

อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์กับการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

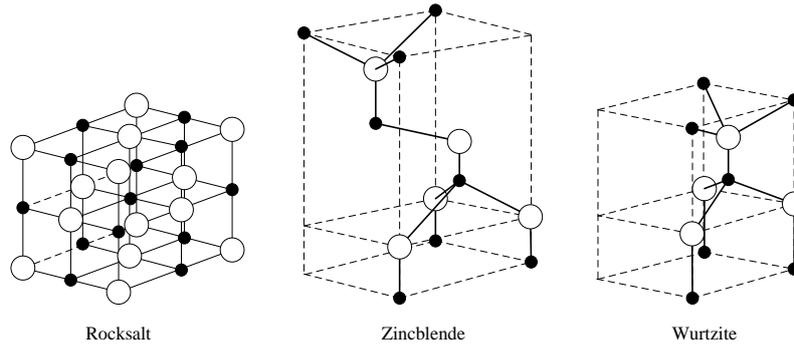
ฉัตร ผลนาถ

สาขาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

บทคัดย่อ

การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ (ZnO NPs) ได้รับความสนใจและศึกษาอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เทคโนโลยีนาโนเพื่อการสังเคราะห์อนุภาคในระดับนาโนเมตร จุลินทรีย์หลายชนิดมีขนาดอยู่ในช่วงตั้งแต่หลายร้อยนาโนเมตรจนถึงหลายสิบล้านไมโครเมตร ZnO NPs ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราบางชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพอันเนื่องมาจากการเพิ่มพื้นที่ผิวที่จำเพาะจากการลดขนาดของอนุภาคลงนำไปสู่การเพิ่มปฏิกิริยาที่ผิวของอนุภาค ZnO เป็นวัสดุที่ปลอดภัยทางชีวภาพ ก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและการเร่งปฏิกิริยาคู่ด้วยแสง (photocatalysis) ซึ่งมีผลต่อกระบวนการทางเคมีและทางชีวภาพของสายพันธุ์สิ่งมีชีวิต บทความนี้นำเสนอการศึกษาการปรับปรุงพื้นที่ผิวอนุภาค ZnO จากการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของสารตั้งต้นและคุณสมบัติทางแสงของทีมนักวิจัยต่างๆ จากวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง และการนำไปใช้ประโยชน์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นต่ำสุด รวมทั้งการอธิบายกลไกการฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคบางชนิด โดยมุ่งเน้นอธิบายกลไกการเกิดปฏิกิริยา Reactive Oxygen Species (ROS) ในเชื้อจุลินทรีย์ ROS เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดความเสียหายของผนังเซลล์อันเนื่องมาจากปฏิกิริยาปฏิกิริยารีดอกซ์ที่เกิดจาก ZnO NPs ซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้มากขึ้นและการดูดซึมซิงก์ไอออนที่เป็นพิษ ส่งผลให้ไมโทคอนเดรียอ่อนแอ รวมทั้งเกิดการรั่วไหลและความเครียดของยีนภายในเซลล์ จนทำให้เกิดการยับยั้งการเติบโตของเซลล์และการตายของเซลล์ในที่สุด

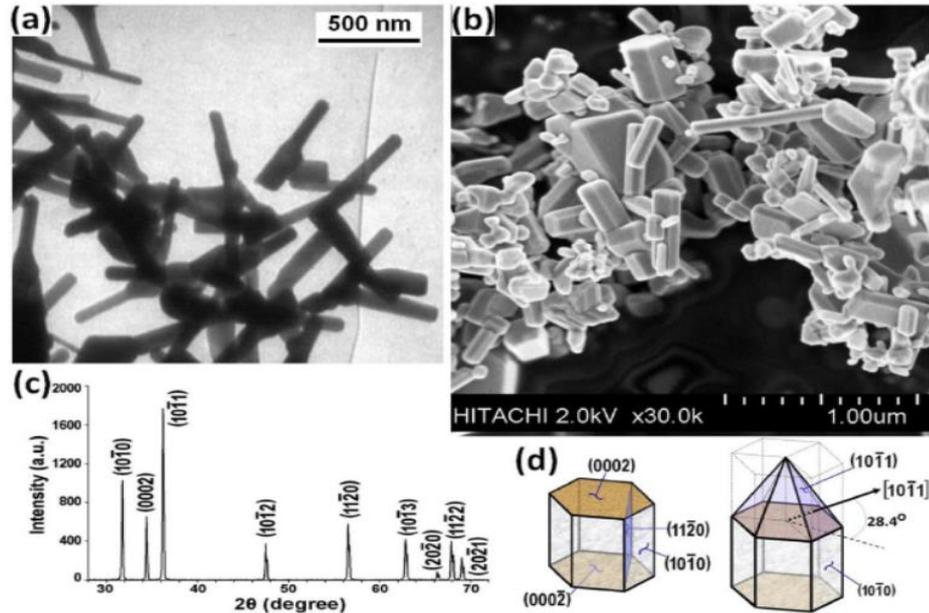
ปัจจุบันเทคโนโลยีด้านโลหะนาโน (เช่น Au, Ag, Pt) และโลหะออกไซด์นาโน (เช่น TiO₂, MgO, CuO, ZnO) ได้ถูกนำไปใช้ในงานภาคอุตสาหกรรมการผลิตต่างๆ มากมาย อาทิเช่น ผลิตภัณฑ์อุปโภคและบริโภค อุปกรณ์ทางการแพทย์ เครื่องใช้ไฟฟ้า ฯลฯ ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ใช้อนุภาคนาโน อาทิเช่น กลุ่มสิ่งทอ ใช้อนุภาคนาโนซิลเวอร์ในการกำจัดกลิ่นอันไม่พึงประสงค์ในเสื้อผ้า จากการศึกษพบว่า การผสมอนุภาคนาโนซิลเวอร์ลงไปบนเนื้อผ้า เมื่อมีการใช้งานและผ่านการซักไประยะหนึ่ง อนุภาคนาโนซิลเวอร์จะมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์พวก *E. coli* และ *Staphylococcus aureus* ได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในการผสมอนุภาคนาโนซิลเวอร์ลงไปบนเนื้อผ้ามักใช้อัตราส่วนของอนุภาคนาโนซิลเวอร์ 1 ส่วนต่อเส้นใยผ้า 1 ส่วน ซึ่งถือว่าเป็นปริมาณที่เล็กน้อยมาก แต่เพียงแค่นี้ก็มากพอที่จะหยุดยั้งการเจริญของเชื้อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ยังช่วยระงับกลิ่นเหม็นอีกด้วย สำหรับการใช้อนุภาคนาโนซิลเวอร์ในเครื่องใช้ไฟฟ้า เช่นในกระบวนการการผลิตตู้เย็น พบว่าสามารถช่วยรักษาความเย็น และช่วยยืดอายุของอาหารที่เก็บในตู้เย็น นอกจากนี้ยังมีการใช้อนุภาคนาโนซิลเวอร์ในการผลิตเครื่องซักผ้า เนื่องจากพบว่าอนุภาคนาโนซิลเวอร์สามารถกำจัดเชื้อโรคได้เป็นอย่างดี ในทำนองเดียวกัน อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ที่มีคุณสมบัติต้านทานเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราเช่นเดียวกับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ แต่ต้นทุนถูกกว่าและยังแสดงสมบัติที่โดดเด่นอื่น ๆ หลายประการทั้งทางด้านไฟฟ้า แสง เคมี และชีวภาพ อาทิเช่น กำเนิดประจุไฟฟ้า เร่งปฏิกิริยา ดูดกลืนแสงยูวี และยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ฯลฯ อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์มีลักษณะที่หลากหลาย สามารถเตรียมได้ง่ายและหลากหลายวิธีการ อีกทั้งยังให้ผลผลิตสูงและต้นทุนการผลิตต่ำ อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์โดยส่วนใหญ่ได้รับการนำไปใช้ในเทคโนโลยีการผลิตอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ อุตสาหกรรมผลิตยางรถยนต์ ซิเมนต์ เครื่องแก้ว เซรามิกส์ สี ปุ๋ยเคมี เครื่องสำอางป้องกันแสงแดด ยาลดผดผื่นคัน และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ทั่วไปในครัวเรือน อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์มีแนวโน้มที่จะใช้ประโยชน์มากขึ้นในอนาคต



รูปที่ 1 แบบจำลองโครงสร้างผลึกของซิงก์ออกไซด์แบบต่าง ๆ ได้แก่ ผลึกเกลือหินคิวบิก (cubic rocksalt) ผลึกซิงก์เบสึนคิวบิก (cubic zinblende) และเฮกซาโกนอลเวิร์ทไซท์ (hexagonal wurtzite) เรียงจากซ้ายไปขวา ทรงกลมสีขาวและสีดำแสดงอะตอมของ Zn และ O ตามลำดับ (ดัดแปลงมาจาก Morkoç & Özgür (2009, p. 2))

ในทางทฤษฎี สังกะสีออกไซด์หรือซิงก์ออกไซด์ (ZnO) เป็นสารกึ่งตัวนำ ซึ่งเป็นสารประกอบของธาตุหมู่ II-VI ยึดเหนี่ยวกันด้วยพันธะไอออนิก (Kittel, 2005, p. 69) เป็นของกลุ่มสเปส C_{6v}^4 หรือ $P6_3mc$ (Morkoç & Özgür, 2009, p. 2) และมีเฟสโครงสร้างแบบเวิร์ทไซท์ (wurtzite) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เสถียรภายใต้เงื่อนไขสภาวะแวดล้อมปกติ แต่เมื่ออยู่ภายใต้เงื่อนไขสภาวะความดันสูงและอุณหภูมิสูง ZnO จะเปลี่ยนเฟสโครงสร้างไปเป็นแบบซิงก์เบลนด์ (zinblende) และเกลือหิน (rocksalt หรือ Rochelle salt) ในหนึ่งหน่วยเซลล์ของ ZnO แต่ละอะตอมของ Zn ถูกแวดล้อมโดยอะตอมของออกซิเจน 4 อะตอม อยู่ที่มุมของแลตทิซโครงสร้างแบบเตตระฮีดรอล และเซลล์ถัดไปชนิดของอะตอมจะสลับตำแหน่งในตรงกันข้ามกัน โครงสร้างผลึกและการจัดวางอะตอมของ ZnO ทั้งสามเฟส แสดงดังภาพที่ 1 โดย ZnO มีขนาดของช่องว่างพลังงานกว้าง (wide band gap) เท่ากับ 3.37 eV และมีพลังงานยึดเหนี่ยวคู่อิเล็กตรอนโฮล (exciton binding energy) ประมาณ 60 meV (Coleman and Jagadish, 2006) การที่มีสมบัติแถบพลังงานกว้างทำให้สามารถประยุกต์ใช้เป็นอุปกรณ์ทางแสง ไฟฟ้า และอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ได้หลากหลาย โดยสารกึ่งตัวนำนี้สามารถใช้ทดแทนสารกึ่งตัวนำบางชนิดที่มีราคาแพง เช่น ซิลิกอน (Si) แกลเลียมไนไตรด์ (GaN) หรือมีองค์ประกอบของโลหะหนักที่เป็นพิษ เช่น แคดเมียมออกไซด์ (CdO) และ แคดเมียมซัลไฟด์ (CdS) ตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา ซิงก์ออกไซด์สามารถนำไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางในหลายสาขา อาทิ การแพทย์ เกษษกรรม ทันตกรรม เกษตรกรรม อุตสาหกรรม ยืนยันได้จากปริมาณการใช้ซิงก์ออกไซด์ทั่วโลกสูง หลายล้านตันต่อปี ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2000 เป็นต้นมา (Zinc Oxide, Retrieved December 21, 2009, from <http://toxnet.nlm.nih.gov>) โดยส่วนใหญ่ใช้ในการผลิต อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ ยางรถยนต์ ซีเมนต์ เครื่องแก้ว เซรามิกส์ สี ปุ๋ยเคมี เครื่องสำอาง ยาสามัญประจำบ้าน และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ทั่วไปในครัวเรือน จนถึงในระดับอุตสาหกรรมการผลิตขนาดใหญ่ อีกทั้งมีแนวโน้มที่จะใช้ประโยชน์มากขึ้นในอนาคต ทำให้นักฟิสิกส์ เคมี วัสดุศาสตร์ และวิศวกร ต่างพัฒนาวิธีการสังเคราะห์ด้วยเทคนิคที่หลากหลาย อาทิเช่น chemical vapor transport, condensation chemical vapor deposition hydrothermal, thermal evaporation, sol-gel, microwave assisted, template-based growth, pulsed laser deposition, ion beam implantation, molecular beam epitaxy, และ plasma sputtering (Shi, Cao, Zhao, Song, and Rong, 2008) เป็นต้น โดยสามารถลดขนาดของโครงสร้างซิงก์ออกไซด์ให้เล็กลงจนมีขนาดอยู่ในระดับนาโนเมตร ทำให้มีความบริสุทธิ์สูงและมีประสิทธิภาพการทำงานสูงขึ้น อีกทั้งเทคนิคเหล่านี้ยังสามารถควบคุมให้ซิงก์ออกไซด์มีโครงสร้าง และคุณลักษณะเฉพาะที่โดดเด่นแตกต่างกันออกไปตามต้องการ เพื่อประยุกต์ใช้งานที่แตกต่างกันทางอิเล็กทรอนิกส์ เช่น organic LED, short-wavelength LED,

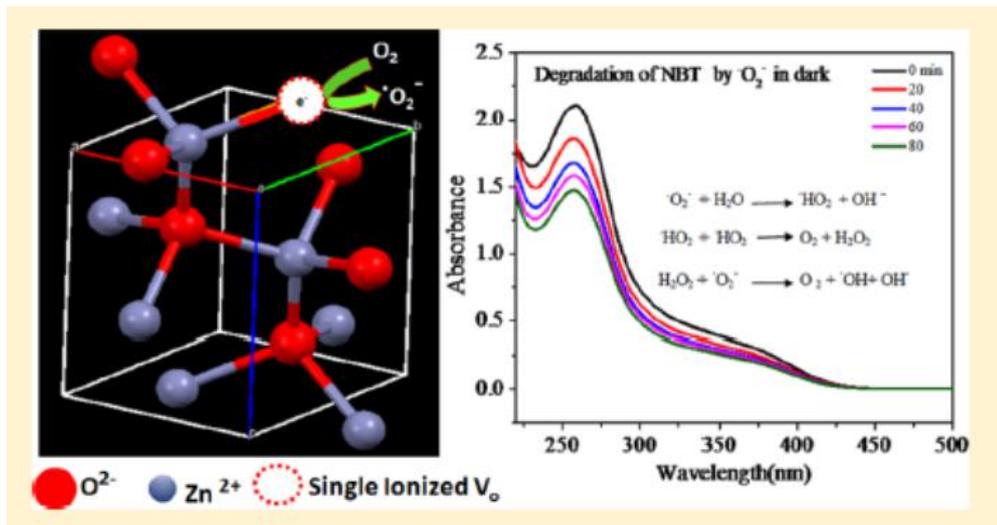
ethanol gas sensor, dye-sensitized solar cell, UV laser, transparent conductor, และ piezoelectric material (Gustafsson, Cao, Treacy, Klavetter, Colaneri, and Heeger, 1992; Gupta and Compaan, 2006; Hou, Xiong, Xie, Li, Zhang, and Tian, 2004)



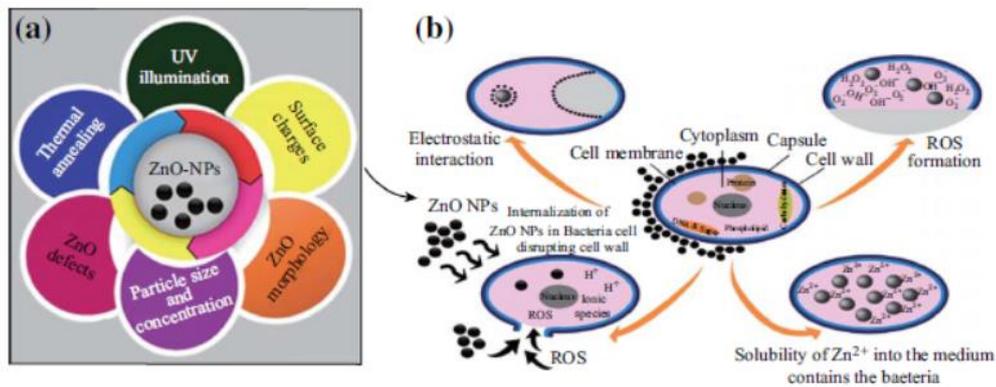
รูปที่ 2 ภาพถ่ายระดับจุลภาคของอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) สเปกตรัมการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ และรูปร่างผลึกของซิงก์ออกไซด์ ตามลำดับ (ที่มา : Nafchi, Nassiri, Sheibani, Ariffin, Karim, 2013)

สำหรับอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ (ZnO nanoparticles) ที่เตรียมได้ในห้องปฏิบัติการมีเอกลักษณ์โดดเด่นจากสมบัติและกลไกการทำงานหลากหลาย (multifunctional properties) มีประสิทธิภาพในการใช้งานสูง เช่น ทำหน้าที่เป็นตัวแลกเปลี่ยนไอออน ทำให้ยางแข็งขึ้นด้วยปฏิกิริยาเคมี (vulcanization activator) ตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) และเป็นตัวดูดกลืนแสงย่านอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet absorption) และแสงย่านที่ตามองเห็นได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับซิงก์ออกไซด์เกรดพาณิชย์ที่มีขนาดอนุภาคระดับไมโคร ซึ่งปกติจะมีลักษณะเป็นแท่งหกเหลี่ยม (hexagonal nanorod) ดังรูปที่ 2 ส่วนใหญ่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิต สี ยางธรรมชาติและยางสังเคราะห์ แก้วและเซรามิกส์ รวมถึงเป็นส่วนผสมในเวชภัณฑ์ยาและเครื่องสำอางป้องกันแสงแดดอีกด้วย สมบัติและกลไกการทำงานที่น่าสนใจเหล่านี้ส่วนหนึ่งเป็นผลเนื่องจากการมีโครงสร้างผลึกเชิงเดี่ยวแบบหนึ่งมิติ ที่มีความบริสุทธิ์สูงและด้วยลักษณะที่จำเพาะมีเอกลักษณ์ และมีความหลากหลายของรูปร่างลักษณะผลึก เช่น nanowire nanobelt nanorods nanotube และ nanowhisker (Yang et al., 2002; Wang, 2004; Jung et al., 2008; Zhao, Cao, Yuan, Lu, Wang, and Zhang, 2010) ฯลฯ จึงทำให้ซิงก์ออกไซด์โครงสร้างระดับนาโนสามารถประยุกต์ใช้งานได้หลากหลายและเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ และเนื่องจากความเป็นสารกึ่งตัวนำที่มีช่องว่างแถบพลังงานกว้าง ที่สามารถใช้เป็นส่วนประกอบพื้นฐานในการผลิตอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์และโฟโตนิกส์ ซึ่งสามารถใช้ทดแทนสารกึ่งตัวนำที่มีสมบัติเทียบเคียงกันเนื่องจากมีต้นทุนการผลิตสูงกว่าและกรรมวิธีการผลิตที่ซับซ้อน ตัวอย่างอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้นจากซิงก์ออกไซด์โครงสร้างระดับนาโน ได้แก่ laser (Huang et al., 2001) LED (Chichibu, Ohmori, Shibata, Koyama, and Onuma, 2005) MOSFET

(LaRoche et al., 2005) varistor (Lee and Kang, 2006) gas sensor (Carotta et al., 2009) solar cells (Keis et al., 2002) และ piezoelectric nanogenerator (Wang and Song, 2006) เป็นต้น เมื่อไม่นานมานี้อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ถูกนำไปใช้ประโยชน์ในงานวิจัยทางด้านชีววิทยา การเกษตร อุตสาหกรรม และทางการแพทย์ เนื่องจากซิงก์ออกไซด์มีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรครอบชนิดอย่างมีประสิทธิภาพ อาทิเช่น เชื้อรา (Snoop, Mahesh, Nampoothiri, Mangalaraja, and Ananthakumar, 2012; Sharma, Rajput, Kaith, Kaur, and Sharma, 2010; Prasad, Shaikh, Kathe, Bisoyi, and Verma, 2010) เชื้อแบคทีเรีย (Wahab et al., 2012) และ ไวรัส (Eshed, Lellouche, Matalon, Gedanken, and Banin, 2012; Ronen, Semiat, and Dosoretz, 2013) แต่เนื่องจากการรายงานกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของซิงก์ออกไซด์มีหลายทฤษฎี (Padmavathy and Vijayaraghavan, 2008; Vidic et al., 2013; Perelshtein et al., 2009; Xu et al., 2013) และยังขึ้นกับขนาดอนุภาค (Yamamoto, 2001) สันฐานของอนุภาคซิงก์ออกไซด์ (Phaechamud, Mahadlek, Aroonrerk, Chooapan, and Charoentearaboon, 2012; Talebian, Amininezhad, and Doudi, 2013) รวมทั้งปฏิกิริยากับแสง (Kim and An, 2012) อีกทั้งยังมีเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคอีกหลายชนิดที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมภายในชุมชน ที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์และสัตว์ จากรายงานการวิจัยการนำอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ไปใช้ศึกษาคุณสมบัติกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรครอบชนิดในชุมชน อาทิเช่น 1) *Escherichia coli* เป็นแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม เป็นตัวชี้การปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำ มีอยู่ตามธรรมชาติในลำไส้ใหญ่ของสัตว์และมนุษย์ แบคทีเรียชนิดนี้ทำให้เกิดอาการท้องเสียบ่อยที่สุด ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ ทำให้ถ่ายอุจจาระเหลว หรือเป็นน้ำ แต่อาการมักไม่รุนแรง เพราะทั้งเด็กและผู้ใหญ่มักมีภูมิคุ้มกันอยู่บ้างแล้ว เนื่องจากได้รับเชื้อนี้เข้าไปที่ละน้อยอยู่เรื่อย ๆ เชื้อนี้มักปนเปื้อนมากับอาหาร น้ำ หรือมือของผู้ประกอบอาหาร 2) *Salmonella typhimurium* เป็นเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารที่สำคัญและพบได้มาก เนื่องจากเป็นเชื้อที่ปนเปื้อนในตัวอย่างอาหาร โดยเฉพาะอาหารที่ได้มาจากเนื้อสัตว์ เช่น เนื้อหมู เนื้อไก่ รวมทั้งผักสด นอกจากนี้เชื่อยังมีปัญหาคือทางด้านจุลชีพที่ค่อนข้างสูงและเป็นปัญหาสำคัญในการรักษา 3) *Pseudomonas aeruginosa* เป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาส และมีปัญหา โดยเฉพาะกรณีเป็นเชื้อที่ติดต่อกันในโรงพยาบาล และกรณีของผู้ป่วยแผลไฟไหม้จะมีปัญหามากเพราะเชื้อคือยามากและมีชีวิตที่จำกั้มากในการรักษา 4) *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อปกติพบที่ผิวหนังและเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อที่ผิวหนัง เช่น ฝีหนอง รวมทั้งระบบทางเดินหายใจด้วย บางสายพันธุ์สร้างสารพิษ และทำให้เกิดภาวะอาหารเป็นพิษเฉียบพลัน 5) *Enterococcus faecalis* พบได้ในทางเดินอาหาร มีปัญหาสำหรับบางสายพันธุ์ที่ดื้อยา โดยเฉพาะยา vancomycin เรียกเชื้อพวกนี้ว่า VRE ก่อให้เกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบและอันตรายเนื่องจากมียาที่สามารถใช้รักษาได้ค่อนข้างจำกัด ผู้ติดเชื้อ VRE จะมีอัตราการเสียชีวิตที่สูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่ไม่ดื้อยา และจากรายงานวิจัยพบว่าซิงก์ออกไซด์ที่สังเคราะห์ได้ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* ได้ดี ทั้งในการทดสอบโดยวิธี disc diffusion และการทดสอบหาค่า MIC ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับในรายงานการศึกษาที่ผ่านมา ซึ่งพบว่าอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์มีผลต่อแบคทีเรียทั้งสองชนิดมากที่สุด (Yousef and Danial, 2012; Karvani and Chehrizi, 2011) นอกจากนี้ยังมีรายงานที่แสดงถึงความสัมพันธ์ของขนาดอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ว่ามีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบว่าอนุภาคที่มีขนาด 12 นาโนเมตร ลงไปจะมีผลยับยั้งแบคทีเรียโดยเฉพาะเชื้อ *S. aureus* ได้สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคขนาด 25 นาโนเมตร ขึ้นไป สันนิษฐานว่าเป็นผลมาจากการที่อนุภาคขนาดเล็กกว่าสามารถเกิด photocatalytic และทำให้เกิดอิเล็กตรอนเพิ่มขึ้น ได้มากกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ ซึ่งอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนได้ superoxide radical anion และทำปฏิกิริยาต่อไปกับไฮโดรเจนไอออนได้ hydrogen superoxide และเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องระหว่าง hydrogen superoxide กับไฮโดรเจนไอออนและอิเล็กตรอนได้ hydrogen peroxide ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรีย (รูปที่ 3-4)

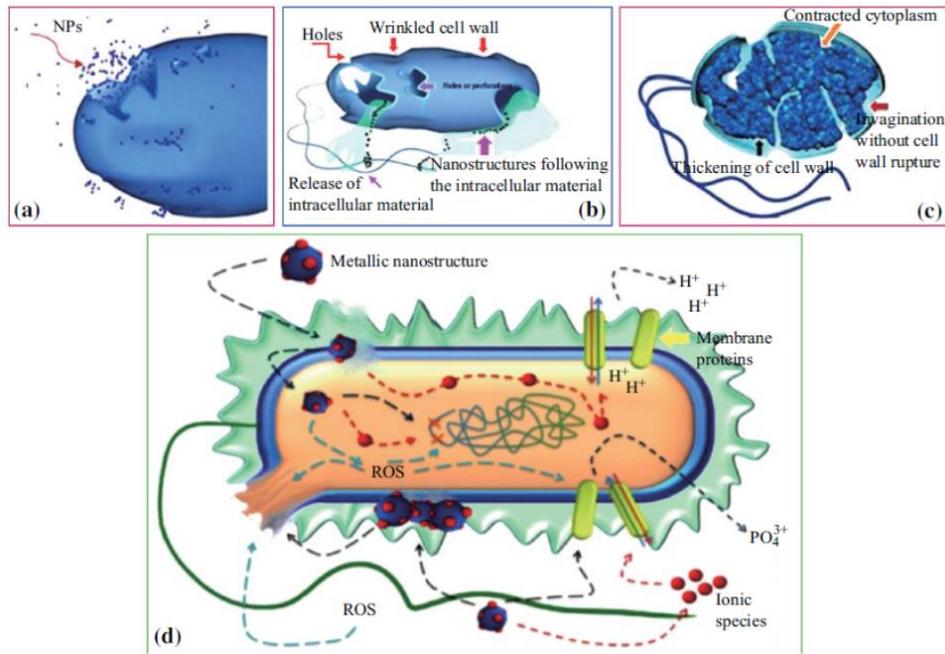


รูปที่ 3 แผนภาพแสดงการเกิด reactive oxygen species (ROS) ได้แก่ อนุมูลอิสระของ $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2$ และ H_2O_2 ซึ่งถูกสร้างขึ้นจากอนุภาค ZnO ที่แขวนลอยอยู่ในของเหลว ในสภาวะที่มีแสง (light) และปราศจากแสง (dark) (ที่มา : Prasanna and Vijayaraghavan, 2015)



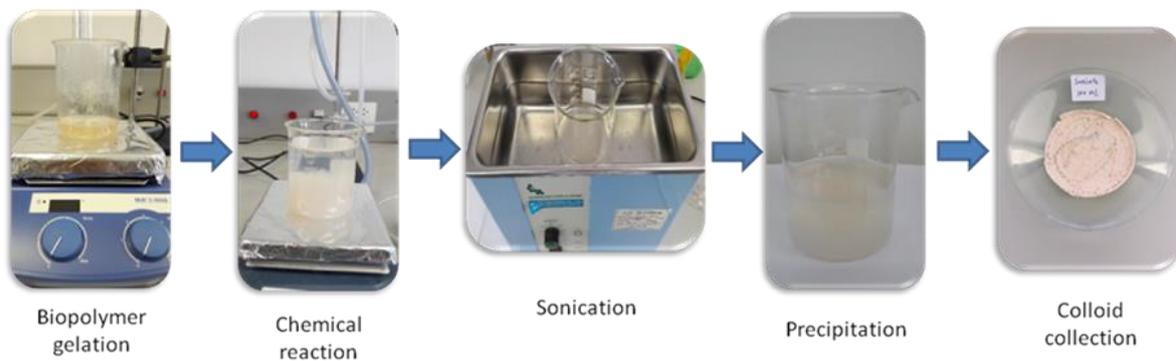
รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ของปัจจัยต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดการต้านเชื้อจุลินทรีย์และกลไกที่หลากหลายมีความเป็นไปได้ในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ (ที่มา : Sirelkhatim, et al., 2015)

นอกจากนี้ยังสันนิษฐานว่าอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ที่มีขนาดเล็กจะเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่า (Raghupathi, Koodali, and Manna, 2011) โดยกลไกการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าน่าจะเกิดจากขนาดของอนุภาคเล็กจนสามารถเข้าสู่ผนังเซลล์ แสดงดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 แผนภาพอธิบายกลไกการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่คิดว่าน่าจะเกิดจากขนาดของอนุภาคเล็กมากจนสามารถแทรกซึมเข้าสู่ผนังเซลล์ (ที่มา : Sirelkhatim, et al., 2015)

ปัญหาสภาวะโลกร้อนทำให้นักวิจัยเริ่มตระหนักถึงความรับผิดชอบต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม จึงพัฒนาแนวคิดและระเบียบวิธีการสังเคราะห์วัสดุนาโนด้วยกรรมวิธีสีเขียว (green synthesis) โดยใช้ไบโอพอลิเมอร์เป็นรีดิวซ์ (reducing agent) หรือตัวยึดเกาะ (capping agent) ที่ไม่เป็นพิษเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและชั้นบรรยากาศ ซึ่งได้จากการสกัดจากพืชในธรรมชาติและเส้นใยผัก อาทิเช่น ไบเจอเรเนียม ไบยี่โต วานหางจระเข้ ไบหอมแขก เส้นใยมะรุ้มและเส้นใยบวบ (Schmid and Corain, 2003; Chandran, Chaudhary, Pasricha, Ahmad, and Sastry, 2006; Franco-Romano, Gil, Palacios-Santader, Delgado-Jaén, Naranjo-Rodríguez, Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, and Cubillana-Aguilera, 2014; Jaybhave, 2015) และพอลิเมอร์ชีวภาพ (Biopolymer) เช่น น้ำตาลกลูโคส แลคโตส ฟรุคโตส แป้ง เจลาติน ู้น และไคโตซาน (Sanoop, Mahesh, Nampoothiri, Mangalaraja, and Ananthakumar, 2012; Okitsu, Mizukoshi, Yamamoto, Maeda, and Nagata, 2007; Mishra, Yadav, Pandey, 2010) รวมทั้งพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ปลอดภัย เช่น 1-propanol, 1,3-popanediol, 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane, polyethylene glycol และ แอลกอฮอล์ (Bhatte, Sawant, Pinjari, Pandit, and Bhanage, 2012; Wei, Famouri, Carroll, Lee, and Famouri, 2013) ตัวอย่างกระบวนการเตรียมอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ด้วยกรรมวิธีสีเขียว แสดงดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ด้วยกรรมวิธีสีเขียว (green synthesis) โดยใช้แป้งสาकुท้องถิ่นเป็นรีดิวซ์ (reducing agent) หรือตัวยึดเกาะ (capping agent)

อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์ (ZnO NPs) ได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางดังที่ได้กล่าวไปแล้วนั้น โดยเฉพาะการนำไปผสม (composite) กับวัสดุอื่น เพื่อคัดแปลงและพัฒนาคุณสมบัติเฉพาะ เพิ่มคุณภาพและหน้าที่การทำงานของวัสดุนั้น ตัวอย่างเช่น การเจือซิงก์ออกไซด์นาโนไวท์เกอร์ในวัสดุเพียโซอิเล็กทริก (piezoelectric material) เพื่อเพิ่มสมบัติเพียโซอิเล็กทริกและสมบัติเชิงกลให้สูงขึ้น (Zhao, Cao, Yuan, Lu, Wang, and Zhang, 2010) และเพิ่มสมบัติการทนแรงอัดของไฟเบอร์กลาสที่ทำจากวัสดุเชิงประกอบของพอลิเมอร์ด้วยการเติมเตตระพอดซิงก์ออกไซด์ (tetrapod ZnO) ลงในเรซิน (resin) ในอัตราส่วนที่เหมาะสม (Cao et al., 2010) เป็นต้น เมื่อไม่นานนี้ซิงก์ออกไซด์ถูกนำไปใช้ในงานวิจัยทางด้านชีววิทยา การเกษตร อุตสาหกรรม และการแพทย์ วัตถุประสงค์เพื่อการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger Fusarium sp.* (Snoop, Mahesh, Nampoothiri, Mangalaraja, and Ananthakumar, 2012; Sharma, Rajput, Kaith, Kaur, and Sharma, 2010) เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus Escherichia coli* (Applerot, Perkas, Amarian, Girshevitz, and Gedanken, 2009; Suwanboon, Amornpitoksuk, Bangrak, Sukolrat, and Muensit, 2010) *Bacillus subtilis Aerobacter aerogenes* (Jain, Bhargava, and Poddar, 2013) *Salmonella typhimurium Klebsiella pneumonia* (Wahab et al., 2012) *Candida albicans* (Phaechamud, Mahadlek, Aroonrerk, Choopan, and Charoenteeraboon, 2012) และไบโอฟิล์ม *Streptococcus mutans* (Eshed, Lellouche, Matalon, Gedanken, and Banin, 2012) ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรครินช่องปาก สำหรับการอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยส่วนใหญ่สรุปว่าเกิดจากการเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระหรือ reactive-oxygen species (ROS) (Applerot, Perkas, Amarian, Girshevitz, and Gedanken, 2009; Leung et al., 2012) ขึ้นที่ผิวของอนุภาคซิงก์ออกไซด์ ซึ่งมักเกิดขึ้นร่วมกับกลไกการเร่งปฏิกิริยาดำวยแสง (photocatalysis) (Abdelhady, 2012) ก่อให้เกิดไอออนอิสระ OH^\cdot , O_2^\cdot , HO_2^\cdot และ H_2O_2 หลุดจากผิวของอนุภาคซิงก์ออกไซด์ (รูปที่ 3) ไอออนอิสระเหล่านี้จะแทรกซึมเข้าสู่เยื่อผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์เข้าไปทำลายเซลล์ภายใน ทำให้เชื้อจุลินทรีย์หยุดการเจริญเติบโตและตายในที่สุด (รูปที่ 5) นอกจากนี้ยังขึ้นกับเงื่อนไขขนาดอนุภาคและความเข้มข้นสารละลายซิงก์ออกไซด์อีกด้วย (Sharma, Rajput, Kaith, Kaur, and Sharma, 2010) แสดงดังแผนภาพในรูปที่ 4 ดังนั้นงานวิจัยแต่ละแบบจำเป็นต้องเลือกใช้ซิงก์ออกไซด์ที่มีรูปร่างจำเพาะไปประยุกต์ใช้งานเพื่อความเหมาะสม รวมทั้งจะต้องมีสมบัติการดูดกลืนรังสี UV ถึงแสงย่านการมองเห็นที่ดีอีกด้วย (Talebian, Amininezhad, and Doudi, 2013; Kim and An, 2012) หากกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพต้องอาศัยกลไกการเร่งปฏิกิริยาดำวยแสงแล้ว (photoactivity) สันฐานของซิงก์ออกไซด์ที่สังเคราะห์จะต้องมี aspect ratio สูง จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะเตรียมอนุภาคระดับนาโนที่มีค่า aspect ratio สูง อีกทั้งมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถนำไปใช้เป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ซึ่ง nano-ZnO สามารถประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมกระดาษ โฟม และเส้นใยผ้า (Prasad, Shaikh, Kathe, Bisoyi, Verma, 2010; Sanoop, et al., 2012) ได้อย่างดีเยี่ยมและยืดอายุการใช้งานได้ยาวนานขึ้น ดังนั้นการพัฒนางานวิจัยเกี่ยวกับซิงก์ออกไซด์ยังสามารถขยายขอบเขตการศึกษาการด้านเชื้อจุลชีพก่อโรครินช่องปากให้กว้างขึ้นอีกและจะ

สามารถอธิบายกลไกการการออกฤทธิ์ของซิงก์ออกไซด์ที่จำเพาะกับเชื้อโรคที่เลือกทดสอบได้มากยิ่งขึ้น อีกทั้งสามารถนำองค์ความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้เป็นตัวยาด้านเชื้อโรคที่มีความปลอดภัยเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและมีราคาถูก ลดต้นทุนการผลิต และปลอดภัยกว่าเมื่อเทียบกับสารเคมีสังเคราะห์สำหรับป้องกันเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราที่มีจำหน่ายในท้องตลาดหรือสารสกัดจากสมุนไพรบางชนิดที่มีราคาแพง ลดการนำเข้ายาด้านเชื้อโรคอีกทั้งเป็นทางเลือกหนึ่งในการใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคตอันใกล้

การศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับอนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์กับการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่กล่าวไปทั้งหมดนี้ จะนำไปสู่การพัฒนาหรือนำองค์ความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้เป็นตัวยาทางเลือกในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ดีเยี่ยม หรืออาจจะใช้เป็นตัวนำส่งยา (drug delivery) ที่มีความปลอดภัย เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และมีราคาถูก ลดต้นทุนการผลิตและลดการนำเข้ายาด้านเชื้อต่อไปในอนาคต สำหรับองค์ความรู้ที่ได้จากการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิงก์ออกไซด์นั้น มีความเป็นไปได้ที่จะสามารถพัฒนายกระดับกระบวนการผลิตให้ใหญ่ขึ้นโดยการนำเทคนิคการแผ่คลื่นอัลตราซาวด์ใช้ในเชิงพาณิชย์และอุตสาหกรรมการผลิตเคมีภัณฑ์ เพื่อลดราคาค่าต้นทุนการผลิตซิงก์ออกไซด์ให้ต่ำลงและลดการนำเข้าจากต่างประเทศได้อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

[1] AbdElhady, M.M. (2012). Preparation and characterization of chitosan/zinc oxide nanoparticles for imparting antimicrobial and UV protection to cotton fabric. **Int. J. Carbohydr. Chem.** 2012, 1-6.

[2] Applerot, G., Perkas, N., Amarian, G., Girshevitz, O., & Gedanken, A. (2009). Coating of glass with ZnO via ultrasonic irradiation and a study of its antibacterial properties. **Appl. Surf. Sci.** 256S, S3-S8.

[3] Bhatte, K.D., Sawant, D.N., Pinjari, D.V., Pandit, A.B., & Bhanage, B.M. (2012). One pot green synthesis of nano sized oxide by sonochemical method. **Mater. Lett.** 77, 93-95.

[4] Cao, M.S., Song, W.L., Zhou, W., Wang, D.W., Rong, J.L., Yuan, J., & Agathopoulos, S. (2010). Dynamic compressive response and failure behavior of fiber polymer composites embedded with tetra-needle-like ZnO nanowhiskers. **Compos. Struct.** 92(12), 2984-2991.

[5] Carotta, M. C., Cervi, A., di Natale, V., Gherardi, S., Giberti, A., Guidi, V., Zanotti, L. (2009). ZnO gas sensors: A comparison between nanoparticles and nanotetrapods-based thick films. **Sens. and Actuators B: Chem.** 137(1), 164-169.

[6] Chandran, S.P., Chaudhary, M., Pasricha, R., Ahmad, A., & Sastry, M. (2006). Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract, **Biotechnol. Progr.** 22, 577-583.

[7] Chichibu, S. F., Ohmori, T., Shibata, N., Koyama, T., & Onuma, T. (2005). Fabrication of p-(CuGaS₂/n-ZnO: Al heterojunction light-emitting diode grown by metalorganic vapor phase epitaxy and helicon-wave-excited-plasma sputtering methods. **J. Phys. Chem.Solid** 66(11), 1868-1871.

[8] Coleman, V.A., & Jagadish, C. (2006). Basic properties and applications of ZnO. In Jagadish, C. & Pearton, S.J. (Eds.), **Zinc oxide bulk, thin films and nanostructures: Processing, properties, and applications.** (pp. 1-20). London, England: Elsevier

[9] Eshed, M., Lellouche, J., Matalon, S., Gedanken, A., & Banin, E. (2012). Sonochemical coatings of ZnO and CuO nanoparticles inhibit *Streptococcus mutans* biofilm formation on teeth model. **Langmuir.** 28(33), 12288-12295.

[10] Franco-Romano, M., Gil, M.L.A., Palacios-Santader, J.M., Delgado-Jaén, Naranjo-Rodríguez, Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, and Cubillana-Aguilera, L.M. (2014). Sonosynthesis of gold nanoparticles from a geranium leaf extract. **Ultrason. Sonochem.** 21, 1570-1577.

- [11] Gupta, A. & Compaan, A.D. (2004). All-sputtered 14% CdS/CdTe thin-film solar cell with ZnO: Al transparent conducting oxide. **Appl. Phys. Lett.** 85(4), 684-686.
- [12] Gustafsson, G., Cao, Y., Treacy, G.M., Klavetter, F., Colaneri, N., & Heeger, A.J. (1992). Flexible light-emitting diodes made from soluble conducting polymers. **Nature.** 357, 477-479.
- [13] Hou, H., Xiong, Y., Xie, Y., Li, Q., Zhang, J., & Tian, X. (2004). Structure-direct assembly of hexagonal pencil-like ZnO group whiskers. **J. Solid State Chem.** 177(1), 176-180.
- [14] Huang, M. H., Mao, S., Feick, H., Yan, H. Q., Wu, Y. Y., Kind, H., Yang, P. D. (2001). Room-temperature ultraviolet nanowire nanolasers. **Science.** 292(5523), 1897-1899.
- [15] Jain, A., Bhargava, R., & Poddar, P. (2013). Probing interaction of gram-positive and gram-negative bacterial cells with ZnO nanorods. **Mater. Sci. Eng: C: Mater. Biol. Appl.** 33(3), 1247-1253.
- [16] Jaybhaye, S.V. (2015). Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles Synthesized From Waste. **Mater. Today: Proc.** 2, 4323-4327.
- [17] Jung, S. H., Oh, E., Lee, K. H., Yang, Y., Park, C. G., Park, W., & Jeong, S. H. (2008). Sonochemical preparation of shape-selective ZnO nanostructures. **Cryst. Growth Des.** 8(1), 265-269.
- [18] Karvani, Z.E. & Chehrazi, P. (2011). Antibacterial activity of ZnO nanoparticle on grampositive and gram-negative bacteria. **Afr. J. Microbiol. Res.** 5(12), 1368-1372.
- [19] Keis, K., Bauer, C., Boschloo, G., Hagfeldt, A., Westermark, K., Rensmo, H., & Siegbahn, H. (2002). Nanostructured ZnO electrodes for dye-sensitized solar cell applications. **J. Photochem. Photobiol. A: Chem.** 148(1-3), 57-64.
- [20] Kim, S.W. & An, Y.-J. (2012). Effect of ZnO and TiO₂ Nanoparticles Preilluminated with UVA and UVB light on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 95(1), 243-253.
- [21] LaRoche, J. R., Heo, Y. W., Kang, B. S., Tien, L. C., Kwon, Y., Norton, D. P., Pearton, S. J. (2005). Fabrication approaches to ZnO nanowire devices. **J. Electron. Mater.** 34(4), 404-408.
- [22] Lee, B. H., & Kang, S. M. (2006). Properties of ZnO varistor blocks under multiple lightning impulse voltages. **Curr. Appl Phys.** 6(5), 844-851.
- [23] Leung, Y.H., Chan, C.M.N., Ng, A.M.C., Chan, H.T., Chiang, M.W.L., Djurisic, A.B., Ng, Y.H., Jim, W.Y., Guo, M.Y., Leung, F.C.C., Chan, W.K., & Au, D.T.W. (2012). Antibacterial activity of ZnO nanoparticles with a modified surface under ambient illumination. **Nanotechnol.** 23, 475703.
- [24] Mishra, P., Yadav, R.S., & Pandey, A.C. (2010). Growth mechanism and photoluminescence property of flower-like ZnO nanostructures synthesized by starch-assisted sonochemical method. **Ultrason. Sonochem.** 17, 560-565.
- [25] Morkoç, H., & Özgür, U. (2009). **Zinc oxide: Fundam. mater. device Technol.**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Nafchi, A. M., Nassiri, R., Sheibani, S., Ariffin, F., & Karim, A. A. (2013). Preparation and characterization of bionanocomposite films filled with nanorod-rich zinc oxide. **Carbohydr. Polym.** 96, 233-239.
- [26] Okitsu, K., Mizukoshi, Y., Yamamoto, T., Maeda, Y., & Nagata, Y. (2007). Sonochemical synthesis of gold nanoparticles on chitosan. **Mater. Lett.** 61, 3429-3431.

- [27] Padmavathy, N. & Vijayaraghavan, R. (2008). Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles-an antimicrobial study. **Sci. Technol. Adv. Mater.** 9, 035004.
- [28] Perelshtein, I., Applerot, G., Perkas, N., Wehrschetz-Sigl, E., Hasmann, A., Guebitz, G.M., & Gedanken, A. (2009). Antibacterial properties of an in situ generated and simultaneously deposited nanocrystalline ZnO on fabrics. **ACS Appl. Mater. Interfaces.** 1(2), 361-366.
- [29] Phaechamud, T., Mahadlek, J., Aroonrerk, N., Choopan, S., & Charoenteeraboon, J. (2012). Antimicrobial activities of ZnO-doxycycline hyclate thermosensitive gel. **ScienceAsia.** 38, 64-74.
- [30] Prasad, V., Shaikh, A.J., Kathe, A.A., Bisoyi, D.K., & Verma, A.K. (2010). Functional behavior of paper coated with zinc oxide-soluble starch nanocomposites. **J. Mater. Process. Technol.** 210, 1962-1967.
- [31] Prasanna, V.L., & Vijayaraghavan, R. (2015). Insight into the mechanism of antibacterial activity of ZnO: surface defects mediated reactive oxygen species even in the dark. **Langmuir**, 31, 9155-9162.
- [32] Raghupathi, K.R., Koodali, R.T., & Manna, A.C. (2011). Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. **Langmuir.** 27(7), 4020-4028.
- [33] Ronen, A., Semiat, R., & Dosoretz, C.G. (2013). Antibacterial efficiency of composite nano-ZnO in biofilm development in flow-through systems. **Desalin. Water Treat.** 51(4-6), 988-996.
- [34] Sanoop, P.K., Mahesh, K.V., Nampoothiri, K.M., Mangalaraja, R.V., & Ananthakumar, S. (2012). Multifunctional ZnO-biopolymer nanocomposite coatings for health-care polymer forms and fabrics. **J. Appl. Polym. Sci.** 126(SI-1), E232-E243.
- [35] Schmid, G., & Corain, B. (2003). Nanoparticulated gold: syntheses, structures, electronics, and reactivities. **Eur. J. Inorg. Chem.** 17, 3081-3098.
- [36] Sharma, D., Rajput, J., Kaith, B.S., Kaur, M., & Sharma, S. (2010). Synthesis of ZnO nanoparticles and study of their antibacterial and antifungal properties. **Thin Solid Films.** 591(3), 1224-1229.
- [37] Shi, X.L., Cao, M.S., Zhao, Y.N., Song, W.L., & Rong, J.L. (2008). Preparation and properties of ZnO nano-whiskers. **Sci. China Ser. E: Technol. Sci.** 51(9), 1433-1438.
- [38] Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N. H. M., Ann, L. C., Bakhori, S. K. M., Hasan, H., & Mohamad, D. (2015). Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. **Nano-Micro Letter.** 7(3), 219-242.
- [39] Suwanboon, S., Amornpitoksuk, P., Bangrak, P., Sukolrat, A., & Muensit, N. (2010). The dependence of optical properties on the morphology and defects of nanocrystalline ZnO powders and their antibacterial activity. **Journal of Ceramic Processing Research.** 11(5), 547-551.
- [40] Talebian, N., Amininezhad, S.M., & Doudi, M. (2013). Controllable synthesis of ZnO nanoparticles and their morphology-dependent antibacterial and optical properties. **J. Photochem. Photobiol., B.** 120, 66-73.
- [41] Toxnet. **Zinc Oxide.** United States National Library of Medicine. Retrieved December 21, 2009, from <http://toxnet.nlm.nih.gov>
- [42] Vidic, J., Stankic, S., Haque, F., Ciric, D., Le Goffic, R., Vidy, A., Jupille, J., & Delmas, B. (2013). Selective antibacterial effects of mixed ZnMgO nanoparticles. **J. Nanopart. Res.** 15(5), 1595.
- [43] Wahab, R., Mishra, A., Yun, S.-I., Hwang, I.H., Mussarat, J., Al-Khedhairi, A.A., Kim, Y.-S., & Shin, H.-S. (2012). Fabrication, growth mechanism and antibacterial activity of ZnO micro-spheres prepared via solution process. **Biomass Bioenergy.** 39, 227-236.

- [44] Wang, Z.L. (2004). Nanostructures of zinc oxide. **Materials today**. 26-32. ISBN: 1369 7021, Elsevier Limited. Retrieved December 15, 2009, from <http://sciencedirect.com>
- [45] Wang, Z.L. & Song, J.H. (2006). Piezoelectric nanogenerators based on zinc oxide nanowire arrays. **Science**. 312(5771), 242-246.
- [46] Wei, M.-Y., Famouri, L., Carroll, L., Lee, Y., & Famouri, P. (2013). Rapid and efficient sonochemical formation of gold nanoparticles under ambient conditions using functional alkoxy silane. **Ultrason. Sonochem.** 20, 610-617.
- [47] Xu, X., Chen, D., Yi, Z., Jiang, M., Wang, L., Zhou, Z., Fan, X., Wang, Y., & Hui, D. (2013). Antimicrobial mechanism based on H₂O₂ generation at oxygen vacancies in ZnO crystals. **Langmuir**. 29(18), 5573-5580.
- [48] Yamamoto, O. (2001). Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. **Int. J. Inorg. Mater.** 3(7), 643-646.
- [49] Yang, P., Yan, H.Q., Mao, S., Russo, R., Johnson, J., Saykally, R., Morris, N., Pham, J., He, R., & Choi, H.J. (2002). [50] [50] Controlled growth of ZnO nanowires and their optical properties. **Adv. Funct. Mater.** 12(5), 323-331.
- [51] Yousef, J.M. & Danial, E.N. (2012). In *vitro* antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of zinc oxide and nano-particle zinc oxide against pathogenic strains. **J. Health Sci.** 2(4), 38-42.
- [52] Zhao, Q.L., Cao, M.S., Yuan, J., Lu, R., Wang, D.W., & Zhang, D.Q. (2010). Thickness effect on electrical properties of Pb(Zr_{0.52}Ti_{0.48})O_{x-3} thick films embedded with ZnO nanowhiskers prepared by a hybrid sol-gel route. **Mater. Lett.** 64(5), 632-635.