

长江口牡蛎礁恢复及碳汇潜力评估

沈新强, 全为民, 袁 骐

(中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090)

摘 要:牡蛎礁是温带河口和滨海区一种特殊的海洋生境,它具有生物生产、净化水体、提供鱼类生境、维持生物多样性和防止海岸侵蚀等重要功能,根据对长江口牡蛎礁恢复工程的跟踪监测结果,分析和评估该人工牡蛎礁恢复及碳汇潜力。研究表明,在2004—2010年期间,该人工牡蛎礁牡蛎种群的增长迅速,2005年牡蛎平均密度和生物量达到最高,以后各年牡蛎生长过程中存在“自疏”现象和死亡,总密度下降,但个体增长。牡蛎礁上大型底栖动物物种数、总密度和总生物量呈快速的增长趋势,2004年至2010年共出现大型底栖动物47种,至2010年8月其密度和生物量分别达到 $941 \text{ ind} \cdot \text{m}^{-2}$ 和 $44.51 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ 。该人工牡蛎礁具有强大的固碳能力,通过牡蛎的钙化过程,单位面积年固碳量为 $2.70 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$,年平均固定碳量达 $3.33 \times 10^4 \text{ t}$,直接产生的年平均固碳效益达837万元,相当于营造 1110 hm^2 热带森林。

关键词:牡蛎礁;恢复;碳汇;评估;长江口

中图分类号:X174 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2011)10-2119-05

Restoration and Assessment of Carbon Sink Potential for Intertidal Oyster Reef in the Yangtze River Estuary, China

SHEN Xin-qiang, QUAN Wei-min, YUAN Qi

(East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Shanghai 200090, China)

Abstract: With the adoption of Kyoto Protocol to the United Nation Framework Convention of Climate Change in 2005, carbon sink fishery becomes the hotspot among the fishery science and technology of China. Oyster reefs are very important marine habitats in temperate estuaries and coasts, providing large number of services and goods such as fishery production, water purification, fish habitat, maintenance of biodiversity, erosion control etc. So far, little information is available on the carbon sink potential of oyster reefs. The present study aimed to assess the restoration and carbon sink potential of a created intertidal oyster reef was in the Yangtze River estuary, China. The oyster (*Crassostrea* sp.) population rapidly increases with reef development, and its mean density and biomass reached the highest at approximately one year after restoration (in June 2005). Thereafter, the mean oyster density decreased with the increasing in the mean size of the oyster. The species richness, density and biomass of resident macrobenthos (exclusive of oyster and barnacles) in the restored oyster reef showed a gradually increasing trend. The study recorded a total of 47 macrobenthos species, the mean density of $941 \text{ ind} \cdot \text{m}^{-2}$ and biomass of $44.51 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ in 2010. The restored intertidal oyster reef has a strong carbon sink potential of about $2.70 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$, can lock up $3.33 \times 10^4 \text{ t}$ carbon per year through calcification process, and produced ecological value of approximately 8 370 000 RMB per year, which was equivalent to restore 1110 hm^2 tropical forest.

Keywords: oyster reef; restoration; carbon sink; assessment; Yangtze River estuary

自2005年《京都议定书》正式生效以来,提高能源使用效率、降低碳排放、发展低碳经济和碳汇技术已经纳入我国国民经济和社会发展规划。发展碳汇渔

业和渔业低碳技术对于我国渔业的可持续发展、提高我国渔业整体竞争力和转变渔业发展模式具有非常重要的现实意义。

牡蛎礁(oyster reef)是由大量牡蛎固着生长于硬底物表面所形成的一种生物礁系统,它广泛分布于温带河口和滨海区^[1]。除为人类提供大量鲜活牡蛎以供食用外,牡蛎礁还具有十分重要的生态功能与环境服务价值,归纳起来主要包括3个方面:(1)水体净化功能:牡蛎作为滤食性底栖动物,能有效降低河口水体

收稿日期:2011-03-14

基金项目:国家重点基础研究发展计划项目(2010CB429005);中央级公益性科研院所基本科研业务费(中国水产科学研究院东海水产研究所)(2011M01);国家现代农业产业技术体系建设项目(nycyt-47)

作者简介:沈新强(1951—),男,上海青浦人,研究员,主要从事渔业生态与环境研究。E-mail: Xinqiang_shen@hotmail.com

中的悬浮物、营养盐及藻类浓度,对于控制水体富营养化和有害赤潮的发生具有显著效果^[2-4]; (2) 栖息地功能: 牡蛎礁相当于热带地区的珊瑚礁系统, 具有较高生物多样性的海洋生境, 成为许多重要经济鱼类和游泳性甲壳动物的避难、摄食或繁殖场所^[5-7]; (3) 能量耦合功能: 牡蛎具有双壳类“生物泵”(bivalve pump) 功能, 通过滤食将水体中大量颗粒物以假粪便形态输入到沉积物表面, 支持着底栖次级生产^[3-4, 8]。

目前, 国内外学者主要集中研究人工恢复牡蛎礁的水体净化价值^[8-10, 18]和生态功能^[20-21]。关于牡蛎礁具有强大的固碳功能, 能有效降低海水 CO₂ 浓度, 对于缓解温室气体排放对全球气候变化的影响具有重要贡献的研究较少^[13-14]。本文根据对长江口牡蛎礁恢复工程的跟踪监测, 分析、评估该人工牡蛎礁恢复及碳汇潜力, 其研究对于认识人工恢复牡蛎礁系统巨大的碳汇潜力, 对于我国牡蛎礁恢复与碳汇渔业发展具有重要的科学意义。

1 材料与方法

1.1 长江口人工牡蛎礁的构建

依据牡蛎的生理生态特点和长江口的环境条件, 并参照国外有关牡蛎礁构建的相关技术, 利用长江口深水航道整治工程的水工建筑物(导堤和丁坝)作为礁体, 通过直接放养在象山港海域培育的成年巨牡蛎

(*Crassostrea* sp.), 补充牡蛎种群数量, 构建了 260 hm² 人工牡蛎礁。长江口牡蛎礁构建方法: (1) 牡蛎投放地点: 选择长江口深水航道导堤护堤工程的水工建筑物作为牡蛎礁构建的硬底物(图 1); (2) 投放时间: 3 月中旬至 4 月上旬, 为长江口牡蛎礁的补苗时间; (3) 投放方式: 采用固着体(水泥柱和废弃轮胎)整体移植成年牡蛎。对于水泥柱类型, 直接投放在导堤潮间带区及其附近潮下带水域; 对于废弃轮胎固着型, 在轮胎上绑缚 3 个直径 12 cm、高 15 cm 的空心圆柱形混凝土重锤^[17]。

1.2 牡蛎礁现状监测

分别于 2004 年的 4 月、9 月、2005 年 6 月、2007 年 8 月和 2010 年 8 月相继 5 次对该牡蛎礁进行现状监测。监测站位选择南北导堤的 S2、S5、S8、N2、N6 和 N9 断面(图 1), 每个断面在高潮带、中潮带和低潮带各 1 个取样点, 每个取样点调查 3 个样方, 样方面积 0.5 m×0.5 m。采集样品带回实验室分析、鉴定。按《海洋监测规范》^[19]分析, 计算牡蛎礁底栖动物物种数组成, 巨牡蛎的栖息密度和生物量。

1.3 固碳量计算

据 2010 年 8 月的取样分析结果, 按公式(1)计算长江口牡蛎礁的总固碳量。

$$C=W \times T \times V \times S \quad (1)$$

式中: C 为长江口牡蛎礁总固碳量 (kg); T 为牡蛎壳

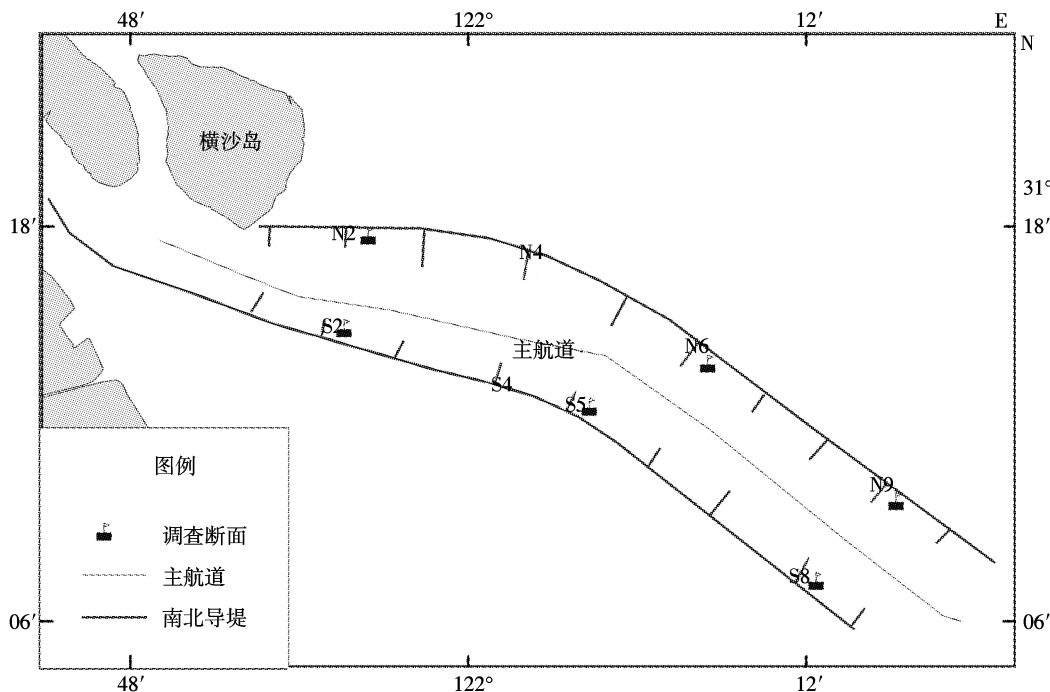


图 1 长江口牡蛎礁构建位置和取样点

Figure 1 Restoration and sampling site of the intertidal oyster reef in the Yangtze River estuary

占牡蛎总重量之比(%); W 为单位面积牡蛎总重量($\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$); V 为牡蛎壳中的碳含量(%); S 为牡蛎固着总面积(m^2)。

2 结果与讨论

2.1 牡蛎种群的增长

图2显示长江口人工恢复的牡蛎礁上巨牡蛎种群的增长动态。2004—2005年巨牡蛎密度和生物量均呈指数增长。与2005年相比,2007年8月巨牡蛎平均密度和生物量(去壳后鲜重)分别达到 $962\text{ ind}\cdot\text{m}^{-2}$ 和 $3\,087\text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$,2010年8月巨牡蛎平均密度和生物量分别达到 $515\text{ ind}\cdot\text{m}^{-2}$ 和 $2\,620\text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ 。与2005年监测结果相比,2007年和2010年巨牡蛎的栖息密度明显下降,而生物量却基本维持稳定,表明在巨牡蛎生长过程中存在“自疏”现象和死亡,总密度下降,但个体增长。从空间分布来看,低潮区牡蛎丰度和生物量显著高于高潮区^[5]。另外,长江口导堤牡蛎礁上牡蛎的平均密度高于美国 Rappahannock 河($77\sim 257\text{ ind}\cdot\text{m}^{-2}$)^[25]、Inlet 河($497\text{ ind}\cdot\text{m}^{-2}$)^[25] 和 Chesapeake 湾($173\text{ ind}\cdot\text{m}^{-2}$)^[12],与亚拉巴马州 Mobile 湾人工恢复的潮下带牡蛎礁上牡蛎密度($850\text{ ind}\cdot\text{m}^{-2}$)^[26]比较相似。

2.2 牡蛎礁底栖动物群落发育

长江口人工构建牡蛎礁系统发挥了重要的栖息地功能,牡蛎礁上大型底栖动物物种数呈快速增长。2004年至2010年共出现大型底栖动物47种,其中:甲壳动物22种,占总物种数的46.81%;软体动物16种,占总物种数的34.04%;环节动物4种,占总物种数的8.51%;鱼类2种,占总物种数的4.25%;棘皮动物门、腔肠动物门和扁形动物门各1种,均占总物种数的2.13%。2004年4月仅为2种大型底栖动物,2005年为17种,2007年为26种,2008年为28种。自从恢复工程开展以来,长江口人工构建牡蛎礁上大

型底栖动物的总密度和总生物量也呈快速增长趋势(图3),至2010年8月其密度和生物量分别达到 $941\text{ ind}\cdot\text{m}^{-2}$ 和 $44.51\text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ 。该人工牡蛎礁系统中大型底栖动物群落的优势种为日本刺沙蚕、双齿围沙蚕、齿纹蛭螺和中间拟滨螺等,这些底栖生物成为河口重要经济鱼类的优质饵料^[5]。长江口导堤牡蛎礁上大型底栖动物密度与新恢复(1~2 a)的潮下带礁上所记录的值比较一致,如 Rappahannock 河^[25]和 Mobile 湾^[26],但明显低于恢复时间较长(>3 a)或自然牡蛎礁上大型底栖动物的丰度,表明大型底栖动物密度与礁体发育状况有关。长江口较低的盐度也是导致该人工牡蛎礁上底栖动物密度较低的原因。有研究发现,牡蛎礁上大型底栖动物的密度和物种丰度与盐度成正相关关系^[27-28]。

另外,长江口导堤牡蛎礁系统约栖息有40多种游泳动物^[5],其中具有重要经济价值的物种有:日本鳀、刀鲚、凤鲚、中国花鲈、鲮、黄姑鱼、黄鳍东方鲀、皮氏叫姑鱼、中华绒螯蟹、锯缘青蟹、葛氏长臂虾、脊尾白虾和安氏白虾等。长江口导堤牡蛎礁系统已成为许多河口重要经济鱼类的栖息、避难和繁殖场所^[5]。

2.3 牡蛎礁碳汇潜力评估

碳是地球圈中最丰富的元素。海水中的碳主要通过吸收大气中二氧化碳(CO_2)的途径来获取,这个过程每年能够吸收2 Gt 碳,通常海水中 CO_2 浓度随着大气中 CO_2 浓度的增加而上升。当海水 CO_2 浓度上升到一定值时,各种不同形态碳会发生还原反应,即一个 CO_2 分子与一个碳酸根离子(CO_3^{2-})和一个水分子(H_2O)反应生成2个碳酸氢根离子(HCO_3^-)^[15-16]。牡蛎礁碳汇过程包括3方面^[22-23]:(1)钙化(Calcification):牡蛎封存碳的能力主要通过牡蛎壳的生长,当牡蛎幼体固着以后,能不断利用水体中的 HCO_3^- 和钙离子(Ca^{2+})形成碳酸钙(CaCO_3);(2)生物同化(Assimila-

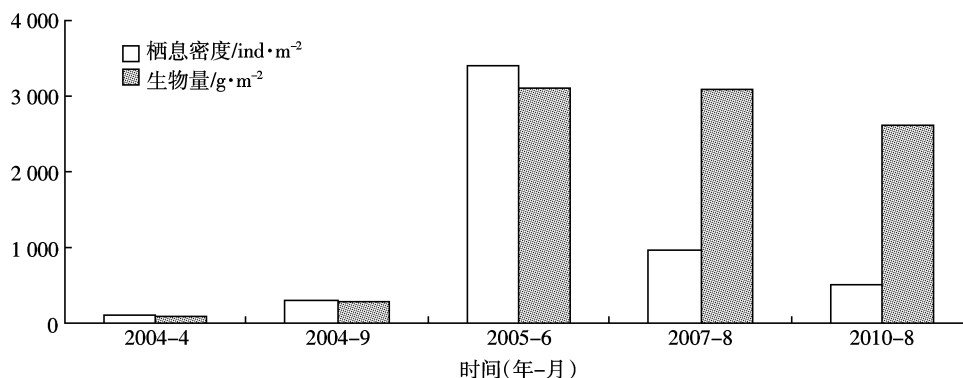


图2 长江口牡蛎礁巨牡蛎栖息密度和生物量的变化

Figure 2 Changes in the mean density and biomass of oyster *Crassostrea* sp. population in the restored oyster reef of Yangtze River estuary

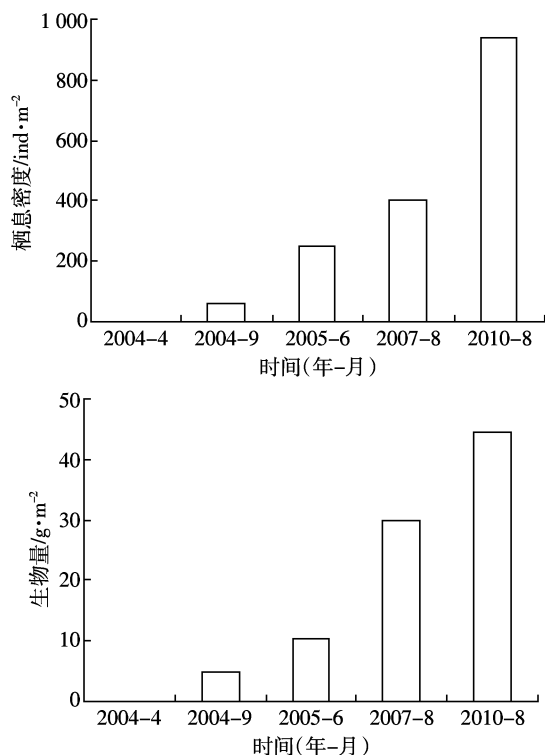


图3 长江口牡蛎礁上大型底栖动物

(不包括固着生物牡蛎和藤壶)栖息密度和生物量的增长

Figure 3 Increase in the mean density and biomass of resident macrobenthos(exclusive of oyster and barnacles) in the restored oyster reef of the Yangtze River estuary

tion):牡蛎通过滤食水体中有机颗粒物,把相当部分有机碳同化进其生物组织;(3)生物沉积(Biodeposition):牡蛎具有生物泵功能,能不断把水体中悬浮颗粒物以假粪便形式输入水体底层,加快生物沉积过程,同时把部分有机或无机碳封存于沉积物中。与生物同化和生物沉积过程相比,钙化过程显然能够封存更多的碳。生物同化和生物沉积所封存的碳在短期内可能通过生物地球化学循环过程重新释放到大气中;而通过钙化过程封存于牡蛎壳内的无机碳(碳酸钙)可以在自然状态存在几千年。

根据测定结果,牡蛎壳约占牡蛎总重量的84%,牡蛎壳中碳含量为12%,其中封存碳量约占牡蛎总重量的10.08%。按2010年8月测定结果,牡蛎总重(活牡蛎和死牡蛎)为 $26.8 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$,则单位面积固碳量为 $26.8 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2} \times 10.08\% = 2.70 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$;据长江口航道管理局测算,长江口深水航道整治工程导堤及丁坝上牡蛎固着面积约 $74 \times 10^6 \text{ m}^2$,则长江口牡蛎礁总固碳量为 $19.98 \times 10^4 \text{ t}$ 。2004年以来,年平均固碳量为 $3.33 \times 10^4 \text{ t}$ 。按照我国造林的平均成本 $251.4 \text{ 元} \cdot (\text{t C})^{-1}$ ^[24]计算,长江口人工牡蛎礁固碳效益为 $837 \text{ 万元} \cdot \text{a}^{-1}$,自该

牡蛎礁建立以来,累计产生的固碳效益达到5022万元;按热带森林的平均固碳量 $30 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2} \cdot \text{a}^{-1}$ ^[24]推算,则长江口人工牡蛎礁恢复相当于营造 1110 hm^2 热带森林。据估算,我国贝类养殖每年从近海移出的碳量为70~99万t,其中67万t碳以贝壳的形式被移出海洋,为碳汇渔业做出了重要贡献。然而也有研究指出,河口水体pH值下降会降低贝类生物钙化速率,影响贝类的固碳潜力^[29]。因此,下一步应研究海水pH值变化对牡蛎固碳潜力的影响机制。

3 结论

本文评估了我国第一个人工构建的牡蛎礁的恢复与碳汇潜力。研究结果表明,该人工牡蛎礁巨牡蛎种群的增长迅速,2005年巨牡蛎平均密度和生物量分别达到最高,以后各年巨牡蛎生长过程中存在“自疏”现象和死亡,总密度下降,但个体增长。牡蛎礁上大型底栖动物物种数、总密度和总生物量呈快速增长趋势,2004—2010年共出现大型底栖动物47种,至2010年8月其密度和生物量分别达到 $941 \text{ ind} \cdot \text{m}^{-2}$ 和 $44.51 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ 。该人工牡蛎礁具有强大的固碳能力,通过牡蛎的钙化过程每年固定碳量达 $3.33 \times 10^4 \text{ t}$,直接产生的固碳效益达 $837 \text{ 万元} \cdot \text{a}^{-1}$,相当于营造 1110 hm^2 热带森林。仅根据2004—2010年的监测数据,初步估算了人工构建牡蛎礁的种类组成和密度变化,以及牡蛎礁的生态固碳能力,尚未开展深入的研究,有关人工牡蛎礁恢复技术、机理,牡蛎礁的环境服务价值和生态功能,C和N元素在牡蛎礁系统内的生物地球化学循环过程尚不清楚,牡蛎的生物同化和生物沉积作用的固碳潜力估算方法应进一步优化。因此,今后应加强相关研究,以便为人工牡蛎礁恢复及碳汇渔业发展提供技术支撑。

参考文献:

- [1] Coen L D, Grizzle R E. The importance of habitat created by mollusk shellfish to managed species along the Atlantic coast of the United States[M]. Atlantic States Marine Fisheries Commission. Habitat Management Series #8, 2007.
- [2] Nelson K A, Leonard L A, Posey M H, et al. Using transplanted oyster (*Crassostrea virginica*) beds to improve water quality in small tidal creeks: A pilot study[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2004, 298:347–368.
- [3] Dame R F, Bushek D, Allen D, et al. The experimental analysis of tidal creeks dominated by oyster reefs: The pre-manipulation year[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2000, 19:361–369.
- [4] Dame R F, Libes S. Oyster reefs and nutrient retention in tidal creeks

- [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1993, 171: 251–258.
- [5] Quan W M, Zhu J X, Ni Y, et al. Faunal utilization of constructed intertidal oyster (*Crassostrea rivularis*) reef in the Yangtze River estuary, China[J]. *Ecological Engineering*, 2009, 35: 1466–1475.
- [6] Meyer D L, Townsend E C. Faunal utilization of created intertidal eastern oyster (*Crassostrea virginica*) reefs in the southeastern United States[J]. *Estuaries*, 2000, 23: 34–45.
- [7] Coen L D, Luckenbach M W. Developing success criteria and goals for evaluating oyster reef restoration: Ecological function or resource exploitation?[J]. *Ecological Engineering*, 2000, 15: 323–343.
- [8] 全为民, 沈新强, 罗民波, 等. 河口地区牡蛎礁的生态功能及恢复措施[J]. 生态学报, 2006, 25(10): 1234–1239.
- QUAN Wei-min, SHEN Xin-qiang, LUO Min-bo, et al. Ecological function and restoration measures of oyster reef in estuaries[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2006, 25(10): 1234–1239.
- [9] Jackson J B C, Kirby M X, Berger W H, et al. Historical over-fishing and the recent collapse of coastal ecosystems[J]. *Science*, 2001, 293: 629–637.
- [10] 全为民, 张锦平, 平仙隐, 等. 巨牡蛎 (*Crassostrea* sp.) 对河口环境的净化功能及其生态服务价值评估[J]. 应用生态学报, 2007, 18(4): 871–876.
- QUAN Wei-min, ZHANG Jin-ping, PING Xian-yin, et al. Purification function and ecological service value of *Crassostrea* sp. in Yangtze River estuary[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(4): 871–876.
- [11] Mann R, Powell E N. Why oyster restoration goals in the Chesapeake Bay are not and probably cannot be achieved[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2007, 26: 905–917.
- [12] Rodney W S, Paynter K T. Comparisons of macro-fauna assemblages on restored and non-restored oyster reefs in mesohaline regions of Chesapeake Bay in Maryland[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2006, 335: 39–51.
- [13] Peterson C H, Lipcius R N. Conceptual progress towards predicting quantitative ecosystem benefits of ecological restorations[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2003, 264: 297–307.
- [14] Dame R F, Spurrier J D, Wolaver T G. Carbon, nitrogen and phosphorus processing by an oyster reef[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1989, 54: 249–256.
- [15] Gattuso J P, Frankignoulle M, Bourge I, et al. Effect of calcium carbonate saturation of seawater on coral calcification[J]. *Global and Planetary Change*, 1998, 18: 37–46.
- [16] Gazeau F, Quiblier C, Jansen J M, et al. Impact of elevated CO₂ on shellfish calcification[J]. *Geophysical Research Letters*, 2007, 34: L07603, doi:10.1029/2006GL028554.
- [17] 沈新强, 陈亚瞿, 全为民, 等. 底栖动物对长江口水域生态环境的修复作用[J]. 水产学报, 2007, 31(2): 199–203.
- SHEN Xin-qiang, CHEN Ya-qu, QUAN Wei-min, et al. Restoration effect of benthos on the ecological environment of Changjiang River estuary[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(2): 199–203.
- [18] 高露姣, 沈盎绿, 陈亚瞿, 等. 巨牡蛎 (*Crassostrea* sp.) 的滤水率测定[J]. 海洋环境科学, 2006, 25(4): 62–65.
- GAO Lu-jiao, SHEN Ang-lv, CHEN Ya-qu, et al. Determination of filtration rate of *Crassostrea* sp. [J]. *Marine Environmental Science*, 2006, 25(4): 62–65.
- [19] GB 17378—2007, 海洋监测规范[S].
- GB 17378—2007, The specification for marine monitoring[S].
- [20] Peterson C H, Grabowski J H, Powers S P. Estimated enhancement of fish production resulting from restoring oyster reef habitat: Quantitative valuation[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2003, 264: 249–264.
- [21] Dame R F. The net flux of inorganic matter by an intertidal oyster reef [J]. *Continental Shelf Research*, 1987, 7: 1421–1424.
- [22] 王俊, 姜祖辉, 陈瑞盛. 太平洋牡蛎生物沉积作用的研究[J]. 水产学报, 2005, 29(3): 344–349.
- WANG Jun, JIANG Zu-hui, CHEN Rui-sheng. Study on biodeposition by oyster *Crassostrea* sp. gigas[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(3): 344–349.
- [23] Miller A W, Reynolds A C, Sobrino C, et al. Shellfish face uncertain future in high CO₂ world: Influence of acidification on oyster larvae calcification and growth in estuaries[J]. *PLOS ONE*, 2009, 4(5): e5661.
- [24] 肖寒, 欧阳志云, 赵景柱, 等. 森林生态系统服务功能及其生态经济价值评估初探: 以海南岛尖峰岭热带森林为例[J]. 应用生态学报, 2000, 11(4): 481–484.
- XIAO Han, OUYANG Zhi-yun, ZHAO Jing-zhu, et al. Forest ecosystem services and their ecological valuation: A case study of tropical forest in Jingfengling of Hainan Island[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2000, 11(4): 481–484.
- [25] Luckenbach M W, Coen L D, Ross Jr P G, et al. Oyster reef habitat restoration: Relationship between oyster abundance and community development based on two studies in Virginia and South Carolina[J]. *Journal of Coastal Research*, 2005, 40: 64–78.
- [26] Gregalis K C, Johnson M W, Powers S P. Restored oyster reef location and design affect responses of resident and transient fish, crab, and shellfish species in Mobile Bay, Alabama[J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2009, 138: 314–327.
- [27] Harwell H D, Kingsley-Smith P R, Kellogg M L, et al. A comparison of *Crassostrea virginica* and *C. ariakensis* in Chesapeake Bay: Does oyster species affect habitat function?[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2010, 29: 253–269.
- [28] Wells H W. The fauna of oyster beds, with special reference to the Salinity factor[J]. *Ecological Monograph*, 1961, 31: 239–266.
- [29] Waldbusser G G, Voigt E P, Bergschneider H, et al. Biocalcification in the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) in relation to long-term trends in Chesapeake Bay pH [J]. *Estuaries and Coasts*, 2011, 34: 221–231.