

## 铜离子抑制作用下的硝化菌群 *amoA* mRNA 动态特征

王峰<sup>1</sup>, 刘易<sup>2</sup>, 杨海真<sup>1</sup>

(1. 同济大学 长江水环境教育部重点实验室, 上海 200092; 2. 上海环境保护有限公司, 上海 200233)

**摘要:** 研究考察了不同质量浓度  $\text{Cu}^{2+}$  离子 (10, 20, 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 对活性污泥硝化菌群活性的抑制作用, 采用 RNA 反转录结合 Real-Time PCR (实时聚合酶链式反应) 定量测定技术, 分析了受到金属离子抑制后, 硝化菌群在短期内 (10 h) 氨单加氧酶编码信息核糖核酸 (ammonia mono-oxygenase encoding messenger ribonucleic acid, *amoA* mRNA) 的受抑变化特征, 结果表明  $\text{Cu}^{2+}$  可以显著抑制活性污泥硝化菌群的 *amoA* mRNA 水平, 且抑制程度随金属离子浓度的升高而增强. *amoA* mRNA 显著抑制出现的时间要先于硝化速率抑制. 抑制作用在从 *amoA* mRNA 传导至代谢活性存在一定的滞后时间, 根据实验结果推断 *amoA* mRNA 合成受抑可能是  $\text{Cu}^{2+}$  生物硝化抑制的分子途径之一.

**关键词:**  $\text{Cu}^{2+}$ ; 生物硝化抑制; *amoA* mRNA

**中图分类号:** X 172

**文献标识码:** A

### Character of *amoA* mRNA During Nitrifying Inhibition by $\text{Cu}^{2+}$

WANG Feng<sup>1</sup>, LIU Yi<sup>2</sup>, YANG Haizhen<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Yangtze Aquatic Environment of the Ministry of Education, Tongji University, Shanghai 200092, China; 2. Shanghai Environmental Protection Limited Company, Shanghai 200233, China)

**Abstract:** The profile of ammonia mono-oxygenase encoding messenger ribonucleic acid (*amoA* mRNA) was examined due to inhibition by  $\text{Cu}^{2+}$  (10, 20, 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) during a short reaction period (10-hour). The test was performed by several continuously fed nitrification reactors and the real-time reverse transcription-PCR method was applied to detect change character of *amoA* mRNA. The  $\text{Cu}^{2+}$  could affect *amoA* mRNA copies in activated sludge, and higher concentration of  $\text{Cu}^{2+}$  would lead to more inhibition for *amoA* mRNA level. The decrease of *amoA* mRNA was more early observed before decrease of nitrifying rate. After mRNA inhibition happened, a lagging time prior to notable decrease in

nitrifying rate was detected. So the nitrification inhibition was likely performed through impact on transcription of *amoA* mRNA by  $\text{Cu}^{2+}$ .

**Key words:**  $\text{Cu}^{2+}$ ; nitrification inhibition; *amoA* mRNA

目前环境工程分子生物学分析方法大多基于总脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 或核糖体核糖核酸 (ribosomal ribonucleic acid, rRNA) 设计, 但两种大分子结构较为稳定, 往往只能反映运行参数长期影响下菌群的群落结构变化. 而信息核糖核酸 (messenger ribonucleic acid, mRNA) 半衰期短, 是细胞内蛋白质合成的调控点之一, 直接决定了相关功能酶的合成, 因此, 相比基于 rRNA 的分析方法, 针对 mRNA 的测定可以反映微生物生理功能的快速变化<sup>[1-2]</sup>. 氨单加氧酶 (ammonia mono-oxygenase, *amoA*) 基因是硝化菌群的关键代谢功能基因, 针对 *amoA* 基因的研究已经广泛应用于硝化细菌的鉴别和分类学分析<sup>[3-4]</sup>, 但是基于废水处理硝化细菌氨单加氧酶编码信息核糖核酸 (ammonia mono-oxygenase encoding messenger ribonucleic acid, *amoA* mRNA) 特征的研究尚处于方法学探讨阶段, 初步的研究结果证实了污水处理过程中实现 mRNA 原位监测的可行性, *amoA* mRNA 与硝化群落代谢活性之间具有相关性<sup>[5-6]</sup>.

本文研究目的在于利用反转录结合实时聚合酶链式反应 (real-time polymerase chain reaction, Real-Time PCR) 定量技术, 测定金属离子抑制过程中, 硝化菌群的原位变化信息, 探讨活性污泥中硝化菌群的 mRNA 受抑特征, 推测和分析主要功能基因 mRNA 在金属离子硝化抑制过程中的作用, 以期进一步丰富污水处理系统的生物硝化作用机理.

收稿日期: 2010-01-14

基金项目: 国家科技支撑基金资助项目 (2009BAC57B01); 长江水环境教育部重点实验室自主课题资助 (YRWEY1006)

第一作者: 王峰 (1978—), 男, 工学博士, 主要研究方向为环境工程和环境评价. E-mail: hjwangfeng@tongji.edu.cn

## 1 实验方法

### 1.1 金属离子影响实验

硝化富集反应器(图1)用于驯化培养抑制试验所需硝化活性污泥,有效容积为30 L,序批式运行,运行周期12 h,具体安排为:曝气11 h、沉淀30 min、排水15 min、进水15 min,污泥泥龄控制在40 d,反应器污泥质量浓度控制在 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .富集培养基组成: $\text{NH}_4\text{Cl}$   $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , $\text{NaHCO}_3$   $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , $\text{CaCl}_2$   $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .反应器富集60 d后达到并继续保持稳定运行.富集污泥用于金属离子的抑制试验,每次盐离子影响实验开始前均从富集反应器取适量的硝化富集污泥经过滤、沉淀、清洗、收集后待用.

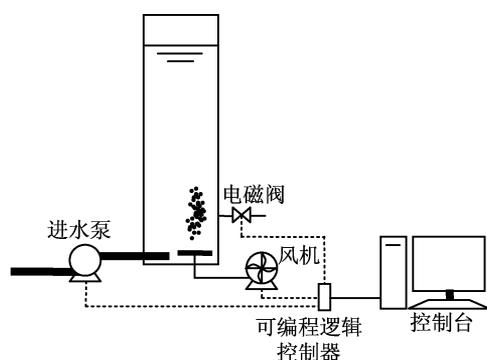


图1 硝化活性污泥富集反应器

Fig.1 Bioreactor construction for accumulation of ammonia oxidizing bacteria

金属离子影响实验在有效容积约1.5 L的完全混合连续流反应器中进行,整个实验室温度控制在 $20^\circ\text{C}$ 左右,溶解氧大于 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,进水组成与富集实验相同.将硝化富集污泥加入到反应器中,污泥质量浓度(SS)控制在 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右,抑制试验开始前系统预运行约2 h,抑制试验开始时刻采用高浓度的 $\text{CuCl}_2$ 溶液将抑制组反应体系快速调节至10,20,50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,并同时切换进水(进水中 $\text{Cu}^{2+}$ 分别为10,20,50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),以保持抑制反应器的 $\text{Cu}^{2+}$ 质量浓度基本稳定在设定值,抑制试验时间约为10 h.此过程中,空白对照组运行条件不变.

### 1.2 总RNA提取

每次从抑制实验反应器中提取2 mL活性污泥离心后取污泥沉淀用于总脱氧核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)的提取.总RNA的提取采用上海生工生物技术公司的环境样品RNA提取试剂盒,提取后的RNA保存在TE缓冲溶液( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl

pH 8.0,  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA(乙二胺四乙酸)pH 8.0)中,为避免样品的降解,提取好的总RNA迅速进行测定.

### 1.3 反转录分析

采用随机引物将提取的RNA反转录为互补单链核酸(complementary DNA, cDNA),20  $\mu\text{L}$ 反应体系含有:2  $\mu\text{L}$ 总RNA模板,2  $\mu\text{L}$ 10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP三磷酸脱氧核苷溶液,1  $\mu\text{L}$  RNase核糖核酸酶抑制剂,4  $\mu\text{L}$ 5 $\times$ 缓冲液,1  $\mu\text{L}$ 10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 随机引物,1  $\mu\text{L}$ 反转录酶(1个单位),9  $\mu\text{L}$ 去RNA纯水.转录反应条件:30 $^\circ\text{C}$  10 min,42 $^\circ\text{C}$  30 min,99 $^\circ\text{C}$  5 min,4 $^\circ\text{C}$  5 min.

### 1.4 Real-Time RT-PCR定量分析

利用Real-Time PCR方法定量测定反转录出的cDNA拷贝,采用宝生物工程(大连)有限公司Real-Time PCR试剂盒.引物采用 $\text{amoA}$ -1F(正向)和 $\text{amoA}$ -2R(反向)<sup>[4]</sup>,分别对应 $\text{amoA}$ 基因332~349及802~822碱基位<sup>[7]</sup>.采用25  $\mu\text{L}$ 反应体系(2.5  $\mu\text{L}$ 10 $\times$  PCR缓冲液,2.5  $\mu\text{L}$ 10 $\times$  SYB Green I染料,2.0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4$ ,10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP,10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物,1  $\mu\text{L}$ 待测模板或标准模板).标准曲线采用菌株*Nitrosomonas europaea*(美国模式培养物集存库编号ATCC 19718)培养后核酸提取物的PCR产物纯化后进行制备,建立的方法见文献<sup>[8]</sup>.

### 1.5 硝化速率测定及数据处理

试验中以相对硝化速率和相对 $\text{amoA}$  mRNA水平来分析系统的动态变化.各组试验中以实验初始测定值作为参照,不同时刻硝化速率和mRNA拷贝数测定值参照值对照计算相对硝化率和相对mRNA丰度.其中抑制反应硝化率的计算采用进出水氨氮差值法,具体计算为:硝化率=(氨氮<sub>进水</sub> - 氨氮<sub>出水</sub>)/氨氮<sub>进水</sub>.其中,氨氮<sub>进水</sub>和氨氮<sub>出水</sub>指进水和出水的氨氮浓度.

## 2 实验结果

$\text{amoA}$ 基因是控制生物硝化反应酶生成的关键基因.抑制实验主要通过测定活性污泥硝化菌群 $\text{amoA}$  mRNA水平和硝化活性变化,探索重金属对生物硝化抑制的分子作用途径.在3种浓度的 $\text{Cu}^{2+}$ 作用下,各抑制组反应器 $\text{Cu}^{2+}$ 离子浓度变化显示在图2中,活性污泥相对mRNA丰度和相对硝化速率分别显示在图3和图4中.图3中“空白对照”是指没有添加铜离子的样品测试得到的mRNA浓度(下同).根据衰减特征,采取Rational函数 $y = 1/(1 +$

$k_1 t + k_2 t^2$ )对数据进行拟合. 初始段(4 h)相对硝化速率抑制现象不明显, 因此采取分段拟合. 根据拟合方程, 计算在测试时间段(10 h)内, 相对 mRNA 拷贝和相对硝化速率下降到最低值的 50% 所需的时间  $t_{1/2}$ , 结果见表 1.

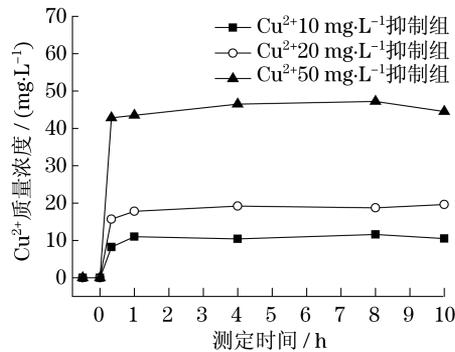


图 2 各抑制组  $\text{Cu}^{2+}$  离子浓度

Fig.2 Level of  $\text{Cu}^{2+}$  concentration for inhibition group

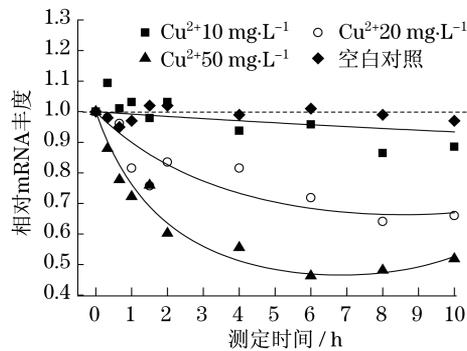


图 3 *amoA* mRNA 相对初始的丰度变化

Fig.3 Relative *amoA* mRNA level versus start for inhibition and control group

反应开始后硝化功能基因的 mRNA 水平都出现了逐渐的下降. 在 10, 20 和 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{Cu}^{2+}$  作用下, 根据拟合方程计算, 在测试时段(10 h)内, mRNA

水平下降到最大抑制 50% 的时间  $t_{1/2}$  分别为 4.52, 1.88 和 1.19 h. 受试  $\text{Cu}^{2+}$  质量浓度越高,  $t_{1/2}$  也越

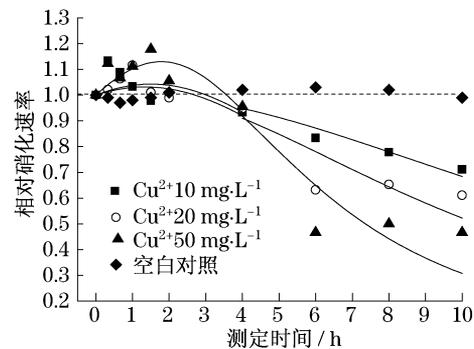


图 4 相对初始时刻的硝化速率变化

Fig.4 Relative nitrifying rate versus start for inhibition and control group

小, 意味着显著抑制出现的时间越早. 金属离子浓度与 mRNA 抑制水平之间也表现出一定的正相关, 金属离子质量浓度越高, mRNA 水平下降的趋势也越加明显.

在实验开始前 4 h, 10, 20, 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$  作用下的相对硝化速率测定均值分别为: 1.024, 1.021 和 1.070, 考虑到测量误差的影响, 可以认为在初始 4 h 内, 硝化速率受到的抑制并不明显. 比较相对硝化速率和相对 mRNA 水平的  $t_{1/2}$ , 也可以反映显著抑制作用出现的早晚. 在本实验的 3 种  $\text{Cu}^{2+}$  质量浓度条件下, 相对硝化速率的  $t_{1/2}$  都大于相应的相对 mRNA 拷贝的  $t_{1/2}$  (表 1), 各测试浓度下  $t_{1/2}$  的差距分别为: 2.15 h (10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$ ), 4.40 h (20  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$ ) 和 4.78 h (50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$ ). 结果表明金属离子对硝化菌群活性的显著抑制现象均晚于 mRNA 抑制出现, 并且这种“滞后”程度随着抑制作用的加强而扩大.

表 1 拟合结果及相对半抑制时间

Tab.1 Curve fitting and half-inhibiting time during study

	抑制质量浓度 ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	相对最低值的 半衰减时间 $t_{1/2}/\text{h}$	拟合方程
相对 mRNA 拷贝	10	4.52	$y = 1/(1 + 0.00797t - 0.00009t^2)$
	20	1.88	$y = 1/(1 + 0.11849t - 0.00691t^2)$
	50	1.19	$y = 1/(1 + 0.33631t - 0.02465t^2)$
相对硝化速率	10	6.67	$y = 1/(1 - 0.04525t + 0.01675t^2)$ ( $t < 4$ h) $y = 1/(1 - 0.00804t + 0.00543t^2)$ ( $t \geq 4$ h)
		6.28	$y = 1/(1 - 0.05414t + 0.01795t^2)$ ( $t < 4$ h) $y = 1/(1 - 0.01961t + 0.01109t^2)$ ( $t \geq 4$ h)
	20	5.97	$y = 1/(1 - 0.12877t + 0.03609t^2)$ ( $t < 4$ h) $y = 1/(1 - 0.11285t + 0.03381t^2)$ ( $t \geq 4$ h)
		5.97	$y = 1/(1 - 0.12877t + 0.03609t^2)$ ( $t < 4$ h) $y = 1/(1 - 0.11285t + 0.03381t^2)$ ( $t \geq 4$ h)

### 3 讨论

硝化细菌较为敏感,包括重金属在内的很多物质都能对硝化菌群的代谢和群落结构造成显著的影响<sup>[9-11]</sup>. 目前的研究证实不同重金属形态对于生物硝化作用存在显著区别,其中游离态金属离子是造成生物硝化抑制的主要原因<sup>[6]</sup>. 本实验验证了游离  $\text{Cu}^{2+}$  浓度和硝化抑制效果间具有相关性,在系统生物量不变的条件下,硝化抑制水平随着金属离子浓度的升高而提高.

本文的主要目的在于进一步研究重金属离子对生物硝化抑制的分子作用途径,验证 mRNA 用于指示重金属短期硝化抑制作用的有效性. 抑制实验显示在 3 种  $\text{Cu}^{2+}$  质量浓度的作用下, mRNA 的下降与硝化代谢活性之间有正相关性. 此外,通过拟合方程的计算也表明在 mRNA 抑制过程中存在“效应滞后时间”,即从 mRNA 显著抑制出现到硝化代谢功能抑制出现之前,存在一定的时间间隔. 在抑制作用时间 10 h 的条件下,半抑制时间间隔为 2.15 h ( $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ), 4.40 h ( $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ) 和 4.78 h ( $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ). 推测这种现象可能的作用过程为: 重金属进入细胞后首先对 *amoA* mRNA 的合成形成干扰和阻断,导致细胞内 mRNA 的丰度逐步降低,逐渐影响到氨单加氧酶的转录合成,造成氨单加氧酶正常消耗和衰变后不能补充至正常水平,功能酶的浓度下降逐步影响到生物硝化反应的速率. 同时,这一结果也表明细菌的表观活性与 mRNA 水平之间可能存在缓冲期,若能在 mRNA 抑制之初就对系统进行及时的调整,可缓解系统受到冲击的程度.

结合硝化菌群基因 mRNA 的研究报道和本文的结果,可以推测,对于一个稳定的污水生物处理系统而言,生物硝化反应受抑可能具有多种作用途径. 生物酶的转录、合成以及酶反应的各个环节都可能是硝化抑制的潜在作用点,硝化抑制的类型可能包括: 基因 mRNA 的合成抑制、基因 mRNA 的转录抑制、酶生化反应过程抑制. 在一个具体的反应系统中,很可能是单一抑制作用也可能是多种抑制综合作用的结果. 对于基因 mRNA 的合成抑制,在此前研究已有一些类似的发展,如有报道溶解氧对生物硝化的抑制可能涉及到 mRNA 抑制环节<sup>[12]</sup>,同时,缺乏铵离子的“饥饿环境”也能显著抑制硝化菌群的 mRNA 水平<sup>[5]</sup>. 本文的实验结果则表明  $\text{Cu}^{2+}$  短期硝化抑制行为也可能是通过基因 mRNA 抑制环节进行的.

### 4 结论

$\text{Cu}^{2+}$  可以显著抑制活性污泥硝化菌群的 *amoA* mRNA 水平,且抑制程度随金属离子浓度的升高而增强. 在本实验浓度范围内(最高  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), *amoA* mRNA 显著抑制出现的时间要先于硝化抑制. 基因 mRNA 受抑可能会传导至硝化代谢,这一过程存在一定的滞后效应. 通过抑制关键基因 mRNA 可能是重金属离子抑制生物硝化的途径之一.

#### 参考文献:

- [1] Sinigaliano C D, Kuhn D N, Jones R D. Amplification of the *amoA* gene from diverse species of ammonium-oxidizing bacteria and from an indigenous bacterial population from seawater[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(7):2702.
- [2] Purkhold U, Pommerening A, Juretschko S, et al. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(12):5368.
- [3] Rotthauwe J H, Boer W, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker, molecular fine scale analysis of natural ammonia oxidizing populations [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(12):4704.
- [4] Hoshino T, Noda N, Tsuneda S, et al. Direct detection by in situ PCR of the *amoA* gene in biofilm resulting from a nitrogen removal process[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(11):5261.
- [5] Aoi Y, Masaki S, Tsuneda S, et al. Quantitative analysis of *amoA* mRNA expression as a new biomarker of ammonia oxidation activities in a complex microbial community [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2004, 39(6):477.
- [6] Agnieszka C, Slawomir C, Irena W B. Bacterial *amoA* and 16S rRNA genes expression in activated sludge during aeration phase in sequencing batch [J]. *Polish Journal of Natural Science*, 2007, 22(2):246.
- [7] McTavish H, Fuchs J A, Hooper A B. Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(8):2436.
- [8] Wang F, Xia S Q, Liu Y, et al. Community analysis of ammonia and nitrite oxidizers in start-up of aerobic granular sludge reactor [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2007, 19(8):996.
- [9] Aoi Y, Shiramasa Y, Masaki Y, et al. Expression of *amoA* mRNA in wastewater treatment processes examined by competitive RT-PCR[J]. *J Biotech*, 2004, 111(2):111.
- [10] Ebie Y, Noda N, Miura H, et al. Comparative analysis of genetic diversity and expression of *amoA* in wastewater treatment

- processes[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 64(5): 740.
- [11] Araki N, Yamaguchi T, Yamazaki S, et al. Quantification of amoA gene abundance and their amoA mRNA levels in activated sludge by real-time PCR[J]. Water Sci Technol, 2004, 50(8): 1.
- [12] Kim K T, Kim I S, Seok H H, et al. Estimating the combined effects of copper and phenol to nitrifying bacteria in wastewater treatment plants[J]. Water Research, 2006, 40(3): 561.

(上接第 856 页)

标来划分城市道路的等级,并且建立了一套严格的具有可操作性的技术流程,因而能够更为准确地区分各条道路在路网结构中的地位与功能,其分析结果也具有可重复性和一致性.因此,计算分级法的结论可以作为道路分级过程中的重要参考.

参考文献:

- [1] Marshall S. Streets and patterns: the structure of urban geometry[M]. London: Spon Press, 2005. 1 - 7.
- [2] 李朝阳,王新军,贾俊刚.关于我国城市道路功能分类的思考[J].城市规划汇刊,1999,4:39.  
LI Chaoyang, WANG Xinjun, JIA Jungang. On functional classification of urban roads in China[J]. Urban Planning Forum, 1999, 4: 39.
- [3] 文国玮.城市道路与交通系统规划[M].北京:清华大学出版社,2001. 45 - 47.  
WEN Guowei. Urban road and traffic system planning[M]. Peking: Tsinghua University Press, 2001. 45 - 47.
- [4] A ASHTO. A policy on geometric design of highways and streets[M]. Washington D C: [s. n.], 2004. 1 - 15.
- [5] Marshall S. Building on buchanan: evolving road hierarchy for today's streets-oriented design agenda [C]//European Transport Conference 2004. Strasbourg: PTRC, 2004: 1 - 16.
- [6] Sergio Porta, Paolo Crucitti, Vito Latora. The network analysis of urban streets: a primal approach [J]. Environment and Planning B: Planning and Design, 2006, 33: 705.
- [7] Sergio Porta, Paolo Crucitti, Vito Latora. The network analysis of urban streets: a dual approach [J]. Physics A, 2006, 369(2): 853.
- [8] Thomson R C, Richardson D E. The "good continuation" principle of perceptual organization applied to the generalization of road networks [C]// Proc 19th Int Cartographic Conf. Ottawa: [s. n.], 1999: 1215 - 1223.
- [9] Bill Hillier. Space is the machine: a configurational theory of architecture[M]. London: Cambridge University Press, 1996. 149 - 181.
- [10] Alasdair Turner. From axial to road-centre lines: a new representation for space syntax and a new model of route choice for transport[J]. Environment and Planning B: Planning and Design, 2007, 34: 539.
- [11] Thomson R C. Bending the axial line: smoothly continuous road centre-line segments as a basis for road network analysis[C]// Proceedings of the 4th International Symposium. London: University College London, 2003, 2: 50. 1 - 50. 10.
- [12] 叶彭姚.城市道路网结构特性研究[D].上海:同济大学交通运输工程学院,2008.  
YE Pengyao. Research on structure characteristics of urban road and street network [D]. Shanghai: Tongji University. College of Transportation Engineering, 2008.