

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 7538-6:2010

ISO 10381-6:2009

Xuất bản lần 2

CHẤT LƯỢNG ĐẤT – LẤY MẪU –

**PHẦN 6: HƯỚNG DẪN VỀ THU THẬP, XỬ LÝ VÀ BẢO
QUẢN MẪU ĐẤT Ở ĐIỀU KIỆN HIẾU KHÍ ĐỂ ĐÁNH GIÁ
CÁC QUÁ TRÌNH HOẠT ĐỘNG, SINH KHỐI VÀ TÍNH ĐA
DẠNG CỦA VI SINH VẬT TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM**

Soil quality – Sampling –

*Phần 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil under aerobic
conditions for the assessment of microbiological processes, biomass and diversity in
the laboratory*

HÀ NỘI – 2010

Lời nói đầu

TCVN 7538-6:2010 thay thế TCVN 5960:1995 (ISO 10381-6:1993).

TCVN 7538-6:2010 hoàn toàn tương đương với ISO 10381-6:2009.

TCVN 7538-6:2010 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC 190 *Chất lượng đất* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học Công nghệ công bố.

Bộ TCVN 7538 (ISO 10381) *Chất lượng đất - Lấy mẫu* bao gồm các phần sau:

- TCVN 7538-1 (ISO 10381-1) Phần 1: Hướng dẫn thiết kế chương trình lấy mẫu;
- TCVN 7538-2 (ISO 10381-2) Phần 2: Hướng dẫn kỹ thuật lấy mẫu;
- TCVN 7538-3 (ISO 10381-3) Phần 3: Hướng dẫn an toàn;
- TCVN 7538-4 (ISO 10381-4) Phần 4: Hướng dẫn quá trình điều tra vùng tự nhiên, bán tự nhiên và vùng canh tác;
- TCVN 7538-5 (ISO 10381-5) Phần 5: Hướng dẫn qui trình điều tra các vùng đô thị và vùng công nghiệp liên quan đến nhiễm bẩn đất;
- TCVN 7538-6 (ISO 10381-6) Phần 6: Hướng dẫn về thu thập, xử lý và bảo quản mẫu đất dưới điều kiện hiếu khí để đánh giá các quá trình hoạt động, sinh khối và tính đa dạng của vi sinh vật trong phòng thí nghiệm.

Bộ ISO 10381 còn gồm các phần sau:

- ISO 10381-7 Part 7: Guidance on sampling of soil gas;
- ISO 10381-8 Part 8: Guidance on sampling of stockpiles.

Lời giới thiệu

Đất là một thực thể phức tạp và không đồng nhất vì chúng bao gồm cả các hợp phần hữu sinh và vô sinh xảy ra trong mỗi kết hợp khác nhau. Do vậy, điều kiện của đất, từ giai đoạn thu thập đến giai đoạn hoàn thành một thí nghiệm cần phải xem xét đến các mối liên quan đến vi sinh vật đất. Nhiệt độ, hàm lượng nước, nồng độ oxy có sẵn và thời gian bảo quản tất cả đều được biết là có ảnh hưởng đến hệ vi sinh vật đất, và do vậy ảnh hưởng đến các quá trình chúng sinh sống.

Tuy nhiên, đất có thể được sử dụng hữu hiệu trong hệ thống phòng thí nghiệm để khảo sát các quá trình của vi sinh vật, miễn là động thái của hệ vi sinh vật đất được dự kiến. Tiêu chuẩn này cung cấp các hướng dẫn về thu thập, xử lý và bảo quản đất trong phòng thí nghiệm nếu hoạt tính vi sinh vật hiếu khí là hợp phần nghiên cứu chính. Tiêu chuẩn này cũng mô tả cách giảm thiểu ảnh hưởng của nhiệt độ, hàm lượng nước và oxy trong quá trình hiếu khí để tạo thuận lợi cho tính tái lập của các phép xác định trong phòng thí nghiệm.

Chất lượng đất – Lấy mẫu –

Phần 6: Hướng dẫn về thu thập, xử lý và bảo quản mẫu đất ở điều kiện hiếu khí để đánh giá các quá trình hoạt động, sinh khối và tính đa dạng của vi sinh vật trong phòng thí nghiệm

Soil quality – Sampling –

Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil under aerobic conditions for the assessment of microbiological processes, biomass and diversity in the laboratory

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này đưa ra hướng dẫn về thu thập, vận chuyển và bảo quản mẫu đất để sau đó tiến hành thử nghiệm dưới điều kiện hiếu khí trong phòng thí nghiệm. Những khuyến nghị trong tiêu chuẩn này không áp dụng cho việc xử lý đất ở nơi có điều kiện kỵ khí được duy trì liên tục.

Tiêu chuẩn này chủ yếu áp dụng cho vùng đất có khí hậu ôn hòa. Đất được lấy trong điều kiện khí hậu khắc nghiệt (ví dụ. đất đóng băng thường xuyên, đất nhiệt đới) có thể cần xử lý đặc biệt.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này, áp dụng các thuật ngữ và định nghĩa sau:

2.1

Hiếu khí (aerobic)

Mô tả về điều kiện mà trong đó có oxy phân tử tự do.

2.2

Kỵ khí (anaerobic)

Mô tả điều kiện mà trong đó không có oxy phân tử.

2.3

Hàm lượng nước theo khối lượng khô (water content on a dry mass basis)

TCVN 7538-6:2010

Khối lượng nước bay hơi từ đất khi sấy đất ở nhiệt độ 105 °C đến khối lượng không đổi, chia cho khối lượng khô của đất và nhân với 100.

[TCVN 5963:1995 (ISO 11465:1993, 3.2)]

3 Quy trình

3.1 Lựa chọn địa điểm lấy mẫu

Các địa điểm lấy mẫu tại các vị trí lấy mẫu cần phải được lựa chọn theo mục đích nghiên cứu.

Những địa điểm này cần phải được nhận biết rõ và ghi chép lại, ví dụ trên bản đồ bằng cách đối chiếu với các vật cố định để nhận hoặc dùng một bản đồ đối chiếu chi tiết hoặc bằng GIS. Nếu có thể được thì địa điểm lấy mẫu cần được đánh dấu sao cho chúng có thể được dùng cho các thử nghiệm so sánh hoặc để lấy mẫu lại.

3.2 Mô tả vị trí lấy mẫu

Việc lựa chọn một vị trí lấy mẫu đất tùy thuộc vào mục đích của từng nghiên cứu cụ thể, và các hiểu biết về lịch sử của khu vực đất đai được lấy mẫu. Vị trí lấy mẫu cần phải được mô tả một cách chính xác và cung cấp cả lịch sử của vị trí đó nữa. Các chi tiết về thảm thực vật bao phủ đất, địa hình của vùng lấy mẫu (ví dụ khu vực bằng phẳng, độ nghiêng, độ dốc), và các điều kiện về hóa học và sinh học hoặc sự có ô nhiễm cần phải được ghi chép lại và viết vào báo cáo.

3.3 Điều kiện lấy mẫu

Mẫu đất để tiến hành nghiên cứu trong điều kiện của phòng thí nghiệm, nếu có thể thì phải lấy ở hiện trường nơi đất có hàm lượng nước không gây khó khăn cho việc rây đất. Tránh lấy mẫu khi hoặc sau khi đất bị khô hạn (ví dụ 1 tháng), bị đóng băng hoặc bị ngập lụt, trừ những yêu cầu khác của nghiên cứu. Nếu thử nghiệm để phục vụ cho việc quan trắc ngoài hiện trường, thì mới chấp nhận lấy mẫu với điều kiện hiện có của hiện trường. Mẫu đất có thể được làm lạnh trước khi nghiên cứu, ví dụ, quá trình oxi hóa amoni.

3.4 Phương pháp lấy mẫu

Kĩ thuật lấy mẫu tùy thuộc vào mục đích nghiên cứu. Nếu yêu cầu lấy mẫu đất canh tác hiếu khí, thì thông thường mẫu được lấy suốt chiều sâu tầng canh tác thực tại. Bất cứ lớp phủ thực vật bề mặt đất bao phủ, lớp rác đã phủ-rêu, rễ cây, cành cây hoặc rác từ cây gỗ và các động vật sống trong đất có thể nhìn thấy đều phải nhặt bỏ để giảm đến mức thấp nhất việc bổ sung cacbon hữu cơ vào trong đất. Thành phần hữu cơ sinh ra từ rễ cây và các nguồn khác có thể gây ra những thay đổi không thể đoán trước được trong thành phần và hoạt tính của hệ vi sinh vật trong đất. Nếu đất tự nhiên có những tầng khác biệt thì mẫu đất cần lấy ở những tầng đó.

3.5 Đánh dấu mẫu

Dụng cụ chứa mẫu cần phải sạch và được đánh dấu rõ ràng rành mạch và được phân định sao cho mỗi một mẫu có thể thể hiện được địa điểm của khu vực mẫu đã được lấy. Cần tránh sử dụng các dụng cụ chứa mẫu có thể hấp thụ nước từ đất hoặc tiết ra các chất, ví dụ như dung môi hoặc chất dẻo, hòa vào trong mẫu đất.

3.6 Điều kiện vận chuyển mẫu

Mẫu cần được vận chuyển theo cách thức sao cho giảm được tới mức thấp nhất sự thay đổi hàm lượng nước trong đất, và mẫu cần được giữ trong tối, tiếp xúc với không khí dễ dàng; nói chung một túi polyetylen thất hơi lỏng là đáp ứng được nhu cầu này. Cần phải tránh các điều kiện môi trường khắc nghiệt: đất nên giữ càng mát càng tốt nhưng quan trọng là không được làm cho đất bị khô cứng hoặc trở nên sũng nước. Tránh tiếp xúc với ánh sáng trong thời gian dài vì điều này kích thích sự phát triển của tảo trên bề mặt đất. Tránh để đất bị nén vật lý càng tốt.

Mẫu dùng cho phân tích AND hoặc ARN cần phải làm lạnh thật nhanh ở hiện trường sử dụng đá khô. Trong quá trình vận chuyển tới phòng thí nghiệm, đá khô được sử dụng để giữ nhiệt độ của mẫu để phân tích ARN. Mẫu dùng cho phân tích AND có thể được vận chuyển trong hộp mát ngoại trừ trường hợp cũng yêu cầu phải sử dụng đá khô.

3.7 Xử lý đất

Đất cần được xử lý càng nhanh càng tốt sau khi lấy mẫu. Thực vật, động vật sống trong đất và sỏi sạn cần phải loại bỏ trước khi rây qua rây cỡ lỗ 2 mm. Rây đất qua rây cỡ lỗ 2 mm để tạo thuận lợi cho sự trao đổi khí giữa các hạt đất và do vậy nên giữ đất trong điều kiện hiếu khí tự nhiên của đất. Đồng thời cũng cần loại bỏ đá sỏi nhỏ, động vật và các mẫu vụn thực vật ra khỏi đất. Một số chất hữu cơ như lớp đất bùn lầy hoặc than bùn sẽ khó lọt qua rây có lỗ 2 mm và cần phải rây với rây có lỗ 5 mm ở điều kiện ẩm. Công việc này cần đến sự thao tác thủ công và chất lượng của các vật liệu lọt qua rây phụ thuộc vào người thực hiện. Nếu đất bị quá ẩm thì rải đất ra, và thổi nhẹ không khí vào đất để tạo điều kiện cho đất được khô đều. Đất cần được bóp vụn bằng tay và thỉnh thoảng đảo đều để tránh lớp đất bề mặt bị quá khô. Thông thường công việc được thực hiện ở điều kiện nhiệt độ xung quanh không đổi. Nếu cần làm khô đất thì không nên làm khô quá mức cần thiết để tạo thuận lợi cho công việc rây đất. Nói chung, không nên làm khô đất ngay cả làm khô trong không khí và làm ẩm lại vì sẽ ảnh hưởng đến sinh lý nói chung của các quần thể vi khuẩn trong đất bề mặt. Trường hợp làm khô-làm ẩm lại có thể gây ra sự thay đổi đáng kể về tính động thái C và N của vi sinh vật mà có thể kéo dài hơn một tháng^[12]. Làm ẩm lại sau khi làm khô dẫn đến sự bùng phát hô hấp và phát triển của quần thể vi khuẩn rõ rệt^[15]. Nếu bảo quản mẫu đất lâu hơn thì phương pháp xử lý cần xem xét theo các thông số nêu trong 3.8.

3.8 Điều kiện bảo quản và thời gian bảo quản

Mẫu đất cần được bảo quản ở chỗ tối với nhiệt độ $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$, tiếp xúc dễ dàng với không khí. Đặt mẫu vào trong một túi chất dẻo thất hơi lỏng hoặc đựng trong một túi tương tự như vậy nói chung là phù hợp với yêu cầu đã nêu. Cần phải cẩn thận để đảm bảo rằng khối lượng đất được lưu giữ không quá nhiều để không cho điều kiện yếm khí xảy ra dưới đáy của các dụng cụ chứa mẫu. Mẫu đất cần phải được xử lý (xem 3.7) trước khi bảo quản để đảm bảo điều kiện hiếu khí ổn định. Điều quan trọng là đất không được để bị khô hoặc trở nên sũng nước trong thời gian bảo quản. Mẫu đất không được để chồng lên nhau. Sử dụng mẫu đất sau khi lấy càng sớm càng tốt. Cần phải giảm đến mức thấp nhất mọi nguyên nhân làm trì hoãn việc vận chuyển mẫu. Nếu cần phải bảo quản mẫu là điều không thể tránh khỏi thì đất không được bảo quản quá ba tháng trừ khi mẫu đất còn cho thấy các dấu hiệu hoạt động của vi sinh vật trong đất. Các mẫu đất dùng cho phân tích AND phải làm lạnh ở nhiệt độ $-20 ^\circ\text{C}$ nếu không xử lý được ngay. Đối với các phân tích ARN, mẫu phải làm lạnh ở nhiệt độ $-80 ^\circ\text{C}$.

Nếu mẫu đất cần được bảo quản trong thời gian dài hơn (hơn ba tháng), thì làm lạnh mẫu ở nhiệt độ thích hợp $-20 ^\circ\text{C}$, $-80 ^\circ\text{C}$ hoặc $-180 ^\circ\text{C}$ mặc dù không thường xuyên được khuyến nghị. Ví dụ đối với điều kiện bảo quản thích hợp cho một số mục đích thử được nêu trong Bảng 1. Các điều kiện này cho thấy một số mẫu được lấy ở vùng có khí hậu ôn hòa mà bảo quản ở nhiệt độ $-20 ^\circ\text{C}$ tới 12 tháng không ức chế được hoạt động của vi khuẩn (ví dụ quá trình oxy hóa amoni). Hơn nữa, mẫu đất để phân tích axit béo phospholipid (PLFA) và phân tích AND có thể được bảo quản ở nhiệt độ $-20 ^\circ\text{C}$ trong một tới hai năm. Mẫu để phân tích ARN có thể bảo quản ở nhiệt độ $-80 ^\circ\text{C}$ trong thời gian tương tự. Nên làm lạnh nhanh với băng nitơ lỏng để mẫu đông lạnh dùng cho các phân tích AND, ARN và PLFA/PLEL.

Khoảng thời gian bảo quản dài hơn chủ yếu là cần cho các phép thử nếu nghiên cứu ảnh hưởng của việc đưa thêm các chất ô nhiễm lên vi sinh vật đất và hoạt động của vi sinh vật trong đất với cùng vật liệu đất hoặc nếu đánh giá cấu trúc quần thể (PLFA, AND, ARN) của đất tại các thời điểm khác biệt trong năm. Trong trường hợp này, thời gian cần cho các phân tích có thể dễ vượt quá ba tháng (hóa chất, phép thử chất ô nhiễm). Đối với phân tích cấu trúc của hệ vi thực vật, bảo quản ở nhiệt độ $4 ^\circ\text{C}$ là không phù hợp.

Bảng 1 – Điều kiện bảo quản để đánh giá các quá trình hoạt động của vi sinh vật hiếu khí khi không thể tiến hành ngay phân tích

Mục đích thử	Tiêu chuẩn	Độ ẩm 4 °C (tháng)	Độ ẩm -20 °C ^a (năm)	Độ ẩm -80 °C hoặc nitơ lỏng (-180 °C) ^a (năm)
PLFA, PLEL		–	2	10
AND		–	2	10
ARN		–	–	10
Sinh khối - Phương pháp hô hấp đã cảm ứng chất nền - Phương pháp chiết – xông hơi	TCVN 6856-1 (ISO 14240-1) TCVN 6856-2 (ISO 14240-2)	3	1	10
Khả năng oxi hóa amoni	ISO 15685	3	1	10
Sự khoáng hóa nitơ	TCVN 6653 (ISO 14238)	3	1	10
Sự hô hấp trong đất của vi sinh vật	ISO 16072	3	1	10
Phạm vi hô hấp trong đất	ISO 17155	3	1	10
Hoạt tính dehydrogenaza	ISO 23753-1 ISO 23753-2	3	1	–
Ký hiệu: — = không có khả năng bảo quản.				
^a Đất được chia thành mẫu phụ cho những nghiên cứu thêm trước khi bảo quản. Cách khác, PLFA cần phải được chiết ra từ đất đồng ẩm (< 2 mm) ngay sau khi lấy mẫu. Dịch chiết này có thể được bảo quản ở nhiệt độ -20 °C trong vài tháng trước khi thực hiện bước tách và phân tích bằng GC/MS. Nên làm lạnh ngay lập tức trong nitơ lỏng trước khi bảo quản ở nhiệt độ -20 °C hoặc -80 °C.				

3.9 Ủ mẫu sơ bộ

Trước khi đem đất đã được xử lý sử dụng vào một thí nghiệm cụ thể trong phòng thí nghiệm, thì đất cần được ủ sơ bộ để cho các hạt cây cỏ ở trong đất này mềm và loại bỏ các hạt đó, và để tái lập lại sự cân bằng trao đổi chất của vi sinh vật tiếp theo sau sự thay đổi từ lúc lấy mẫu và điều kiện lưu giữ mẫu cho đến lúc điều kiện ủ mẫu tạo ra. Các điều kiện ủ mẫu sơ bộ sẽ phụ thuộc vào mục đích nghiên cứu nhưng phải càng gần giống điều kiện thử càng tốt nếu có thể. Thời gian ủ sơ bộ tùy thuộc vào mục đích của nghiên cứu, thành phần đất và điều kiện ủ sơ bộ/bảo quản. Thời gian thích hợp thường trong khoảng 2 ngày và 28 ngày.

Nếu mẫu đã được đông lạnh, cần đặc biệt chú ý quá trình rã đông mẫu. Đối với các phân tích về hoạt tính của vi sinh vật (ví dụ sự hô hấp trong đất), thời gian rã đông nên là một tuần ở nhiệt độ 4 °C và đối

TCVN 7538-6:2010

với phân tích khác thời gian rã đông là ba ngày ở nhiệt độ 20 °C. Thời gian rã đông một ngày ở 20 °C cũng có thể phù hợp. Đối với phân tích AND, ARN và PLFA/PLEL, thời gian rã đông càng ngắn càng tốt để tránh các quá trình phân hủy.

Đông lạnh mẫu có thể làm thay đổi khả năng giữ nước; do vậy, đối với những mẫu như thế cần xác định khả năng giữ nước sau khi rã đông.

4 Báo cáo lấy mẫu

Báo cáo chi tiết về lấy mẫu phụ thuộc vào mục đích lấy mẫu, nhưng nói chung các dữ liệu sau cần phải đưa vào báo cáo.

- a) Viện dẫn tiêu chuẩn này;
- b) Địa điểm lấy mẫu (đủ chính xác để một người khác tìm ra mà không cần có hướng dẫn gì thêm);
- c) Sự mô tả toàn diện của các chi tiết và nét đặc trưng tương ứng của vị trí lấy mẫu;
- d) Lịch sử của vị trí lấy mẫu, bao gồm cả việc sử dụng đất trước đây và bất kì sự bổ sung hóa học hay sinh học vô tình hoặc cố ý;
- e) Thời gian thu thập mẫu (ngày, giờ);
- f) Điều kiện thời tiết vào thời điểm hay ngay trước lúc lấy mẫu bao gồm nhiệt độ không khí, mưa, ánh nắng mặt trời, mây v.v...;
- g) Địa điểm chính xác nơi mẫu được lấy;
- h) Loại dụng cụ, thiết bị được dùng để lấy mẫu;
- i) Mẫu có cần hoặc không cần làm khô trước khi rây hay không;
- j) Số lượng mẫu lấy, vùng có mảnh đất nhỏ được lấy mẫu hoặc khu vực lấy mẫu;
- k) Độ sâu lấy mẫu;
- l) Các mẫu đất riêng biệt hay được gộp thành mẫu tổ hợp;
- m) Thời gian xen kẽ giữa khi lấy mẫu, vận chuyển và xử lý mẫu sau khi lấy mẫu;
- n) Mọi yếu tố có thể ảnh hưởng tới kết quả thử nghiệm sau này.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6648 (ISO 11465) Chất lượng đất – Xác định chất khô và hàm lượng nước theo khối lượng,
- [2] TCVN 6653 (ISO 14238) Chất lượng đất – Phương pháp sinh học – xác định quá trình khoáng hóa nitơ và nitrit hóa trong đất và ảnh hưởng của hóa chất đến các quá trình này.
- [3] TCVN 6856-1 (ISO 14240-1), Chất lượng đất – Xác định sinh khối vi sinh vật đất – Phần 1: Phương pháp đo hô hấp cảm ứng chất nền.
- [4] TCVN 6856-2 (ISO 14240-2), Chất lượng đất – Xác định sinh khối vi sinh vật đất – Phần 2: Phương pháp chiết xông hơi.
- [5] ISO 15685, *Soil quality – Determination of potential nitrification and inhibit of nitrification – Rapid test by ammonium oxidation*
- [6] ISO 16072, *Soil quality – Laboratory methods for determination of microbial soil respiration*
- [7] ISO 17155, *Soil quality – Determination of abundance and activity of soil microflora using respiration curves*
- [8] ISO 23753-1, *Soil quality – Determination of dehydrogenase activity in soil – Part 1: Method using triphenyltetrazolium chloride (TTC)*
- [9] ISO 23753-2, *Soil quality – Determination of dehydrogenase activity on soil – Part 2: Method using iodotetrazolium chloride (INT)*
- [10] ANDERSON, J.P.E. Handling and Storage of Soil and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. *Soil Science*, **100**, 1965, pp. 68-70
- [11] BARTHA, R. and PRAMER, D., *Features of a flask for pesticide Experiments, Pesticide Effects and Soil Microflora* (eds. Sommerville, L. and Greaves, M.P.), 1987, pp. 45-60, Taylor and Francis
- [12] FIERER, N. and SCHIMMEL, J.P. Effects of drying-rewetting frequency on soil carbon and nitrogen transformations. *Soil biology & Biochemistry*, **34**, 2002, pp. 777-787
- [13] GOBERNA, M., INSAM, H., PASCUAL, J.A. and SANCHEZ, J. Storage effects on the community level physiological profiles of Mediterranean forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **37**, 2005, pp. 173-178
- [14] HAYNES, R.J. and BEARE, M.H. Aggregation and organic matter storage in meso-thermal, humid soils. In: *Soil Structure and Organic Matter Storage* (eds. Carter, M.R., Steward, B.A.), CRC/Lewis Publishers, Boca Raton, 1996, pp. 213-262

- [15] LUND, V. and GOKSØR, J. Effects of water Fluctuations on Microbial Mass and Activity on Soil. *Microbial Ecol.*, **6**, 1980, pp. 115-123
- [16] SHISHIDO, M. and CHANWAY, C.P. Storage effect on indigenous microbial communities and PGPR efficacy. *Soil Biology and Biochemistry*, **30**, 1998, pp. 939-947
- [17] STENBERG, B., JOHANSSON, M., SJODAHL-SVENSSON, K., STENSTROM, J. and TORSTENSSON, L. Microbial biomass and activities in soil as affected by frozen and cold storage. *Soil biology and biochemistry*, **30**, 1998. pp. 293-402
- [18] VERCHOT, L.V. Cold storage of a tropical soil decrease nitrification potential. *Soil Science Society of America Journal*, **63**, 1999, pp. 1942-1944
-