

# Antimikrobni učinak vodenih pripravaka kalcijevog hidroksida na *Streptococcus mutans*, *Streptococcus faecalis* i *Candida albicans*, in vitro

The Antimicrobial Efficiency of Aqueous Solutions of Calcium Hydroxide on *Streptococcus mutans*, *Streptococcus faecalis* and *Candida albicans*, in vitro

Božidar Pavelić  
Ivica Anić  
Dora Najžar-Fleger  
Božidar Stilinović\*  
Kristian Temmer\*\*

Zavod za bolesti zubi  
Stomatološkog fakulteta  
Sveučilišta u Zagrebu

\* Prirodoslovno-matematički  
fakultet Sveučilišta  
u Zagrebu

\*\* Zavod za bolesti usta  
Stomatološkog fakulteta  
Sveučilišta u Zagrebu

## Sažetak

*Preparati kalcijevog hidroksida mogu biti pripremljeni u obliku vodene otopine, kita, laka, cementa i umjetnog materijala. Terapijski učinak pojedinog preparata ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima dodanih sastojaka.*

*Cilj rada bio je ispitati osjetljivost mikroorganizama *Streptococcus mutans*, *Streptococcus faecalis* i *Candida albicans* na različite koncentracije vodenih suspenzija kalcijevog hidroksida. Za kruta hranilišta korišteni su Bacto Mitis Salivarius agar za *S. mutans*, »Torlak« krvni agar za *S. faecalis* i Sabouraud agar »Torlak« za *C. albicans*. Na hranilišta je stavljeno 0,2 ml pripremljene suspenzije mikroorganizama. Na podlogama su izbušene udubine u koje je stavljeno po 0,2 ml vodene otopine kalcijevog hidroksida. Tako pripremljena hranilišta držana su u aerobnim uvjetima na 37°C kroz 48 sati. Rezultati su očitavani nakon 24 i 48 sati.*

*Ispitivane otopine kalcijevog hidroksida pokazale su maksimalni antimikrobni učinak nakon 24 sata. Rezultat je ostao isti i nakon 48 sati. Na krutom hranilištu inhibicija rasta *S. mutans* nastupila je kod koncentracije otopine  $\text{Ca(OH)}_2$  od  $271,18 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$  i pH 12,76. Inhibicija rasta *S. faecalis* nastala je kod koncentracije od  $3335,21 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$  i pH 12,82. Inhibicija rasta *C. albicans* nastupila je kod koncentracije otopine  $\text{Ca(OH)}_2$  od  $1023,20 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$  i pH 12,84.*

*Na pokusima in vitro zamijećena je razlika u osjetljivosti ispitivanih mikroorganizama kod istih koncentracija otopina  $\text{Ca(OH)}_2$ .*

*Ključne riječi: kalcijev hidroksid, antimikrobni učinak, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus faecalis*, *Candida albicans**

Acta Stomatologica Croatica  
1991; 25:207-212

IZVORNI  
ZNANSTVENI RAD

CODEN: ASCRBK  
ISSN: 0001-7019  
Primljeno: 15. srpnja 1991.

## Uvod

Za razliku od većine antimikrobnih sredstava, koja se koriste u terapiji bolesti zuba, preparati kalcijevog hidroksida uz antimikrobno djelovanje stimuliraju reparatorne promjene u zubnoj pulpi i periapikalnom tkivu. Kalcijev hidroksid rastvara nekrotični sadržaj i uklanja supstrat za rast i razvoj bakterija (1). Neutralizira kiselu reakciju upalnog tkiva i čini fizičku prepreku toksičnom djelovanju ispuna. Sva ta svojstva kao i odsutnost alergijskih reakcija i promjene boje zuba objedinjena su u nekim preparatima kalcijevog hidroksida. Von Heinrich i Kneist (2) objavili su da Calxyl u karijesnom dentinu inhibira rast acidurinih i acidofilnih mikroorganizama roda *Streptococcus* i *Lactobacillus*, a pospešuje rast bakterija roda *Actinomyces*, *Streptomyces* i *Nocardia*. Zubna pulpa podnosi prisutnost bakterija roda *Streptomyces* na ostatnom dentinu debljine do 0,4 mm, što omogućuje dobar reparatorni odgovor tkiva (3). Iz vrste *Streptomyces miyagawaensis* izoliran je ribocitrin koji djeluje inhibitory na glikoziltransferazu *S. mutans* E 49 (4). Na taj način  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  može i indirektno inhibirati rast *S. mutans*.

Prema De Freitasu (5) kemijske karakteristike i topljivost nekih tvorničkih preparata određuju njihovo antimikrobno djelovanje. Iznenađujuća je razlika u antimikrobnom djelovanju cemenata na bazi kalcijevog hidroksida. Tako npr. Life i Dycal imaju sličan pH kada se dispergiraju u destiliranoj vodi, ali različit antibakterijski učinak (6). Otpuštanje hidroksidnih iona ovisi o kompoziciji materijala i njegovoj topljivosti (7).

Tvornički gotovi preparati (Dycal, Reolit, Reocap, Hydroxiline) osim kalcijevog hidroksida sadržavaju i dodatne sastojke, što može utjecati na fizikalno-kemijska svojstva istih, a samim time i na njihovu terapijsku djelotvornost (8, 9, 10, 11, 12). Na tržištu ih uglavnom nalazimo u obliku paste. Ti se preparati ne stvrdnjaju već se samo talože na dodirnoj površini, u dodiru s lentinom ili pulpnim tkivom (13). Najjednostavniji oblik preparata kalcijevog hidroksida predstavlja vodena suspenzija. Osim vodene suspenzije preparati kalcijevog hidroksida mogu biti i u obliku kita, laka, cementa i umjetne mase. Najizraženije lužnato djelovanje pokazuju vodena suspenzija i kit. Kod cementa je to djelovanje slabije, dok kod linera i umjetne mase užnati učinak gotovo da i ne postoji (13).

Cilj istraživanja bio je ispitati in vitro djelovanje različitih koncentracija vodenih pripravaka

kalcijevog hidroksida na rast mikroorganizama *Streptococcus mutans*, *Streptococcus faecalis* i *Candida albicans*; odrediti najnižu koncentraciju koja pokazuje inhibitorni učinak i utvrditi ovisnost antimikrobnog djelovanja o pH vrijednosti pripravka.

## Materijal i metode

U radu je upotrijebljen prah kalcijevog hidroksida, proizvod tvornice »Kemika«, br. 11053.

Kao otapalo služila je sterilna destilirana voda (SDV). Za mjerenje alkaličnosti otopina upotrijebljen je MA-5730 pH-metar s NEC 0101 kombiniranom elektrodom s točnošću  $\pm 0.02$  pH.

U ispitivanju su korištene bakterije *Streptococcus mutans* soj D-283 i *Streptococcus faecalis* izoliran pod brojem 6716-R/89, dobivene u Zavodu za mikrobiologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu i kvasnica *Candida albicans* biotop 357 izolirana na Zavodu za bolesti usta Stomatološkog fakulteta u Zagrebu.

Za *S. mutans* upotrijebljena je kruta podloga Bacto Mitis Salivarius Agar (u daljnjem tekstu MS agar), za *S. faecalis* krvni agar, a za *C. albicans* kao kruto hranilište korišten je Sabouraud dekstrozni agar.

Od kalcijevog hidroksida dobivenog u obliku praška napravljena su serijska razrjeđenja sa sterilnom destiliranom vodom (SDV) (tablica 1), neposredno prije aplikacije na kulture mikroorganizama. Prije pokusa izmjerene su pH vrijednosti suspenzija.

Otopine s količinom kalcijevog hidroksida većom od 0,128 g/100 ml SDV stvaraju talog.

Tablica 1. *Serijska razrjeđenja kalcijevog hidroksida sa sterilnom destiliranom vodom*

Table 1. *Serial dilutions of calcium hydroxide with distilled water*

$\text{Ca}(\text{OH})_2$ g	pH	$\text{Ca}(\text{H})_2$ g	pH
0,032	10,93	2,048	12,76
0,064	11,90	4,096	12,80
*0,128	*12,50	8,192	12,82
0,256	12,69	16,384	12,83
0,512	12,72	32,768	12,83
1,024	12,73	65,536	12,83

(\*) – maksimalna količina  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  koja se otopila u 100 ml SDV

Kulture ispitivanih mikroorganizama (*S. mutans*, *S. faecalis* i *C. albicans*) nasadene su zasebno iz dubokog agara u Todd Hewitt Broth hranilište i tako ostavljene u aerobnim uvjetima na temperaturi od 37°C kroz 24 sata. Nakon 24 sata mikroorganizmi su razrijeđeni do koncentracije od 10<sup>7</sup> ml bujona.

Na kruta hranilišta (MS-, Sabouraud- i krvni agar) stavljeno je po 0,2 ml inkubiranog sadržaja i staklenim štapićem po Drygalu razmazano po površini hranjive podloge. U agaru su, nakon što je inkubirani sadržaj upijen, izbušeni bunari promjera 11 i dubine 4 mm. Na svakoj agar ploči napravljena su dva takva bunara, osim na kontrolnoj gdje je napravljen jedan. U bunar na kontrolnoj ploči stavljeno je 0,2 ml SDV, dok su u ostale bunare stavljani pripravci kalcijevog hidroksida.

Antimikrobni učinak pripravaka kalcijevog hidroksida promatran je nakon 24 i 48 sati. Mjerena je zona inhibicije u milimetrima.

Eksperiment je ponovljen 5 puta za svaki mikroorganizam.

## Rezultati

Inhibicija rasta *S. mutans* počela je kod koncentracije od 271,18 x 10<sup>-3</sup> mol/dm<sup>3</sup> i pH 12,76 (2 mm). Kod maksimalne koncentracije od 5350,01 x 10<sup>-3</sup> mol/dm<sup>3</sup> Ca(OH)<sub>2</sub> i pH 12,83, korištene u ovom eksperimentu, dobivena je zona inhibicije od 5 mm. Zona inhibicije bila je jednaka nakon 24 i 48 sati. Povećanjem udjela Ca(OH)<sub>2</sub> u vodenoj otopini usprkos istom pH povećala se zona inhibicije (tablica 2).

Kod kvasnice *C. albicans* prva inhibicija rasta od 1 mm pojavila se kod koncentracije 1023,20

Tablica 2. Utjecaj otopina Ca(OH)<sub>2</sub> na *S. mutans* difuznom metodom na MS-agaru

Table 2. The Influence of calcium hydroxide solution on *S. mutans* by method of diffusion on MS-agar

Ca(OH) <sub>2</sub> g/100 ml SDV	pH	zona inhibicije 24 h/mm	zona inhibicije 48 h/mm
KONTROLA	6,84	0	0
1,024	12,73	0	0
2,048	12,76	2	2
4,096	12,80	2	2
8,192	12,82	3	3
16,384	12,83	4	4
32,768	12,82	5	5
65,536	12,83	5	5

Tablica 3. Osjetljivost *C. albicans* na serijska razrjeđenja otopina Ca(OH)<sub>2</sub>

Table 3. The Sensitivity of *C. albicans* on serial dilutions of calcium hydroxide solutions

Ca(OH) <sub>2</sub> g/100 ml SDV	pH	zona inhibicije 24 h/mm	zona inhibicije 48 h/mm
KONTROLA	6,84	0	0
4,096	12,80	0	0
8,192	12,82	1,0	1,0
16,384	12,83	1,5	1,5
32,768	12,82	3,0	3,0
65,536	12,83	3,0	3,0

x 10<sup>-3</sup> mol/dm<sup>3</sup> i pH 12,82. Kod najveće korištene koncentracije dobili smo zonu inhibicije od 3 mm. Zona inhibicije bila je jednaka nakon 24 i 48 sati. Povećanjem koncentracije Ca(OH)<sub>2</sub> povećava se i zona inhibicije (tablica 3).

Rod bakterija *S. faecalis* pokazao je najveću otpornost prema djelovanju suspenzija Ca(OH)<sub>2</sub>. Prva zona inhibicije rasta (2 mm) pojavila se kod koncentracije od 3335,21 x 10<sup>-3</sup> mol/dm<sup>3</sup> i pH 12,82. Zona inhibicije bila je jednaka nakon 24 i 48 sati (tablica 4).

Tablica 4. Utjecaj otopina Ca(OH)<sub>2</sub> na *S. faecalis* difuzijskom metodom na krvnom agaru

Table 4. The influence of calcium hydroxide on *S. faecalis* by method of diffusion on blood agar

Ca(OH) <sub>2</sub> g/100 ml SDV	pH	zona inhibicije 24 h/mm	zona inhibicije 48 h/mm
KONTROLA	6,84	0	0
16,384	12,83	0	0
32,768	12,82	2	2
65,536	12,83	2	2

## Rasprava

Jednostavna analiza pH površine cementa nije dobar indikator određivanja antimikrobne aktivnosti materijala. Bitniji je totalni kapacitet i odnos otpuštanja hidroksidnih iona. Vodena suspenzija kalcijevog hidroksida u odnosu na ostale preparate kalcijevog hidroksida pokazuje najjači antimikrobni učinak. U našem radu, mikroorganizmi su pokazali različitu osjetljivost prema vodenim suspenzijama istih koncentracija.

*S. mutans* je na krutom hranilištu prvu inhibiciju rasta pokazao kod koncentracija  $271,18 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3 \text{ Ca(OH)}_2$  i pH 12,76 (2 mm). S porastom koncentracije kalcijevog hidroksida i pH vrijednosti povećavao se i antimikrobni učinak. Kod maksimalne koncentracije kalcijevog hidroksida korištene u ovom eksperimentu dobivena je zona inhibicije od 5 mm kod pH 12,83.

Stahle, Pioch i Hoppe (14) dobili su ispitivanjem »Pulpdent« paste zonu inhibicije od 8,5 mm. Fisher i Shortall (15) ispitivali su antimikrobni učinak 10 različitih preparata kalcijevog hidroksida. Vrijednosti dobivene u mjerenju zone inhibicije kod Dycala bile su grupirane između 3,5–5,5 mm, dok je kod preparata Life zona inhibicije bila od 0 do 7 mm. U našem istraživanju kod svakog ponovljenog ispitivanja pripravka dobili smo uvijek isti rezultat. Ispitujući antimikrobni učinak preparata Kalzinol Fisher (16) nalazi inhibiciju rasta bakterije *S. mutans* od 3,5 mm. Staehle i Pioch (17, 18) navode da različite tvornički gotove, kao i svježije zamiješane suspenzije, stvaraju prsten inhibicije od 7,5–9 mm.

Kod kvasnice *C. albicans* prva inhibicija rasta od 1 mm pojavila se kod koncentracije  $1023,20 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3 \text{ Ca(OH)}_2$  i pH 12,82. Granična vrijednost koncentracije suspenzije kalcijevog hidroksida nakon koje nije dolazilo do povećanja pH vrijednosti iznosila je  $1902,36 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ . Suprotno vrijednostima pH, antimikrobni učinak rastao je s porastom koncentracije suspenzije. Kod najveće upotrijebljene koncentracije dobili smo zonu inhibicije od 3 mm.

Klaiber, Grüner i Brecht (19) ispitivanjem inhibitornog učinka komercijalnih preparata najjači inhibitorni učinak dobili su kod Calxyła, slabiji kod Cp-Capa, dok Procal, Dycal, Reolit i Reo-cap nisu pokazali djelovanje na kvasnicu *C. albicans*. Njihovi rezultati (zona inhibicije od 10 mm kod Calxyła) dobiveni su većim koncentracijama kalcijevog hidroksida od one u komercijalnim preparatima.

*Streptococcus faecalis* pokazao je najveću otpornost prema djelovanju suspenzija kalcijevog hidroksida. Prema Byströmu (20) bakterija *Enterococcus faecalis* preživljava kod pH 11,5, ali ne i pH 12,5. Prva zona inhibicije rasta (2 mm) pojavila se kod koncentracije od  $3335,21 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3 \text{ Ca(OH)}_2$  i pH 12,83. Povećanjem koncentracije promjer zone inhibicije ostao je nepromijenjen.

Smatramo da bi razlika u dobivenim rezultatima mogla nastati kao posljedica upotrebe različitih hranilišta, te razlikama u koncentracijama ispitivanih preparata i u metodi rada.

In vivo, kao i u eksperimentalnim uvjetima, moguće je djelovanje puferskih komponenata. Stvaranje netopljivih spojeva (kalcijevog fosfata) u agaru oko testiranog materijala onemogućuje daljnju difuziju hidroksidnih iona (21).

S obzirom na vrijeme, maksimalni antimikrobni učinak postignut je za 24 sata i ostao je nepromijenjen i nakon 48 sati. Barkhordar i Kempler (22), za razliku, kod nekih preparata dobili su iste, kod nekih povećane vrijednosti nakon 24 i 48 sati, a kod jednog je nestvrdnjavajućeg preparata smanjen antimikrobni učinak nakon 48 sati.

### Zaključak

1. Minimalna koncentracija suspenzije kalcijevog hidroksida izaziva antimikrobni učinak na krutim hranilištima uz  $\text{pH } x = 12,80$ ,  $s = 0,0012$

- za *S. mutans*  $271,18 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3 \text{ Ca(OH)}_2$
- za *S. faecalis*  $3335,21 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3 \text{ Ca(OH)}_2$
- za *C. albicans*  $1023,20 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3 \text{ Ca(OH)}_2$

2. Zona inhibicije kod istog ispitivanog mikroorganizma rasla je s povećanjem koncentracije, usprkos podjednakim pH vrijednostima otopina od 12,80 do 12,83.

**THE ANTIMICROBIAL EFFICIENCY OF AQUEOUS SOLUTIONS OF CALCIUM HYDROXIDE ON STREPTOCOCCUS MUTANS, STREPTOCOCCUS FAECALIS AND CANDIDA ALBICANS, IN VITRO**

Adresa autora:  
Address for correspondence:

**Summary**

Calcium hydroxide preparations  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  are used as water solutions, putty, liner, cement or artificial material. The therapeutic effect of each medicaments depends on physical and chemical characteristic of additional components.

The aim of the paper is to research the sensitivity of *Streptococcus faecalis* and *Candida albicans* to different water solution concentrations of calcium hydroxide. As solid plates, Bacto-Mitis-Salivarius agar was used for *S. mutans*, Torlak blood agar for *S. faecalis* and Sabourand agar »Torlak« for *C. albicans*. The holes were drilled in solid plates and were filled by 0.2 ml of water solutions of  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .

Preparations, created as described were incubated aerobically at 37°C in the period of 48 hrs. Results were read after 24 as well as after 48 hrs.

The examined solutions of  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , revealed the highest antimicrobial effect after 24 hrs. The result remained unchanged even after 48 hrs. The inhibition of *S. mutans* growth on the solid plate occurred with the concentration of  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  solution from  $271,18 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$  and pH 12,76. The growth of *S. faecalis* at the solid plate was inhibited with the concentration of  $3335,21 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$  and pH 12,82. The inhibition of *C. albicans* growth on solid plate occurred with the concentration of  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  solution from  $1023,20 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$  and pH 12,84.

The difference in the sensitivity of the examined microorganisms at the same concentrations of  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  solution was observed.

Key words: Calcium hydroxide, Antimicrobial effect, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus faecalis*, *Candida albicans*

Božidar Pavelić  
Zavod za bolesti zuba  
Stomatološki fakultet u Zagrebu  
Gundulićeva 5  
41000 Zagreb  
Hrvatska

**Literatura**

- HASSELGREN G, OLSSON B, CVEK M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. *J Endodont* 1988; 14:125–127.
- Von HEINRICH R, KNEIST S. Antimikrobielle Wirkung von Kalziumhydroxid. *Stomatol DDR* 1988; 38:332–334.
- Von KNEIST S, HEINRICH R, KÜNZEL W. Fördert Kalziumhydroxid die überlebensfähigkeit antibiotisch aktiver Streptomyceten am harten Kavitätenboden. *Zahn Mund Kieferheilkd* 1988; 76:56–70.
- TAKASHIO M, OHNUKI T, OKAMI Y. The structure of ribocitrin and its structure activity relationship in the inhibition of dextransucrase of *Streptococcus mutans* E 49. *Agric Biol Chem* 1982; 46:2449–2456.
- De FREITAS JF. Characterisation and aqueous extraction of calcium hydroxide materials. *Aust Dent J* 1982; 27:352–356.
- McCOMB D. Comparison of physical properties of commercial calcium hydroxide lining cements. *J Am Dent Assoc* 1983; 107: 610–613.
- SCHRÖDER U. Effects of calcium hydroxide containing pulp capping agents on pulp cell migration, proliferation and differentiation. *J Dent Res* 1985; 64:541–548.

8. STAEHLE HJ, HOPPE W, PIOCH T. Experimentelle Studien über die Löslichkeit, die OH Ionen Abgabe die mechanische Belastbarkeit von Unterfüllungsmaterialien auf der Basis von Kunstharzen und Kalziumhydroxid. Dtsch Zahnärztl Z 1987; 42: 572–576.
9. STAEHLE HJ. Experimentelle Studien zur Diffusion von Wasserstoff, Hydroxyl und Kalziumionen durch das Dentin menschlicher Zähne. Dtsch Zahnärztl Z 1988; 43:155–159.
10. FISHER FJ, McCABE FJ. Calcium hydroxide base materials. An investigation into the relationship between chemical structure and antibacterial properties. Brit Dent J 1978; 144:341–344.
11. BÜSSMANN K, HOPPE W, STAEHLE HJ. Experimentelle Untersuchungen über die antimikrobielle Wirksamkeit verschiedener Unterfüllungsmaterialien. Dtsch Zahnärztl Z 1984; 39:725–731.
12. STAEHLE HJ, ZIEGLER A, HOPPE W. Experimentelle Untersuchungen über die OH Ionen Abgabe kalziumhydroxidhaltiger Präparate. Dtsch Zahnärztl Z 1984; 39:128–131.
13. STAEHLE HJ, PIOCH T. Die Alkalisierende Wirkung Kalziumhydroxidhaltiger Handelspräparate. Schweiz Monatsschr Zahnmed 1988; 98:1072–1077.
14. STAEHLE HK, PIOCH T, HOPPE W. The alkalizing properties of calcium hydroxide compounds. Endod Dent Traumatol 1989; 5:147–152.
15. FISHER FJ, SHORTALL AC. Setting calcium hydroxide base materials. Br Dent J 1984; 157:133–135
16. FISHER FJ. The effect of three proprietary lining materials on micro-organisms in carious dentine. Brit Dent J 1977; 143:231–235
17. STAEHLE HJ, PIOCH T. Antimikrobielle Wirksamkeit und alkalisierender Effekt verschiedener Calcium hydroxidpräparate. Dtsch Zahnärztl Z 1989; 44:344–348
18. STAEHLE HJ, PIOCH T. Zur alkalisierenden Wirkung von calciumhydroxidhaltigen Präparaten. Dtsch Zahnärztl Z 1988; 43:308–312.
19. Von KLAIBER B, GRÜNER W, BREDT W. Antimikrobielle Wirksamkeit von Wurzelfüllmaterialien, provisorischen Befestigungszementen und Unterfüllungs- bzw. Überkappungsmitteln. Dtsch Zahnärztl Z 1982; 37:448–451.
20. COHEN F, LASFARGUES JJ. Quantitative chemical study of root canal preparations with calcium hydroxide. Endod Dent Traumatol 1988; 4:108–113.
21. McCOMB D, ERICSON D. Antimicrobial action of new, proprietary lining Cements. J Dent Res 1987; 5:1025–1028.
22. BARKHORDAR RA, KEMPLER D. Antimicrobial activity of calcium hydroxide liners on Streptococcus sanguis and S. mutans. J Prosthet Dent 1989; 61:314–317.