

Biološka denitrifikacija

Grgas, Dijana; Štefanac, Tea; Galant, Mirjana; Brozničević, Andrijana; Štrkalj, Anita; Landeka Dragičević, Tibela

Source / Izvornik: **Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam, 2021, 16, 28 - 34**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

<https://doi.org/10.31895/hcptbn.16.1-2.4>

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:115:633846>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-09**



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
METALURŠKI FAKULTET
UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF METALLURGY

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Metallurgy University of Zagreb - Repository of Faculty of Metallurgy University of Zagreb](#)





PREGLEDNI RAD / REVIEW

Biološka denitrifikacija

Biological denitrification

Dijana Grgas¹, Tea Štefanac¹, Mirjana Galant², Andrijana Brozinčević³, Anita Štrkalj⁴, Tibela Landeka Dragičević^{1*}

¹ Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

² Usluga odvodnja d.o.o., Šime Kurelića 22, 52000 Pazin, Hrvatska

³ Nacionalni park Plitvička jezera, Josipa Jovića 19, 53231 Plitvička Jezera, Hrvatska

⁴ Sveučilište u Zagrebu, Metalurški fakultet, Aleja narodnih heroja 3, 44000, Sisak, Hrvatska

*Corresponding author: tlandekadragicevic@pbf.hr

Sažetak

Ubrzani napredak industrije, poljoprivrede i domaćinstva su pogodovali povišenim koncentracijama dušika u vodenom ekosustavu, što uzrokuje eutrofikaciju. Dušik se iz otpadne vode uklanja procesom biološke denitrifikacije. U ovom preglednom radu dan je osvrt na denitrifikaciju, s aspekta mikroorganizama, koncentracije otopljenog kisika, donora i akceptora elektrona.

Gljučne riječi: denitrifikacija, denitrifikanti, uklanjanje dušika, otpadne vode

Abstract

The accelerated progress of industry, agriculture and households favoured the elevated nitrogen concentrations in the aquatic ecosystem, which cause eutrophication. Nitrogen is removed from wastewater by biological denitrification. This review deals with denitrification, from the aspect of microorganisms, dissolved oxygen concentration, electron donors and acceptors.

Keywords: denitrification, denitrificants, nitrogen removal, wastewater

Uvod

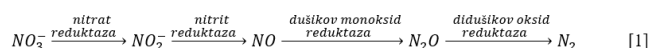
Posljednjih desetljeća raste kontaminacija vodnih tijela dušikom (N), kao i globalna svijest o onečišćenju pa su i zakonski propisi sve stroži (Albina i sur., 2019; Li i sur., 2019; Rajta i sur., 2019; NN 26/2020), a onečišćenje nitratom i sanacija/remedijacija izazov su znanstvenicima i sa tehničkog i sa znanstvenog aspekta. Izvori nitrata u okolišu su otpadne vode kućanstva i industrije, odlagališta otpada, kao i farme životinja. Biološka denitrifikacija je najčešće korištena metoda uklanjanja nitrata iz otpadnih voda, odvija se u anoksičnim ili anaerobnim uvjetima pomoću denitrifikanata koji koriste organske donore elektrona i NO₃-N ili NO₂-N kao akceptore elektrona. Učinkovitost procesa denitrifikacije ovisi o brojnim čimbenicima, poput: vrsta i količina izvora ugljika (C), koncentracija otopljenog kisika (DO, *engl. Dissolved Oxygen*), količina i aktivnost denitrifikanata, omjer C/N, temperatura, pH vrijednost, redoks potencijal i toksičnost influenta. Nitrati se učinkovito uklanjaju dodavanjem vanjskog izvora ugljika, metanola, etanola, octene kiseline i dr. Mikrobna denitrifikacija je ekonomičniji i učinkovitiji proces u usporedbi s fizikalo-kemijskim metodama, poput reverzne osmoze, izmjene iona, elektrodijalize, kemijske denitrifikacije i metode adsorpcije (Mohsenipour i sur., 2014).

Za ispuštanje obrađene otpadne vode u površinske vode hrvatsko zakonodavstvo je postavilo granične vrijednosti od 15 mg N/L za ukupni dušik, 10 mg NH₄-N/L, 1 mg NO₂-N/L i 2 mg NO₃-N/L, kao i 25 mg BPK/L (BPK, Biokemijska Potrošnja Kisika) i 125 mg KPK/L (KPK, Kemijska Potrošnja Kisika) (NN 26/2020).

Denitrifikacija

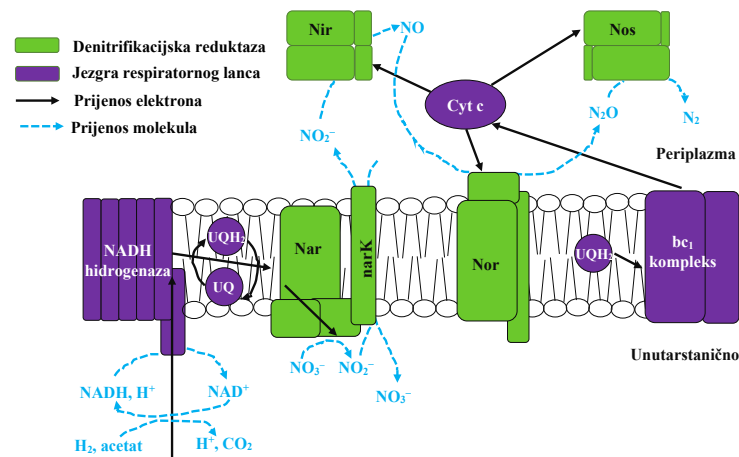
Denitrifikacija je anoksičan heterotrofan respiracijski proces kojeg provode denitrificirajuće bakterije u četiri koraka, kataliziraju ga

četiri mikrobne reduktaze [1]. Tijekom procesa denitrifikacije, nitrat (NO₃-N) se reducira preko nitrita (NO₂-N), dušikovog monoksida (NO) i didušikovog oksida (N₂O) do molekularnog dušika (N₂), s organskim ugljikom kao donorom elektrona koji se oksidira (Metcalf & Eddy, 2003; Gerardi, 2002).



Respiracija nitrata je proces u kojem se odvija prijenos elektrona od donora, organskog spoja, do akceptora, nitrata odnosno nitrita (Slika 1). Ta redoks reakcija skupa s respiratornim lancem kogenerira gradijent protona kroz staničnu membranu bakterija, što se u konačnici konvertira u energiju u obliku ATP (Adenozin Trifosfat) pomoću ATP sintaze (Chen i Strous, 2013). Upravo je redukcija nitrita do dušikovog monoksida ključni korak koji ograničava brzinu denitrifikacije, kao i korak u kojem se denitrifikacija razlikuje od drugih metaboličkih reakcija nitrata (Braker i sur., 2000). U tom koraku je aktivan enzim nitrit reduktaza (*nir*), pa se *nir* geni, *nirS* i *nirK*, koriste za analizu denitrifikanata kada se istražuje struktura i raznolikost mikrobne populacije (Li i sur., 2019; Braker i sur., 2000). Visoka koncentracija nitrita inhibira *nir*, što smanjuje brzinu denitrifikacije nitrita, i didušik oksid reduktazu (*nos*), što dovodi do povećanja emisije N₂O (Zhou i sur., 2008; Soto i sur., 2007).

Ukoliko u okolišu nema amonijaka, a bakterijama je potreban, zbiva se redukcija nitrata i nitritnih iona do amonijevih iona u stanici, pri čemu se dušik iz amonijevih iona ugrađuje u stanični materijal. U ovisnosti je o koncentraciji otopljenog kisika. Ovakvom vrstom redukcije ne zbiva se uklanjanje dušika iz otpadne vode, a naziva se asimilatorna redukcija. Disimilirajućom redukcijom nitrata ili nitrita, ili anoksičnom denitrifikacijom, nastaju molekularni dušik i dušikov (I) oksid, koji se ne otapa u otpadnoj vodi i odlazi u atmosferu. U disimilirajućoj redukciji



Slika 1. Shematski prikaz respiratornog lanca u denitrifikaciji (prilagođeno prema Albina i sur., 2019; Chen i Strous, 2013; van Spanning i sur., 2007)

Figure 1. A scheme of respiration chain in denitrification (adapted from Albina et al., 2019; Chen and Strous, 2013; van Spanning et al., 2007)

nitrata ili nitrita dušik se u nitratnim i nitritnim ionima ne ugrađuje u stanični materijal i vezan je za transportni lanac elektrona (Gerardi, 2002).

Denitrifikacija nitrata – denitratacija

U teoriji, u anoksičnim uvjetima potreba za redukciju 1 g $\text{NO}_3\text{-N}$ iznosi 2,86 g KPK, ukoliko nema staničnog rasta (Henze, 1991). Iskustvo pak upućuje da je za redukciju 1 g $\text{NO}_3\text{-N}$ nužno 3,5-4,5 g KPK, pa čak i do 7 g KPK (Her i Huang, 1995). Brzina denitrifikacije ovisi o koncentraciji, vrsti i aktivnosti mikroorganizama, koncentraciji nitrata, i dostupnom topivom organskom ugljiku (Lu i sur., 2014; Cherchi i sur., 2009). S porastom omjera KPK/N raste i učinkovitost denitrifikacije, a prekomjerni KPK/N omjer dovodi do inhibicije (Her i Huang, 1995). Koncentracija nitrata utječe na maksimalnu specifičnu brzinu rasta denitrifikanata. Monod-ova jednačba se može koristiti za opis odnosa između brzine rasta denitrifikanata i koncentracije dušika [2] (Metcalf & Eddy, 2003):

$$\mu_N = \frac{\mu^* \cdot N}{K_M + N}$$

gdje je: μ_N = brzina rasta denitrifikanata [dan^{-1}]; μ^* = maksimalna specifična brzina rasta denitrifikanata [dan^{-1}]; N = koncentracija nitrata [mg/L]; K_M = koncentracija dušika pri $\mu_N = 0,5 \mu^*$ [mg/L]

Neke industrije proizvode efluent i otpad visoke koncentracije nitrata, obično uz alkalni pH i nedostatak organskih sastojaka, primjerice odlaganje radioaktivnog otpada (Francis, 1980), efluent iz postrojenja nehrđajućeg čelika (Fernández-Nava i sur., 2008), otpadna voda iz industrije eksploziva (Marecik i sur., 2013). Do sada je istražena denitrifikacija s visokom koncentracijom nitrata od nekoliko stotina mM nitrata (Dhamole i sur., 2007; van Rijn i sur., 1996; Turk i Mavinic, 1987). Također su objavljena istraživanja o obradi otpadne vode koja je sadržavala 100-1000 mM nitrata pomoću aktivnog mulja (Liao i sur., 2013; Fernández-Nava i sur., 2008; Dhamole i sur., 2007; Glass i Silverstein, 1999). Tijekom aklimatizacije bakterije su se prilagodile visokoj koncentraciji nitrata pomoću stupnjevitog povećavanja koncentracije nitrata. U svim tim istraživanjima nitrat je u potpunosti reduciran, a distribucija bakterijskih zajednica u aktivnom mulju se promijenila u korist nitrat respirirajućih bakterija (Dhamole i sur., 2007).

Kada je koncentracija nitrata bila ispod 100 mM, akumulacija nitrita nije premašila 90% ukupne koncentracije nitrata. U pokusima između 100 i 300 mM nitrata, akumulacija nitrita je bila u rasponu 40-70%. Pri koncentraciji nitrata 300 mM ili višoj, nitrit nije dalje reduciran osim u radu Glass i Silverstein (1999). Budući da su ta istraživanja imala dugi eksperimentalni period, moguće je da je došlo do proliferacije pravih denitrifikanata koji su reducirali nitrit (Albina i sur., 2019).

Denitrifikacija nitrita – denitritacija

Denitrifikacija preko nitrita ima nekoliko prednosti u odnosu na denitrifikaciju preko nitrata: (i) zahtijeva 40% manju količinu ugljika, (ii) 25% je manja potreba na energiji za aeraciju (tijekom nitrifikacije aeracija se troši za oksidaciju amonijaka do nitrita – nitritacija, a ne do nitrata – nitratacija), te (iii) niži kapitalni troškovi (Badia i sur., 2021; Yao i sur., 2020; Wu i sur., 2014). Učinkovitost uklanjanja dušika iz otpadne vode preko nitrita se može poboljšati korištenjem aktivnog mulja koji je obogaćen denitrifikantima koji koriste nitrit kao akceptor elektrona (Yao i sur., 2020). Yao i sur. (2020) su tijekom 12 dana procesa s acetatom kao izvorom ugljika postigli porast brzine denitrifikacije s nitritom kao elektron akceptorom s 10 mg/Lh na 275,35 mg/Lh i pri tome je omjer KPK/N smanjen sa 7,9 na 2,7. S druge strane, nitrit može biti toksičan za mikroorganizme, a visoke vrijednosti nitrita uzrokuju inhibiciju procesa denitrifikacije (Cua i Stein, 2011; Zhou i sur., 2008; Soto i sur., 2007). Zhou i sur. (2008) sugeriraju da je stupanj inhibicije snažnije koreliran sa koncentracijom slobodne nitritne kiseline ($\text{HNO}_2\text{-N}$), nego sa koncentracijom nitrita. Slobodna nitritna kiselina je protonirani oblik nitrita i u ovisnosti je o pH vrijednosti miješane tekućine. Zabilježeno je 50% inhibicije pri koncentraciji slobodne nitritne kiseline u rasponu 0,0007-0,001 mg $\text{HNO}_2\text{-N/L}$ i potpuna inhibicija pri koncentraciji većoj od 0,004 mg $\text{HNO}_2\text{-N/L}$ (Zhou i sur., 2008).

U procesu biološke denitrifikacije često dolazi do nakupljanja nitrita. Brzina redukcije nitrita je relativno niža od brzine redukcije nitrata, pa se redukcija nitrita do NO smatra ograničavajućim korakom brzine denitrifikacije, koji uglavnom rezultira akumulacijom nitrita (Almeida i sur., 1995). Čimbenici koji utječu na akumulaciju nitrita su sastav denitrifikanata u aktivnom mulju, omjer C/N, izvor ugljika, i pH vrijednost (Badia i sur., 2021; Grgas i sur., 2017; Ge i sur., 2012; Oh i Silverstein, 1999; Glass i Silverstein, 1998). Također, visoka koncentracija nitrata uzrokuje akumulaciju nitrita (Grgas i sur., 2017; Mohan i sur., 2016; Cua i Stein, 2011). Tako je u denitrifikaciji s acetatom kao izvorom



ugljika početnih vrijednosti nitrata 677 mg NO₃-N/L, 1354 mg NO₃-N/L, 2031 mg NO₃-N/L i 2709 mg NO₃-N/L zabilježena akumulacija nitrita 400 mg NO₂-N/L, 1000 mg NO₂-N/L, 2000 mg NO₂-N/L i 2700 mg NO₂-N/L (Mohan i sur., 2016). U procesu denitrifikacije s acetatom kao izvorom ugljika pri omjeru C/N 3, pri početnih 80 mg NO₃-N/L i 35 mg NO₃-N/L zabilježena je maksimalna koncentracija akumuliranog nitrita od 43 mg NO₂-N/L i 0,7 mg NO₂-N/L, koji su do kraja pokusa potpuno denitrificirani (Grgas i sur., 2017). Nedovoljna količina organskih sastojaka za potpunu denitrifikaciju također dovodi do akumulacije nitrita (Grgas i sur., 2017; Ge i sur., 2012). U pokusima s acetatom kao izvorom ugljika od početnih 80 mg NO₃-N/L pri C/N omjeru 2 akumulirano je maksimalnih 44 mg NO₂-N/L (Grgas i sur., 2017). Kod denitrifikata na razini genoma postoji regulacija supstratom s nitratom i regulacija produktom s NO i nitritom, čiji je cilj izjednačiti unutarnju koncentraciju citotoksičnih spojeva poput nitrita i NO (van Spanning i sur., 2007). Na razini metabolizma, kompeticija među reduktazama može uzrokovati akumulaciju nitrita ili N₂O, što je pod utjecajem okolišnih uvjeta poput pH vrijednosti, i transporteri elektrona mogu transferirati elektrone radije jednoj reduktazi nego drugoj. Tako je pri vrijednosti pH 5,5 kod *P. denitrificans* uočena djelomična denitrifikacija, s nakupljanjem nitrita i N₂O zbog transfera elektrona preferencijalno nekim reduktazama, dok pri vrijednosti pH 8,5 nije bilo akumulacije jer se transfer elektrona odvijao istovremeno svim reduktazama (Thomsen i sur., 1994). Vrsta elektron donora također utječe na akumulaciju nitrita. Kod *Pseudomonas stutzeri* zabilježena je akumulacija nitrita pri 5 mM acetata, koji sadrži 2 C-atoma, ali nije bilo akumulacije pri istoj koncentraciji butirata, koji ima četiri C-atoma (van Rijn i sur., 1996). Kako se tijekom oksidacije butirata oslobađa 20 elektrona, a kod acetata 8, butirat omogućava dovoljno elektrona i ne dolazi do kompeticije među reduktazama za prihvatanje elektrona. Da bi bakterije spriječile akumulaciju nitrita unutar stanice, koriste transportere poput narK za izlučivanje nitrita (Slika 1) (Li i sur., 2016). Yao i sur. (2020) sugeriraju da je veza između koncentracije nitrita i brzine denitrifikacije takva da što je viša postignuta brzina denitrifikacije nitrita, to je viša vrijednost praga inhibicije nitritom na denitrifikante (iz prethodnih neuspjeha). Također, napominju da bi doseg inhibicije koji je rezultat relativno visoke koncentracije nitrita bio umanjnjen uklanjanjem supernatanta, pranjem mulja i prekidom hranjenja tijekom nekoliko dana. Izbjegnuta je inhibicija ključnih enzima u denitrifikaciji pomoću očekivane niske koncentracije nitrita u sustavu tijekom anoksičnog perioda u svakom ciklusu, što se postiže uzastopnim prilagođavanjem brzine dotoka nitrita dodanog u reaktor od ciklusa do ciklusa u ovisnosti o brzini denitrifikacije nitrita u prethodnom ciklusu.

Izvor ugljika

Izvori ugljika (elektron donor) za denitrifikaciju mogu biti: (i) razgradivi organski sastojci prisutni u otpadnoj vodi, (ii) vanjski dodani (egzogeni) izvor ugljika, i (iii) unutarstanične rezerve ugljika (KPK, Kemijska Potrošnja Kisika) poput polihidroksi alkanoata (PHA) (Bernat i Wojnowska-Baryła, 2007; Metcalf & Eddy, 2003).

Osim vrste izvora ugljika važna je i količina dodanog ugljika, posebice u odnosu na količinu raspoloživog dušika, izraženo kao omjer C/N (Rajta i sur., 2019). Kada nema dovoljno raspoloživog ugljika protok elektrona ne može zadovoljiti potrebe energije za stanični rast te su narušeni stanični rast i denitrifikacija. Isto tako, količina raspoloživog ugljika veća

Tablica 1. Potpuna denitrifikacija nitritnih i nitratnih iona s metanolom kao izvorom ugljika (prilagođeno prema Gerardi, 2002)

Dušikov ion	Potrebno metanola po mg/L dušikovog iona	Proizvedene stanice	Dušik u proizvedenim stanicama
NO ₂ ⁻	1,5 mg/L	0,3 mg	0,04 mg
NO ₃ ⁻	2,5 mg/L	0,5 mg	0,06 mg

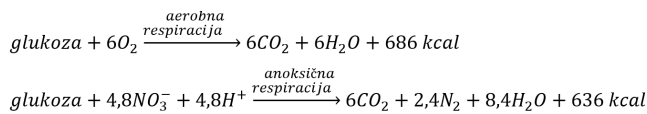
od optimalne ograničava porast brzine denitrifikacije (Huang i Tseng, 2001). Smatra se da odgovarajuća količina organskog ugljika za proces denitrifikacije, izraženo kao omjer topivog BPK i/ili nitritnog i nitratnog iona, iznosi oko 3. Za potpunu denitrifikaciju nitratnih iona potrebno je 2,5 mg metanola/1 mg nitratnog iona, odnosno 1,5 mg metanola/1 mg nitritnog iona (Tablica 1) (Gerardi, 2002). Zhang i sur. (2019) navode potreban omjer C/N 16 za citrat kao izvor ugljika, Zhao i sur. (2010) i He i sur. (2018) za glukozu kao izvor ugljika ističu omjer C/N 15 za *Bacillus* sp. i *Pseudomonas taiwanensis*, a Prasetyo i sur. (2018) omjer C/N 10 za *Pseudomonas* sp.

Komunalne otpadne vode karakterizira niski omjer KPK/N, što često nije dovoljno za učinkovito uklanjanje dušika, pa se svakodnevno u postrojenjima za biološku obradu otpadnih voda troše velike količine vanjskog izvora ugljika što predstavlja znatan trošak (Bernat i Wojnowska-Baryła, 2007). Budući da su većina denitrificirajućih bakterija heterotrofi, vanjski izvor ugljika se često dodaje kao elektron donor za stanični rast i redukciju nitrata odnosno nitrita (Bernat i Wojnowska-Baryła, 2007; Lee i Rittmann, 2003), a metanol, etanol i natrijev acetat se obično koriste u laboratorijskim i industrijskim procesima za biološku obradu otpadnih voda (Grgas i sur., 2017; Bernat i Wojnowska-Baryła, 2007; Lee i Welander, 1996). Različite vrste izvora organskih supstrata, ovisno o njihovoj biorazgradivosti, su glavni čimbenici koji utječu na varijacije u brzini stanične proizvodnje, brzini denitrifikacije i sastav bakterijske zajednice (Grgas i sur., 2020; Griefmeier i Gescher, 2018; Kurniawan i sur., 2016; Landeka Dragičević i sur., 2010). Budući da vanjski izvor ugljika za proces denitrifikacije predstavlja trošak u postrojenju za biološku obradu otpadnih voda, istražuju se alternativni izvori ugljika, poput: otpadna voda iz mljekarske industrije, iz procesa konzerviranja ribe, mesne industrije, mulj, drveni peleti, pšenična slama, drvene strugotine, biorazgradiva plastika (Griefmeier i Gescher, 2018; Guo i sur., 2018; Zhang i Zhang, 2018; Kurniawan i sur., 2016; Landeka Dragičević i sur., 2010; Grgas i sur., 2020; Štefanac i sur., 2021). Carlson i sur. (2020) su istraživali učinak 94 izvora ugljika na konačne produkte mikrobiološke respiracije nitrita u mikrobnim kulturama. Kako su katabolički i respiratorni geni različito raspoređeni duž genoma, tako određeni izvor ugljika može favorizirati različite respiratorne procese. Autori ističu da neki izvori ugljika favoriziraju akumulaciju nitrita ili denitrifikaciju, dok drugi izvori ugljika favoriziraju disimilatornu redukciju nitrata do amonijaka. Tako primjerice *Klebsiella* bilo s L-sorbozom ili D-celobiozom akumulira nitrite, *Escherichia* s drugim šećerima amonificira nitrate, dok sa citratom ili formijatom kao izvorom C *Pseudomonas* denitrificira, a *Sulfurospirillum* amonificira nitrate. Autori dodaju trenutnoj paradigmi da više koncentracije ugljika uvijek favoriziraju disimilatornu redukciju nitrata do amonijaka prije nego denitrifikaciju ili akumulaciju nitrita, da ponekad sastav izvora ugljika može biti jednako važan kao i koncentracija ugljika u određivanju konačnih produkata nitratne redukcije (Carlson i sur., 2020).

Koncentracija otopljenog kisika

Denitrifikanti preferiraju aerobnu respiraciju ili korištenje slobodnog molekularnog kisika za razgradnju BPK jer je energija dobivena aerobnom respiracijom veća od energije dobivene anoksičnom respiracijom BPK. Stoga, u prisutnosti visoke koncentracije otopljenog kisika (> 1,0 mg/L), denitrifikanti aktiviraju enzimski sustav za korištenje slobodnog molekularnog kisika i deaktiviraju enzimski sustav

za korištenje nitritnih i nitratnih iona. Ako postoji gradijent otopljenog kisika kroz flokulu denitrifikacija se odvija u središtu flokule, odnosno zbiva se u prisutnosti mjerljivog otopljenog kisika. Flokule veličine > 100 µm su dovoljno velike da proizvedu gradijent otopljenog kisika. Uz prisutan gradijent otopljenog kisika bakterijske stanice unutar flokule respiriraju istovremenim korištenjem kisika, nitritnih i nitratnih iona, na način da bakterijske stanice na periferiji flokule koriste otopljeni kisik, a bakterije u središtu flokule koriste nitritne i nitratne ione za respiraciju. Energija dobivena anoksičnom respiracijom je usporediva s aerobnom respiracijom [3], [4]. Do potpune oksidacije organskih sastojaka do CO₂ dolazi i tijekom aerobne respiracije i tijekom denitrifikacije. Oko 25% BPK razgrađenog tijekom anoksične respiracije se koristi za staničnu sintezu ili proizvodnju mulja. Količina stanica ili mulja proizvedena tijekom aerobne respiracije veća je, zbog veće količine energije dobivene tijekom aerobne respiracije, u usporedbi s anoksičnom respiracijom (Gerardi, 2002).



Koncentracija otopljenog kisika u anoksičnom reaktoru bi trebala biti ispod 0,2 mg/L jer kisik ima trenutni inhibični učinak na denitrifikaciju (Raboni i sur., 2014; Oh i Silverstein, 1999). Brzina denitrifikacije se može značajno smanjiti u prisutnosti DO u denitrificirajućem reaktoru, a inhibicija brzine denitrifikacije sa DO ovisi o veličini i strukturi flokule (Metcalf & Eddy, 2003). Prisutnost 0,2 mg DO/L može smanjiti brzinu denitrifikacije do 40% u odnosu na maksimalnu vrijednost (Metcalf & Eddy, 2003; Oh i Silverstein, 1999). Hernandez i Rowe (1988) su pokazali da su ekspresija i aktivnost skoro svih dušikovih oksid reduktaza suprimirane u prisutnosti kisika. Zhang i Zhang (2018) su istražili učinkovitost uklanjanja nitrata u ovisnosti o koncentraciji DO, a kao izvor ugljika u procesu denitrifikacije u aerobnim, anoksičnim i uvjetima niske koncentracije otopljenog kisika uporabili su biorazgradivu plastiku (škrob 60% i polipropilen 30%). Trend učinkovitosti uklanjanja nitrata je iznosio 98% pri anoksičnim uvjetima > 97% pri niskoj koncentraciji otopljenog kisika > 65% pri aerobnim uvjetima. Pri svim istraživanim koncentracijama otopljenog kisika nisu zabilježeni nitriti na kraju pokusa, zabilježena je akumulacija nitrata od 4,4 mg NO₂-N/L pri niskoj koncentraciji otopljenog kisika i 1,5 mg NO₂-N/L pri anoksičnim i aerobnim uvjetima. Također, tijekom pokusa je nastao 1 mg NH₄-N/L kao posljedica disimilatorne redukcije nitrata do amonijaka.

Temperatura, pH

Brzina denitrifikacije povećava se s porastom temperature, i obrnuto. Optimalna temperatura za denitrifikaciju je u rasponu 20-30 °C, a pri <5 °C denitrifikacija je inhibirana. Usporena denitrifikacija pri niskoj temperaturi kompenzira se povećanjem koncentracije mikrobne biomase (MLVSS, engl. *Mixed Volatile Suspended Solids*) (Gerardi, 2002). Denitrifikacija se može zbivati u širokom rasponu pH, a optimalna vrijednost je 7,0-7,5 (Gerardi, 2002). Pri suboptimalnom pH opaža se akumulacija intermedijera denitrifikacije, uključujući NO₂-N i dušikove okside (Glass i Silverstein, 1998). Većina denitrifikanata je osjetljivija na varijacije temperature od varijacija pH (Saleh-Lakha i sur., 2009).

Denitrifikanti

Denitrificirajuće bakterije su vrlo raznolika skupina fakultativnih anaerobnih bakterija i mogu preusmjeriti aktivnost s aerobne respiracije s kisikom kao terminalnim akceptorom elektrona na anaerobnu respiraciju s nitratom, nitritom i dušikovim oksidima kao terminalnim

elektron akceptorima (Petri, 2000). U miješanoj bakterijskoj populaciji, dva različita bakterijska fenotipa mogu utjecati na ravnotežu nitrata i nitrita: (i) nitrat respirirajuće bakterije koje ne mogu reducirati nitrit, i (ii) prave denitrificirajuće bakterije koje reduciraju nitrat i nitrit do plinovitog dušika (Szekeres i sur., 2002; Glass i Silverstein, 1998). Nitrat respirirajuće bakterije imaju tri puta veću brzinu rasta, pa brzo postanu dominantne (Turk i Mavinic, 1987). Posljedično, u prisutnosti nitrata, dominacija nitrat respirirajućih bakterija uzrokuje akumulaciju nitrata. Nakon utroška nitrata, pravi denitrifikanti se nastavljaju razvijati korištenjem nitrita i postanu dominantni. Glavni čimbenici koji utječu na rast denitrifikanata su temperatura, pH vrijednost, vrsta izvora ugljika, omjer KPK/N, koncentracija otopljenog kisika i koncentracija nitrata (Yao i sur., 2020; Albina i sur., 2019; Rajta i sur., 2019; Griebmeier i Gescher, 2018; Zhang i Zhang, 2018; Misiti i sur., 2011; Metcalf & Eddy, 2003; Gerardi, 2002).

U procesu s aktivnim muljem oko 80% bakterija su fakultativni anaerobi, sposobni za proces denitrifikacije (Gerardi, 2002).

Udio bakterijskih zajednica u aktivnom mulju je jedan od glavnih čimbenika varijacije brzine bioloških reakcija, što se reflektira na obradu otpadnih voda. Do sada je identificirano skoro 130 bakterijskih vrsta unutar više od 50 rodova kao denitrifikanti, a neki od njih su: *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Halobacterium*, *Hyphomicrobium*, *Kingella*, *Methanonas*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Axotobacter*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Denitrobacillus*, *Propionibacterium*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Spirillum*, *Thiobacillus*, *Xanthomonas* (Shapleigh, 2006). Većina denitrifikanata spada u rodove *Alcaligenes*, *Bacillus*, i *Pseudomonas* (Gerardi, 2002). Unatoč tome što struktura denitrificirajuće zajednice značajno varira među postrojenjima za biološku obradu otpadnih voda zbog obradnih procesa i operativnih uvjeta, izolirani bakterijski rodovi iz denitrificirajućih reaktora su bili usko povezani s vrstama *Proteobacteria* (Chakravarthy i sur., 2011), uključujući *Thauera* spp., *Paracoccus* spp., i *Pseudomonas* spp. (Fang i sur., 2020). Mikroorganizmi *Pseudomonas*, *Dechloromonas*, *Flavobacterium*, *Thauera*, *Rhodobacter*, i *Zoogloea* se obično povezuju s denitrifikacijom (Yong i sur., 2015; Thomsen i sur., 2007). Fang i sur. (2020) sugeriraju da bi bilo prikladnije fokusirati se na predominantne organizme odgovorne za denitrifikaciju nego identificirati sve bakterije koje sadrže skupinu gena za denitrifikaciju, budući su inženjerske prakse obrade otpadne vode obično bazirane na cjelokupnom funkcioniranju procesa.

Nekoliko ključnih enzima uključenih u respiratorni put disimilatorne redukcije nitrata su karakteristični za proces denitrifikacije (Slika 1) i mogu se kvalificirati za analize raznolikosti denitrificirajućih bakterija. Većina pažnje je posvećena membranski vezanoj nitrat reduktazi (*nar*) i periplazmatskoj nitrat reduktazi (*nap*) i dvije vrste nitrit reduktaza (*nirK* i *nirS*) (Petri, 2000). U aerobnim uvjetima denitrifikanti preusmjeravaju aktivnost na aerobnu respiraciju zbog najučinkovitijeg očuvanja Gibbsove slobodne energije. Pri niskoj koncentraciji otopljenog kisika i kada ima nitrata, dolazi do inicijacije denitrifikacije. Intermedijeri denitrifikacije, nitrit i NO, su toksični spojevi za bakterije (Cua i Stein, 2011), njihove unutarnje koncentracije su regulirane ispod citotoksične razine do mM i nM (Chen i Strous, 2013; van Spanning i sur., 2007). Ključni signali koji utječu na regulaciju denitrifikacije su kisik, nitrat, nitrit i NO. Regulacija mikrobne denitrifikacije na razini transkripcije je intenzivno proučavana na modelu denitrificirajućih sojeva *Paracoccus denitrificans* i *Pseudomonas aeruginosa*. Kod denitrifikanata, regulacija transkripcije gena denitrifikacijske reduktaze se postiže pomoću transkripcijskih faktora FNR (engl. *Fumarate and Nitrate Reductase Regulatory*) obitelji (Crack i sur., 2016).

U denitrifikaciji, nitrat reduktaza je prvi enzim u procesu (Slika 1, jednadžba 1). Membranski vezana nitrat reduktaza (*narG*) i periplazmatski vezana nitrat reduktaza (*napA*) su prepoznate kao široko raspršene kroz rodove koji pripadaju Bacteria i Archaea kraljevstvima (Philippot i sur., 2002). Fang i sur. (2020) su proučavali rodove denitrifikanata *Paracoccus* spp., *Thauera* spp., *Pseudomonas*-



slične spp., i dva funkcionalna gena nitrat reduktaze, *narG* i *napA* kao potencijalne biomarkere za ukupno uklanjanje dušika pomoću kvantitativne lančane reakcije polimerazom (qPCR, engl. *Quantitative Polymerase Chain Reaction*). Ti bakterijski rodovi i funkcionalni geni su pokazali značajnu negativnu korelaciju s ukupnim dušikom u efluentu. U Pearsonovoj korelaciji i analizi kanoničke redundancije pokazano je da su varijable koje najviše objašnjavaju kombinacija konstituenata, a kao najvažnija se ispostavila temperatura, a zatim i pH vrijednost, vrijeme zadržavanja čestica (SRT, engl. *Solids Retention Time*), ukupni dušik i organski sastojci u influentu (BPK i KPK). Rezultati su potvrdili da su glavni 16S rRNA geni denitrifikanata i geni nitrat reduktaza bolji biomarkeri od koncentracije biomase, i bilo koji od biomarkera bi mogao pratiti denitrifikaciju u stvarnom vremenu. *Thauera* spp. je činila oko 16% ukupnih bakterija u aktivnom mulju, *Paracoccus* spp. 0,09% i *Pseudomonas*-slične bakterije 0,02%. Količina *narG*-sličnih genskih stanica je bila oko 20-90 puta veća nego *napA* gena ovisno o datumu uzorkovanja.

Istraživanje Chakravarthy i sur. (2011) sugerira da je *Proteobacteria* dominantan red u procesu aktivnog mulja i vjerojatno odgovoran za denitrifikaciju. Rodovi *Thauera* (*Betaproteobacteria*), *Paracoccus* (*Alphaproteobacteria*) i *Pseudomonas* (*Gammaproteobacteria*) su česti

Literatura

- Albina P., Durban N., Bertron A., Albrecht A., Robinet J. C., Erable B. (2019) Influence of Hydrogen Electron Donor, Alkaline pH, and High Nitrate Concentrations on Microbial Denitrification: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 5163.
- Almeida J. S., Reis M. A., Carrondo M. J. (1995) Competition between nitrate and nitrite reduction in denitrification by *Pseudomonas fluorescens*. *Biotechnology and Bioengineering*, 46 476-484.
- Badia A., Kim M., Dagnew M. (2021) Nitrite denitrification using biomass acclimatized with methanol as complementary carbon source: long-term performance and kinetics study. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 7 93-106.
- Bernat K., Wojnowska-Baryła I. (2007) Carbon source in aerobic denitrification. *Biochemical Engineering Journal*, 36 116-122.
- Braker G., Zhou J. Z., Wu L. Y., Devol A. H., Tiedje J. M. (2000) Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific northwest marine sediment communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 2096-2104.
- Carlson H. K., Lui L. M., Price M. N., Kazakov A. E., Carr A. V., Kuehl J. V., Owens T. K., Nielsen T., Arkin A. P., Deutschbauer A. M. (2020) Selective carbon sources influence the end products of microbial nitrate respiration. *ISME Journal*, 14 2034-2045.
- Cherchi C., Onnis-Hayden A., El-Shawabkeh I., Gu A. (2009) Implication of using different carbon sources for denitrification in wastewater treatments. *Water Environment Research*, 81 788-799.
- Chakravarthy S. S., Pande S., Kapoor A., Nerurkar A. S. (2011) Comparison of denitrification between *Paracoccus* sp. and *Diaphorobacter* sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165 260-269.
- Lu H., Nuruzzaman F., Ravindhar J., Chandran K. (2011) Alcohol dehydrogenase expression as a biomarker of denitrification activity in activated sludge using methanol and glycerol as electron donors. *Environmental Microbiology*, 13 2930-2938.
- Chen J., Strous M. (2013) Denitrification and aerobic respiration, hybrid electron transport chains and co-evolution. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1827 136-144.
- Crack J. C., Hutchings M. I., Thomson A. J., le Brun N. E. (2016) Biochemical properties of *Paracoccus denitrificans* FnrP: reactions with molecular oxygen and nitric oxide. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 21 71-82.
- Cua L. S., Stein L. Y. (2011) Effects of nitrite on ammonia-oxidizing activity and gene regulation in three ammonia-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 319 169-175.
- Dhamole P. B., Nair R. R., D'Souza S. F., Lele S. S. (2007) Denitrification of high strength nitrate waste. *Bioresource Technology*, 98 247-252.
- Fang H., Olson B. H., Asvapathanagul P., Wang T., Tsai R., Rosso D. (2020) Molecular biomarkers and influential Factors of denitrification in a full-scale biological nitrogen removal plant. *Microorganisms*, 8 11.
- Fernández-Nava Y., Marañón E., Soons J., Castrillón L. (2008) Denitrification of wastewater containing high nitrate and calcium concentrations. *Bioresource Technology*, 99 7976-7981.
- Francis C. W. (1980) Biological denitrification of high-nitrates wastes generated in the nuclear industry. Environmental Sciences Division, Oak Ridge National Laboratory: Oak Ridge, TN, USA.
- Ge S. J., Peng Y. Z., Wang S. Y., Lu C. C., Cao X., Zhu Y. P. (2012) Nitrite accumulation under constant temperature in anoxic denitrification process: the effect of carbon sources and COD/NO₃-N. *Bioresource Technology*, 114 137-143.
- Gerardi M. H. (2002) Nitrification and denitrification in the activated sludge process, 1st ed. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Glass, C. Silverstein, J. (1998) Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation. *Water Research*, 32 831-839.
- Glass C., Silverstein J. (1999) Denitrification of high-nitrate, high-salinity wastewater. *Water Research*, 33 223-229.
- Grgas D., Širac T., Prodan M., Brozinčević A., Landeka Dragičević T. (2017) Denitrifikacija: Učinak omjera C/N. 16th Ružička days („Today science – tomorrow industry“), Jukić A., Šubarić D. (ur.). Zagreb, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. 277-288, Vukovar, 21-23.09.2016. ISSN broj zbornika 2459-9387.
- Grgas D., Ugrina M., Toromanović M., Ibrahimpašić J., Štefanac T., Landeka Dragičević T. (2020) Fish canning wastewater treatment in sequencing batch reactor with activated sludge. *Holistic Approach to Environment*, 10 29-34.
- Grießmeier V., Gescher J. (2018) Influence of the potential carbon sources for field denitrification beds on their microbial diversity and the fate of

- carbon and nitrate. *Frontiers in Microbiology*, 9 1313.
- Guo L., Guo Y., Sun M., Gao M., Zhao Y., She Z. (2018) Enhancing denitrification with waste sludge carbon source: the substrate metabolism process and mechanisms. *Environmental Science and Pollution Research*, 25 13079–13092.
- Henze M. (1991) Capabilities of biological nitrogen removal processes from wastewater. *Water Science and Technology*, 23 669-679.
- Her J. J., Huang J. S. (1995) Influences of carbon source and C/N ratio on nitrate/nitrite denitrification and carbon breakthrough. *Bioresource Technology*, 54 45-51.
- He T., Ye Q., Sun Q., Cai X., Ni J., Li Z., Xie D. (2018) Removal of nitrate in simulated water at low temperature by a novel psychrotrophic and aerobic bacterium, *Pseudomonas taiwanensis* strain J. *Bio-Med Research International*, 2018 1–9.
- Hernandez D., Rowe J. J. (1988) Oxygen inhibition of nitrate uptake is a general regulatory mechanism in nitrate respiration. *Journal of Biological Chemistry*, 263 7937–7939.
- Huang H. K., Tseng S. K. (2001) Nitrate reduction by *Citrobacter diversus* under aerobic environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55 90–94.
- Kurniawan A., Kwon S. Y., Shin J.-H., Hur J., Cho J. (2016) Acid fermentation process combined with post denitrification for the treatment of primary sludge and wastewater with high strength nitrate. *Water*, 8 117.
- Landeka Dragičević T., Zanoški Hren M., Grgas D., Buzdum I., Čurlin M. (2010) The potential of dairy wastewater for denitrification. *Mljekarstvo*, 60 191–197.
- Lee K. C., Rittmann B. E. (2003) Effects of pH and precipitation on autohydrogenotrophic denitrification using the hollow-fiber membrane-biofilm reactor. *Water Research*, 37 1551–1556.
- Lee N. M., Welander T. (1996) The effect of different carbon sources on respiratory denitrification in biological wastewater treatment. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82 277–285.
- Li G., Vilcherrez D., Carvajal-Arroyo J. M., Sierra-Alvarez R., Field J. A. (2016) Exogenous nitrate attenuates nitrite toxicity to anaerobic ammonium oxidizing (anammox) bacteria. *Chemosphere*, 144 2360–2367.
- Li S. S., Peng C. R., Cheng T. S., Wang C. H., Guo L. L., Li D. H. (2019) Nitrogen-cycling microbial community functional potential and enzyme activities in cultured biofilms with response to inorganic nitrogen availability. *Journal of Environmental Sciences*, 76 89–99.
- Liao R., Shen K., Li A.-M., Shi P., Li, Y., Shi Q., Wang Z. (2013) High-nitrate wastewater treatment in an expanded granular sludge bed reactor and microbial diversity using 454 pyrosequencing analysis. *Bioresource Technology*, 134 190–197.
- Marecik R., Biegańska-Marecik R., Cyplik P., Ławniczak Ł., Chrzanowski Ł. (2013) Phytoremediation of industrial wastewater containing nitrates, nitroglycerin, and nitroglycol. *Polish Journal of Environmental Studies*, 22 773–780.
- Metcalf & Eddy Inc. (2003) Tchobanoglous G., Burton F. L., Stensel H. D. Wastewater Engineering: Treatment and Reuse; McGraw-Hill: New York, NY, USA.
- Misiti T. M., Hajaya M. G., Pavlostathis S. G. (2011) Nitrate reduction in a simulated free-water surface wetland system. *Water Research*, 45 5587–5598.
- Mohan T. K., Nancharaiah Y. V., Venugopalan V. P., Sai P. S. (2016) Effect of C/N ratio on denitrification of high-strength nitrate wastewater in anoxic granular sludge sequencing batch reactors. *Ecological Engineering*, 91 441–448.
- Mohsenipour M., Shahid S., Ebrahimi K. (2014) Removal techniques of nitrate from water. *Asian Journal of Chemistry*, 26 7881–7886.
- Oh J., Silverstein J. (1999) Oxygen inhibition of activated sludge denitrification. *Water Research*, 33 1925–1937.
- Petri R. (2000) Diversität Nitratreduzierender Bakteriengemeinschaften in den Sedimenten der Ostsee und Untersuchungen zur Phylogenie der Respiratorischen Nitratreduktase. Ph.D. Thesis, University Kiel, Kiel, Germany, p. 148.
- Philippot L., Hallin S. (2005) Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. *Current Opinion in Microbiology*, 8 234–239.
- Philippot L., Piutti S., Martin-Laurent F., Hallet S., Germon J. C. (2002) Molecular analysis of the nitrate-reducing community from unplanted and maize-planted soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 6121–6128.
- Prasetyo R. A., Pertwiningrum A., Erwanto Y., Yusiati L. M., Fitriyanto N. A. (2018) Characterization of *Pseudomonas* sp. LS3K as nitrate removal agent at different C/N ratios under aerobic condition. In Proceeding of the 2nd International Conference on Tropical Agriculture pp. 185–194. Cham: Springer.
- Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (NN 26/2020). Narodne Novine 2020, 26.
- Raboni M., Torretta V., Viotti P., Urbini G. (2014) Pilot experimentation with complete mixing anoxic reactors to improve sewage denitrification in treatment plants in small communities. *Sustainability*, 6 112–122.
- Rajta A., Bhatia R., Setia H., Pathania P. (2019) Role of heterotrophic aerobic denitrifying bacteria in nitrate removal from wastewater. *Journal of Applied Microbiology*, 128 1261–1278.
- Saleh-Lakha S., Shannon K.E., Henderson S.L., Goyer C., Trevors J.T., Zebarth B.J., Burton, D.L. (2009) Effect of pH and temperature on denitrification gene expression and activity in *Pseudomonas mandelli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 3903-3911.
- Shapleigh J. P. (2006) The Denitrifying Prokaryotes. In *The Prokaryotes a Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology and Biochemistry*; Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H., Stackebrandt T., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, Volume 2, pp. 769–792.
- Soto O., Aspé E., Roeckel M. (2007) Kinetics of cross-inhibited denitrification of a high load wastewater. *Enzyme and Microbial Technology*, 40 1627–1634.
- Szekeres S., Kiss I., Kalman M., Soares M. I. M. (2002) Microbial population in a hydrogen-dependent denitrification reactor. *Water Research*, 36 4088–4094.
- Štefanac T., Grgas D., Landeka Dragičević T. (2021) Metode obrade otpadne vode mesne industrije. *Meso*, 1 54-66.
- Thomsen J. K., Geest T., Cox R. P. (1994) Mass spectrometric studies of the effect of pH on the accumulation of intermediates in denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 536–541.
- Thomsen T. R., Kong Y., Nielsen P. H. (2007) Ecophysiology of abundant denitrifying bacteria in activated sludge. *FEMS Microbiology Ecology*, 60 370–382.
- Turk O., Mavnic D. S. (1987) Benefits of using selective inhibition to remove nitrogen from highly nitrogenous wastes. *Environmental Technology Letters*, 8 419–426.
- van Rijn J., Tal Y., Barak Y. (1996) Influence of volatile fatty acids on nitrite accumulation by a *Pseudomonas stutzeri* strain isolated from a denitrifying



- fluidized bed reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 2615–2620.
- van Spanning R. J. M., Richardson D. J., Ferguson S. J. (2007) Chapter 1 - Introduction to the biochemistry and molecular biology of denitrification. Editor(s): Bothe H., Ferguson S. J., Newton W. E. *Biology of the nitrogen cycle*, Elsevier, pp. 3–20.
- Wu G., Zheng D., Xing L. (2014) Nitritation and N₂O emission in a denitrification and nitrification two-Sludge system treating high ammonium containing Wastewater. *Water*, 6 2978–2992.
- Yao R., Yuan Q., Wang K. (2020) Enrichment of denitrifying bacterial community using nitrite as an electron acceptor for nitrogen removal from wastewater. *Water*, 12 48.
- Yong Y. C., Wu X. Y., Sun J. Z., Cao Y. X., Song H. (2015) Engineering quorum sensing signaling of *Pseudomonas* for enhanced wastewater treatment and electricity harvest: a review. *Chemosphere*, 140 18–25.
- Zhang N., Chen H., Lyu Y., Wang Y. (2019) Nitrogen removal by a metal-resistant bacterium, *Pseudomonas putida* ZN1, capable of heterotrophic nitrification–aerobic denitrification. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 94 1165–1175.
- Zhang X., Zhang J. (2018) Effect of dissolved oxygen on biological denitrification using biodegradable plastic as the carbon source. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 121 032015.
- Zhao B., He Y. L., Zhang X. F. (2010) Nitrogen removal capability through simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Bacillus* sp. LY. *Environmental Technology*, 31 409–416.
- Zhou Y., Pijuan M., Zeng R. J., Yuan Z. (2008) Free nitrous acid inhibition on nitrous oxide reduction by a denitrifying-enhanced biological phosphorus removal sludge. *Environmental Science & Technology*, 42 8260–8265.