

Nghiên cứu chế tạo bạc nano trên nền Zeolite bằng phương pháp chiếu xạ ứng dụng làm tác nhân diệt khuẩn trong nhựa

Đặng Văn Phú, Nguyễn Ngọc Duy, Nguyễn Thị Kim Lan, Võ Thị Kim Lăng, Nguyễn Quốc Hiến, Lê Anh Quốc*

Trung tâm Nghiên cứu và Triển khai Công nghệ Bức xạ
Viện Năng lượng Nguyên tử Việt Nam

Ngày nhận bài 2.1.2015, ngày chuyển phản biện 6.1.2015, ngày nhận phản biện 6.2.2015, ngày chấp nhận đăng 12.2.2015

Bằng phương pháp chiếu xạ, bạc nano đã được tổng hợp hiệu quả trên nền zeolite (Agnano/Z). Trước tiên, bạc ion được đưa vào mạng lưới zeolite bằng phản ứng trao đổi ion tạo Ag^+/Z , sau đó chiếu xạ gamma Cobalt-60 trong dung dịch etanol để tạo Agnano/Z. Các nhân tố ảnh hưởng đến quá trình tạo bạc nano như: tỷ lệ giữa Ag^+/Z và dung dịch etanol, liều xạ hấp thụ... đều được nghiên cứu và lựa chọn. Hàm lượng bạc trong Agnano/Z được xác định và các đặc trưng của chúng được phân tích bằng phổ cực tím (UV-vis), phổ nhiễu xạ tia X, ảnh chụp hiển vi điện tử TEM, SEM... Hoạt tính kháng khuẩn của Agnano/Z được nghiên cứu trên vi khuẩn *Escherichia coli* (*E. coli*). Kết quả cho thấy, có đến 98% số tế bào *E. coli* bị tiêu diệt khi lắc 0,5 g Agnano/Z trong 100 ml huyền phù chứa 10^6 tế bào *E. coli*/ml. Ngoài ra, sau khi phối trộn Agnano/Z với nhựa polypropylen (PP), sản phẩm nhựa PP/Agnano/Z có khả năng tiêu diệt hoàn toàn các tế bào *E. coli* trên bề mặt. Với kết quả đó, Agnano/Z cho thấy tiềm năng ứng dụng lớn trong lĩnh vực nhựa kháng khuẩn.

Từ khóa: bạc nano, chiếu xạ gamma, *E. coli*, nhựa kháng khuẩn, zeolite.

Chỉ số phân loại 2.5

Đặt vấn đề

Ngày nay vật liệu nhựa được sử dụng rất rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau, các loại nhựa phổ biến là polypropylen (PP), polyetylen (PE), polystyren (PS), polyvinyl chlorid (PVC)... [1]. Trong số đó, PP là polyme nhiệt dẻo được khai thác rộng rãi nhất vì nó có nhiều ưu điểm: trọng lượng nhẹ, kháng hóa chất, chi phí thấp, dễ gia công và có thể tái sử dụng [2]. Tuy nhiên, cũng như các loại nhựa khác, nhựa PP không có khả năng kháng khuẩn nên vẫn còn hạn chế ứng dụng trong một số lĩnh vực. Có rất nhiều cách để tích hợp đặc tính kháng khuẩn cho nhựa như bổ sung trực tiếp các chất diệt khuẩn bay hơi hoặc không bay hơi vào trong nhựa, phủ các chất diệt khuẩn lên bề mặt nhựa, cố định các chất diệt khuẩn lên nhựa bằng liên kết ion hoặc liên kết hóa trị... [3]. Trong đó, tác nhân diệt khuẩn từ bạc (ở dạng ion hoặc nano) thu hút được nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học do bạc có các đặc tính vượt trội như: khả năng diệt khuẩn mạnh, phổ rộng và đặc biệt là có tính bền nhiệt và hoạt lực kéo dài. Trong lĩnh vực công nghiệp nhựa, bạc ion được sử dụng phổ biến nhất so với các ion kim loại có tính

diệt khuẩn khác như đồng ion và kẽm ion [4]. Nhằm ổn định trong quá trình phối trộn vào trong nhựa, bạc ion thường được gắn trên các chất mang khác nhau, trong đó có zeolite [3, 4]. Có nhiều phương pháp khác nhau để tích hợp khả năng diệt khuẩn của bạc lên chất nền zeolite, phổ biến là: bạc ion Ag^+ được trao đổi vào trong mạng lưới zeolite [5, 6] và bạc nano được tổng hợp trực tiếp trên nền zeolite bằng phương pháp khử hóa học [6-8]...

Trong nghiên cứu này, bạc nano trên nền zeolite 4A (Agnano/Z) được chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ tia gamma từ nguồn Co-60, hiệu quả diệt khuẩn *E. coli* của vật liệu và khả năng sử dụng như tác nhân diệt khuẩn trong nhựa PP cũng được nghiên cứu.

Nội dung nghiên cứu

Nguyên liệu và hóa chất

Bạc nitrat ($AgNO_3$), etanol, acid nitric, zeolite 4A và nhựa PP được sử dụng có xuất xứ từ Trung Quốc. Nước cất cũng được sử dụng trong thí nghiệm. Môi trường nuôi cấy Luria Bertani của Hãng Himedia có

*Tác giả chính: Tel: 0903837049; Email: anhquoc1704@gmail.com

STUDY ON THE FABRICATION OF SILVER NANOPARTICLES IN ZEOLITE FRAMEWORK BY GAMMA IRRADIATION FOR APPLYING AS ANTIBACTERIAL AGENT FOR PLASTICS

Summary

Using the irradiation method, silver nanoparticles have been effectively synthesised into the zeolite framework (Agnano/Z). Firstly, silver ions have been introduced into the porous zeolite framework by ion-exchange reaction for creating Ag^+/Z , then irradiated in ethanol solution by gamma Cobalt-60 for forming Agnano/Z. The conditions of the irradiation process such as: ratio of Ag^+/Z to ethanol solution, irradiation dose... have been also investigated and chosen. The silver content in Agnano/Z has been determined by ICP-AES and characterized by ultraviolet-visible spectroscopy, powder X-ray diffraction, transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM)... The antibacterial activity of the Agnano/Z has been investigated against Gram-negative bacteria *Escherichia coli* by both: quality and quantity tests. The results have shown that Agnano/Z possesses a high antibacterial property, namely the bactericide effect and can kill more than 98% of *E. coli* bacteria for shaking 0.5 g Agnano/Z in 100 ml of *E. coli* suspension containing about 10^6 CFU/ml. After mingling Agnano/Z with polypropylene plastic (PP) for the final silver content of about 100 mg/kg, PP/Agnano/Z has exhibited the ability to eliminate most of the bacteria on its surface. In conclusion, providing and maintaining the vigorously antimicrobial activity in Agnano/Z plastics is promising to be applied in antibacterial plastics.

Keywords: antibacterial plastics, *E. Coli*, gamma irradiation, silver nanoparticles, zeolite.

Classification number 2.5

xuất xứ từ Ấn Độ. Giống vi khuẩn *E. coli ATCC 6538* được cung cấp bởi Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Tp Hồ Chí Minh và bảo quản tại Phòng thí nghiệm vi sinh (Trung tâm Nghiên cứu và Triển khai Công nghệ Bức xạ, Viện Năng lượng Nguyên tử Việt Nam).

Phương pháp

Chế tạo zeolite có chứa bạc ion (Ag^+/Z):

Ag^+/Z được chế tạo từ bạc nitrat và zeolite 4A bằng phương pháp trao đổi ion theo quy trình của tác giả Đặng Tú Suyền [9], quy trình tóm tắt như sau: 1050 g zeolite 4A được khuấy đều trong 1,3 lít nước cất, trung hòa bằng dung dịch HNO_3 2M đến khi pH = 6. Hỗn hợp này được bổ sung từ từ 17,5 g $AgNO_3$ và khuấy đều ở nhiệt độ 60°C trong 2 giờ, để lắng qua đêm, thu phần lắng Ag^+/Z . Sau đó, Ag^+/Z được rửa sạch bằng nước cất và sấy khô trong tủ sấy ở 110°C để khô hoàn toàn, cuối cùng thu được bột Ag^+/Z và sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Chế tạo bạc nano trên nền zeolite (Agnano/Z):

Ag^+/Z có hàm lượng bạc ~ 10000 mg/kg được cho vào dung dịch ethanol 10% với tỷ lệ Ag^+/Z :ethanol là 1:5. Hỗn hợp được chiếu xạ bằng nguồn Co-60 ở các liều xạ hấp thụ khác nhau từ 20-60 kGy, suất liều 3,2 kGy/h tại Viện Nghiên cứu Hạt nhân. Sản phẩm sau khi chiếu xạ được rửa sạch bằng nước cất, sấy khô và đo phổ UV-vis.

Phân tích đặc trưng của bạc nano trên nền zeolite:

Ảnh hưởng của liều xạ đến khả năng hình thành bạc nano trên nền zeolite được đánh giá thông qua kết quả đo phổ UV-vis. Hàm lượng bạc của Agnano/Z được phân tích bằng kỹ thuật ICP-AES. Sự hiện diện của bạc trên zeolite còn được xác định thông qua phổ tán sắc năng lượng tia X (EDX). Đặc trưng hình dạng và kích thước hạt của Agnano/Z được xác định thông qua kết quả chụp ảnh SEM, TEM.

Chế tạo vật liệu nhựa PP-Agnano/Z diệt khuẩn:

Agnano/Z có hàm lượng bạc ~ 8000 mg/kg (Agnano/Z 8k) được lựa chọn để phối trộn vào nhựa PP. Quá trình phối trộn được thực hiện bằng máy đùn hạt nhựa DSE 20 Brabender Germany tại Trung tâm Nghiên cứu và Triển khai Công nghệ Bức xạ. Sản phẩm hạt nhựa sau khi đùn có hàm lượng bạc ~ 100

mg/kg (PP-Agnano/Z 100) được ép thành tấm và được đánh giá đặc tính kháng vi khuẩn *E. coli*.

Đánh giá hiệu quả diệt khuẩn:

Vi khuẩn *E. coli* được xem là vi sinh vật chỉ thị cho sự ô nhiễm trong nước và là vi khuẩn mô hình cho các thí nghiệm trên vi khuẩn [10]. Trong nghiên cứu này, *E. coli* ATCC 6538 được lựa chọn là đối tượng thử nghiệm trong các thí nghiệm đánh giá hiệu quả diệt khuẩn.

Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của Agnano/Z: hoạt tính kháng khuẩn của Agnano/Z 8k được khảo sát bởi các phương pháp: định tính và định lượng. Thí nghiệm định tính hiệu quả diệt khuẩn được tiến hành theo phương pháp vòng vô khuẩn: đĩa giấy vô trùng (ϕ 1 cm) được phủ bởi bột Agnano/Z 8k và đặt trên đĩa thạch môi trường LB đã được trải vi khuẩn *E. coli*, ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C và quan sát vòng vô khuẩn. Thí nghiệm tương tự được tiến hành với mẫu zeolite dùng làm đối chứng.

Trong thí nghiệm định lượng hiệu quả diệt khuẩn: 0,5 g zeolite và 0,5 g Agnano/Z 8k được tiếp xúc trực tiếp với 100 ml môi trường LB có nhiễm *E. coli* ($\sim 10^6$ CFU/ml) trong 5 phút và số tế bào *E. coli* sống sót trong môi trường được xác định bằng phương pháp trải đĩa và đếm khuẩn lạc. Ngoài ra, hoạt tính kháng khuẩn của Agnano/Z ở các liều lượng khác nhau cũng được nghiên cứu: lần lượt 0,34 g, 0,5 g và 0,68 g Agnano/Z được cho vào các bình có chứa 100 ml LB nhiễm *E. coli*, lắc trong 5 phút và xác định số vi khuẩn sống sót trong môi trường.

Hiệu suất kháng khuẩn được xác định theo công thức: $\eta(\%) = (N_0 - N) \times 100 / N_0$, trong đó N_0 , N lần lượt là số vi khuẩn *E. coli* trong môi trường trước và sau khi tiếp xúc với mẫu thí nghiệm (CFU/ml) [11].

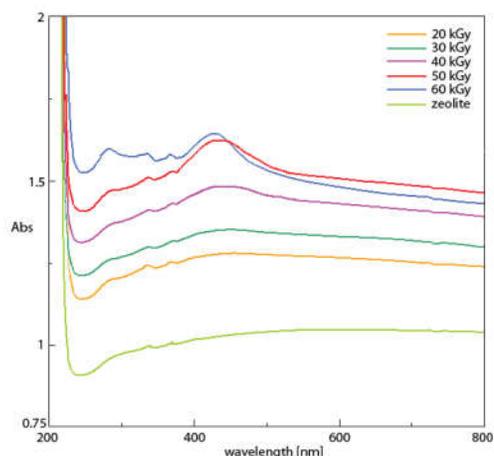
Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn của mẫu nhựa PP-Agnano/Z 100: mẫu nhựa được khảo sát hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp vòng vô khuẩn của nhóm tác giả Đặng Văn Phú và các cộng sự (2013) [12]. Mẫu nhựa PP-Agnano/Z 100 hình tròn, đường kính 1,5 cm, dày 2 mm được tiếp xúc với vi khuẩn *E. coli* (10^7 CFU/ml) và để khô ở nhiệt độ phòng trong điều kiện vô trùng, sau đó đặt lên môi trường thạch LB, ủ qua đêm ở 37°C và quan sát sự xuất hiện của

vi khuẩn lạc trên mẫu nhựa. Thí nghiệm tương tự được tiến hành với mẫu nhựa PP dùng làm đối chứng.

Kết quả nghiên cứu

Chế tạo bạc nano trên nền zeolite

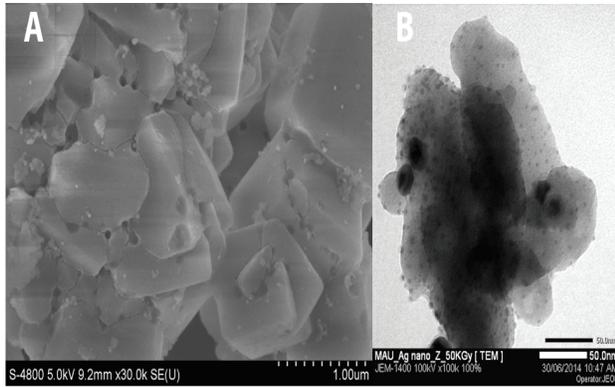
Hình 1 cho thấy, khi chiếu xạ Ag^+/Z với nồng độ $Ag^+ \sim 25$ mM trong dãy liều xạ từ 20-60 kGy, phổ UV-vis sẽ xuất hiện đỉnh hấp thụ trong dãy bước sóng tương ứng 455-429 nm, hiện tượng này hoàn toàn không xảy ra ở mẫu Ag^+/Z chưa chiếu xạ. Khi liều xạ hấp thụ tăng, cường độ hấp thụ tại các đỉnh cũng tăng và tại liều xạ 50 và 60 kGy, cường độ hấp thụ của các đỉnh gần như ổn định. Theo các công trình nghiên cứu của Ramnani và các cộng sự (2007), bạc nano sẽ cho đỉnh hấp thụ đặc trưng trong khoảng bước sóng 390-450 [13]. Vì vậy, phổ UV-vis trong hình 1 đã chứng tỏ bạc nano đã được tạo thành trên nền zeolite bằng phương pháp chiếu xạ. Thông qua kết quả này, liều xạ hấp thụ 50 kGy được lựa chọn để chế tạo bạc nano trên nền zeolite cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1: phổ UV-vis của mẫu Ag^+/Z được chiếu xạ ở các liều hấp thụ khác nhau

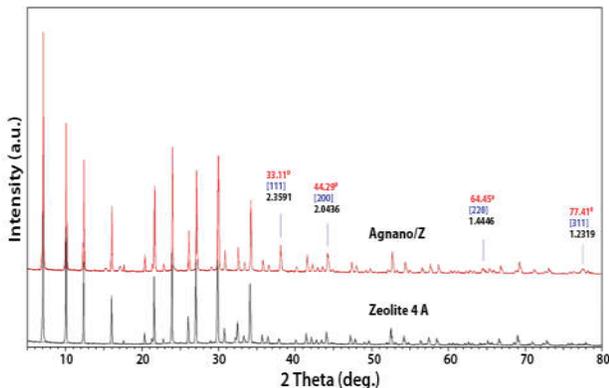
Kết quả phân tích hàm lượng bạc bằng phương pháp ICP-AES cho thấy, mẫu bạc nano Agnano/Z được chế tạo bằng con đường chiếu xạ gamma có hàm lượng bạc ~ 10000 mg/kg.

Ảnh chụp SEM, TEM của mẫu Agnano/Z được thể hiện trong hình 2. Ảnh SEM cho thấy có sự biến đổi cấu trúc bề mặt của zeolite sau khi gắn bạc nano. Từ ảnh TEM, kích thước hạt trung bình của bạc nano trong Agnano/Z được ước lượng trong khoảng 5-30 nm.



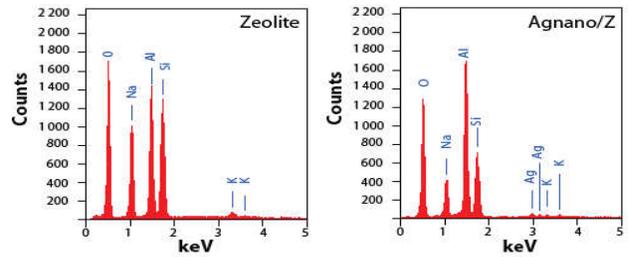
Hình 2: ảnh chụp SEM (A) và TEM (B) của Agnano/Z

Từ phổ XRD trong hình 3, kích thước hạt trung bình của Agnano/Z được tính toán bằng cách sử dụng định luật $2\theta = 38,11^\circ$ theo công thức của Debye-Scherrer: $t = 0,9\lambda/B \times \cos\theta$ được trình bày trong nghiên cứu của Jiang và các cộng sự (2007) [14]. Kết quả tính toán cho thấy, kích thước hạt trung bình của bạc nano trên nền zeolite là ~ 27 nm. Điều này phù hợp với kết quả ước lượng kích thước hạt trung bình của bạc nano từ ảnh chụp TEM.



Hình 3: phổ XRD của zeolite và Agnano/Z

Kết quả phân tích phổ tán sắc năng lượng tia X (EDX) trong hình 4 cho thấy, thành phần cấu tạo của zeolite gồm 4 nguyên tố chính: oxy, natri, nhôm và silic, cùng một lượng nhỏ kali, nhưng hoàn toàn không có dấu vết của bạc. Trong khi đó, phổ EDX của Agnano/Z có xuất hiện đỉnh tại vị trí 3 keV, chứng tỏ có sự hiện diện của bạc trong thành phần cấu tạo của Agnano/Z. Trong nghiên cứu của Klemenčič và các cộng sự (2010) [15] và của Gusseme và các cộng sự (2010) [16], phổ EDX cũng được sử dụng để xác minh sự hiện diện của bạc nano trong các mẫu cellulose và polyvinylidene flouride.

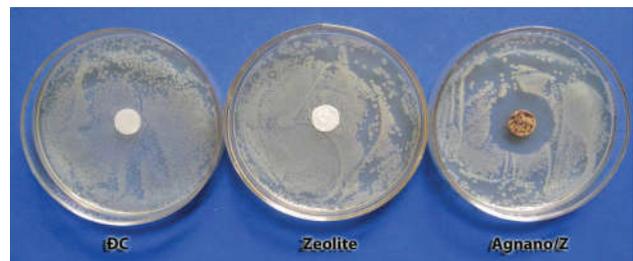


Hình 4: phổ EDX của zeolite và Agnano/Z

Hiệu quả diệt khuẩn

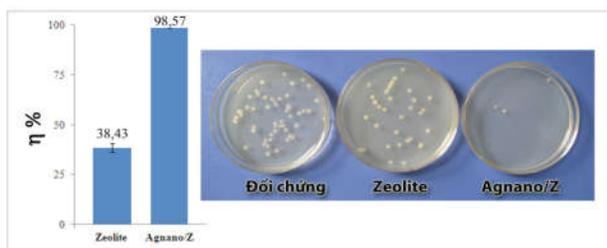
Hoạt tính kháng khuẩn của Agnano/Z:

Kết quả thử nghiệm định tính hoạt tính kháng khuẩn của Agnano/Z thể hiện trong hình 5 cho thấy, chỉ có mẫu Agnano/Z tạo được vòng vô khuẩn, trong khi mẫu đối chứng (ĐC) và mẫu zeolite đều không có. Điều này chứng tỏ Agnano/Z có hoạt tính kháng khuẩn đối với *E. coli* và hoạt tính kháng khuẩn đó là do tác dụng của bạc nano, còn zeolite hoàn toàn không có khả năng diệt khuẩn. Trong nghiên cứu của Shameli và cộng sự (2007), phương pháp vòng vô khuẩn cũng được sử dụng để định tính hiệu quả diệt khuẩn của bạc nano trên nền zeolite [7].

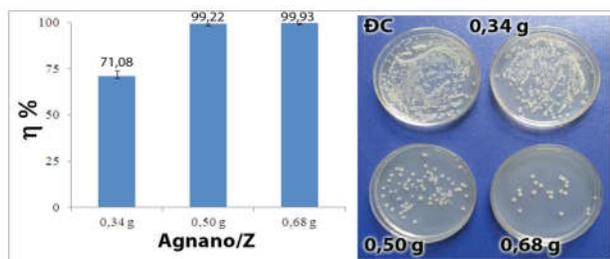


Hình 5: thử nghiệm vòng vô khuẩn của zeolite và Agnano/Z

Kết quả tính hiệu suất diệt khuẩn của Agnano/Z được thể hiện trong hình 6, 7. Kết quả cho thấy, Agnano/Z có hiệu suất diệt khuẩn cao (98,57%) và khi tăng hàm lượng Agnano/Z tiếp xúc với huyền phù *E. coli* (từ 0,34-0,68 g) thì hiệu suất diệt khuẩn cũng tăng (từ 69,64-99,21%). Ngoài ra, khi lắc zeolite với huyền phù *E. coli*, mật độ vi khuẩn sau khi lắc cũng giảm xuống đáng kể (38,43%), nguyên nhân là do zeolite có khả năng hấp phụ mạnh, trong quá trình lắc, các tế bào *E. coli* sẽ bám dính trên nền zeolite, do đó số lượng tế bào *E. coli* pha lỏng của huyền phù sẽ giảm xuống. Hiện tượng này cũng đã xảy ra khi lắc PE vải không với huyền phù *E. coli* trong công trình nghiên cứu của nhóm tác giả Đặng Văn Phú và các cộng sự (2013) [12].



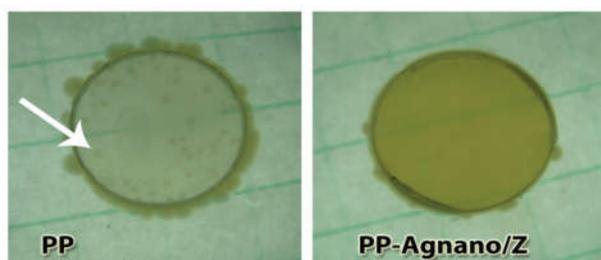
Hình 6: hiệu quả diệt khuẩn *E. coli* của Agnano/Z so với zeolite



Hình 7: hiệu quả diệt khuẩn *E. coli* của Agnano/Z ở các hàm lượng khác nhau

Hoạt tính kháng khuẩn của nhựa PP-Agnano/Z:

Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn của nhựa PP-Agnano/Z bằng phương pháp vòng vi khuẩn được thể hiện trong hình 8. Kết quả cho thấy, sau khi tiếp xúc với huyền phù *E. coli*, không có khuẩn lạc nào xuất hiện bám trên bề mặt nhựa PP-Agnano/Z, trong khi trên bề mặt mẫu nhựa đối chứng PP xuất hiện rất nhiều khuẩn lạc. Điều này chứng tỏ, sau khi tiếp xúc với PP-Agnano/Z các tế bào *E. coli* trên bề mặt đã bị tiêu diệt hoàn toàn.



Hình 8: kết quả thử nghiệm vòng vi khuẩn của mẫu nhựa PP và PP-Agnano/Z

Kết luận

Bằng phương pháp chiếu xạ gamma, bạc nano đã được tổng hợp hiệu quả trên nền zeolite có kích thước hạt ~ 27 nm và hiệu suất diệt khuẩn *E. coli* (10^6 CFU/ml) đạt trên 99%. Ngoài ra, sau khi phối trộn vào nhựa PP, hoạt tính của Agnano/Z vẫn được duy trì và có khả năng diệt vi khuẩn *E. coli* hiệu quả. Bạc nano trên nền



zeolite có lợi thế là ở dạng rắn dễ dàng phối trộn vào các loại nhựa nhưng vẫn duy trì hoạt tính kháng khuẩn cao, hứa hẹn có tiềm năng ứng dụng lớn trong việc thay thế các tác nhân diệt khuẩn hiện có trong lĩnh vực công nghiệp nhựa.

Tài liệu tham khảo

- [1] J.J Wu, G.J Lee, Y.S Chen, T.L Hu (2012), "The synthesis of nano-silver/polypropylene plastics for antibacterial application", *Current Applied Physics*, **12**, pp.89-95.
- [2] E.P Moore (1996), "Polypropylene Handbook-Polymerization, Characterization, Properties, Processing, Applications", *Hanser Gardner Publications, Inc.*, Cincinnati.
- [3] C Radheshkumar, H Munstedt (2006), "Antimicrobial polymers from polypropylene/silver composites-Ag⁺ release measured by anode stripping voltammetry", *Reactive & Functional Polymers*, **66**, pp.780-788.
- [4] A Jones (2009), "Choosing antimicrobial additives for plastics", *Plastics Additives and Compounding*, **11(4)**, pp.26-28.
- [5] L Ferreira, A.M Fonseca, G Botelho, C.A Aguiar, I.C Neves (2012), "Antimicrobial activity of faujasite zeolites doped with silver", *Microporous and Mesoporous Materials*, **160**, pp.126-132.
- [6] D Jiraroj, S Tungasmita, D.N Tungasmita (2014), "Silver ions and silver nanoparticles in zeolite A composites for antibacterial activity", *Powder Technology*, **264**, pp.418-422.
- [7] K Shameli, M.B Ahmad, M Zargar, W.M.Z.W Yunus, N.A Ibrahim (2011), "Fabrication of silver nanoparticles doped in the zeolite framework and antibacterial activity", *International Journal of Nanomedicine*, **6**, pp.331-341.
- [8] A Nagy, A Harrison, S Sabbani, R.S Munson Jr, P.K Dutta, W.J Waldman (2011), "Silver nanoparticles embedded in zeolite membranes: release of silver ions and mechanism of antibacterial action", *International Journal of Nanomedicine*, **6**, pp.1833-1852.
- [9] Đặng Tú Suyền (2013), "Nghiên cứu chế tạo hỗn hợp PP/

Ag⁺/Zeolite dùng để sản xuất vật liệu PP hỗn hợp kháng khuẩn bằng phương pháp trao đổi ion bạc vào cấu trúc zeolite”, *Luận văn tốt nghiệp Thạc sỹ*, Trường Đại học Bách khoa Tp Hồ Chí Minh.

[10] L.V Yaohui, H Liu, Z Wang, S Liu, L Hao, Y Sang, D Liu, J Wang, R.I Boughton (2009), “Silver nanoparticle-decorated porous ceramic composite for water treatment”, *Journal of Membrane Science*, **331**, pp.50-56.

[11] F Zhang, X Wu, Y Chen, H Lin (2009), “Application of silver nanoparticles to cotton fabric as an antibacterial textile finish”, *Fibers and Polymers*, **10(4)**, pp.496-501.

[12] D.V Phu, L.A Quoc, N.N Duy, N.Q Hien (2013), “Study of incorporation of silver nanoparticles onto PE-g-PAAc nonwoven fabric by γ -irradiation for watertreatment”, *Radiation Physics and Chemistry*, **88**, pp.90-94.

[13] S.P Ramnani, J Biswal, S Sabharwal (2007), “Synthesis of silver nanoparticles supported on silica aerogel using gamma radiolysis”, *Radiation Physics and Chemistry*, **76**, pp.1290-1294.

[14] L Jiang, Z Wu, D Wu, W Yang, R Jin (2007), “Controllable embedding of silver nanoparticles on silica nanospheres using poly(acrylic acid) as a soft template”, *Nanotechnology*, **18**, pp.15603-16809.

[15] D Klemenčič, B Simončič, B Tomšič, B Orel (2010), “Biodegradation of silver functionalised cellulose fibres”, *Carbohydrate Polymers*, **80**, pp.426-435.

[16] B.D Gusseme, L Sintubin, L Baert, E Thibo, T Hennebel, G Vermeulen, M Uyttendaele, W Verstraete, N Boon (2010), “Biogenic Silver for Disinfection of Water Contaminated with Viruses”, *Applied and Environmental Microbiology*, **76**, pp.1082- 1087.