

一株邻苯二甲酸二异辛酯高效降解菌的 筛选及其降解特性的初步研究

秦 华^{1,2,3}, 林先贵^{1,2}, 尹 睿^{1,2}, 张华勇^{1,2}, 陈瑞蕊^{1,2}, 王俊华^{1,2}

(1.中国科学院南京土壤研究所, 江苏 南京 210008; 2.南京土壤研究所-香港浸会大学土壤与环境联合开放实验室, 江苏 南京 210008; 3.中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘 要:从某化工厂的活性污泥中分离到一株能高效降解 DEHP(邻苯二甲酸二异辛酯)的细菌 DW1,该菌株能够以 DEHP为惟一碳源和能源生长。根据革兰氏染色的结果以及其形态特征、生理生化特性等对该菌株进行菌种鉴定,初步鉴定该菌株为纤维单胞菌属(*Cellulomonas sp.*),并对该菌株的 DEHP 降解特性进行了初步研究。研究表明,菌株 DW1 可以耐受较高浓度的 DEHP,在 7 d 的时间内对摇瓶中 2 000 mg·L⁻¹ 的 DEHP 降解率达到 96%,其降解 DEHP 的最适温度和 pH 值分别是 30℃和 8.0。菌株对 DEHP 的降解曲线显示,经过短暂的延滞期后培养基中 DEHP 的降解很快就进入了对数期,在第 3 d 降解率即可达到 89%,菌体生长量在第 5 d 进入稳定期。研究了添加土壤浸液对菌株 DW1 降解 DEHP 的影响,结果表明,添加少量的外来碳源可以刺激微生物的生长并提高了 DEHP 的降解率,但过多的外加碳源减缓了细菌对 DEHP 的降解。

关键词:邻苯二甲酸二异辛酯; 微生物降解; 纤维单胞菌属; 土壤浸液

中图分类号:X172 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2005)06-1171-05

Isolation and Degradation Characters of A DEHP Degrading Bacterial Strain

QIN Hua^{1,2,3}, LIN Xian-gui^{1,2}, YIN Rui^{1,2}, ZHANG Hua-yong^{1,2}, CHEN Rui-rui^{1,2}, WANG Jun-hua^{1,2}

(1. Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2. Joint Open Laboratory of Soil and Environment, Institute of Soil Science and Hongkong Baptist University, Nanjing 210008, China; 3. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Banjing 100039, China)

Abstract: A bacterial strain DW1 that could degrade DEHP was isolated from activated sludge of wastewater treatment plant from a chemical factory. DW1 could take DEHP as sole carbon and energy resources, and was identified to be *Cellulomonas sp.* based on its morphology, physiological and biochemical properties. DW1 could endure high concentration of DEHP and in flask test degraded 96% of 2 000 mg·L⁻¹ of the DEHP within a week of incubation in a shaking incubator. The optimal pH and temperature for the growth of DW1 and the degradation of DEHP was 8.0 and 30℃, respectively. The degradation curve of DEHP by DW1 showed that after a short lag phase, the degradation entered exponential phase and the degradation rate reached 89% in 3 days, microbial populations also entered the stationary phase after 5 days. The effect of soil extract to DEHP degradation by DW1 was studied also. Adding a little amount of carbon resource accelerated the growth of microorganisms and the degradation of DEHP, but overusing them would delay the degradation of DEHP.

Keywords: DEHP; microbial degradation; *Cellulomonas*; soil extract

邻苯二甲酸二异辛酯(di-(2-ethylhexyl) phtha-

late, DEHP) 主要作为增塑剂和软化剂被用于聚氯乙烯等的生产,约占增塑剂总量的 80%~85%,在终产品中含量可达到 50%左右。另外也用于油漆及化妆品等的生产。DEHP 不但成为土壤、大气和水体中常被检出的持久性污染物,而且也对食品、油脂以及饮用

收稿日期:2005-03-04

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(40101015)

作者简介:秦 华(1981—),男,江苏泰兴人,硕士研究生,主要从事环境微生物学研究。

联系人:林先贵 E-mail: xglin@issas.ac.cn

水等形成了污染^[1]。已有研究表明 DEHP 可以致癌并具有较强的生殖毒性,尤其会导致雄性哺乳动物的睾丸受损,另外还具有致畸性和胚胎毒性。因此美国国家毒理规划署(NTP)以及中国国家环保总局都已将其列为环境优先控制污染物。研究 DEHP 的生物降解对于保护生态环境和人类健康具有十分重要的意义。

尽管 DEHP 可以被缓慢地水解和光解,但微生物的降解作用被认为是其从自然环境中消除的主要途径。目前,国内外已经就 DEHP 的微生物降解做了大量的工作,主要包括高效降解菌株的筛选和降解动力学研究、以及酶促降解性和降解途径等方面^[2,3]。纤维单胞菌属(*Cellulomonas*)很早就被发现具有产生纤维素酶以及溶解角质素等特性而广泛应用于纤维素的降解^[4],也有研究表明其可以对甲苯起到降解的作用^[5],但迄今尚未发现其对 DEHP 具有降解作用的报道。本实验室从某化工厂的污水处理车间的活性污泥中分离到一株能高效降解 DEHP 的菌株 DW1,初步鉴定其属于纤维单胞菌属,并对该菌株的 DEHP 降解特性进行了初步的研究。

1 材料和方法

1.1 试剂和器材

DEHP 购自苏州工业园区振兴化工研究院,含量 $\geq 98.5\%$,DEHP 标准品购自 Chem Service Inc.(美国)。石油醚($60^{\circ}\text{C}\sim 90^{\circ}\text{C}$)(分析纯)杭州炼油厂生产,丙酮和二氯甲烷(分析纯)南京化学试剂厂生产,使用前都经重蒸。在 DEHP 提取和分析过程中所接触的所有玻璃器皿都必须先用洗液洗涤,置 300°C 烘箱过夜,冷却后分别用丙酮和石油醚淋洗,使用前风干。

气相色谱仪购自美国惠普公司,型号为 Hewlett-Packard 5890 II。

1.2 样品来源及菌株筛选

试验样品取自某化工厂的污水处理车间。污泥样品按 10%接种量接种于 100 mL 添加 $2\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ DEHP 作为惟一碳源的无机盐培养基中, 30°C 、 $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床振荡培养 1 周,取样测定 DEHP 的降解情况。以后每周转接 1 次,以 1%的接种量接入新鲜培养基中,如此重复 5 次。最后取富集液经适当稀释后,采用划线法利用 DEHP 培养基平板分离得到单菌落,选择水解透明圈较大的单菌落进一步划线分离纯化,直至得到纯的单菌落。

无机盐培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5 g, NaCl 0.5 g, KH_2PO_4 1.5 g, K_2HPO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, 1 000

mL H_2O , pH 7.0。

LB 培养基:蛋白胨 10 g, 酵母膏 5 g, NaCl 10 g, 1 000 mL H_2O , pH 7.0。

固体培养基加入 2.0%的琼脂。

1.3 细菌生理生化特性测定

细菌生长量以光吸收值 OD_{600} 表示。在 LB 固体培养基上观察菌落的形状,并在显微镜下观察菌体形态,有无鞭毛以及芽孢。细菌鉴定参照文献[6]。以 LB 培养基为基础,革兰氏染色以及碳源利用等指标参照文献[7]对菌株进行生理生化试验。

1.4 菌株悬液的制备及接种

接种一环菌体到装有 5 mL LB 液体培养基的试管中, 30°C 、 $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养 24 h, $8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 用灭菌的磷酸缓冲液重悬菌体, 调节 OD_{600} 为 0.5, 加 1 mL 细菌悬液至 100 mL 以 DEHP 为唯一碳源的无机盐培养基中,根据不同的试验条件恒温摇床培养。

1.5 土壤浸液的制备

取农田土壤(潮土,有机质 $6.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,全磷 $0.62\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,全氮 $0.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,全钾 $16.27\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,有效磷 $7.42\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,速效钾 $163.7\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, pH8.2), 风干,捣碎,过粗筛去掉植物残体。称取 400 g 于 2 L 容器,加蒸馏水 960 mL,在 121°C 下高压灭菌 1 h,静置过夜,滤纸过滤。滤液平均分装于 3 个小烧瓶中,在 121°C 下高压灭菌 20 min,室温放置 2 周,取上清液备用^[8]。

1.6 DEHP 的测定

1.6.1 样品处理

将在摇瓶中培养后的样品 100 mL 转移入分液漏斗,加入 20 mL 二氯甲烷振荡萃取 10 min,用 150 mL 三角瓶收集有机相(下相),分液漏斗中的水相再加入 20 mL 的二氯甲烷相同方法振荡萃取 3 次,合并有机相,加入少量经 550°C 烘干的无水 Na_2SO_4 干燥,吸取 10 mL 溶液至指形刻度试管中, N_2 吹干刻度试管中的二氯甲烷后用 10 mL 的石油醚将 DEHP 重新溶解, HP-5890 型气相色谱仪测定 DEHP 的含量^[9]。

1.6.2 气相色谱条件

色谱柱 HP-5(Crosslinked Methyl Silicone Gum $25\text{ m}\times 0.32\text{ mm}\times 0.25\text{ }\mu\text{m}$ film thickness, U.S.A), 柱温从 200°C 以 $8^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率升到 275°C ; 电子捕获检测器,温度 320°C ;进样口温度 250°C ,进样量 $1\text{ }\mu\text{L}$;载气 N_2 ,流速 $40\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;峰面积外标法定量,保留时间为 8.70 min,最低检测浓度为 $1.23\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2 结果

2.1 菌株的筛选及鉴定

2.1.1 样品的富集培养和菌株的分离纯化

污泥样品经过 5 次富集培养后,摇瓶中的混合培养物能够在含有 2 000 mg·L⁻¹ 的 DEHP 的培养基中很好的生长。经测定,培养基中的 DEHP 降解率已由最初的 73%提高到了 94%,说明降解菌株在此过程中得到了富集。摇瓶中的混合培养物通过在含有 DEHP 的平板上进行划线分离,挑取能产生较大水解圈的单菌落,经过复筛、纯化后筛选得到一株能以 DEHP 为惟一碳源和能源生长的菌株,命名为 DW1。

DW1 菌株在 DEHP 平板上 30℃恒温培养 3 d 后,菌落呈淡黄色、圆形、微凸、边缘整齐、湿润、不透明。显微镜下观察,细菌为直或稍弯的短杆菌(0.4~0.6 μm×2.0~5.0 μm),细胞单个或不规则群状出现,常呈 V 字形生长,不产生芽孢。

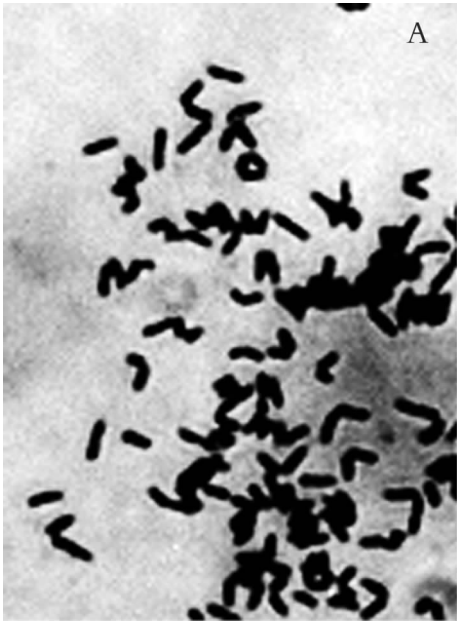


图 1 菌株 DW1 的光学显微镜照片(×1 000)
Figure 1 Optical microscopy of strain DW1 (×1 000)

2.1.2 细菌鉴定及生理生化特性

参照文献[6]、[7]研究了 DW1 的部分生理生化特性。菌株 DW1 接触酶阳性,细胞中可见到异染颗粒,能发酵葡萄糖产酸,还原硝酸盐到亚硝酸盐,其部分生理生化试验的结果如表 1。

对照《伯杰细菌鉴定手册》,结合细菌的形态以及生理生化特征初步鉴定菌株 DWI 属于纤维单细胞菌属(*Cellulomonas sp.*)。

表 1 DW1 部分生理生化特征
Table 1 Some physiological and biochemical properties of DW1

生理生化试验	表征
运动性	+
以唯一碳源利用:	
D-核糖	+
棉籽糖	—
L(+)-乳酸盐	—
乙醇	—
脯氨酸	—
从糊精产酸	+
以无机氮作为单一氮源	+
破坏纤维素	+

注:“+”表示反应呈阳性,“-”表示反应呈阴性。

2.2 菌株生长和 DEHP 的降解特性以及培养条件对其的影响

2.2.1 温度对菌株生长及 DEHP 降解率的影响

培养温度是影响微生物生长和 DEHP 降解的一个重要的环境因素,确定菌株生长和 DEHP 降解的最适温度对于充分发挥其作用提高降解效率有很大意义。接种 DW1 菌种悬液 (OD₆₀₀=0.5) 1 mL 于 100 mL 含 2 000 mg·L⁻¹ DEHP 的无机盐培养基中,分别在 20℃、25℃、28℃、30℃、35℃和 40℃下于 120 r·min⁻¹ 摇床振荡培养 1 周,取样测定菌体的生长量和 DEHP 的降解率,结果见图 2。

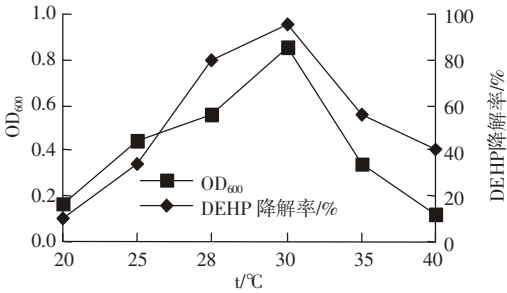


图 2 不同温度对菌株 DW1 生长及 DEHP 降解率的影响
Figure 2 Influence of temperature on the growth of strain DW1 and degradation of DEHP

图中可以看出,在以 DEHP 为惟一碳源的培养基中,培养温度对 DW1 菌株的生长和 DEHP 的降解都有显著的影响。在温度为 30℃的条件下振荡培养一周后,摇瓶中 DW1 菌体的生长量最大,测定表明此时 DEHP 降解率也最高,并且高于或低于这个温度都对菌株的生长量产生影响,同时菌株对 DEHP 的降解率也随着其生长量表现出相同的趋势。

2.2.2 初始 pH 值对细菌生长及 DEHP 降解率的影响

接种 DW1 菌种悬液 ($OD_{600}=0.5$)1 mL 于 100 mL 含 $2\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ DEHP 的无机盐培养基中, 初始 pH 值分别为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0℃, 于 30°C 、 $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下摇床振荡培养 1 周, 取样测定菌体的生长量和 DEHP 的降解率, 结果如图 3 所示。

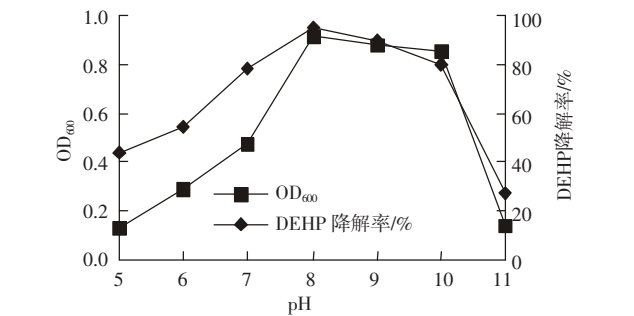


图 3 不同初始 pH 对菌株 DW1 生长及 DEHP 降解率的影响
Figure 3 Influence of original pH value on the growth of DW1 and degradation of DEHP

结果表明, 在 pH5.0~11.0 范围内, 细菌生长量随初始 pH 值升高先增加, 在初始 pH 为 8.0 时生长量最大, 但随着 pH 值的继续升高, 菌株生长量也随之减少, 初始 pH 超过 10.0 时, 其生长量显著减少, 当初 pH 为 11.0 时菌株几乎不能生长。DEHP 的降解率也随着初始 pH 值的升高而加大, 同样在初始 pH 为 8.0 时达到最大, 并且与菌株的生长量有很好的相关性, 在 pH8.0~10.0 之间均可以保持较高的降解率。由此可见, 菌株较适合在偏碱性的条件下生长, 而在碱性条件下的底物降解率也比较高, 初始 pH 值为 8.0 是细胞生长和 DEHP 降解的最适 pH 值, 在初始 pH 过高或过低的情况下无论是生长量还是对 DEHP 的降解率都明显地受到影响。

2.3 培养时间对细菌生长及 DEHP 降解率的影响

接种 DW1 菌种悬液 ($OD_{600}=0.5$)1 mL 于 100 mL 含 $2\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ DEHP、pH 为 8.0 的无机盐培养基中, 于 30°C 、 $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下摇床振荡培养。接种后每天取样, 测定菌体的生长量和 DEHP 的降解率, 结果见图 4。

图 4 表明, 菌株 DW1 对 DEHP 的降解有个短暂的延滞期, 随后很快就进入了对数期, 在细菌生长的对数期初期, 随着细胞开始快速增殖, 培养基中 DEHP 的降解率也随之急速上升, 在第 3 d 时降解率即可达 89%, 随后增长速度开始大大减缓, 说明菌株 DW1 在高浓度的 DEHP 胁迫下, 经过短暂的适应期后迅速诱导产生了大量的降解酶, 以减轻 DEHP 对细

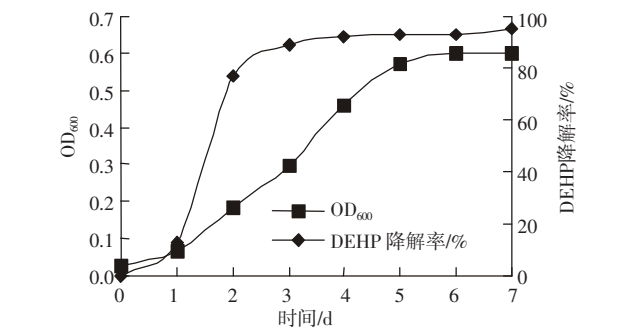


图 4 菌株 DW1 利用 DEHP 生长及其对 DEHP 降解的关系
Figure 4 Degradation of DEHP during cultivation of DW1

胞的毒害作用。菌体的生长量经过指数增长后期后在第 5 d 的时候也达到最大, 此时 DEHP 的降解率随时间的变化也趋于平稳, 可能是细胞更趋向于利用其降解产物的原因, 从总体上看 DEHP 的降解率与菌株的生长量基本保持同步。

2.4 土壤浸液对菌株 DW1 降解 DEHP 的影响

营养物质对污染物的降解具有重要的影响, 添加营养物质在一定浓度范围内可以大大促进菌株的降解性能, 而当浓度太高时反而不能降解底物了, 但也有研究表明, 添加土壤浸液等贫营养物质不能对微生物产生太大的影响^[8]。将土壤浸液加入到含有 DEHP ($2\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的无机盐培养基中 (pH8.0), 使其终浓度分别达到 0、5、10、50、100 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$, 然后以 1% 的接种量接入 DW1 菌种悬液 ($OD_{600}=0.5$), 于 30°C 、 $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下摇床振荡培养。根据 DEHP 的降解曲线, 选取第 3 d 时取样测定细菌的生长量以及 DEHP 的降解率以研究不同浓度的外加营养对其降解的影响, 结果如图 5 所示。

由图 5 可以看出, 添加土壤浸液对菌株的生长有显著影响, 表现出随土壤浸液添加量增加而菌株生长量增加的趋势。但添加土壤浸液对 DEHP 降解却并没

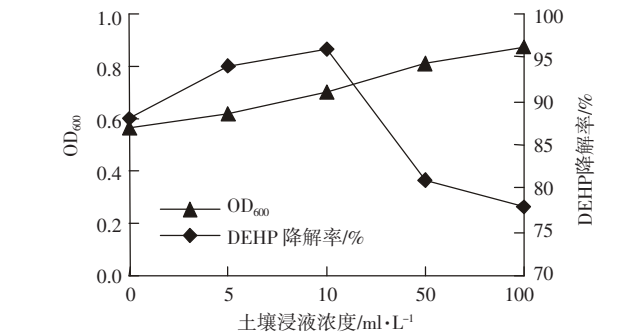


图 5 添加土壤浸液对 DEHP 降解的影响
Figure 5 Effect of soil extract on DEHP degradation by DW1

有表现出相同的趋势,只有在添加少量的土壤浸液时,可以提高 DEHP 的降解率,但当添加量持续加大时反而降低了降解率。

3 讨论

邻苯二甲酸酯的生物降解反应首先是由微生物酯酶作用水解生成邻苯二甲酸单酯,再生成邻苯二甲酸和相应的醇。在好氧条件下,邻苯二甲酸在加氧酶的作用下生成 3,4-二羟基邻苯二甲酸或 4,5-二羟基邻苯二甲酸后,形成原儿茶酸等双酚化合物,芳香环开裂形成相应的有机酸,进而转化成丙酮酸、琥珀酸、延胡索酸等进入三羧酸环,最终转化为 CO_2 和 H_2O ^[10]。但是邻苯二甲酸酯的生物降解性随烷基链的长短以及分枝侧链的增加而降低,这是由于随着分子量的增加,增大了对生物反应的位阻效应。研究表明长链的邻苯二甲酸酯如 DHP、DEHP 等远不如 DEP、DBP 等短链的容易降解^[11]。

筛选 DEHP 降解菌对于治理环境、食品及饮用水中的 DEHP 污染有重要意义,国内外已进行过一些研究。目前的研究资料表明,已筛选到的能降解 DEHP 的微生物菌株主要属于假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)^[12]、微球菌属 (*Micrococcus* sp.)^[13]、棒状杆菌属 (*Corynebacterium* sp.)、鞘胺醇单胞菌属 (*Sphigomonas* sp.)^[14]等等。本试验从活性污泥中分离得到的 DEHP 降解菌株 DW1 初步鉴定为纤维单胞菌属 (*Cellulomonas* sp.)。有关其更多的生物学性状以及与其它属的降解菌在降解 DEHP 方面的优劣还待进一步研究。

微生物对难降解有机污染物的利用与其环境中营养物质,特别是可利用碳源的多少有关。Margesin 等研究了肥料对降解菌在土壤中的降解活性的影响,发现肥料能明显促进微生物对土壤中柴油的降解^[15]。本文研究结果表明,添加土壤浸液虽然可以增加微生物的活性,提高其生长量,但却不能同步提高 DEHP 的降解率。主要原因可能是,在加入少量的外加碳源时,可以迅速增加细菌数量,但由于可利用碳源的迅速耗尽,微生物必需利用难利用的 DEHP,因而可以提高其降解率。但如果外加碳源浓度超过一定范围,由于加入的是容易被细菌利用的碳源,菌体会先利用这些碳源生长而很少利用环境中的 DEHP,因此虽然此时菌体生长量增加了,但 DEHP 的降解率反而大大降低。

4 结论

(1)本研究从某化工厂污水处理车间的活性污泥样品中分离到一株能够利用 DEHP 做为惟一碳源和能源生长的细菌 DW1,初步鉴定为纤维单胞菌属。

(2)菌株 DW1 降解 DEHP 的最佳条件是温度 30℃、pH8.0,在此条件下菌株能达到最大生长量和最高降解率,初始浓度为 2 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DEHP,经过 1 周的培养,降解率可达 96%。

(3)研究了贫营养物土壤浸液对菌株 DW1 降解 DEHP 的影响,在适当外加碳源的情况下,菌株的生长量以及对 DEHP 的降解率都有所提高。

参考文献:

- [1] Latini G. Potential hazards of exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate in babies[J]. *Biol Neonate*, 2000,78:269-276.
- [2] Feng Zeng, Kunyan Cui, Xiangdong Li, et al, Guoying Sheng. Biodegradation kinetics of phthalate esters by *Pseudomonas fluorescences* FS1[J]. *Process Biochemistry*, 2004,39:1125-1129.
- [3] Charles A S, Dennis R P, Thomas F P, et al. The environmental fate of phthalate esters: A literature review[J]. *Chemosphere*, 1997,35(4):667-749.
- [4] Noyola T P, Torre M. Isolation of a high-specific-growth-rate mutant of *Cellulomonas flavigena* on sugar cane bagasse[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1995,42(5):709-712.
- [5] Chao W L, Hsu S F. Response of the soil bacterial community to the addition of toluene and toluene-degrading bacteria [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004,36(3):479-487.
- [6] J G 霍尔特,刘复今,等译. 简明第八版伯杰细菌鉴定手册[M]. 山东: 山东大学出版社, 1988.
- [7] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [8] 刘 智,张晓舟,何 健,等. 营养物质及金属离子对 DLL-E4 菌降解对硝基苯酚的影响[J]. *土壤学报*, 2004,41(2):292-297.
- [9] 柴素芬,曾 锋,傅家谟,等. DEHP 的微生物降解性研究[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2000,39(4):57-60.
- [10] Eaton, R W, et al. Metabolism of Di-butyl Phthalate and Phthalic Acid by *Micrococcus* sp. Strain 12B[J]. *J Bacteriol*, 1982,151(48):6983-6988.
- [11] Chang B V, Yang C M, Cheng C H, et al. Biodegradation of Phthalate esters by two bacteria strains[J]. *Chemosphere*, 2004,55:533-538.
- [12] Nakazawa, Hayashi T E. Phthalate and 4-Hydroxyphthalate Metabolism in *Pseudomonas testosteroni*: Purification and Properties of 4,5-Dihydroxyphthalate Decarboxylase [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1978,36:264-269.
- [13] Eaton R W, Ribbons D W. Metabolism of Di-Butyl Phthalate and Phthalic Acid by *Micrococcus* sp. Strain 12B[J]. *J Bacteriol*, 1982,151:48-57.
- [14] Chang B V, Yang C M, Cheng C H, et al. Biodegradation of phthalate esters by two bacteria strains[J]. *Chemosphere*, 2004,55:533-538.
- [15] Margesin R, Schinner F. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001,67(7):3127-3313.