

Ultrazvuková dezintegrace bakteriálního biofilmu

Petr Schovanec <petr.schovanec@tul.cz>, Petr Schovanec

Práce se zaměřuje na modifikaci ultrazvukového vlnění s proměnnou časovou smyčkou a frekvencí. V práci se popisuje metodika a zařízení s cílem dezintegrace bakteriálního biofilmu.

Klíčová slova: ultrazvuk, bakteriální biofilm

Úvod

Bakterie v suspenzi jsou často formovány do vloček, zatímco bakterie na povrchu vytvářejí biofilm. V obou případech jsou buňky obklopeny tzv. extracelulárními polymerními látkami, které zajišťují vysokou míru ochrany před chemickými nebo termálními účinky sterilace.

Mikroorganismy se postupem času stávají odolné vůči současným dezinfekčním technikám zahrnujícím biocidy, ultrafialové světlo, tepelné ošetření nebo dokonce i vůči antibiotikům.

Ultrazvuk je schopen dezintegrovat bakteriální vločky tj. biofilm a inaktivovat bakteriální buňky, a to prostřednictvím součinnosti řady fyzikálních, mechanických a chemických účinků vyplývajících z akustické kavitace, tj. (vysoký gradient tlaku v podobě rázové vlny a lokálního silového účinku).

Velká výhoda využití ultrazvuku spočívá v absenci dalších chemických látek, které je jinak nutno do systému přidávat. Jedná se například při čištění pitné vody, aplikace na lidské tělo aj. Povrch je sterilován fyzikálně mechanickým způsobem a při vhodném nastavení pracovních frekvencí a intenzit se jedná o velmi šetrnou metodu pro nanovláknenné nebo jinak citlivé povrchy.

Vhodným nastavením frekvence a energie ultrazvuku lze dosáhnout cílené aplikace léčiv, narušení stěn živých buněk nebo řízené eliminace bakterií [1,2].

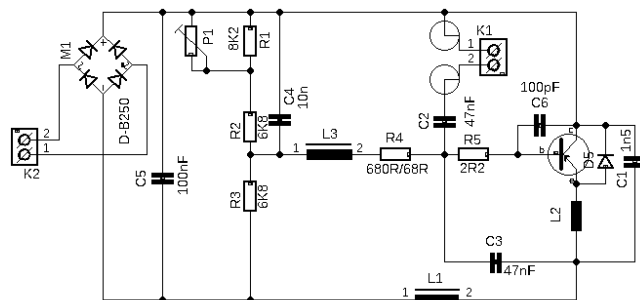
Aplikace ultrazvuku v biotechnologických aplikacích má potenciál pro využití jako například sterilace a čištění filtračních membrán, v anaerobních digestorech, při fermentaci atd. [3,4].

Metodika

Trend výzkumu směřuje k optimalizaci základních součástí ultrazvukového systému, tj. vývoj oscilátoru pro zdroj vlnění neboli aktuátoru, což může být membrána nebo v našem případě piezoelektrický prvek. Fyzikální podstatou jevu je vyvolání akustické vlny, která způsobí lokální nárůst rychlosti v kapalině tj.

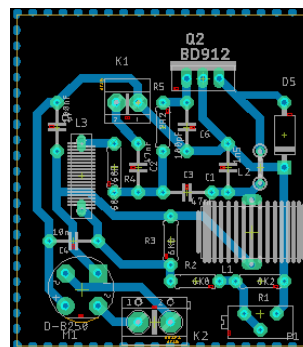
(gradient rychlosti), který je provázen lokální změnou tlaku, která se navenek projeví tvorbou kavitací bubliny. Bublina velmi rychle imploduje a kolabuje směrem k blízkému povrchu, tento efekt je provázen rázovou vlnou. Takto vyvolaný mechanický účinek na povrch dosahuje až 18kPa [5]. Jedná se o tlak dostatečně velký k rozrušení buněčných struktur. Ultrazvukové vlny pronikají do hlubších struktur, proto tento jev může probíhat uvnitř porézních, vláknenných materiálů.

Na obrázku 1 je vidět schematické zapojení oscilátoru a na obrázku 2 plošný spoj se součástkami.



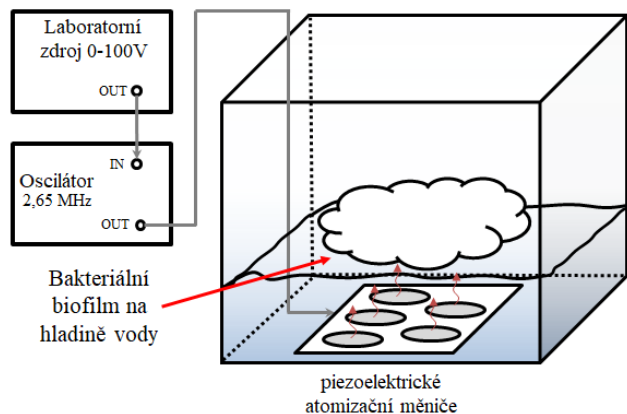
Obrázek 1: Schematické zapojení oscilátoru.

Oscilátor generuje signál o frekvenci 1,65 MHz. Tento generovaný signál z oscilátoru je poté přiveden k piezoelektrickým prvkům, které generují ultrazvukové vlny. Tyto generované vlny směřují ze dna nádoby přímo k předem definované výšce vodní hladiny, na které je umístěna bakteriální pěna z ČOV.



Obrázek 2: Plošný spoj se součástkami oscilátoru.

Sestavení celého experimentu se tedy skládá z laboratorního zdroje, oscilátoru a piezoelektrických atomizačních měničů, které jsou umístěny do nádoby s vodou a bakteriálním biofilmem. Sestava je uvedena na obrázku 3.

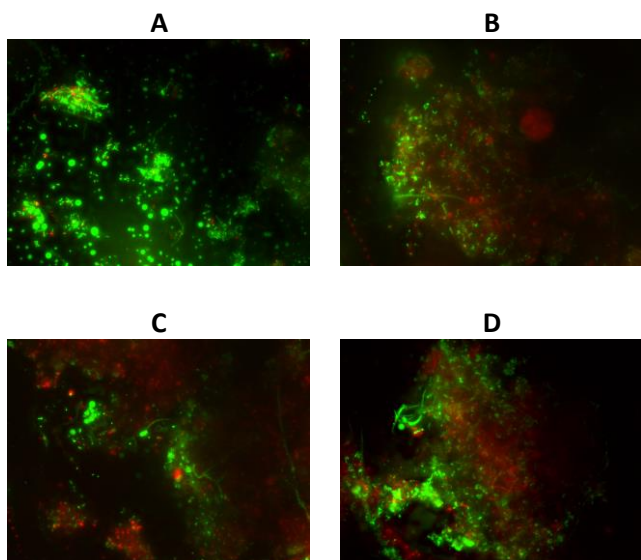


Obrázek 3: Schematické sestavení experimentu.

Výsledky a diskuze

Při působení signálu o frekvenci 1,65 MHz, tj. rezonanční frekvenci piezoelektrických měničů, byla zcela zásadní výška hladiny nad piezoelektrickými prvky. Jelikož atomizační proces probíhá při určitém výkonu v určité výšce, museli jsme dbát na správné nastavení poměru výkonu oscilátoru a výšky hladiny.

Na obrázku 4 jsou uvedeny snímky z mikroskopu pomocí metody Live/Dead, kde živé bakterie jsou zvýrazněny zeleně a mrtvé bakterie červeně. Na snímku A je vidět počáteční vzorek bez působení ultrazvuku. Na snímku B až D jsou zachyceny vzorky bakterií, které byly odebrány vždy po 1 minutě působení ultrazvuku, ale při různých výškách hladiny nad piezoelektrickými měniči.



Obrázek 4: Snímky z mikroskopu.

Vzorek B byl odebrán z hladiny o výšce 2 cm nad měniči, vzorek C z hladiny 3 cm a poslední vzorek D byl odebrán z hladiny 2 cm, ale s upraveným výkonem oscilátoru, tak aby atomizace neboli kavitační efekt zasahovala co nejvíce v bakteriálním biofilmu.

Závěr

Tento experiment nám ukázal, že bakteriální biofilm není snadné dezintegrovat pomocí více kusů menších piezoelektrických měničů o frekvencích v řádu Megahertzů. Jedním z důvodů je i fakt, že piezoelektrické měniče s rezonanční frekvencí v řádech MHz jsou vyrobeny s tolerancí 10 % a je zapotřebí pro každý jeden kus nastavit co nejpřesněji rezonanční frekvenci. Metoda Live/Dead nám ukázala, že největší vliv na dezintegraci pěny z ČOV mělo působení ultrazvuku u vzorku D. Následné úpravy v experimentu budou spočívat v úpravě oscilátoru, tak aby bylo možné experiment provozovat po delší dobu.

Poděkování

Tato práce byla podpořena z projektu Studentské grantové soutěže (SGS) na Technické univerzitě v Liberci v roce 2021.

Reference

- [1] IZADIFAR, Z., et al. *Mechanical and biological effects of ultrasound: A review of present knowledge*. *Ultrasound in Med. & Biol.*, 43 (6), 1085-1104, 2017. ISSN 0301-5629.
- [2] ASHOKKUMAR, M. *The characterization of acoustic cavitation bubbles*. *Ultrasonics Sonochemistry*. 18, 864-872, 2011. ISSN 1350-4177.
- [3] KHMELEV, V.N., et al. *Ultrasonic Device for Foam Destruction*. In 2007 8th Siberian Russian Workshop and Tutorial on Electron Devices and Materials, pp. 252–254., 2007.
- [4] LEONELLI, C., MASON, T.J. *Microwave and ultrasonic processing: Now a realistic option for industry*. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 49, 885–900., 2010.
- [5] HELLMAN, A.N., et al. *Biophysical response to pulsed laser microbeam-induced cell lysis and molecular delivery*. *J. Biophoton.* 1 (1), 24-35., 2008. ISSN 1864-0648.
- [6] PITT, W. G., & ROSS, S. A. (2003). *Ultrasound increases the rate of bacterial cell growth*. *Biotechnology progress*, 19(3), 1038–1044. <https://doi.org/10.1021/bp0340685>