

การกระจายและแหล่งที่มาของสารอินทรีย์ในดินตะกอนบริเวณชายฝั่งทะเล เทศบาลเมืองชลบุรี

Distribution and Sources of Organic Matter in Coastal Sediment of Chonburi Municipality

สดีโส มุขหา¹ และ ถนอมศักดิ์ บุญภักดี^{1,2*}

Sodsai Mukhao¹ and Thanomsak Boonphakdee^{1,2*}

บทคัดย่อ: ทำการเก็บตัวอย่างน้ำทะเลและดินตะกอนในเดือนสิงหาคม 2558 บริเวณปากคลองคลองสังเขป และคลองปางปลาสร้อย เทศบาลเมืองชลบุรี จำนวน 10 สถานี พบว่าในน้ำทะเลมีปริมาณ POC และ POC:Chl *a* อยู่ในช่วง 1,049.8-4,537.2 และ 66.9-626.1 ($\mu\text{g/l}$) ตามลำดับ ส่วนในดินตะกอนปริมาณ TOC, TN, $\delta^{13}\text{C}$ และ $\delta^{15}\text{N}$ อยู่ในช่วง 3.5-76.9 $\mu\text{g/g}$, 0.8-8.3 $\mu\text{g/g}$, -25.63 ถึง -22.36 ‰ และ 2.58-6.03 ‰ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ามีการสะสมของสารอินทรีย์ในน้ำทะเลและดินตะกอนโดยมีปริมาณลดลงตามระยะทางจากชายฝั่งออกสู่ทะเล โดยสารอินทรีย์ที่สะสมในดินตะกอนใกล้ชายฝั่งมีแหล่งที่มาจากน้ำทิ้งชุมชน ส่วนดินตะกอนที่อยู่ห่างฝั่งในทะเลจะได้รับสารอินทรีย์จากแพลงก์ตอนพืชในทะเล

คำสำคัญ: ดินตะกอน, สารอินทรีย์, ไอโซโทปเสถียร, ชายฝั่ง

ABSTRACT: To study sources and distribution of organic matter in coastal sediment of Chonburi municipality area which receiving sewage from residential area. Seawater and sediment samples were collected from at Sungkep and Bangplasoy estuaries during August 2015. The POC and POC:Chl *a* in seawater ranged from 1,049.8 to 4,537.2 $\mu\text{g/l}$, and 66.9 to 626.1 $\mu\text{g/l}$ respectively. TOC, TN, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in sediment ranged from 3.5 to 76.9 $\mu\text{g/g}$, 0.8 to 8.3 $\mu\text{g/g}$, -25.63 to -22.36 ‰ and 2.58 to 6.03 ‰ respectively. The results show organic matter in seawater and sediment decreased in seaward direction. Source organic matter in sediment were investigated by using simple mixing model of $\delta^{13}\text{C}$. It clearly shows anthropogenic organic matter accumulated in nearshore stations whereas source of organic matter in the offshore were marine phytoplankton.

Keywords: sediment, organic matter, stable isotopes, coastal

¹ โครงการบัณฑิตศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131
Graduate Program in Environmental Science, Faculty of Science Burapha University, Chonburi Province.

² ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131
Department of Aquatic Science, Faculty of Science Burapha University, Chonburi province. 20131

* Corresponding author: nuiosk@yahoo.com

บทนำ

บริเวณชายฝั่งของเทศบาลเมืองชลบุรีเป็นพื้นที่ชุมชนเมืองที่มีประชากรอาศัยอยู่อย่างหนาแน่น โดยมีจำนวนประชากรมากกว่า 30,000 คน (กรมการปกครอง, 2561) และมีการระบายน้ำทิ้งที่ยังมิได้ผ่านการบำบัดลงสู่ทะเลในปริมาณมาก (Sangmanee et al., 2017) ซึ่งน้ำทิ้งเหล่านี้จะมีปริมาณสารอินทรีย์จากกิจกรรมของมนุษย์ปนเปื้อนอยู่จำนวนมาก เมื่อสารอินทรีย์ลงสู่ชายฝั่งทะเลก็อาจทำให้มีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและระบบนิเวศชายฝั่ง (Piola et al., 2006; Sampiao et al., 2010; Nijole et al., 2017) เนื่องจากจุลินทรีย์ต้องใช้ออกซิเจนปริมาณมากในการย่อยสลายสารอินทรีย์ ทำให้ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำลดลงจนเกิดสภาวะออกซิเจนต่ำ ไม่เพียงพอต่อการหายใจของสัตว์น้ำ (Hu et al., 2008) และยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปของสารอินทรีย์ในดินตะกอนกลายเป็นสารอาหารไนโตรเจน ซึ่งทำให้เกิดปรากฏการณ์ยูโทรฟิเคชัน (นฤตุมภ์ และจิราวรรณ, 2555) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดน้ำทะเลเปลี่ยนสีส่งผลให้สัตว์ทะเลตายเป็นจำนวนมาก เนื่องจากปริมาณออกซิเจนละลายน้ำต่ำลง และยังส่งผลกระทบต่อประชาชนที่อาศัยอยู่บริเวณชายฝั่งอีกด้วย

งานวิจัยนี้ใช้เทคนิคไอโซโทปเสถียร (stable isotopes) ของคาร์บอน ($\delta^{13}\text{C}$) และไนโตรเจน ($\delta^{15}\text{N}$) ในการตรวจสอบแหล่งที่มาและการกระจายของสารอินทรีย์ในดินตะกอน ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการจัดการและควบคุมปริมาณสารอินทรีย์หรือมลสารต่าง ๆ ในบริเวณชายฝั่งทะเลได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วิธีการศึกษา

ทำการเก็บตัวอย่างดินตะกอนที่ระดับผิว (surface sediment) ระดับความลึก 0-5 เซนติเมตร โดยใช้เครื่องตักหน้าดิน (grab sampler) และสารอินทรีย์แขวนลอย (Particulate organic matter: POM) ในน้ำทะเลระดับความลึก 30 เซนติเมตร ด้วยวิธีจ้วงเก็บน้ำ ทำการเก็บตัวอย่างในบริเวณปากคลองสังเขป และคลองบางปลาสร้อย เทศบาลเมืองชลบุรี ในเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2558 ซึ่งเป็นฤดูฝน รวม 10 สถานี โดยแต่ละสถานีห่างกันประมาณ

300 เมตร (Figure 1) นำตัวอย่างดินตะกอนไปอบให้แห้งแล้วบดให้ละเอียด พร้อมทั้งกำจัดคาร์บอนेटด้วยกรดไฮโดรคลอริก ตามวิธีของ Onpankoon and Boonphakdee (2012) ส่วนตัวอย่างน้ำทะเลจะกรองผ่านกระดาษกรอง GF/F แล้วอบให้แห้งพร้อมทั้งย่อยคาร์บอนेट ตามวิธีการของ Boonphakdee et al. (2008) จากนั้นบรรจุตัวอย่าง POM และดินตะกอนลงใน ทินแคปซูล (Tin capsule) เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณ $\delta^{13}\text{C}$ และ $\delta^{15}\text{N}$ ด้วยเครื่อง Isotope Ratio Mass Spectrometer (IRMS) ที่มหาวิทยาลัยคอร์เนล ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมีความผิดพลาดในการวิเคราะห์น้อยกว่า 0.40 และ 0.52 ตามลำดับ ซึ่งมีสัดส่วนของคาร์บอน คือ $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ และสัดส่วนของไนโตรเจน $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ได้ค่าเป็นส่วนในพันส่วน โดยใช้หน่วยเป็น per mil (‰) คำนวณโดยใช้สูตร (Sampiao et al., 2010)

$$\delta X (\text{‰}) = \left[\frac{R_{\text{sample}}}{R_{\text{standard}}} - 1 \right] * 1000$$

เมื่อ X แทนไอโซโทปเสถียรของคาร์บอนและไนโตรเจน (^{13}C และ ^{15}N)

R แทนสัดส่วนของไอโซโทปหนัก กับไอโซโทปเบา ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ และ $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) ในตัวอย่างและสารมาตรฐาน ส่วนการวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์เออนั้น จะเตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์ตามวิธีของ Mishima et al. (1999)

นำข้อมูลปริมาณ $\delta^{13}\text{C}$ ที่ได้มาคำนวณสัดส่วนร้อยละของแหล่งที่มาของสารอินทรีย์ในดินตะกอนชายฝั่งเทศบาลเมืองชลบุรีโดยใช้สมการของ Gu et al. (2017) ดังนี้

$$T (\%) = \frac{\delta^{13}\text{C}_{\text{marine}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{sample}}}{\delta^{13}\text{C}_{\text{marine}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{sewage}}} \times 100$$

เมื่อ T แทนสัดส่วนของของสารอินทรีย์จากแผ่นดิน $\delta^{13}\text{C}_{\text{marine}}$ แทน $\delta^{13}\text{C}$ ของสารอินทรีย์ในน้ำทะเล $\delta^{13}\text{C}_{\text{sewage}}$ แทน $\delta^{13}\text{C}$ ของสารอินทรีย์จากน้ำทิ้ง $\delta^{13}\text{C}_{\text{sample}}$ แทน $\delta^{13}\text{C}$ ของสารอินทรีย์ในตัวอย่าง

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

ปริมาณสารอินทรีย์แขวนลอยในน้ำทะเล

ปริมาณอินทรีย์คาร์บอนแขวนลอย (Particulate organic carbon: POC) และสัดส่วนอินทรีย์คาร์บอน

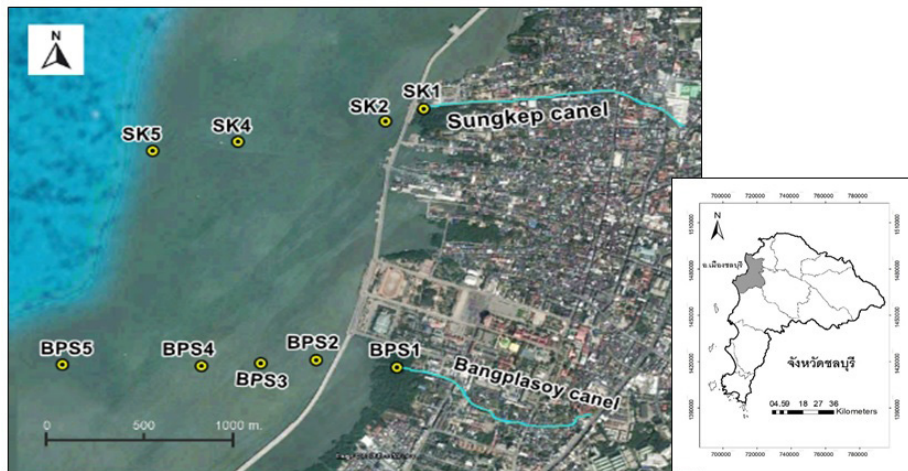


Figure 1 Location of sampling site in coastal area of Chonburi municipality.

แขวนลอยต่อคลอโรฟิลล์เอ (POC:Chl *a*) บริเวณชายฝั่งของเทศบาลเมืองชลบุรีพบว่าอยู่ในช่วง 1,049.8-4,537.2 และ 66.9-626.1 $\mu\text{g/l}$ ตามลำดับ (Table 1) ปริมาณ POC มีค่าสูงในสถานที่ที่อยู่ใกล้ชายฝั่ง (SK1, SK2 BPS1 และ BPS2) ซึ่งเป็นบริเวณที่น้ำลึกประมาณ 2 เมตร จึงได้รับอิทธิพลจากการขึ้นลงของน้ำในรอบวันทำให้สารอินทรีย์ในดินฟุ้งกระจายขึ้นมาเป็นสาเหตุทำให้น้ำทะเลมีปริมาณสารอินทรีย์เพิ่มสูงขึ้น (Boonkhwang et al., 2013) ส่วนปริมาณ Chl *a* มีค่าสูง ($12.8 \pm 7.0 \mu\text{g/l}$) แสดงให้เห็นว่ามีสารอาหารที่เหมาะสมทำให้แพลงก์ตอนพืชเจริญเติบโตได้ดี เมื่อพิจารณาจาก POC:Chl *a* พบว่าสถานี SK1-4 และ BPS1-4 มีค่ามากกว่า 100 ขณะที่สถานี SK5 และ BPS5 ซึ่งอยู่ห่างจากฝั่งมากกว่า 1200 เมตร นั้นจะมี POC:Chl *a* น้อยกว่า 100 (Table 1, Figure 2a) ซึ่ง Cifuentes et al. (1996) หากในแหล่งน้ำมี POC:Chl *a* มากกว่า 100 แสดงว่าอินทรีย์คาร์บอนในแหล่งน้ำนั้นมิได้เกิดจากแพลงก์ตอนพืช หากแต่มีที่มาจากแหล่งกำเนิดภายนอก (allochthonous source) แต่หากมี POC:Chl *a* น้อยกว่า 100 แสดงว่าอินทรีย์คาร์บอนในแหล่งน้ำมาจากแพลงก์ตอนพืช ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Boonphakdee et al. (2008) และ Nijole et al. (2017) ได้รายงานว่าพื้นที่ชายฝั่งทะเลจะมีการสะสมของสารอินทรีย์จากแผ่นดินรวมถึงสารอินทรีย์จากกิจกรรมของมนุษย์

ปริมาณสารอินทรีย์ในดินตะกอน

ดินตะกอนที่ระดับผิวมีปริมาณอินทรีย์คาร์บอนรวม (Total organic carbon: TOC) ไนโตรเจนรวม (Total nitrogen: TN) $\delta^{13}\text{C}$ และ $\delta^{15}\text{N}$ อยู่ในช่วง 3.5-76.9 $\mu\text{g/g}$, 0.8-8.3 $\mu\text{g/g}$, -25.63 ถึง -22.36 ‰ และ 2.58-6.03 ‰ ตามลำดับ สารอินทรีย์ในดินตะกอนมีปริมาณสูงในสถานี SK1, SK2 และ BPS1 ซึ่งเป็นสถานที่ที่อยู่ใกล้ชายฝั่งและลดลงตามระยะทางเมื่อออกสู่ทะเล สัมพันธ์กับลักษณะของดินตะกอนซึ่งบริเวณชายฝั่งดินตะกอนมีลักษณะเป็นโคลนสามารถดูดซับสารอินทรีย์และมวลสารต่าง ๆ ได้ปริมาณมากกว่า (Kao et al., 2003; Ramaswamy et al., 2008; Gao et al., Liu et al., 2015; Xu et al., 2017) สถานีที่ห่างจากชายฝั่งเป็นดินตะกอนทราย ส่วนสถานี SK5 ที่มีปริมาณสารอินทรีย์สูงเนื่องจากดินตะกอนมีลักษณะเป็นทรายละเอียด (Table 1) (Liu et al., 2006; Sampaio et al., 2010) จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง TOC และ TN (Figure 2c) ในดินตะกอน ได้ค่า R^2 เท่ากับ 0.95 ซึ่งให้เห็นว่าสารอินทรีย์คาร์บอนรวมแปรผันตามไนโตรเจนรวม เช่นเดียวกับ POC และ TOC (Figure 2b) ได้ค่า R^2 เท่ากับ 0.53 แสดงให้เห็นว่าสารอินทรีย์คาร์บอนในน้ำทะเลและอินทรีย์คาร์บอนในดินตะกอนมีแหล่งที่มาจากแหล่งเดียวกัน สอดคล้องกับการศึกษาของ Boonphakdee et al. (2008) และ Gu et al. (2017) จากผลการศึกษาดิน

Table 1 Elemental and isotopic composition of samples in study area.

Station	POC($\mu\text{g/l}$)	POC:Chl <i>a</i>	TOC _{sed} (mg/g)	TN _{sed} (mg/g)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{sed}}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}_{\text{sed}}$ (‰)
Sungkep canal						
SK1	4537.2	626.1	76.9	8.3	-25.2	4.6
SK2	2619.2	464.7	33.4	4.5	-23.6	5.0
SK4	1734.2	170.9	19.4	2.5	-23.2	5.3
SK5	1049.8	66.9	23.5	3.2	-22.4	5.8
Bangplasoy canal						
BPS1	3887.2	255.4	33.3	2.8	-25.7	6.0
BPS2	2897.8	114.2	8.3	1.1	-24.3	2.7
BPS3	1414.7	281.8	6.2	0.9	-23.4	4.5
BPS4	2090.0	206.0	3.5	0.8	-23.6	2.6
BPS5	1479.4	72.2	7.7	2.1	-23.0	5.3

ตะกอนสถานีใกล้ชายฝั่ง (น้อยกว่า 1000 เมตร) มีปริมาณ $\delta^{13}\text{C}$ ต่ำกว่าสถานีที่ห่างจากชายฝั่ง (มากกว่า 1000 เมตร) และมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะทางออกสู่ทะเล ส่วนปริมาณ $\delta^{15}\text{N}$ สถานีใกล้ชายฝั่งมีปริมาณไม่แตกต่างกันได้รับสารอินทรีย์ทั้งจากแผ่นดินและจากทะเล สถานีที่ห่างจากชายฝั่งได้รับจากทะเลเป็นหลัก ดังแสดงใน Figure 3a และ 3b.

แหล่งที่มาของสารอินทรีย์ในดินตะกอน

การบ่งชี้ของแหล่งที่มาของสารอินทรีย์ในดินตะกอน โดยใช้ simple mixing model (Onpankoon and Boonphakdee, 2012; Gu et al, 2017) ในการคำนวณสัดส่วนของแหล่งที่มาของสารอินทรีย์ในดินตะกอน บริเวณชายฝั่งทะเลของเทศบาลเมืองชลบุรี (Figure 4a, 4b) พบว่าแหล่งที่มาของสารอินทรีย์ในดินตะกอนของสถานีที่อยู่ใกล้ชายฝั่งเทศบาลเมืองชลบุรี (น้อยกว่า 1000 เมตร) ได้รับสารอินทรีย์จาก

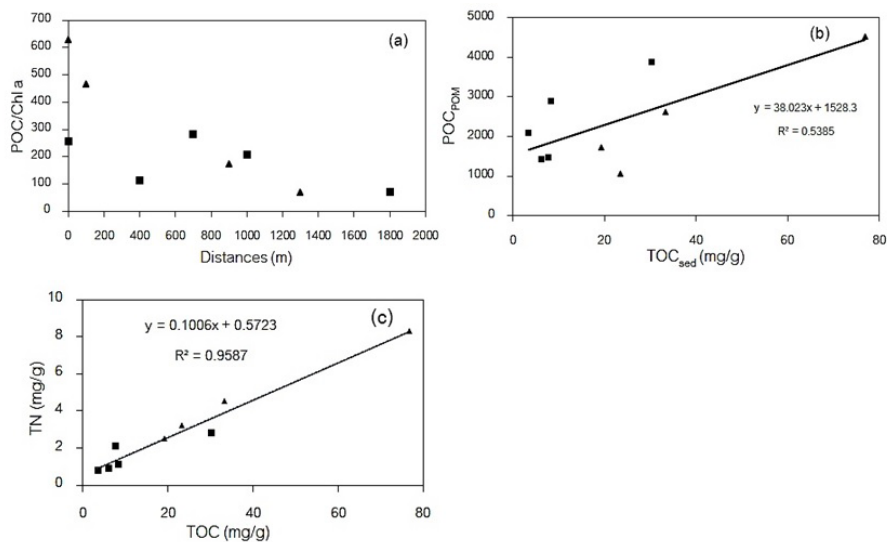


Figure 2 Relationships between POC:Chl *a* and distances (a), linear correlation between POC_{POM} and TOC_{sed} (b) and between TN and TOC (c) of SK (▲) and BPS (■).

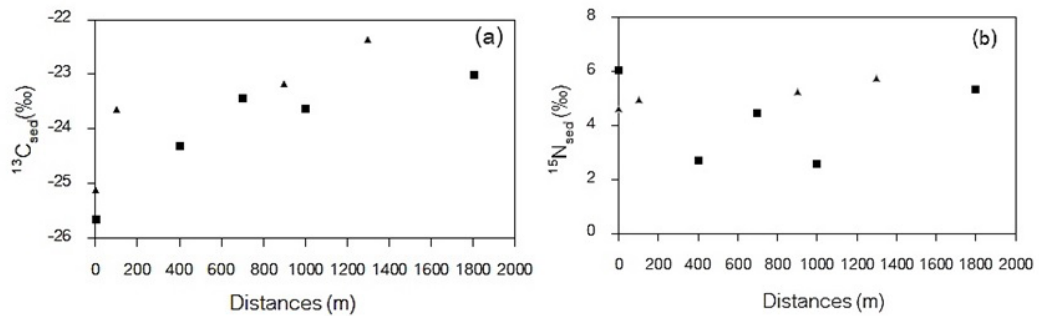


Figure 3 Relationships between $\delta^{13}C$ (a) and $\delta^{15}N$ (b) in surface sediments and seaward distances in study area SK (▲) and BPS (■).

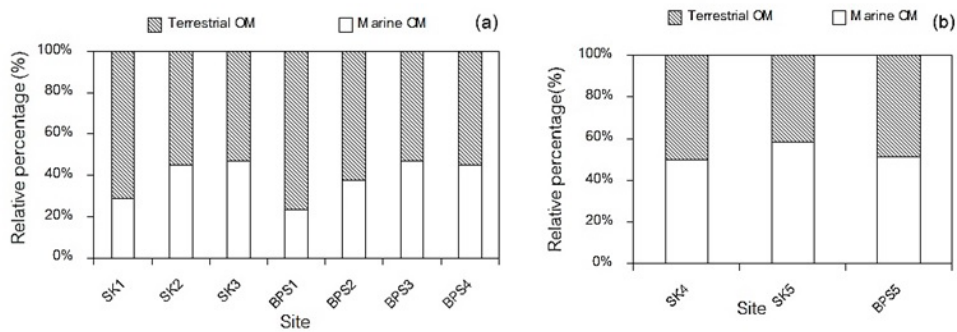


Figure 4 The relative percentages of terrestrial and marine organic carbon in sediments in coastal (distances less than 1000 m) (a) and offshore areas (distance more than 1000 m) (b).

น้ำที่มากกว่าร้อยละ 50 สอดคล้องกับการศึกษาของ Sampaio et al.(2010) และ Gu et al. (2017) ซึ่งพบว่าสถานที่ห่างจากชายฝั่งได้รับสารอินทรีย์จากแผ่นดินน้อยกว่าร้อยละ 50 ซึ่งให้เห็นว่าสารอินทรีย์จากน้ำที่ชุมชนมีปริมาณการสะสมอยู่ใกล้ชายฝั่งสูง และลดลงตามระยะทาง

สรุป

จากการศึกษากระจายของสารอินทรีย์ที่มาจากน้ำที่ชุมชนบริเวณชายฝั่งทะเลเทศบาลเมืองชลบุรี พบว่าสารอินทรีย์ในน้ำทะเลและดินตะกอนระดับผิวมีปริมาณการกระจายลดลงเมื่อมีระยะห่างจากฝั่งออกสู่ทะเล

ชายฝั่งทะเลเทศบาลเมืองชลบุรีดินตะกอนใกล้ชายฝั่งได้รับสารอินทรีย์มาจากน้ำที่ชุมชนเป็นหลัก เมื่อคำนวณสัดส่วนของแหล่งที่มาของสารอินทรีย์ใน

ดินตะกอน พบว่าสถานที่ใกล้ชายฝั่งมีแหล่งที่มาจากน้ำที่ชุมชน ส่วนสถานที่อยู่ห่างชายฝั่งได้รับสารอินทรีย์มาจากแพลงก์ตอนพืช

เอกสารอ้างอิง

กรมการปกครอง. 2561. จำนวนประชากรปี 2561. <http://stat.dopa.go.th> ค้นเมื่อ 3 มิถุนายน 2561.
 นฤตตม์ สหนาวิน และจิรวรรณ ตอฤทธิ. 2555. ปรัชญาการณัฐโทรพีเคชั่น. วารสารคณะพลศึกษา15:154-159.
 Cifuentes, L. A., R. B. Coffin., L. Solorzano., W. Cardenas., J. Espinoza, and R. R. Twilley.1996. Isotopic and elemental variations of carbon and nitrogen in a mangrove estuary. Estuarine, Coastal and Shelf Science. 43: 781-800.

- Boonphakdee, T., A. Kasai., T. Fujiwara., P. Sawangwong, and V. Cheevaporn. 2008. Combined stable carbon isotope and C/N ratios indicators of source and fate of organic matter in the Bangpakong river estuary, Thailand. *EnvironmentAsia*. 28-36.
- Gu, Y. G., J. Ouyang., J. J. Ning, and Z. H. Wang. 2017. Distribution and sources of organic carbon, nitrogen and their isotopes in surface sediments from the largest mariculture zone of the eastern Guangdong coast, South China. *Marine Pollution Bulletin*. 120: 286-291.
- Hu, J., G. Zhang., K. Li., P. A. Peng, and A. R. Chivas. 2008. Increased eutrophication offshore Hong Kong, China during the past 75 years: Evidence from high-resolution sedimentary records. *Marine Chemistry*. 110: 7-17.
- Kao, S. J., F. J. Lin, and K. K. Liu. 2003. Organic carbon and nitrogen contents and their isotopic compositions in surficial sediments from the East China sea shelf and the southern Okinawa trough. *Deep-Sea Research II*. 50:1203-1217.
- Liu, D., X. Li., K. C. Emeis., Y. Wang, and R. Pierre. 2015. Distribution and sources of organic matter in surface sediments of Bohai Sea near the Yellow River Estuary, China. *Estuarine Coastal and Shelf Science*. 165:128-136.
- Liu, M., L. J. Hou., S. Y. Xu., D. N. Ou., Y. Yang., J. Yu, and Q. Wang. 2006. Organic carbon and nitrogen stable isotopes in the intertidal sediment from the Yangtze Estuary, China. *Marine Pollution Bulletin*. 52: 1625-1633.
- Mishima, Y., A. Hoshika, and T. Tanimoto. 1999. Deposition rates of terrestrial and marine organic carbon in the Osaka Bay, Seto Inland Sea, Japan, determined using carbon and nitrogen stable isotope ratios in the sediment. *Journal of Oceanography*. 55:1-11.
- Namthip, B, and T. Boonphakdee. 2013. Variation of chemical and isotopic compositions of particulate organic matter in the inner Gulf of Thailand. *EnvironmentAsia*. 449-460.
- Nijole, R. N., L. Galina., M. Vitalijus., B. Ruta., Z. Mindaugas., V. L. Irma., G. B. Galina, and S. Algirdas. 2017. Assessing nature and dynamics of POM in transitional environment (the Curonian Lagoon, SE Baltic Sea) using a stable isotope approach. *Ecological Indicators*. 82:217-226.
- Piola, R. F., S. K. Moore, and I. M. Suthers. 2006. Carbon and nitrogen stable isotope analysis of three types of oyster tissue in an impacted estuary. *Estuarine Coastal and Shelf Science*. 66:255-266.
- Ramaswamy, V., B. Gaye., P. V. Shirodkar., P. S. Rao., A. R. Chivas., D. Wheeler, and S. Thwin. 2008. Distribution and sources of organic carbon, nitrogen and their isotopic signatures in sediments from the Ayeyarwady (Irrawaddy) continental shelf, northern Andaman Sea. *Marine Chemistry*. 111:137-150.
- Sampaio, L., R. Freitas., C. Mangus., A. Rodringues, and V. Quintino. 2010. Coastal sediments under the influence of multiple organic enrichment sources: An evaluation using carbon and nitrogen stable isotopes. *Marine Pollution Bulletin*. 60:272-282.
- Sangmanee, P., T. Boonphakdee, and N. Boonkhwang. 2017. An application of geographic information systems for wastewater management based on land use characteristic in Chonburi province. *EnvironmentAsia*. 626-635.
- Onpankoon, S. and T. Boonphakdee. 2012. Chemical and sources of organic matter in sediment from the Inner Gulf of Thailand. p. 404-414. In *Proceedings of Marine Sciences Conference 2012*. Oct 17-19, 2012. The Tawanna Bangkok Hotel.
- Xu, G., J. Lui., G. Hu., N. T. Jonell, and L. Chen. 2017. Distribution and source of organic matter in surface sediment from the muddy deposit along the Zhejiang coast. East China sea. *Marine Pollution Bulletin*. 123:395-399.