

УДК 636.52/.58.084.1:546.173

ПРОДУКТИВНОСТЬ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ИХ КРОВИ ПРИ ВВЕДЕНИИ В КОМБИКОРМА, СОДЕРЖАЩИЕ НИТРИТЫ, ТИОСУЛЬФАТА НАТРИЯ

**В. К. МЕНЬКИН, Т. М. ПОДКОЛЗИНА, Н. П. БУРЯКОВ,
М. А. БУРЯКОВА, А. В. ЗАЙЦЕВ**

(Кафедра кормления с.-х. животных)

Изучали эффективность введения разного количества тиосульфата натрия в комбикорма для снижения негативного влияния нитритов на рост цыплят-бройлеров, использование ими питательных веществ и биохимические показатели крови.

Создание прочной кормовой базы для животноводства связано с интенсивным использованием органических и минеральных удобрений, и в том числе азотных. Нерациональное применение азотсодержащих удобрений, нарушение правил их хранения и транспортировки приводят к значительному повышению уровня нитратов и нитритов в кормах и воде [1, 3, 8, 11—13]. Потребление кормов с повышенным количеством этих веществ может вызвать отравление или даже гибель животных [9]. Нитратный азот и продукты его восстановления интенсивно всасываются в желудочно-кишечный тракт и поступают в кровяное русло, аккумулируются в организме и продукции животных, вызывают нарушение обмена веществ и канцерогенез [7, 11, 12].

Отрицательное воздействие нитритов обусловлено интенсификацией процессов перекисидации, значительным снижением количества ферментов антиоксидантной защиты, уменьшением окислительно-восстановительного потенциала организма животных [4, 5].

При скармливании комбикормов,

содержащих нитриты, у птицы резко снижается интенсивность роста и уменьшается А-витаминная обеспеченность организма [6]. Цыплята гораздо сильнее страдают от нитритно-нитратных токсикозов, чем взрослая птица. При повышенном содержании нитратов и нитритов в рационе у них ухудшается переваримость органического вещества, протеина и жира и возрастает концентрация нитрат-иона в тушках [2]. По мере поступления в организм нитритов уровень метгемоглобина в крови увеличивается, и в том случае, когда данный показатель достигает 30—40 % к общему количеству гемоглобина, возникают симптомы интоксикации, а при 60 % метгемоглобина в крови наблюдается гибель птицы [2]. Все это обуславливает необходимость изыскания способов контроля токсического действия нитратов и нитритов.

В настоящее время большое внимание уделяется соединениям, способствующим нормализации содержания нитритного азота, предохранению комплекса важнейших ферментов антиоксидантной системы организма от негативного воздействия активных форм кислорода, об-

разующихся вследствие дестабилизации метаболизма нитритов.

Цель настоящих исследований — выявить влияние разных уровней тиосульфата натрия (0,1; 0,15 и 0,2 % к содержанию сухого вещества), вводимого в комбикорма для нейтрализации негативного воздействия нитритов, на рост цыплят-бройлеров, использование ими питательных веществ корма и некоторые биохимические показатели крови.

Методика

Опыты проводили в виварии кафедр кормления сельскохозяйственных животных Тимирязевской академии с 20 апреля по 9 июня 1989 г. (1-й опыт) и с 22 января по 14 марта 1991 г. (2-й опыт) по схеме, представленной в табл. 1.

Суточные цыплята кросса Конкурент были завезены из ГППЗ «Конкурсный» Сергиево-Посадского района Московской области. Молодняк размещали в 3-ярусных металлических клетках (по 35 гол. на

Таблица 1
Схема опытов

Группа	Характеристика кормления
--------	--------------------------

1-й опыт (n=100 гол.)

1 (контроль)	Основной рацион (ОР)
2	ОР+0,1 % тиосульфата натрия (т. н) *
3	ОР+0,1 % KNO ₃
4	То же+0,1 % т. н
5	» » +0,15 % т. н
6	» » +0,2 % т. н

2-й опыт (n=100 гол.)

7 (контроль)	ОР
8	ОР+0,1 % т. н
9	ОР+0,1 % KNO ₂
10	То же+0,1 % т. н
11	» » +0,15 т. н

* От содержания сухого вещества в комбикорме.

Таблица 2
Состав и питательность комбикормов в разные периоды выращивания цыплят (%)

Компонент	1-й опыт		2-й опыт	
	1—4 нед	5—7 нед	1—4 нед	5—7 нед
Кукуруза	25,0	10,0	45,0	40,0
Пшеница	20,0	38,0	6,0	10,0
Ячмень	15,0	15,0	5,0	10,0
Шрот:				
соевый	8,0	5,0	15,2	8,0
подсолнечный	13,0	10,0	5,0	8,0
Мука:				
рыбная	8,0	4,0	9,0	5,0
костная	1,0	1,5	2,0	2,0
травяная	2,0	4,2	3,0	5,0
Жир кормовой	3,0	6,2	3,0	4,5
Мел	0,5	0,8	0,4	0,5
Преципитат	0,3	—	0,3	—
Соль поваренная	0,2	0,3	0,1	0,2
В 100 г смеси содержится:				
обменной энергии, МДж	1,3	1,3	1,3	1,3
сырого протеина	22,2	19,2	22,2	19,1
сырой клетчатки	4,5	4,4	3,7	4,8
кальция	1,0	0,9	1,1	0,9
фосфора	0,8	0,7	0,9	0,7
натрия	0,3	0,2	0,3	0,3
лизина	1,2*	0,9*	1,2*	0,9*
метионина+цистина	0,8*	0,6*	0,7*	0,5*

* Недостающее до нормы количество восполняли за счет кормовых препаратов.

1 м²) и выращивали до 7-недельного возраста. Пол цыплят определяли в 4-недельном возрасте (количество курочек и петушков в группах было почти одинаковое). Температурный и световой режимы, влажность в помещении поддерживали согласно действующим нормативам. Птица имела свободный доступ к корму и воде.

В 1-м опыте изучали эффективность применения тиосульфата натрия в дозах 0,1; 0,15 и 0,2 % к со-

держанию сухого вещества в рационе. С целью подтверждения результатов, полученных в 1-м эксперименте, был проведен 2-й опыт. В обоих экспериментах основной рацион цыплят контрольных и опытных групп состоял из комбикорма, сбалансированного по содержанию питательных и биологически активных веществ, содержание обменной энергии соответствовало рекомен-

дуемым нормам (табл. 2). Для приготовления комбикорма использовали размолотые и тщательно перемешанные в смесителе корма, в которые вводили витамины, микроэлементы и изучаемые добавки.

В течение экспериментов в середине периодов выращивания цыплят групповым методом (по 1 ярусу из каждой группы — 20 гол.) было проведено 4 балансовых опыта по

Т а б л и ц а 3
Живая масса и среднесуточный прирост цыплят (г; числитель — 4 нед, знаменатель — 7 нед)

Группа	Живая масса		В среднем	Среднесуточный прирост за период опыта
	курочки	петушки		
	<i>1-й опыт</i>			
1 (контроль)	817 ± 26	914 ± 35	866 ± 30	29,4
	1936 ± 46	2324 ± 74	2130 ± 60	42,6
2	850 ± 25	981 ± 15	916 ± 21	31,2
	2025 ± 38	2389 ± 42	2207 ± 40	44,2
3	806 ± 27	938 ± 35	872 ± 30	29,6
	1800 ± 58	2206 ± 69	2003 ± 61	40,0
4	911 ± 18	942 ± 26	927 ± 22	31,6
	$2144 \pm 35^*$	$2327 \pm 53^*$	$2236 \pm 48^*$	44,8
5	$839 \pm 30^*$	$999 \pm 20^*$	$919 \pm 20^*$	31,3
	$1977 \pm 48^*$	$2464 \pm 55^*$	$2221 \pm 50^*$	44,5
6	$905 \pm 17^*$	$982 \pm 21^*$	$944 \pm 20^*$	32,2
	$2113 \pm 38^*$	$2386 \pm 50^*$	$2250 \pm 47^*$	45,1
	<i>2-й опыт</i>			
7 (контроль)	971 ± 14	1069 ± 12	1020 ± 11	34,8
	2073 ± 23	2369 ± 29	2221 ± 13	44,4
8	982 ± 8	1057 ± 17	1020 ± 14	34,8
	2052 ± 24	2367 ± 34	2210 ± 28	44,2
9	959 ± 15	1042 ± 15	1001 ± 14	34,1
	1948 ± 21	2136 ± 19	2042 ± 20	40,8
10	953 ± 11	1138 ± 18	1046 ± 15	35,8
	$2138 \pm 20^*$	$2513 \pm 24^*$	$2326 \pm 24^*$	46,6
11	992 ± 10	1093 ± 16	1043 ± 13	35,7
	$2101 \pm 25^*$	$2491 \pm 23^*$	$2296 \pm 24^*$	45,9

П р и м е ч а н и е. В этой и последующих таблицах звездочкой обозначена достоверность разности по отношению к 3-й и 9-й группам при $P < 0,05$.

стандартной методике. В этих опытах определяли живую массу суточных, 4- и 7-недельных цыплят, химический состав кормов и помета, расход кормов по периодам выращивания, затраты корма, обменной энергии и сырого протеина на 1 кг прироста живой массы по периодам выращивания и в целом за опыт, сохранность поголовья, переваримость органического вещества, протеина и жира, использование азота и биологическую ценность протеина, биохимические показатели крови — концентрацию гемоглобина, метгемоглобина — с помощью спектрофотометра, нитрат-иона — с помощью ионоселективного электрода, каротина и витамина А — колориметрическим методом, содержание витамина А, каротина и нитрат-иона в печени — теми же методами, что при определении соответствующих показателей в крови. Данные о составе и питательности комбикормов, скармливаемых цыплятам в возрасте 1—4 и 5—7 нед, представлены в табл. 2. Результаты исследований обработаны биометрически.

Результаты

Исследования показали (табл. 3), что при введении в основной рацион тиосульфата натрия в количестве 0,1 % к содержанию сухого вещества живая масса цыплят не сколько возросла по сравнению с контролем в 1-м опыте (2-я группа) и практически не изменилась во 2-м (8-я группа).

Скармливание цыплятам кормосмеси, содержащей 0,1 % нитрита калия (3-я и 9-я группы), не повлияло на массу цыплят в 1-м периоде выращивания, в конце 1-го и 2-го опытов этот показатель снизился по сравнению с контролем соответственно на 6,0 и 8,1 %. В этих группах получен самый низкий среднесуточный прирост за 7 нед выращивания.

При включении тиосульфата натрия в рацион, содержащий нитриты (4, 5, 6, 10 и 11-я группы), масса цыплят в 7-недельном возрасте в 1-м опыте в среднем была на 11—12 %, во 2-м — на 12—14 % больше, чем в 3-й и 9-й группах (разность достоверна при $P < 0,05$). Максимальная живая масса отмечена у курочек 4-й и 10-й групп и у петушков 10-й группы, получавших 0,1 % тиосульфата натрия на фоне нитритсодержащего рациона (табл. 3).

Наибольший среднесуточный прирост живой массы за 7 нед выращивания в 1-м опыте был у цыплят 6-й группы — 45,1 г, во 2-м опыте — в 10-й группе (46,6 г).

За весь период выращивания сохранность поголовья в 1-м опыте составляла 88,7—98,1 %, во 2-м — 91,3—98,1 %. Наименьшая сохранность поголовья характерна для цыплят, получавших 0,1 % нитрита калия. Включение в нитритсодержащие комбикорма тиосульфата натрия способствовало повышению

Таблица 4

Затраты корма, сырого протеина и обменной энергии на 1 кг прироста живой массы цыплят

Группа	Корм, кг	Сырой протеин, г	Обменная энергия, МДж
<i>1-й опыт</i>			
1 (контроль)	2,1	430	27,3
2	2,1	425	26,9
3	2,5	515	32,7
4	2,0	409	26,0
5	2,1	419	26,6
6	2,1	417	26,5
<i>2-й опыт</i>			
7 (контроль)	2,0	411	26,8
8	2,0	408	26,5
9	2,4	478	31,1
10	2,0	397	25,9
11	2,0	401	26,1

сохранности птицы. Падеж цыплят, как правило, происходил из-за травм.

Учет потребления кормосмеси цыплятами всех групп позволил рассчитать затраты корма, сырого протеина и обменной энергии на 1 кг прироста живой массы (табл. 4).

Максимальные затраты корма были в группах цыплят, получавших нитритсодержащий рацион. При включении в его состав разных доз тиосульфата натрия затраты корма снизились, особенно

в 4-й и 10-й группах. Таким образом, введение 0,1 % тиосульфата натрия в рационы, содержащие нитриты, приводило не только к увеличению интенсивности роста цыплят, но и к более экономному расходу корма.

Как показали результаты балансовых опытов, коэффициенты переваримости органического вещества, протеина и жира были самые низкие при скармливании нитрита калия (3-я и 9-я группы). Для 12—16-суточных цыплят этих групп ха-

Т а б л и ц а 5

Переваримость питательных веществ, биологическая ценность и использование протеина цыплятами (%; числитель — 12—16 сут, знаменатель — 38—42 сут)

Группа	Коэффициент переваримости			Биологическая ценность протеина	Коэффициент использования протеина от потребленного с кормом
	органического вещества	протеина	жира		
<i>1-й опыт</i>					
1 (контроль)	64,0	86,7	72,1	55,8	48,4
	66,8	85,2	69,6	63,7	54,3
2	63,7	86,8	73,1	58,6	50,9
	67,6	85,6	76,4	65,4	55,9
3	58,5	83,4	69,6	55,4	42,3
	62,7	82,0	70,8	56,9	46,7
4	65,4	87,5	72,9	59,8	52,3
	68,3	85,9	75,4	59,2	50,8
5	64,3	86,8	71,4	57,9	50,3
	64,2	83,9	71,7	61,7	51,7
6	62,7	86,1	72,3	55,3	47,6
	68,0	84,9	75,8	58,5	49,7
<i>2-й опыт</i>					
7 (контроль)	63,1	87,8	70,3	54,2	47,6
	67,0	86,0	68,9	54,1	46,6
8	64,9	88,3	71,3	56,1	49,6
	69,6	86,8	70,8	58,6	50,9
9	63,6	86,5	66,4	50,0	43,3
	65,6	84,7	65,4	51,9	44,0
10	62,7	87,3	75,8	52,5	45,8
	68,6	86,4	73,2	54,7	47,3
11	65,6	88,3	74,9	53,9	47,6
	67,1	86,4	73,3	55,6	48,0

Концентрация гемоглобина, метгемоглобина и нитрат-иона в крови цыплят

Группа	Гемоглобин, г %		Метгемоглобин, %		Нитрат-ион, мг%	
	курочки	петушки	курочки	петушки	курочки	петушки
<i>1-й опыт</i>						
1 (контроль)	9,6±0,4	9,7±0,1*	1,4±0,1*	1,7±0,2*	3,22±0,06	3,31±0,02*
2	9,7±0,1	9,8±0,2	1,4±0,3*	1,7±0,1*	3,17±0,04	3,35±0,03*
3	8,6±0,2	8,6±0,3	3,3±0,1	3,5±0,1	5,05±0,03	5,10±0,01
4	9,7±0,3	9,7±0,2	1,7±0,1*	1,7±0,1*	3,24±0,01*	3,28±0,02*
5	9,6±0,4	9,2±0,2	1,7±0,2*	1,8±0,2*	3,40±0,04*	3,35±0,02*
6	9,1±0,2	9,3±0,1	1,8±0,1*	1,9±0,1*	3,28±0,02*	3,34±0,04*
<i>2-й опыт</i>						
7 (контроль)	9,4±0,3	9,8±0,4	1,1±0,1*	1,2±0,1*	3,05±0,33*	3,26±0,12*
8	9,8±0,4	9,9±0,2	1,4±0,1*	1,2±0,4*	3,09±0,04*	3,32±0,07*
9	8,8±0,3	8,8±0,6	4,9±0,4	4,2±0,8	5,18±0,18	5,27±0,16
10	9,7±0,4	9,8±0,2	1,1±0,1*	1,2±0,1*	3,29±0,07*	3,38±0,07*
11	9,8±0,4	9,4±0,2	1,1±0,1*	1,1±0,1*	3,23±0,07*	3,39±0,07*

рактены и наиболее низкие коэффициенты использования протеина от потребленного с кормом; отмечена также более низкая биологическая ценность протеина — в 1-м опыте 55,4 %, во 2-м — 50,0 %. Аналогичная закономерность прослеживалась и в период 38—42 сут (табл. 5). Наиболее полная переваримость питательных веществ рациона свойственна цыплятам, кото-

рым скармливали тиосульфат натрия на фоне как основного рациона (2-я и 8-я группы), так и рациона, содержащего нитриты. Максимальное использование протеина от потребленного с кормом и наивысшая его биологическая ценность отмечены у цыплят 2-й и 8-й групп.

Скармливание цыплятам-бройлерам комбикормов, содержащих 0,1 % нитрита калия, привело к

Таблица 7

Концентрация каротина и витамина А в сыворотке крови цыплят

Группа	Каротин, мг%		Витамин А, мкг%	
	курочки	петушки	курочки	петушки
<i>1-й опыт</i>				
1 (контроль)	0,52±0,02*	0,53±0,01*	172±1*	185±2*
2	0,53±0,01*	0,53±0,02*	173±1*	185±3*
3	0,26±0,03	0,28±0,07	103±3	130±3
4	0,47±0,03*	0,49±0,02*	160±7*	160±2*
5	0,48±0,02*	0,49±0,02*	160±1*	159±4*
6	0,49±0,01*	0,51±0,03*	161±3*	164±3*
<i>2-й опыт</i>				
7 (контроль)	0,54±0,02*	0,59±0,02*	197±16	208±14
8	0,55±0,01*	0,64±0,01*	203±14	203±4
9	0,43±0,03	0,48±0,02	135±6	169±16
10	0,57±0,04*	0,63±0,02*	199±15	215±10
11	0,55±0,02*	0,67±0,01*	201±14	208±16

Содержание каротина, витамина А и нитрат-иона в печени цыплят

Группа	Каротин, мкг%		Витамин А, мкг%		Нитрат-ион, мг%	
	курочки	петушки	курочки	петушки	курочки	петушки
<i>1-й опыт</i>						
1 (контроль)	—	2,1±0,1*	—	175±14*	—	5,4±0,1*
2	—	2,0±0,1*	—	179±11*	—	5,3±0,2*
3	—	1,1±0,1	—	102±3	—	8,0±0,1
4	—	1,9±0,1*	—	174±2*	—	5,6±0,1*
5	—	1,9±0,1*	—	169±11*	—	5,4±0,2*
6	—	1,8±0,1*	—	168±7*	—	5,5±0,1*
<i>2-й опыт</i>						
7 (контроль)	2,32±0,03	2,43±0,04*	170±5*	172±6*	5,0±0,3*	5,2±0,4*
8	2,35±0,03	2,40±0,02*	170±2*	176±4*	5,1±0,5*	5,2±0,3*
9	1,24±0,04	1,31±0,06*	102±2	110±3	8,2±0,3	8,3±0,1
10	2,05±0,02*	2,11±0,04*	169±4*	172±1*	5,1±0,4*	5,6±0,3*
11	2,10±0,05*	2,18±0,05*	165±6*	173±2*	5,2±0,2*	5,6±0,1*

Пр и м е ч а н и е. В 1-м опыте содержание каротина, витамина А и нитрат-иона в печени курочек не определяли.

снижению содержания гемоглобина в крови, при этом достоверно повысилось количество метгемоглобина (до 3,3—4,9 %) и нитрат-иона (до 5,1—5,3 мг %).

При разных уровнях тиосульфата натрия в кормосмесях, содержащих нитрит калия, нормализовалось содержание гемоглобина, метгемоглобина и нитрат-иона в крови, значения данных показателей приближались к их уровню в контрольных группах (табл. 6).

Концентрация каротина и витамина А в сыворотке крови снижалась при скармливании цыплятам комбикормов, содержащих нитриты (3-я и 9-я группы): в 1-м опыте соответственно до 0,26—0,28 мг % и 103—130 мкг %, во 2-м — до 0,43—0,48 мг % и 135—169 мкг % (табл. 7).

Содержание каротина и витамина А в печени цыплят также было минимальным (соответственно 1,24—1,31 и 102—110 мкг %) в 3-й и 9-й группах (табл. 8). Введение в нитритсодержащие ком-

бикорма разных уровней тиосульфата натрия стабилизировало А-витаминную обеспеченность организма.

При вскармливании птице комбикормов с нитритами содержание нитрат-иона в печени достоверно повышалось (на 47—63 % больше, чем в контроле). В печени цыплят, получавших разные уровни тиосульфата натрия на фоне рациона с нитритами, содержание нитрат-иона составило 5,0—5,6 мг %.

Выводы

1. Введение в кормосмесь 0,1 % нитрита калия и 0,1 % тиосульфата натрия не оказывало существенного влияния на сохранность цыплят-бройлеров.

2. Живая масса цыплят, получавших 0,1 % нитрита калия, была на 6,0—8,1 % меньше, а затраты корма, сырого протеина и обменной энергии — в среднем на 19—20 % выше контроля. Включение в состав комбикормов разных уровней тиосульфата натрия позволило досто-

верно увеличить массу цыплят и снизить затраты корма.

3. Переваримость органического вещества, сырого протеина и жира в контроле (основной рацион) и опытных (добавление к основному рациону нитрита калия и тиосульфата натрия) группах существенно не различалась.

4. Содержание метгемоглобина, нитрат-иона в крови цыплят, получавших комбикорма с 0,1 % нитрита калия, было достоверно выше, чем в контроле. При введении в рацион разных доз тиосульфата натрия содержание нитрат-иона и метгемоглобина в крови снизилось. Наибольший эффект наблюдался при введении 0,1 % тиосульфата натрия.

5. Запасы витамина А и каротина в печени, сыворотке крови цыплят при введении в состав рациона 0,1 % нитрита калия были ниже, чем в контроле. Введение в кормосмесь тиосульфата натрия в количестве 0,1—0,2 % к содержанию сухого вещества в рационе позволило нормализовать уровень витамина А в организме цыплят.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агеев В. А., Семенов В. Н., Мовсуров О. А., Соколов О. А. Включение азота удобрений в нитраты.— Изв. АН СССР. Сер. биол., 1988, № 5, с. 733—739.— 2. Архипов А. Нитраты и нитриты в кормах.— Птицеводство, 1989, № 7, с. 31—33.— 3. Басманов А. Е., Соколов С. Р. Нитраты в продукции растениеводства.— Химизация сельск. хоз-ва,

1989, № 9, с. 39—44.— 4. Вороница Л. П., Вотяков А. В., Перельгин В. М. Токсикологическая оценка нитратов, поступающих в организм с растительными продуктами.— Биол. науки, 1988, № 7, с. 22—26.— 5. Запорожец Н. Ф. Влияние нитратов и нитритов на гемопоэз у животных.— Ветеринария, 1986, № 4, с. 67—70.— 6. Ковалева Е. С., Таланов Г. А. Содержание нитратов и нитритов в кормовых культурах в зависимости от вида и дозы азотных и калийных удобрений.— Вопросы зооигиены и ветеринарии при различных технологиях содержания животных. М.: Агропромиздат, 1988, с. 63—69.— 7. Костюковский Я. А., Меламед Д. В. Канцерогенные нитрозамины, образование, свойства, анализ.— Успехи химии, 1988, т. 7, вып. 4, с. 625—655.— 8. Кузин К. И., Мочалов А. Д., Покровская С. Ф. Влияние минеральных удобрений на качество продукции и окружающую среду. М.: ВНИИТЭИСХ, 1985.— 9. Максоков В. Я., Шеяцова Г. Н. Нитраты и кормление животных. Киев: Урожай, 1990.— 10. Мурох В. И. Влияние минеральных азотных удобрений на накопление нитратов, нитритов и нитрозо соединений в растительных продуктах БССР.— Гигиена и санитария, 1987, № 4, с. 19—21.— 11. Полоз Д. Д., Полякова В. Н., Скорodinский З. П., Олейник З. Г. Методические указания по диагностике, профилактике и лечению отравлений сельскохозяйственных животных нитратами и нитритами. М.: Колос, 1979.— 12. Хмельницкий Г. А., Локтионова В. А., Полоз Д. Д. Ветеринарная токсикология. М.: Агропромиздат, 1987, с. 237—246.— 13. Oplisil M.— Veterinarstvi, 1985, vol. 35, N 7, p. 308—309.

Статья поступила 26 октября 1992 г.

SUMMARY

The efficiency of introducing different amount of sodium thiosulfate into combined feeds in order to reduce negative effect of nitrites on growth of broiler chickens, their utilizing nutrient substances and on biochemical blood properties was studied.