por la ICMSF (2000). Para ello se estableció que el factor de dilución  $10^{-6}$  como la dilución ideal

para el recuento de *L. plantarum* URP69, para esto se realizaron varios ensayos, y se determinó la estimación ideal de colonias a contabilizar.

#### Procedimiento para la exposición al campo magnético

Para la generación de los campos de inducción magnética de distinta frecuencia, se ha diseñado, construido y probado una bobina tipo Helmholtz, que pueda producir campos magnéticos estables hasta 60 KHz. en el orden de los miliGauss. Esta bobina tiene las siguientes características indicadas en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Principales características de la bobina tipo Helmholtz para la generación de los campos de inducción magnética.

Bobina #	# avg	# de vueltas	# de bobinas	Diámetro cm	Resistencia Ohms	Inductancia milihenrios	Rango de frecuencia en KHz	Arrollamiento
5	21	200	2	5,25	0,4	0,354	20-60	Bifilar

Para la medición del campo se ha usado un Gausimetrotrifield™ meter, magneticfield; 3axis. ex100 version. Frequency: 50HZ - 100KHz. magneticfieldrange: 1-100 mG.

El cultivo joven de *L. plantarum* URP69 con una dilución  $10^{-6}$  se colocó en tubos de prueba de 5mL, se introdujeron dentro de la bobina, para ser expuestos durante 90 y 180 seg. a un campo magnético de 100 miliGauss sinusoidal de cuatro frecuencias de 22, 32, 42 y 52 KHz, perpendicular al campo magnético terrestre. En nuestras coordenadas geográficas WWNN, es probable que el campo magnético resultante instantáneo aplicado a las muestras varié entre 0,223 y 0,5 Gauss, en campos combinado de DC y alterno; luego del cual se procedió al homogenizado por un tiempo de 25 seg. Luego se procedió al sembrado de cada una de las diluciones de  $10^{-6}$  expuestas al campo magnético en agar MRS Rogosa mediante la metodología de disseminación en superficie de agar establecida por la ICMSF (2000). Se incubó a 37°C durante 24 – 48 h, para posteriormente realizar los recuentos de las placas control (C) y experimental de onda sinusoidal (S) de *L. plantarum* URP69.

#### RESULTADOS

Las Tablas 2 al 5 muestran los promedios de recuento en placas control (C) y experimental ONDA SINUSOIDAL (S) de *L. plantarum* a 22KHz, 32KHz, 42KHz y 52KHz - 100 miliGauss a 180 seg.

Los resultados promedios de los ocho ensayos controles y experimentales obtenidos a una frecuencia de 52 KHz a 100 miliGauss con exposición de tiempo de 180 seg, evidencian un incremento porcentual que esta entre 98 a 117% sobre la población de *L. plantarum* URP69 (Tabla 2). Así mismo, para los promedios de dos ensayos controles y experimentales obtenidos a una frecuencia de 42 KHz a 100 miliGauss con exposición de tiempo de 180 seg evidencian un incremento de la población de *L. plantarum* URP69 entre 101% a 103% (Tabla 3). Para los promedios de los dos ensayos controles y experimentales obtenidos a una frecuencia de 32 KHz a 100 miliGauss con exposición de tiempo de 180 seg evidencian un incremento de la población de *L. plantarum* URP69 entre 102% a 103% (Tabla 4). Finalmwente, para los promedios de los dos ensayos controles y experimentales obtenidos a una frecuencia de 22 KHz a 100 miliGauss con exposición de tiempo de 180 seg evidencian un incremento de la población de *L. plantarum* URP69 entre 101% a 102% (Tabla 5).

**Tabla 2.** Promedios de Recuento en Placas Control (C) y Experimental -Onda Sinusoidal (S) de *Lactobacillus plantarum* 52KHz - 100 miliGauss - 180 seg.

Promedios Log N (Control) UFC·mL <sup>-1</sup>	Promedios Log N (Onda sinusoidal) UFC·mL <sup>-1</sup>	Número de ensayos
7,92	8,45	1
7,27	8,52	2
8,87	8,71	3
8,87	8,72	4
8,98	9,06	5
8,98	9,14	6
9,24	9,39	7
9,24	9,36	8

**Tabla 3.** Promedios de Recuento en Placas Control (C) y Experimental -Onda Sinusoidal (S) de *Lactobacillus plantarum* 42KHz - 100 miliGauss - 180 seg.

Promedios Log N (Control) UFC·mL <sup>-1</sup>	Promedios Log N (Onda sinusoidal) UFC·mL <sup>-1</sup>	Número de Ensayos
9,24	9,54	1
9,24	9,43	2

**Tabla 4.** Promedios de Recuento en Placas Control (C) y Experimental -Onda Sinusoidal (S) de *Lactobacillus plantarum* 32KHz - 100 miliGauss - 180 seg.

Promedios Log N (Control) UFC·mL <sup>-1</sup>	Promedios Log N (Onda sinusoidal) UFC·mL <sup>-1</sup>	Número de Ensayos
9,25	9,55	1
9,25	9,45	2

**Tabla 5.** Promedios de Recuento en Placas Control (C) y Experimental -Onda Sinusoidal (S) de *Lactobacillus plantarum* 22KHz - 100 miliGauss - 180 seg.

Promedios Log N (Control) UFC·mL <sup>-1</sup>	Promedios Log N (Onda sinusoidal) UFC·mL <sup>-1</sup>	Número de Ensayos
9,25	9,42	1
9,25	9,43	2

Las Tablas 6 al 9 muestran los promedios de recuento en placas control (C) y experimental Onda Sinusoidal (S) de *L. plantarum* a 22KHz, 32KHz, 42KHz y

52KHz a 100 miliGauss a 90 seg, no evidenciando una multiplicación por estimulación del campo (Tablas 6-9).

**Tabla 6.** Promedios de Recuento en Placas Control (C) y Experimental Onda Sinusoidal (S) de *Lactobacillus plantarum* 52KHz - 100 miliGauss - 90 seg.

Promedios Log N (Control) UFC·mL <sup>-1</sup>	Promedios Log N (Onda sinusoidal) UFC·mL <sup>-1</sup>	Número de Ensayos
9,16	8,93	1
9,16	8,98	2

**Tabla 7.** Promedios de Recuento en Placas Control (C) y Experimental Onda Sinusoidal (S) de *Lactobacillus plantarum* 42KHz - 100 miliGauss - 90 seg.

Promedios Log N (Control) UFC·mL <sup>-1</sup>	Promedios Log N (Onda sinusoidal) UFC·mL <sup>-1</sup>	Número de Ensayos
9,16	9,14	1
9,16	8,95	2

**Tabla 8.** Promedios de Recuento en Placas Control (C) y Experimental Onda Sinusoidal (S) de *Lactobacillus plantarum* 32KHz - 100 miliGauss - 90 seg.

Promedios Log N (Control) UFC·mL <sup>-1</sup>	Promedios Log N (Onda sinusoidal) UFC·mL <sup>-1</sup>	Número de Ensayos
9,16	8,80	1
9,16	8,86	2

**Tabla 9.** Promedios de Recuento en Placas Control (C) y Experimental Onda Sinusoidal (S) de *Lactobacillus plantarum* 22KHz - 100 miliGauss - 90 seg.

Promedios Log N (Control) UFC·mL <sup>-1</sup>	Promedios Log N (Onda sinusoidal) UFC·mL <sup>-1</sup>	Número de Ensayos
9,16	8,79	1
9,16	8,93	2

## DISCUSIÓN

Loghavi *et al.* (2008) señalan que el retraso del tiempo disminuyó a una temperatura subóptima de crecimiento cuando se aplicó una frecuencia de campo eléctrico moderado - MEF a 45 y 90 Hz, pero no a 60 Hz, a pesar de que todos los parámetros cinéticos de crecimiento no eran significativamente diferentes en los diferentes niveles de frecuencia.

Lima & Sastry (1999), Kulshrestha & Sastry (2003) y Sensoy & Sastry (2004) han observado que la transferencia de masas mejora en células eucariotas a medida que aumenta la intensidad del campo y disminuye la frecuencia. Estos autores han sugerido que la electroporación temporal y reversible puede ser la causa principal de la difusión mejorada. Kulshrestha & Sastry (2003) mencionaron que esta observación es consistente con la teoría de que la baja frecuencia permite más tiempo para que las cargas se acumulen a nivel de la membrana celular. Consiguientemente, se espera una mayor formación de electroporos a frecuencias más bajas. De forma similar, se espera que la fase de retardo aumente a medida que la frecuencia aumente de 60 a 90 Hz. Sin embargo, los resultados indican una mayor fase lag a 60 Hz en comparación con 90 Hz, lo que no es coherente con la teoría de baja frecuencia (Loghavi *et al.*, 2008).

Loghavi *et al.* (2008) utilizaron una fuente de alimentación de frecuencia variable para los tratamientos de 45 y 90 Hz. planteando la hipótesis de que la diferencia de la fuente de energía puede haber causado alguna variación en la forma de onda (Lima & Sastry, 1999; Sensoy & Sastry 2004), tanto la forma de onda y la dependencia de frecuencia para

la transferencia de masa asistida eléctricamente. Para verificar si las ondas de corriente y de tensión eran puramente sinusoidales y consistentes entre todos los tratamientos, se examinaron las formas de onda a diferentes frecuencias con un osciloscopio (Tektronix, TDS 5052, Beaverton, OR). Las ondas a 45 y 90 Hz producidas por el suministro de frecuencia variable eran puramente sinusoidales, mientras que las ondas a 60 Hz no lo eran. Esto sugiere que las células pueden responder de manera diferente a diferentes formas de onda, y en particular, a la presencia de armónicos de alta frecuencia (Loghavi *et al.*, 2008).

La exposición de una membrana celular a un campo eléctrico externo a bajas frecuencias puede causar poros temporales, un aumento de la conductividad transmembrana y/o permeabilidad difusiva de nutrientes, y una autoinducción alrededor de la membrana celular (Pillai & Jesudhasan, 2006).

La alta producción de bacteriocina se asocia comúnmente con la etapa de crecimiento de las bacterias, el pH óptimo de la producción de bacteriocina y un suministro de nutrientes específicos para una especie/cepa (Yang & Ray, 1994; Callewaert & Vuyst, 2000; Verluyten *et al.*, 2003; Loghavi *et al.*, 2007).

En nuestros resultados se ha podido establecer que existe un incremento de la población de *L. plantarum* URP69 entre (6% y 200%) cuando son expuestos a campo magnético por 180 seg con una frecuencia óptima de 52 KHz a 100 miliGauss, como se registra en los promedios de los 14 ensayos realizados. Sin embargo, en los promedios de dos ensayos no se



evidenció el crecimiento probablemente por el desgaste, debido al sexto pasaje de la cepa de *L. plantarum* URP69.

En comparación con los promedios de los 8 ensayos expuestos a 90 seg bajo las mismas frecuencias establecidas previamente, se observó una inhibición aproximada del 50% sobre el crecimiento de *L. plantarum* URP69. Así mismo, de los 44 ensayos realizados entre controles y experimentales se ha obtenido un 63% de crecimiento de *L. plantarum* URP69.

Se concluye que a todas las frecuencias 22, 32, 42 y 52 KHz y a 100 miliGauss expuestos a 180 seg se puede aseverar que si se produce un aumento de *L. plantarum* URP69 con una variabilidad entre 6 y 200%. Los ensayos nos muestran que para obtener un aumento de *L. plantarum* URP69 es de suma importancia el tiempo de exposición al campo magnético mayor a 90 seg. Las funciones metabólicas de la cepa *L. plantarum* URP69 se fue desgastando a medida que se realizaban los pasajes de los cultivos, esto se evidenció durante el sexto pasaje para los recuentos establecidos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barbosa, G.V; Góngora, M.M. & Swanson, B.G. 2000. Nonthermal electrical methods in food preservation. *Food Science and Technology International*, 4:363-370.
- Callewaert, R. & Vuyst, L.D. 2006. Bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 is improved and stabilized by fedbatch fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 606-613.
- Cook, M.T; Tzortzis, G.; Charalampopoulos, D. & Khutoryanskiy, V.V. 2012. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, 162: 56-67.
- Corona-Hernandez, R.I.; Alvarez-Parrilla, E.; Lizardi-Mendoza, J.; Islas-Rubio, A.R., Rosa, L.A. & Wall-Medrano, A. 2013. Structural stability and viability of microencapsulated probiotic bacteria: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12: 614-628.
- Fojt, L.; Klapetek, P.; Strašák, L. & Vetter, V. 2009. 50 Hz magnetic field effect on the morphology of bacteria. *Micron*, 40: 918-922.
- Fojt, L.; Strašák, L.; Vetter, V. & Smarda, J. 2004. Comparison of the low-frequency magnetic field effects on bacteria *Escherichia coli*, *Leclercia adecarboxylata* and *Staphylococcus aureus*. *Bioelectrochemistry*, 63: 337-341.
- Kailasapathy, K. & Chin, J. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and cell biology*, 78: 80-88.
- Kulshrestha, S. & Sastry, S. 2003. Frequency and voltage effects on enhanced diffusion during moderate electric field treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4: 189-194.
- Lima, M. & Sastry, S.K. 1999. The effects of ohmic heating frequency on hot-air drying rate and juice yield. *Journal of Food Engineering*, 41: 115-119.
- Loghavi, L.; Sastry, S.K. & Yousef, A. 2007. Effect of moderate electric Field on the metabolic activity and growth kinetics of *Lactobacillus acidophilus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 98: 872-881.
- Loghavi, L.; Sudhir, K.; Sastry, I and Ahmed, E. 2008. Effect of moderate electric field frequency on growth kinetics and metabolic activity of *Lactobacillus acidophilus*. *Biotechnology Progress*, 24: 148-153
- Malik, M.; Widlansky, M.; Suboc, T.; Coulliard, A., Su, J.; Salzman, N.H. & Baker, J.E. 2015. The probiotic bacterium *Lactobacillus plantarum* 299v improves vascular endothelial function and decreases inflammatory biomarkers in men with established cardiovascular disease. *Circulation*, 132 (Suppl 3), A10898.

- Morrow, AC.; Dunstan, RH.; King, B.V. & Roberts, T.K. 2007, Metabolic effects of static magnetic fields on *Streptococcus pyogenes*. *Bioelectromagnetics*, 28:439-445.
- Niedzielin, K.; Kordecki, H. & Birkenfeld, B. 2001. A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299V in patients with irritable bowel syndrome. *European journal of Gastroenterology & Hepatology*, 13: 1143-1147.
- Paunesku, T. & Woloschak, G.E. 2007. *Effects of radiofrequency and extremely low-frequency electromagnetic field radiation on cells of the immune system*. Handbook of biological effects of electromagnetic fields. 3<sup>th</sup> Ed. Boca Raton, FL. pp. 39-56.
- Pillai, S. D. & Jesudhasan, P. R. 2006. Quorum sensing: How bacteria communicate, understanding bacterial cell-to-cell communication can reduce foodborne disease and retard food spoilage. *Food Technology*, 60: 42-49.
- Pothakamury, U.; Barletta, B.; Barbosa, G. & Swanson, B. 1993. Inactivación de microorganismos en alimentos usando campos magnéticos oscilantes. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 33: 479-489.
- Sensoy, I. & Sastry, S.K. 2004. Ohmic blanching of mushrooms. *Journal of Food Process Engineering*, 27: 1-15.
- Verluyten, J.; Messens, W. & Vuyst, L.D. 2003. The Curing agent sodium nitrite, used in the production of fermented sausages, is less inhibiting to the bacteriocin-producing meat starter culture *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 under anaerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 3833-3839.
- Yang, R. & Ray, B. 1994. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 11: 281-291.
- Zapata, J.E.; Moreno, O. & Márquez, G.F. 2005. Acción de un campo magnético sobre un cultivo aireado de *Saccharomyces cerevisiae*. *Interciencia*, 30:40-46.

Received November 8, 2016.

Accepted December 12, 2016.