

EFEITO DE PAREDE CELULAR DE LEVEDURA SOBRE O DESEMPENHO PRODUTIVO DE FRANGOS DE CORTE INTOXICADOS COM AFLATOXINA B₁*

Kelly Moura Keller¹⁺, Águida Aparecida de Oliveira¹, Tatiana Xavier de Almeida¹, Luiz Antonio Moura Keller¹, Beatriz Dias Queiroz¹, Lucila Maria Teixeira Nunes², Lilia Renée Cavaglieri³ e Carlos Alberto da Rocha Rosa⁴

ABSTRACT. Keller K.M., Oliveira A.A., Almeida T.X., Keller L.A.M., Queiroz B.D., Nunes L.M.T., Cavaglieri L.R. & Rosa C.A.R. [Effect of yeast cell wall on the performance of broiler chickens intoxicated with aflatoxin B₁]. Efeito de parede celular de levedura sobre o desempenho produtivo de frangos de corte intoxicados com aflatoxina B₁. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 34 (2):101-105, 2012. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rodovia BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. Email: kelly.keller@yahoo.com.br

Mycotoxins are secondary metabolites produced by several filamentous fungi, which are toxic to animals and humans by contact, inhalation and ingestion mainly. Aflatoxins are hepatotoxic and carcinogenic mycotoxins produced mainly by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. Its presence is of great concern to the poultry industry due to problems such as decreased productivity and damage to the poultry carcass. Adsorbents based on the yeast cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* have esterified glucomannans, and are able to adsorb several mycotoxins such as aflatoxins, fumonisins and zearalenone. The aim of this study was to evaluate the effect of a yeast cell wall (anti-mycotoxin additive) on the performance of broiler chickens intoxicated with aflatoxin B₁ (AFB₁) until 21 days old. The addition of 1.01 mg kg⁻¹ (ppm) of AFB₁ in the diet of broilers in this study could affect negatively body weight, weight gain and feed consumption after 7 days old, and under the same experimental conditions the yeast cell wall (0.2%) used as an anti-mycotoxin additive reversed such effects. More studies should be conducted to better clarify the mechanism of action of these additives in animal production.

KEY WORDS. Aflatoxins, adsorbent, *Aspergillus*, *Saccharomyces cerevisiae*.

RESUMO. Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por diversos fungos filamentosos, tóxicos à animais e ao homem por contato, inalação e principalmente ingestão. Aflatoxinas são micotoxinas hepatotóxicas e carcinogênicas, produzidas principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, e sua presença constitui grande pre-

ocupação para a avicultura mundial por problemas como diminuição da produtividade das aves e lesões de carcaça. Adsorventes à base de parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, possuem glucomannanos esterificadas, e são capazes de ligar-se eficientemente a diversas micotoxinas, como aflatoxinas, fumonisinas e zearalenona. O objetivo do pre-

*Recebido em 2 de janeiro de 2011.

Aceito para publicação em 25 de fevereiro de 2012.

¹ Médico-veterinário. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária (IV) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. *Responsável pela correspondência. E-mail: kelly.keller@yahoo.com.br E-mails: aguidaoliveira@gmail.com; tattyalmeida@gmail.com; kellers@bol.com.br; bissetriz_vet@yahoo.com.br - bolsista CNPq.

² Curso de Engenharia de Alimentos, Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas, UFRRJ, Seropédica, RJ 23890-000. Email: lucilanunes@hotmail.com - bolsista CNPq.

³ Microbióloga. DSc., Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 36 km 601, (5800) Río Cuarto, Córdoba, Argentina. E-mail: lcavaglieri@arnet.com.ar - bolsista CONICET.

⁴ Médico-veterinário, PhD, Dr.Cienc.Tec.Alim., LD., Departamento de Microbiologia e Inmunologia Veterinária, IV, UFRRJ, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: shalako1953@gmail.com - bolsista CNPq.

sente estudo foi avaliar o efeito de parede de levedura (aditivo anti-micotoxinas) sobre o desempenho produtivo de frangos de corte intoxicados com aflatoxina B₁ até os 21 dias de idade. A adição de 1,01 mg kg⁻¹ (ppm) de AFB₁ na dieta dos frangos de corte no presente estudo foi capaz de alterar negativamente o peso vivo, ganho de peso e consumo de ração a partir dos 7 dias de idade, e nas mesmas condições experimentais a adição da parede celular de levedura, usada como um aditivo anti-micotoxina, reverteu tais efeitos. Mais estudos devem ser realizados acerca do assunto para melhor esclarecer o mecanismo de ação destes aditivos na produção animal.

PALAVRAS-CHAVE. Aflatoxinas, adsorvente, *Aspergillus*, *Saccharomyces cerevisiae*.

INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos saprófitas, capazes de utilizar uma grande variedade de substratos para obter carbono orgânico. Muitos fungos filamentosos são agentes deteriorantes de alimentos e também são capazes de produzir micotoxinas, que são substâncias tóxicas para animais e homens por ingestão, contato e inalação, produzidos durante seu metabolismo secundário. A contaminação por micotoxinas também gera grandes perdas econômicas na produção de grãos e criação de animais (Samson et al. 2000). Dentre as micotoxinas que contaminam os alimentos, as mais estudadas e de maior importância econômica são as aflatoxinas, a zearalenona, os tricotecenos, as fumonisinas e a ocratoxina A (Sassahara et al. 2003).

Aflatoxinas são micotoxinas produzidas principalmente por duas espécies fúngicas do gênero *Aspergillus*: *A. flavus* e *A. parasiticus*. Existem cerca de 17 compostos similares designados como aflatoxinas, sendo os principais tipos identificados como B₁ (de maior toxidez), B₂, G₁ e G₂. (Mídio & Martins 2000). Ao alcançar a circulação sanguínea, pode ligar-se de forma reversível às proteínas plasmáticas, principalmente à albumina, sendo então distribuída aos diversos órgãos, como músculo, rins, tecido adiposo e fígado, e é neste órgão onde ocorre a maior parte do processo de biotransformação das aflatoxinas. Há diversos relatos da contaminação do alimento produzido e destinado à avicultura por aflatoxinas, bem como da colonização por fungos aflatoxígenos (Almeida et al. 2009, Magnoli 1998, Rosmaninho et al. 2001, Salle et al. 2001).

As estratégias de prevenção priorizam minimizar a formação de micotoxinas no campo e durante

armazenamento de grãos, no entanto, os esforços podem não ser eficientes, e devem ser então aplicadas medidas pós-colheita para a detoxificação destas. Daí faz-se o uso de aditivos anti-micotoxinas (AAM), grupo que inclui os produtos que, quando adicionados em alimentos para animais, são capazes de adsorver, inativar, neutralizar ou biotransformar as micotoxinas (Brasil 2006). Um exemplo desses produtos são os adsorventes constituídos por parede celular de leveduras (PCL), uma alternativa segura e benéfica aos animais. Esses efeitos são advindos de sua composição, que é rica em carboidratos, a maioria glucanos e mananos, formando a maior parte dos polissacarídeos constituintes da parede celular (Gibson & Roberfroid 1995). São considerados os verdadeiros colaboradores para a saúde animal, pois estimulam o sistema imunológico e contribuem para a integridade da mucosa intestinal (Flemming & Freitas 2005), mostrando-se semelhantes aos antimicrobianos melhoradores de desempenho, por impedirem a adesão de microrganismos enteropatógenos, e possuírem a capacidade de ligarem-se e inativarem micotoxinas no lúmen intestinal (Albino et al. 2006). Como as propriedades benéficas dos microorganismos são cepa-dependentes e não podem ser extrapoladas ao gênero nem à espécie, torna-se necessária a avaliação de cada novo produto originado a partir de uma nova cepa de levedura. Assim, o objetivo do presente estudo foi o de avaliar o efeito de PCL (parede celular de *S. cerevisiae*), usado como aditivo anti-micotoxina, em frangos de corte intoxicados com AFB₁ até os 21 dias de idade.

MATERIAL E MÉTODOS

O local dos ensaios *in vivo* foi no Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas - Projeto Sanidade Animal (Embrapa/UFRRJ), Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

A AFB₁ foi produzida nos laboratórios do NPMM/UFRRJ, a partir da fermentação controlada de arroz branco polido por *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999, de acordo com Shotwell et al. (1966) com modificações. Todo o núcleo de AFB₁ foi autoclavado, seco a 50°C e triturado (granulometria de 20 mesh). A micotoxina foi extraída e purificada através de coluna MycoSep[®]226 AflaZon de acordo com as informações do fabricante (Romer Labs Diagnostic GmbH, Áustria), sendo em seguida quantificada por cromatografia líquida de alta efi-

ciência (CLAE). Após a quantificação, o núcleo foi incorporado à ração das aves em proporção conveniente utilizando um misturador mecânico tipo “Y”. Após esta etapa, uma nova extração e quantificação por CLAE foi realizada a fim de se obter a concentração final mínima de 1 mg kg⁻¹ (ppm) de AFB₁ na ração experimental. Foi utilizado o delineamento em blocos ao acaso, sendo os tratamentos constituídos por: T01 (dieta sem aflatoxinas, ou dieta base - DB), T02 (DB + PCL 0,2 %), T03 (DB + 1,01 ppm de AFB₁), T04 (DB + 1,01 ppm de AFB₁ + PCL 0,2 %). Todas as dietas foram fornecidas às aves *ad libitum*, assim como a água potável. Foram utilizados 288 frangos de corte, machos, da linhagem Cobb, recebidos com um dia de idade, vacinados contra a Doença de Marek, Newcastle e Gumboro, com peso médio de 42g, alojados em gaiolas, no total de 72 animais por tratamento (9 por gaiola, 36 por bloco, 2 blocos por tratamento). A observação clínica dos animais e aferição das temperaturas do ambiente e das gaiolas foram realizadas três vezes ao dia durante os 21 dias de experimentação.

Foram calculados o peso vivo (PV), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) das aves de todos os tratamentos aos 7, 14 e 21 dias de idade. Os resultados foram submetidos à análise de variância ($P \leq 0,05$), conduzidas usando o programa computacional PROC GLM em SAS (*SAS Institute, Cary, NC*). As comparações estatísticas foram realizadas entre tratamentos segundo teste estatístico LSD.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O PV dos quatro tratamentos no 1º dia e aos 7, 14 e 21 dias estão apresentados na tabela 1. Aos sete dias a média de PV dos animais pertencentes ao T03

foi inferior às demais médias. Esta diminuição de PV é um efeito negativo da dieta com AFB₁ (1,01 ppm) resultado de acordo com o estudo de Aravind et al. (2003), que utilizaram para frango de corte uma concentração bem menor de toxina - 0,168 ppm de AFB₁ - sem a adição de AAM, e observaram redução significativa no PV das aves intoxicadas. Aos 21 dias, a maior média de PV correspondeu aos animais do T04, e a menor foi observada nos animais do T03. O AAM foi capaz de elevar o PV aos 21 dias, resultado semelhante ao encontrado por Lopes et al. (2006), que testaram o efeito da adição de bentonita sódica (AAM inorgânico), na ração de frangos de corte.

Os polissacarídeos presentes na parede celular são prebióticos, promovem um ambiente intestinal saudável e estimulam respostas imunológicas, o que pode refletir em melhor desempenho zootécnico, entretanto Benites et al. (2008), que avaliando o desempenho de aves intoxicadas aos 21 dias alimentadas com 0,5 g kg⁻¹ de parede celular de *S. cerevisiae* não observaram aumento no PV e no GP das aves que receberam o aditivo.

O GP dos quatro tratamentos aos 7, 14 e 21 dias estão apresentados na tabela 2. O menor GP aos 7 dias (T03) está relacionado ao efeito negativo da AFB₁. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Miazzo et al. (2005), que testaram uma concentração de 2,5 ppm aos 33 dias de tratamento e obtiveram uma redução do GP das aves intoxicadas.

As aves do T04 alcançaram maior média de GP quando comparadas às outras aos 21 dias de idade. Estes resultados não estão de acordo com os encontrados por Santín et al. (2003), pois em seu experimento o AAM testado não foi capaz de alterar o GP nem o PV das aves.

Tabela 1. Variação do Peso vivo de frangos submetidos a diversas doses de AFB₁+PCL.

Tratamentos	Peso Vivo (g) ¹			
	1º dia	7º dia	14º dia	21º dia
T01: 0 ppm AFB ₁ + PCL 0,0%	42,26 ± 0,27 ^a	157,44 ± 9,35 ^a	453,41 ± 4,56 ^a	746,11 ± 5,34 ^{ab}
T02: 0 ppm AFB ₁ + PCL 0,2%	42,35 ± 0,28 ^a	158,63 ± 3,75 ^a	458,85 ± 17,30 ^a	777,15 ± 3,67 ^{ab}
T03: 1,01 ppm AFB ₁ + PCL 0,0%	42,35 ± 0,13 ^a	142,04 ± 7,91 ^b	383,33 ± 5,56 ^b	709,73 ± 2,27 ^b
T04: 1,01 ppm AFB ₁ + PCL 0,2%	42,44 ± 0,28 ^a	160,85 ± 2,33 ^a	456,26 ± 3,89 ^a	809,29 ± 59,18 ^a

¹ Letras diferentes na coluna indicam resultados significativos segundo teste estatístico de LSD

Tabela 2. Ganho de peso de frangos submetidos a diferentes doses de AFB₁+PCL.

Tratamentos	Ganho de Peso (g) ¹		
	7º dia	14º dia	21º dia
T01: 0 ppm AFB ₁ + PCL 0,0%	115,30 ± 9,49 ^a	291,06 ± 23,23 ^a	329,44 ± 2,51 ^a
T02: 0 ppm AFB ₁ + PCL 0,2%	118,96 ± 1,22 ^a	293,26 ± 16,07 ^a	331,14 ± 11,78 ^a
T03: 1,01 ppm AFB ₁ + PCL 0,0%	99,63 ± 7,99 ^b	243,44 ± 4,61 ^b	323,56 ± 1,57 ^b
T04: 1,01 ppm AFB ₁ + PCL 0,2%	115,63 ± 3,20 ^a	293,50 ± 8,05 ^a	331,95 ± 65,43 ^a

¹ Letras diferentes na coluna indicam resultados significativos segundo teste estatístico de LSD

Tabela 3. Consumo de Ração de frangos submetidos a diferentes doses de AFB₁+PCL.

Tratamentos	Consumo de Ração (g) ¹		
	7° dia	14° dia	21° dia
T01: 0 ppm AFB ₁ + PCL 0,0%	150,46 ± 1,68 ^a	406,55 ± 10,33 ^a	556,58 ± 43,73 ^a
T02: 0 ppm AFB ₁ + PCL 0,2%	156,27 ± 4,61 ^b	411,81 ± 17,50 ^a	560,75 ± 36,42 ^a
T03: 1,01 ppm AFB ₁ + PCL 0,0%	148,22 ± 3,30 ^a	384,47 ± 15,65 ^b	518,61 ± 13,81 ^b
T04: 1,01 ppm AFB ₁ + PCL 0,2%	155,11 ± 4,13 ^b	405,30 ± 11,31 ^a	558,95 ± 65,90 ^a

¹ Letras diferentes na coluna indicam resultados significativos segundo teste estatístico de LSD

Tabela 4. Conversão alimentar de frangos submetidos a diferentes doses de AFB₁+PCL

Tratamentos	Conversão Alimentar (g/g) ¹		
	7° dia	14° dia	21° dia
T01: 0 ppm AFB ₁ + PCL 0,0%	0,89 ± 0,04 ^{ab}	1,30 ± 0,08 ^a	1,53 ± 0,09 ^a
T02: 0 ppm AFB ₁ + PCL 0,2%	0,89 ± 0,04 ^{ab}	1,31 ± 0,04 ^a	1,48 ± 0,06 ^a
T03: 1,01 ppm AFB ₁ + PCL 0,0%	0,85 ± 0,08 ^b	1,34 ± 0,09 ^a	1,47 ± 0,07 ^a
T04: 1,01 ppm AFB ₁ + PCL 0,2%	0,92 ± 0,01 ^a	1,28 ± 0,04 ^a	1,52 ± 0,12 ^a

¹ Letras diferentes na coluna indicam resultados significativos segundo teste estatístico de LSD

O CR dos animais dos quatro tratamentos nos dias 7, 14 e 21 dias estão apresentados na tabela 3. E os resultados se assemelham aos de PV e GP, com menores médias para as aves intoxicadas a partir de 7 dias. Estes dados confirmam as observações de Aravind et al. (2003), Santín et al. (2003), Giacomini et al. (2006) e Lopes et al. (2006) que em seus experimentos também observaram efeito da AFB₁ na redução do CR. No geral, o CR foi inferior ao esperado em todos os tratamentos, em função da elevada temperatura interna do aviário, cerca de 30°C na região, apesar da utilização de nebulizadores e ventiladores.

O valor da CA dos animais dos quatro tratamentos aos 7, 14 e 21 dias estão representados na tabela 4. Os resultados sobre a eficácia de AAM à base de parede de leveduras dependem do manejo, composição do produto, idade e estado sanitário das aves, mas em geral, estes produtos são reportados como capazes de reverter efeitos negativos das aflatoxinas em frangos e podem melhorar a conversão alimentar na presença ou não de micotoxinas na dieta (Roll et al. 2010). Neste trabalho, o AAM (PCL 0,2%) não melhorou significativamente a CA, discordando dos trabalhos de Çelýk et al. (2003) e de Santín et al. (2003). Nesse tipo de estudo, a avaliação da conversão alimentar deve ser feita com cuidado e critério, pois a adição de aflatoxina na dieta provoca um marcante efeito na redução do ganho de peso e do consumo alimentar, resultando, muitas vezes, em conversões alimentares similares. Desta forma, as principais variáveis a serem consideradas devem ser o peso vivo, o ganho de peso e o consumo de ração, sendo a conversão alimentar analisada

como um critério posterior ou de desempate na avaliação de múltiplos produtos.

CONCLUSÕES

A adição de 1,01 ppm de AFB₁ na dieta dos frangos de corte no presente estudo foi capaz de alterar negativamente o peso vivo, ganho de peso e consumo de ração a partir dos 7 dias de idade, e nas mesmas condições experimentais a adição do AAM (PCL 0,2%) reverteu tais efeitos. Mais estudos devem ser realizados acerca do assunto a fim de esclarecer a ação destes tipos de AAM no organismo animal, e sua capacidade de adsorção às diversas micotoxinas.

Agradecimento. Ao CNPq pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albino L.F.T., Feres F.A., Dionizio M.A., Rostagno H.S., De Vargas Júnio R.J.G., Carvalho D.C.O., Gomes P.C. & Costa C.H.R. Uso de prebiótico à base de mananoligossacarídeo em rações para frangos de corte. *Rev. Bras. Zootec.*, 35:742-749, 2006.
- Almeida A.V.A.F., Botura M.B., Abreu R.D., Bittencourt T.C.C. & Batatinha M.J.M. Ocorrência de aflatoxinas em milho destinado à alimentação de aves no Estado da Bahia. *Arq. Inst. Biol.*, 76:353-358, 2009.
- Aravind K.L., Patil V.S., Devegowda G., Umakantha B. & Ganpule S.P. Efficacy of esterified glucomannan to counteract micotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters in broilers. *Poult. Sci.*, 82:571-576, 2003.
- Benites V., Gilharry R., Gernat A.G. & Murillo J.G. Effect of dietary mannan oligosaccharide from Bio-Mos or SAF-Mannan on live performance of broiler chickens. *J. Appl. Poult. Res.*, 17:471-475, 2008.

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 13 de 24 mai. 2006. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 25 mai. 2006, Seção 2, p.6.
- Çelýk K., Denlý M. & Savas T. Reduction of toxic effects of aflatoxin by using baker yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in growing broiler chicken diets. *R. Bras. Zootec.*, 32:615-619, 2003.
- Flemming J.S. & Freitas R.J.S. Avaliação do efeito de prebióticos (MOS), probióticos (*Bacillus licheniformes* e *Bacillus subtilis*) e promotor de crescimento na alimentação de frangos de corte. *Arch. Vet. Sci.*, 10:41-47, 2005.
- Giacomini L., Fick F.A., Dilkin P., Mallmann C.A., Rauber R.H. & Almeida C. Desempenho e plumagem de frangos de corte intoxicados por aflatoxinas. *Cienc. Rur.*, 36:234-239, 2006.
- Gibson G.R. & Roberfroid B.M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, 125:1401-1412, 1995.
- Lopes J.M., Rutz F., Mallmann C.A. & Toledo G.S.P. Adição de bentonita sódica como adsorvente de aflatoxinas em rações de frangos de corte. *Cienc. Rur.*, 36:1594-1599, 2006.
- Magnoli C. Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds from Argentina. *Mycopathologia*, 142:27-32, 1998.
- Miazzo R., Peralta M.F., Magnoli C., Salvano M., Ferrero S., Chiacchiera S.M., Carvalho E.C.Q., Rosa, C.A.R. & Dalcero A. Efficacy of sodium bentonite as a detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin and fumonisin. *Poult. Sci.*, 84:1-8, 2005.
- Mídio A.F. & Martins D.I. *Toxicologia de Alimentos*. São Paulo, Varela, 2000. 295 p.
- Roll V.F.B., Lopes L.L., Rossi P., Anciuti M.A., Rutz F., Xavier E.G. & Silva S.S. Hematologia de frangos alimentados com dietas contendo aflatoxinas e adsorventes de aflatoxinas. *Arch. Zootec.*, 59:93-101, 2010.
- Rosmaninho J.F., Oliveira C.A.F. & Bittencourt A.B.F. Efeitos da micotoxicoses crônicas na produção avícola. *Arq. Inst. Biol.*, 68:107-114, 2001.
- Salle C.T.P., Lorenzini G., Sfoggia M., Cé M.C., Guahyba A.S., Moraes H.L.S., Nascimento V.P. & Salle F.O. Presença de aflatoxinas em fígados de frangos de corte criados a campo. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, 29:101-106, 2001.
- Samson R.A., Van Reenen-Hoekstra E.S., Frisvad J.C. & Filtenborg O. *Introduction to Food and Airborne Fungi*. 6^a ed., The Netherlands, Centraalbureau Voor Schimmelcultures, 2000. 388 p.
- Santin E., Paulillo A.C., Krabbe E.L., Alessi A.C., Polveiro W.J.C. & Maiorka A. Low level of aflatoxina in broiler at experimental conditions. Use of cell wall yeasts as adsorbent of aflatoxin. *Arch. Vet. Sci.*, 8:51-55, 2003.
- Sassahara M., Yanaka E.K. & Netto D.P. Ocorrência de aflatoxina e zearalenona em alimentos destinados ao gado leiteiro na Região Norte do Estado do Paraná. *Semina: Cienc. Agr.*, 24:63-72, 2003.
- Shotwell O.L., Hesseltine C.W., Stubblefield R.D. & Sorenson W.G. Production of aflatoxin on rice. *Appl. Microbiol.*, 14:425-428, 1966.