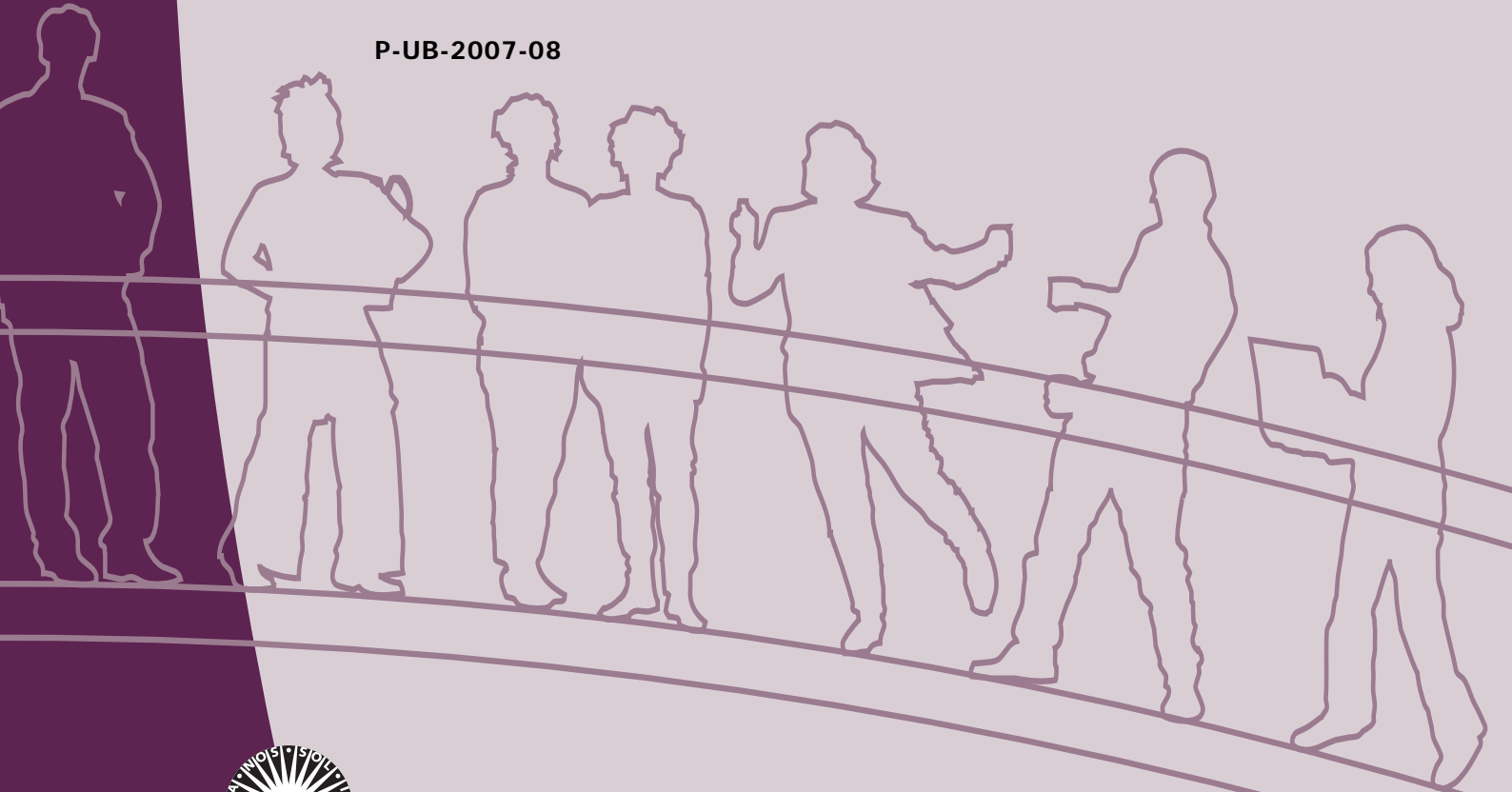


Wetenschapswinkel  
**Biologie**

# Ultrasoon geluid als sterilisatiemethode

Laurens Vehmeijer

P-UB-2007-08



Universiteit Utrecht

# **Ultrasoon geluid als sterilisatiemethode**

*Literatuuronderzoek naar de werking van sonicatie en cavitatie op micro-organismen en de toepassingsmogelijkheden in de industrie.*

**Laurens Vehmeijer**

*Wetenschapswinkel Biologie, Universiteit Utrecht  
Leerstoelgroep Microbiologie, Universiteit Utrecht*

*oktober 2007*

P-UB-2007-08

Wetenschapswinkels slaan een brug tussen maatschappij en wetenschap. Verbonden aan de universiteit geven zij advies en doen onderzoek.

### **Colofon**

Rapportnummer	P-UB-2007-08
ISBN	978-90-5209-161-7
Prijs	€ 5,-
Verschenen	oktober 2007
Druk	eerste
Titel	<b>Ultrasoon geluid als sterilisatiemethode</b>
Ondertitel	Literatuuronderzoek naar de werking van sonicatie en cavitatie op micro-organismen en de toepassingsmogelijkheden in de industrie.
Auteur	L.J.C. Vehmeijer
Begeleider	Dr. H. de Cock, Departement Biologie, leerstoelgroep Microbiologie, Universiteit Utrecht
Projectcoördinator	Ir. M.A. Vaal, Wetenschapswinkel Biologie, Universiteit Utrecht
Opdrachtgever	Inrada Group
Projectnummer	2007-008
Reproductie	Document Diensten Centrum Uithof
Uitgever	Wetenschapswinkel Biologie, Universiteit Utrecht Padualaan 8, 3584 CH Utrecht. tel. 030-253 7363 <a href="http://www.bio.uu.nl/wetenschapswinkel">www.bio.uu.nl/wetenschapswinkel</a>
Copyright	Het is niet toegestaan (gedeelten van) deze uitgave te vermenigvuldigen door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze dan ook. Overname van gedeelten van de tekst, mits met bronvermelding, is wel toegestaan. Toezending van een bewijsexemplaar wordt zeer op prijs gesteld.

# Inhoudsopgave

<b>Voorwoord</b>	<b>5</b>
<b>Samenvatting</b>	<b>7</b>
<b>1 Inleiding</b>	<b>9</b>
<b>2 Sonicatie en cavitatie</b>	<b>10</b>
2.1 <i>Wat is cavitatie?</i>	10
2.2 <i>Vier methodes om cavitatie op te wekken</i>	10
2.3 <i>Het werkingsmechanisme van akoestische cavitatie</i>	11
2.4 <i>Inertiële en non-inertiële cavitatie</i>	12
<b>3 Factoren van invloed op cavitatie</b>	<b>15</b>
3.1 <i>Temperatuur</i>	15
3.2 <i>Druk</i>	16
3.3 <i>Frequentie</i>	16
3.4 <i>Ultrasone intensiteit</i>	16
3.5 <i>Opgeloste gassen</i>	17
3.6 <i>Oplosmiddel</i>	17
3.7 <i>Duur van de behandeling</i>	17
<b>4 De effecten van cavitatie</b>	<b>19</b>
<b>5 Het effect van cavitatie en sonicatie op micro-organismen</b>	<b>22</b>
5.1 <i>Algemene opbouw van cellen en virussen</i>	22
5.2 <i>De verschillen tussen archaea, Gram-positieve en Gram-negatieve bacteriën.</i>	23
5.3 <i>Planten, schimmels en dieren</i>	24
5.4 <i>De algemene effecten van sonicatie en cavitatie op micro-organismen</i>	25
5.5 <i>De invloed op specifieke micro-organismen</i>	26
<b>6 Waarmee kan ultrasonicatie gecombineerd worden?</b>	<b>29</b>
<b>7 Discussie en conclusie</b>	<b>32</b>
<b>Literatuurlijst</b>	<b>34</b>



## **Voorwoord**

Dit rapport is geschreven in het kader van de bachelorcurcus 'Scriptiecurcus Biologie'. Opdrachtgever voor dit onderzoek was de heer drs. P. de Ruyter van de Inrada Group, een bedrijf dat zich onder andere met systemen voor procestechniek bezig houdt (zie [www.inrada.com](http://www.inrada.com)). De Inrada Group was geïnteresseerd in de vragen 'hoe veroorzaakt ultrasoon geluid cavitatie, waarom is dit dodelijk voor micro-organismen en welke factoren zijn hierbij van invloed?' Deze vraag is als opdracht bij de scriptiecurcus terecht gekomen en zodoende bij Dr. Hans de Cock van het Departement Biologie, leerstoel Microbiologie die het project inhoudelijk heeft begeleid en Ir. Manon Vaal van de Wetenschapswinkel Biologie die de procesbegeleiding deed.

Met dank aan Dr. Hans de Cock en Manon Vaal, voor de fantastische begeleiding bij een zeer interessant onderwerp.

Laurens Vehmeijer  
oktober 2007, Utrecht



## **Samenvatting**

Sterilisatie, het doden of inactiveren van bacteriën, virussen en andere micro-organismen, is een essentiële bezigheid in veel sectoren van de industrie, onderzoek en geneeskunde. Er wordt dan ook veel onderzoek gedaan naar nieuwe effectievere en efficiëntere methodes. Een mogelijke manier om micro-organismen te verzwakken of te doden is ultrasonatie. Dit is de naam die gegeven wordt aan het behandelen van een medium met ultrasoon geluid.

Geluid bestaat uit een longitudinale golf en het zorgt voor afwisselende compressie- en expansiefasen van het medium die op hun beurt ervoor kunnen zorgen dat er microscopische bellen ontstaan. Dit wordt cavitatie genoemd. De bellen die hierbij ontstaan worden zelf ook beïnvloed door de compressie en expansie en ze kunnen daardoor al of niet stabiel zijn. Non-inertiële cavitatie is het ontstaan van stabiele bellen, deze krimpen en groeien ongeveer evenveel gedurende compressie en expansie. De microbellen kunnen echter ook instabiel zijn, dit wordt inertiële cavitatie genoemd. Deze bellen imploderen vrij snel, waarbij er veel effecten ontstaan, zoals extreme verhogingen van druk en temperatuur.

Er is een aantal factoren van invloed op inertiële en non-inertiële cavitatie. Deze factoren beïnvloeden de drempel voor de vorming van bellen en de effecten die ze bij implosie veroorzaken. De meeste van deze factoren hebben invloed op beide, ze maken het bijvoorbeeld makkelijker voor bellen om te ontstaan maar zorgen ook voor minder extreme effecten.

Sonicatie en cavitatie brengen veel effecten teweeg: er kunnen zeer grote druk en temperatuur verhogingen, schokgolven, chemische reacties en stromingen in het medium optreden.

Sonicatie en cavitatie zijn zeer effectief in het bestrijden van micro-organismen en beschadigen micro-organismen dan ook op veel verschillende manieren. De belangrijkste effecten zijn echter drukverhogingen en mechanische stress. Deze kunnen de membranen van micro-organismen in stukken scheuren of permeabel maken, zodat stoffen makkelijk naar binnen en naar buiten diffunderen.

Ultrasonatie is zeer effectief als deze gecombineerd wordt met andere sterilisatiemethoden. Daarnaast zorgt de menging van het medium en de verstoring van membranen voor grotere effectiviteit van antibiotica en andere chemische middelen.





## Hoofdstuk 1

# Inleiding

Sterilisatie, het doden of inactiveren van bacteriën, virussen en andere micro-organismen, is nodig in veel sectoren van de industrie, onderzoek en geneeskunde. Hierbij worden al veel verschillende technieken gebruikt, zoals radioactieve straling, ultraviolet licht, chemische middelen, sterke verhitting en soms zelfs elektrische spanning. Er wordt echter nog steeds veel onderzoek gedaan naar verbeteringen van bestaande methoden en de ontwikkeling van nieuwe methoden, dit in verband met kosten en efficiëntie.

Een van deze methoden, sonicatie, is een vrij oude techniek die gebruikt wordt in onder andere de waterzuivering, de metaalindustrie en de medische industrie. Sonicatie, of specifieker, ultrasonicatie, is een methode waarbij geluidsgolven van een hoge frequentie, boven 18 kiloHertz, worden gebruikt om cellen en partikels te vernietigen. Hierbij wordt een ultrasone "probe" in een container met vloeistof geplaatst. De probe maakt snelle bewegingen waardoor er microscopisch kleine belletjes ontstaan omdat de dichtheid en de druk van de vloeistof gaan variëren door de geluidsgolf. De belletjes storten weer in en hierbij ontstaan er grote schokgolven. Dit hele proces van vorming, groei en ineenstorting van de belletjes door de actie van intense geluidsgolven wordt cavitatie genoemd. De ontstane schokgolven hebben een gigantisch hoge druk, oplopend tot enkele duizenden atmosfeer. De aanwezige cellen worden daardoor zwaar beschadigd of zelfs compleet vernietigd. Een aantal factoren is van invloed op dit proces.

De wetenschap die zich bezighoudt met de chemische effecten en invloeden op ultrasonicatie en cavitatie wordt de sonochemie genoemd. De interesse in dit vakgebied neemt toe, het blijkt namelijk dat ultrasoon geluid en cavitatie meer, en interessantere, effecten hebben dan oorspronkelijk gedacht.

Ultrasoon geluid kan op twee manieren worden gebruikt: sonicatie met golven met een lage amplitude en hoge frequentie en golven met een hoge amplitude en lage frequentie. Bij de lage amplitude golven wordt het effect van het medium op de golf gemeten dit kan bijvoorbeeld gebruikt worden in medische scanning en chemische analyse.

Bij ultrasonicatie met een hoge amplitude en lage frequentie gaat het om het effect van de golf op het medium, zoals cavitatie.

Het doel van dit literatuuronderzoek is te beschrijven hoe ultrasone sonicatie werkt en hoe het cavitatie teweeg brengt. De theorie achter deze processen en manieren om ze teweeg te brengen zullen beschreven worden. Er zal aandacht besteed worden aan de factoren die invloed hebben op deze processen, zoals, frequentie, amplitude, temperatuur, druk en de samenstelling van het medium. Het effect van sonicatie en cavitatie op verschillende micro-organismen zal onderzocht worden en er zal beschreven worden op welke manier deze processen gebruikt kunnen worden als methode voor het doden van micro-organismen, eventueel in combinatie met andere methodes. Ten slotte zal er ook aandacht besteed worden aan de mogelijke toepassingen van sonicatie en cavitatie.

## Hoofdstuk 2

# Sonicatie en cavitatie

### 2.1 Wat is cavitatie?

Cavitatie is een zeer basale term die gebruikt wordt om het gedrag van lege holtes en bellen in een vloeistof te beschrijven. Er wordt onderscheid gemaakt tussen twee vormen: inertiële en non-inertiële cavitatie. De resultaten van beide vormen van cavitatie zijn zeer divers en hier vallen verschillende mechanische, chemische en biologische effecten onder die later beschreven zullen worden.

### 2.2 Vier methodes om cavitatie op te wekken

In het algemeen zijn er vier verschillende typen cavitatie, elk met een eigen manier van opwekking.

- Optische cavitatie

Hierbij ontstaat cavitatie doordat de fotonen afkomstig van een lichtbron met een hoge intensiteit, bijvoorbeeld een laser, een medium plaatselijk verplaatsen. Hierdoor ontstaan er microscopische belletjes in de vloeistof.

- Partikel cavitatie

Als een geladen deeltje door een vloeistof beweegt laat het, voor een fractie van een seconde, ionen achter. Deze ionen zorgen voor het ontstaan van zeer grote potentiaalverschillen, die kunnen oplopen tot duizenden volts. Dit zorgt lokaal voor extreem hoge en snelle verhitting waardoor een deel van de vloeistof zal gaan koken in het voetspoor van het deeltje.

- Hydrodynamische cavitatie

Dit was de eerst ontdekte vorm van cavitatie en dit is, vaak ongewenst, de meest voorkomende vorm. Als er in een systeem vloeistofstroming optreedt ontstaan er meestal lokale snelheidsverschillen in de vloeistof. Deze snelheidsverschillen zorgen ook voor drukveranderingen en vooral versnelling van de waterstroom zorgt voor verlaging van de druk. Als de druk lager wordt dan de dampdruk van het medium ontstaan er miljoenen microscopische belletjes. Als de stroomsnelheid weer lager en dus de druk weer hoger wordt imploderen de belletjes weer. Het verschil in druk dat hydrodynamische cavitatie veroorzaakt, zorgt ook voor zeer sterke turbulentie, hetgeen effect heeft op de cavitatie en visa versa. Hydrodynamische cavitatie kan worden opgewekt door middel van vernauwingen in een stromend systeem, pompen en zelfs de schroeven van schepen, die vaak erdoor beschadigd raken.

- Akoestische cavitatie

Cavitatie kan ook worden opgewekt worden door ultrasonatie, de geluidsgolven zijn namelijk zogenaamde longitudinale golven en bestaan uit korte afwisselende periodes van compressie en

expansie. Deze veroorzaken drukverschillen in het medium hetgeen op zijn beurt cavitatie veroorzaakt. Hier zal later verder op ingegaan worden.

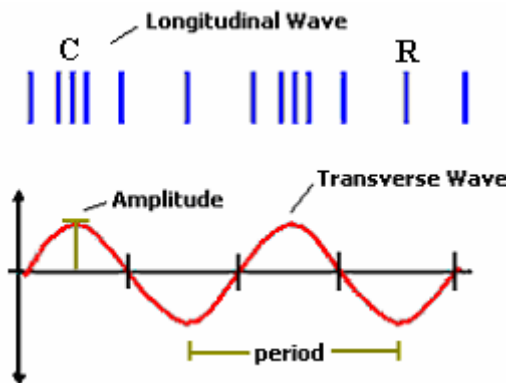
Over het algemeen wordt er in onderzoek en industrie de voorkeur gegeven aan de hydrodynamische en akoestische methoden van cavitatie aangezien deze makkelijker en goedkoper zijn toe te passen. Dit onderzoek gaat vooral in op akoestische cavitatie [Gogate, 2002] [Pond, 2007].

## 2.3 Het werkingsmechanisme van akoestische cavitatie

Geluid is een merkwaardig verschijnsel: het is geen echte materie of energievorm, in ieder geval niet zoals water, licht of elektromagnetische straling dat zijn. Geluid is meer een staat waarin een medium zich kan bevinden; het is in principe een verstoring van een medium bestaande uit mechanische energie die zich door de materie als een golf voortbeweegt. Geluidsgolven zijn dan ook mechanische golven, ze hebben een medium nodig om zich te propageren, in tegenstelling tot bijvoorbeeld elektromagnetische golven. Bij sonicatie beweegt het medium niet met de golf mee maar het vibreert wel.

Er wordt onderscheid gemaakt tussen twee typen golven: transversaal en longitudinaal. Bij transversale golven beweegt het medium loodrecht ten opzichte van de beweging van de golf. Een mooi voorbeeld hiervan is te zien als je een stuk draad in je hand laat bungelen en het laat trillen. De golf zal verticaal bewegen maar het "medium" horizontaal.

Longitudinale golven daarentegen laten het medium in de voortplantingsrichting van de golf bewegen, deeltjes bewegen dus parallel aan de golf. Door het op-en-neer bewegen van de deeltjes ontstaan er plekken waarin het medium uit elkaar wordt getrokken en plekken waar het wordt samengedrukt. De fases van de golf waarin dit zich voordoet worden respectievelijk de rarefactie (R) en de compressie (C) fases genoemd. Dit is goed te zien in figuur 2.1 [Henderson, 2007] [Mason, 2007].



**Figuur 2.1** Longitudinale en transversale golven [Moy, 2007].

Geluid bestaat uit longitudinale golven die de moleculen in het medium waarin ze zich voortbewegen beïnvloeden, zelf bewegen de geluidsgolven het medium niet, maar zorgen wel voor trillingen van de moleculen. In figuur 2.2 is het goed te zien hoe een stemvork lucht laat bewegen in een longitudinale golf.

Bij ultrasoon geluid treden deze fases ook op, en vooral bij hoge intensiteit en lage frequentie van het ultrageluid hebben de golven drastisch effect op het medium. Gedurende de rarefactie en compressie fases treden in het medium drukveranderingen op, respectievelijk een verlaging en verhoging van de druk.



**Figuur 2.2** Een stemvork veroorzaakt een longitudinale geluidsgolf in een buis, hier zijn de compressie en rarefactie fases van de lucht duidelijk te zien [Henderson, 2007].

Als de intensiteit van het ultrageluid hoog genoeg is zullen er microscopische holtes in de vloeistof ontstaan wanneer de longitudinale golven zich door een vloeibaar medium voortbewegen. Dit gebeurt doordat de negatieve druk groter wordt dan de treksterkte van het medium. Deze treksterkte is de weerstand dat een materiaal biedt tegen vervorming en hangt natuurlijk af van het type en samenstelling van het medium. Deze holtes ontstaan op zogenaamde nucleation sites, dit zijn "zwakke plekken" in de vloeistof zoals gasophoppingen, al bestaande belletjes, opgeloste deeltjes, krasjes in de container en dergelijke. Deze zwakke plekken zijn vrijwel altijd aanwezig in vloeistof, het is bijna onmogelijk om water volledig te zuiveren. De microbellen ontstaan op deze plekken en blijken dan, ten opzicht van de vloeistof, ook twee tot drie keer grotere concentratie gas te bevatten [Lepoint en Mullie, 1994].

Dit proces, het ontstaan van microscopische belletjes wordt cavitatie genoemd [Gogate, 2002] [Leighton, 2007] [Mason, 2007] [Suslick, 1994] [Thompson en Doraiswamy, 1999].

## 2.4 Inertiële en non-inertiële cavitatie

Als de microscopische bellen eenmaal ontstaan zijn, worden ze nog steeds beïnvloed door het ultrageluid; de bellen zullen de energie van de ultrasonische golven absorberen en groeien. Vooral hoge intensiteit ultrageluid heeft veel effect op de groei van de belletjes. Hierbij wordt onderscheid gemaakt tussen inertiële en non-inertiële, of, respectievelijk, tussen tijdelijk en stabiele bellen. Inertiële cavitatie is het proces van het ontstaan, groeien en imploderen van microscopische bellen en holtes gedurende zeer korte tijdsperiodes. Hierbij komen zeer grote hoeveelheden energie vrij, zoals extreem grote veranderingen in temperatuur en druk.

Onder non-inertiële cavitatie wordt een proces verstaan waarbij een bel of holte in het medium gedwongen wordt te oscilleren onder invloed van ultrasonatie. Hierbij is de intensiteit van het ultrasoon geluid niet groot genoeg om de bellen te laten imploderen maar wel groot genoeg om ze in stand te houden.

### Non-inertiële cavitatie

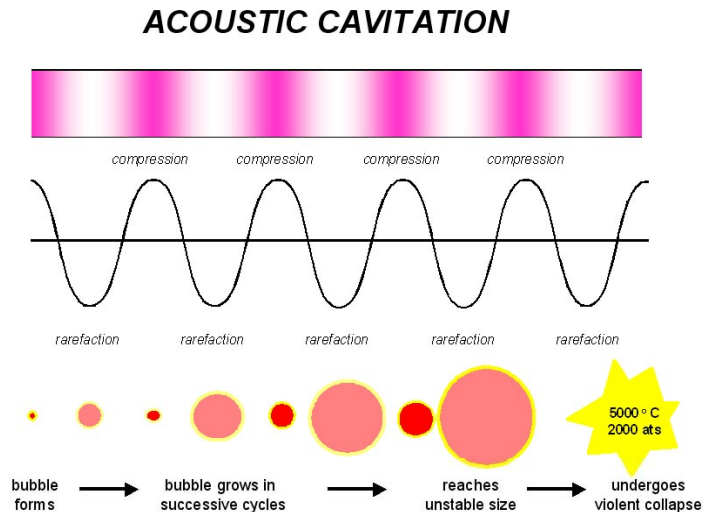
Bij non-inertiële cavitatie ontstaan er stabiele bellen die gedurende meerdere compressie en rarefactie cycli blijven bestaan doordat ze onder invloed van ultrasonatie oscilleren rond een gemiddelde radius zonder ineen te storten. Deze situatie doet zich voor als de groei gedurende de rarefactie ongeveer even groot is als de krimp tijdens compressie. Dit evenwicht kan alleen optreden als de frequentie van het ultrageluid gelijk is aan de frequentie waarmee de microscopische belletjes resoneren aan de sonicatie, dit wordt dan ook wel resonantie cavitatie genoemd. Stabiele bellen zorgen voor een hogere opbrengst van chemische reacties die gebonden zijn aan cavitatie en andere effecten. Het evenwicht dat nodig is voor stabiele cavitatie kan bereikt worden door het aanpassen van de frequentie, temperatuur, dichtheid, oppervlaktespanning van het medium of andere factoren die van invloed zijn op cavitatie [Leighton, 2007] [Thompson en Doraiswamy, 1999].

Hoewel non-inertiële cavitatie vaak minder extreme resultaten oplevert dan inertiële cavitatie heeft het een ander effect: het vibreren van microscopische belletjes bij non-inertiële cavitatie heeft namelijk een bijkomend resultaat. Het "oppervlak" van de bel, de interface tussen het medium en de inhoud van de bel, gedraagt zich als een vibrerend membraan onder sonicatie en zal een vloeistofstroom rond de bel veroorzaken. Dit proces wordt

akoestische microstroming genoemd en hier zal later verder op in gegaan worden [Brennen, 1995] [Davidson en Riley, 1971] [Hui Liu et al., 2003].

### Inertiële cavitatie

Door ultrasonatie kunnen er behalve stabiele ook tijdelijke bellen ontstaan, deze zullen gedurende enkele cycli zeer snel groeien, tot vele malen de originele grootte, en uiteindelijk imploderen, waarbij grote hoeveelheden energie vrijkomen. Dit wordt Inertiële cavitatie genoemd en het ontstaat meestal uit non-inertiële cavitatie [Leighton, 2007] [Thompson en Doraiswamy, 1999]. Figuur 2.3 geeft een schematische afbeelding van het proces van Inertiële cavitatie.



**Figuur 2.3** Een schematische weergave van akoestische non-inertiële cavitatie [Brennen, 1995].

De overgangsdrempel van inertiële naar non-inertiële cavitatie is afhankelijk van een paar factoren: de amplitude en frequentie van de ultrasonatie en de grootte van de, al bestaande, bel. Door deze specifieke parameters (en het feit dat een geluidsveld vrijwel nooit homogeen is) is het dan ook praktisch onmogelijk om alleen inertiële cavitatie op te wekken; er ontstaan altijd wel een aantal stabiele bellen [Leighton, 2007].

Een van de genoemde factoren is de grootte van de bel, deze moet dan ook binnen een bepaald bereik vallen. Dit is duidelijk te zien in figuur 2.4 waar de inertiële cavitatiegrens is uitgedrukt in de maximum negatieve druk in de rarefactie fase ten opzichte van de originele radius bij verschillende frequenties. Als een bel tussen de aangegeven lijnen zit zal er inertiële cavitatie optreden. Hoe hoger de frequentie hoe smaller de kritische "size range" van de bellen die inertiële cavitatie veroorzaken, ofwel hoe hoger de drempel voor tijdelijke bellen. Als de radius dus voor elke gegeven frequentie binnen een bepaald bereik valt zal er inertiële cavitatie optreden, in de grafiek is dit geïllustreerd voor een frequentie van 10 MHz en een maximum negatieve druk van 1.5 MPa [Leighton, 2007].

De grenzen waarbinnen de initiële grootte van de bel moet vallen om te imploderen zijn gebonden aan het feit dat inertiële cavitatie bestaat uit snelle, explosieve groei en een bijna even snelle implosie. Als de bel te klein is zal de oppervlaktespanning van het "membraan" de groei tegengaan doordat deze spanning omgekeerd evenredig is aan de grootte van de bel; de oppervlaktespanning zal te snel stijgen bij compressie van de bel [Leighton, 2007].

Als de bel echter te groot is groeit deze wel maar de groei is relatief veel kleiner dan die van bellen die wel binnen de grenzen vallen. Te grote bellen zullen dan ook niet genoeg energie opwekken als deze ineens stort, de implosie zal geen spectaculaire effecten hebben [Leighton, 2007].



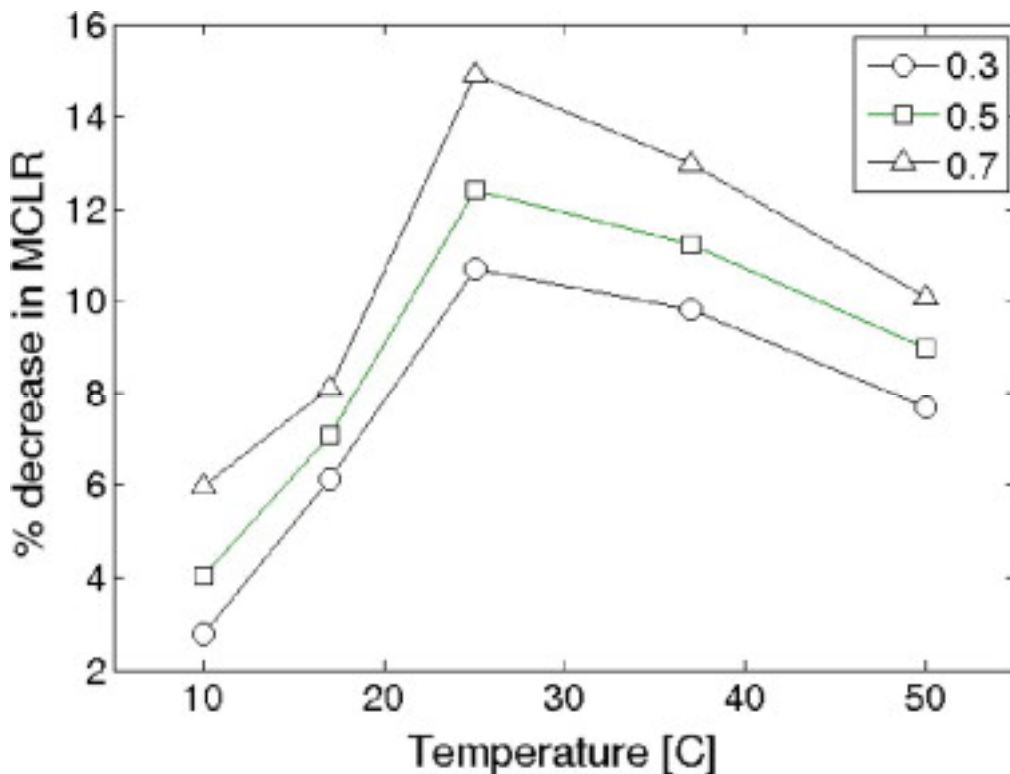
## Hoofdstuk 3

## Factoren van invloed op cavitatie

Het medium en diverse chemische en fysische factoren binnen het systeem zijn van grote invloed op de intensiteit van de cavitatie en dus ook op de resultaten ervan. De belangrijkste factoren worden hier besproken.

### 3.1 Temperatuur

Een verhoging in de temperatuur van het medium zal ervoor zorgen dat de cavitatie minder wordt. Dit komt doordat bij een hogere temperatuur de vloeistof makkelijker verdampt waardoor de bellen, die wel makkelijker worden gevormd, ook meer damp bevatten. Deze damp zal, zoals al eerder besproken, energie gedurende de implosie opvangen en dus deze milder maken door de compressie op te vangen door het samendrukken van de gassen. Er zal dus voor veel toepassingen een optimum temperatuur gevonden moeten worden, waarbij cavitatie makkelijk genoeg optreedt maar de implosie toch genoeg effect heeft [Thompson en Doraiswamy, 1999].



**Figuur 3.1** Het percentage gebroken deeltjes gedurende cavitatie bij verschillende temperaturen en vermogens (in Watt). De drie lijnen geven drie verschillende amplitudes weer. 0.3 komt overeen met 150 Watt, 0,5 met 250 en 0,7 met 350 Watt [Raman en Abbas, 2007].



Figuur 3.1 laat het effect van temperatuur op het breken van deeltjes duidelijk zien, hier is het effect van temperatuur op de breking van anorganische aluminium oxide deeltjes bij verschillende amplitudes. De optimum temperatuur blijkt hier voor alle amplitudes tussen de 25 en 37° Celsius [Raman en Abbas, 2007]

### **3.2 Druk**

De druk op het medium heeft invloed op de sonochemische effecten van cavitatie doordat een verhoging van de druk de dampdruk verlaagt en de kracht achter de implosie verhoogt. Een lagere dampdruk verhoogt de intensiteit van de implosie, tot een maximum. Een te hoge druk zorgt ervoor dat de drempel voor cavitatie te hoog komt te liggen omdat de ultrasonatie te hoge tegenwerkende krachten moet overwinnen [Thompson en Doraiswamy, 1999].

### **3.3 Frequentie**

De frequentie, en dus ook golflengte, is een van de belangrijkste factoren in akoestische cavitatie omdat dit de grootte en groei van de bel bepaalt. De frequentie bepaalt de duur van de compressie en rarefactie fases en dus de snelheid en intensiteit van de compressie en expansie van het medium, wat de oorzaak is van de cavitatie.

Als de frequentie te hoog is treedt er minder cavitatie op doordat de rarefactie fase de negatieve druk niet lang duurt of intensief genoeg kan produceren om cavitatie te initiëren of onderhouden. Daarnaast is de compressie fase zo kort dat de krimp van de bel het niet bij kan houden.

Lagere frequenties veroorzaken daarom intensere implosies en daardoor hogere temperatuur- en drukverschillen. De ideale frequentie lijkt wat dat betreft tussen de 20 en 50 kHz te liggen.

Hogere frequenties hebben echter ook een gewenst effect, hoe hoger de frequentie hoe kleiner de bellen worden en hoe korter ze blijven bestaan. Hierdoor ontstaan er meer radicalen, zoals beschreven in hoofdstuk 4. De grotere hoeveelheid en het kortere leven van de bellen bevordert dit doordat er meer radicalen ontstaan en de bel ineens stort voordat de radicalen kunnen reageren met andere stoffen [Gogate, 2002] [Thompson en Doraiswamy, 1999]. Zoals altijd moet er ook hier een optimum gevonden worden dat afhangt van de applicatie van de cavitatie.

### **3.4 Ultrasonische intensiteit**

Men verkeert vaak in de veronderstelling dat meer ruwe kracht effectiever werkt, dit blijkt echter niet zo te zijn bij cavitatie. De ultrasonische intensiteit wordt meestal gedefinieerd als de elektrische output van de generator ten opzichte van de oppervlakte van het gebied waar het op toegepast wordt.

De omzetting van elektrische naar ultrasonische energie gebeurt door een oscillator, een object dat de golven in het medium veroorzaakt, een soort ultrasonische roerspatel. Deze omzetting van energie is ten eerste niet honderd procent, de efficiëntie hangt af van de mate van cavitatie. Ten tweede blijkt het dat verhoging van het ultrasonische vermogen weliswaar meer cavitatie veroorzaakt maar de efficiëntie wordt relatief veel kleiner, tot op het punt dat verdere verhoging negatief gaat werken. Dit komt doordat er relatief zeer veel cavitatie optreedt rond de oscillator en deze grote concentratie van microbellen absorbeert vrijwel alle ultrasonische energie [Gogate, 2002] [Thompson en Doraiswamy, 1999].

De optimale intensiteit lijkt te liggen bij 1.2 Watt per vierkante centimeter, meer of minder vermogen verlaagt de sonochemische activiteit. Dit, nogal lage, maximum kan deels vermeden worden door niet het vermogen maar de oppervlakte aan te passen. De intensiteit is, zoals besproken, het vermogen ten opzichte van het oppervlak, dus als het oppervlak groter wordt kan het vermogen weer verhoogd worden. Hoe uniformer de optimum intensiteit verspreid wordt hoe meer cavitatie [Gogate, 2002].

### **3.5 Opgeloste gassen**

Zoals eerder besproken dienen gasvervuilingen in het medium als nucleatie sites voor cavitatie, deze zijn essentieel voor de reactie. Het blijkt dan ook dat hoe langer er ultrasonatie op het medium wordt uitgevoerd hoe minder cavitatie er zal gaan optreden doordat de gassen uit de vloeistof verwijderd worden door de implosies. Hoe beter oplosbaar het gas, hoe minder extreem de cavitationele effecten doordat de gasbellen weer opgelost zullen worden voordat er implosie kan plaatsvinden. Als deze gassen niet snel opgelost worden, zullen de bellen teveel groeien doordat er teveel gas de bel in zal komen en naar het oppervlak gaan drijven.

De hittegeleidbaarheid van het gas is belangrijk omdat, ondanks het feit dat het proces adiabatisch is, er tijdens de implosie een kleine hoeveelheid hitte aan het medium afgegeven zal worden.

Ten slotte is de samenstelling van de opgeloste gassen natuurlijk belangrijk als substraten voor reacties die beïnvloed worden door de cavitatie [Thompson en Doraiswamy, 1999].

### **3.6 Oplosmiddel**

Het blijkt zo te zijn dat cavitatie makkelijker optreedt bij oplosmiddelen die een hoge dampdruk, lage viscositeit en lage oppervlaktespanning veroorzaken. De intensiteit van de cavitatie gaat daar juist door omlaag; lagere dampdruk, hogere viscositeit en hogere oppervlaktespanning vergroten de cavitationele effecten [Thompson en Doraiswamy, 1999].

Dit effect is te beredeneren uit de eerdere bespreking van inertieële en non-inertieële cavitatie: het omslagpunt van groei naar implosie van non-inertieële bellen wordt bepaald door de dampdruk van het medium. Als deze hoger wordt zal het langer duren voordat de bel instort, er ontstaat dus wel meer cavitatie, maar het effect van de ineenstorting is niet echt spectaculair doordat er niet genoeg energie wordt opgewekt.

Een lage oppervlaktespanning zorgt ervoor dat kleine bellen makkelijker groeien, de oppervlaktespanning is namelijk een van de belangrijkste tegenwerkende krachten bij deze grootte. Een te lage spanning maakt de bellen echter weer te groot. De verlaging van viscositeit maakt het medium weliswaar makkelijker manipuleerbaar maar weer is de grootte van de bellen een probleem en tevens zal een lagere viscositeit minder spectaculaire drukverschillen creëren doordat de bellen te snel weer opgenomen worden.

### **3.7 Duur van de behandeling**

Het is duidelijk dat hoe langer het medium onder invloed van ultrasonatie is hoe meer cavitatie er de kans krijgt op te treden; een langere behandeling zorgt voor meer chemische reacties. Het blijkt echter, zoals al besproken bij het effect van de opgeloste gassen, dat cavitatie steeds minder optreedt bij langere sonatie doordat het gebrek

aan gassen de nucleatie bemoeilijkt. Er is geen maximum of optimum duur van de behandeling maar na enige tijd is de mate van cavitatie zodanig gedaald dat het vrijwel geen effect meer heeft [Thompson en Doraiswamy, 1999].

## Hoofdstuk 4

# De effecten van cavitatie

Zowel de intense energieën die vrijkomen bij de implosie als andere elementen van cavitatie kunnen sterke effecten hebben op het medium en de inhoud daarvan.

Doordat er bij cavitatie vaak groepen van bellen ontstaan, ook wel cavitatiewolken genoemd, hebben de microbellen ook invloed op elkaar. De functionele eenheid van cavitatie-effecten is dan ook niet de individuele bel maar de cavitatiewolk in zijn geheel. Helaas is er tot op heden vrijwel alleen nog aandacht besteed aan effecten van individuele bellen. De belangrijkste resultaten van cavitatie op het medium en de inhoud daarvan zullen hier beschreven worden [Lepoint en Mullie, 1994].

### **Drukverandering**

De implosie van non-inertiële bellen gaat gepaard met gigantische drukverhogingen. Dit effect is eigenlijk zeer simpel; de bellen imploderen zo snel dat het gas geen tijd heeft terug te gaan en wordt daardoor zeer snel samengeperst. De druk kan hierbij oplopen tot 500 atmosfeer, de helft van de druk op het diepste punt in de oceaan! Deze drukverhoging is dan ook de oorzaak van de verhitting en het ontstaan van schokgolven.

### **Schokgolven**

De implosie van de microbellen en de druk die daarbij ontstaat oefenen zelf ook kracht uit op de vloeistof. Deze krachten, eerst inwaarts gericht gedurende implosie en daarna naar buiten gericht gedurende de "terugkaatsing" na de implosie, bewegen de vloeistof met zich mee in een longitudinale golfbeweging. Deze golf, of beter gezegd, schokgolf, kan lokaal zeer grote snelheden bereiken en veroorzaken op zichzelf ook weer, al dan wel kleinere, druk en temperatuur verschillen. Daarnaast zorgen de schokgolven ook voor botsing van objecten in de vloeistof en zeer grote schuifspanningen. Deze schuifspanning is een spanning die materialen vervormt parallel aan de richting van de kracht. Deze schuifspanning is zeer schadelijk voor vaste structuren in de vloeistof en vooral microscopische structuren, zoals celwanden, membranen en genomisch materiaal (DNA), zijn hier gevoelig voor, dit zal in verder detail worden besproken in hoofdstuk 5 [Gogate, 2002] [Pond, 2007].

### **Cavitatiegeluid**

Vrijwel elke verandering in een medium - vloeistof, lucht of vaste stoffen - creëert een geluid, zoals te zien, of horen, door bijvoorbeeld tegen een metalen buis te slaan of het ruizen van de wind. Dit is ook het geval bij cavitatie, de groei, oscillatie en implosie van de bellen door ultrageluid maakt zelf ook geluid, zoals te zien bij het onderdeel schokgolven. De bellen zelf zorgen dus ook voor sonicatie van het medium. Natuurlijk haalt dit het niet bij het ultrasonische geluid maar het zorgt wel voor interferentiepatronen, hetgeen invloed heeft op de cavitatie zelf.

### **Propagatie van ultrageluid**

De bellen die ontstaan uit cavitatie hebben ook invloed op de propagatie van de golven die de cavitatie zelf veroorzaken. De bellen nemen, zoals al besproken in hoofdstuk 3, een groot deel van de ultrasonische energie op, vooral

in de buurt van de oscillator. De hoeveelheid absorptie wordt bepaald door de intensiteit, als deze hoger dan 1.2 Watt per vierkante centimeter zal de cavitatie in de rest van het medium omlaag gaan. Dit kan vermeden worden door de sonicatie uniformer toe te passen [Gogate, 2002] [Thompson en Doraiswamy, 1999].

### **Verhitting**

Het blijkt dat de krimp van de microbellen adiabatisch is, maar toch speelt warmte een zeer belangrijke rol gedurende het laatste gedeelte van de implosie. Gassen en waterdamp in de bel worden dan in een extreem korte tijd met een zodanige kracht ineengedrukt dat de temperatuur kan oplopen tot een maximum tot rond de 5000 K (Kelvin) in het centrum van de bel, 3500 K aan het oppervlak en 2100 K in de vloeistof dicht om de bel [Gogate, 2002]. Deze temperaturen zijn zeer lokaal en van korte duur; het blijkt dat na 2 microseconden de oppervlak temperatuur al zakt tot 300 K. Deze verhitting en koeling is zo kort dat het gemiddeld een snelheid van 10 miljard Kelvin per seconde bereikt.

Deze korte en lokale temperatuurverhogingen worden ook wel "hot spots" genoemd en sommige onderzoekers zien dit als een van de belangrijkste oorzaken van sonochemische reacties. Anderen zijn het hier niet mee eens; de temperatuurverhoging is wel zeer hoog maar de hot spot is zo klein dat de hitte snel verloren gaat [Brennen, 1995] [Thompson en Doraiswamy, 1999].

### **Elektrische stroom**

Elk contactoppervlak tussen vloeistof en gas vertoont een lichte elektrochemische gradiënt door de aanwezigheid van ionen en dipolen in de vloeistof. Vooral de dipolen hebben de neiging om zich naar het contactoppervlak te oriënteren en ze vormen een dichte, maar meestal dunne, laag om het oppervlak. Dit is ook het geval bij cavitatie; de microbellen die hier gevormd worden hebben ook deze elektrische lading, bij implosie ontstaan er elektrische pulsen die kunnen oplopen tot enkele honderden microvolts [Mason, 2007].

### **Radicaalvorming**

De gigantische verhitting en samendrukking van gassen en waterdamp zorgt voor het breken van watermoleculen ( $H_2O$ ) en het daaruit ontstaan van hydroxyl radicalen ( $OH^\cdot$ ) en waterstof atomen ( $H^\cdot$ ). Dit zijn zogenaamde radicalen; moleculen en atomen met ongepaarde elektronen en dus een "open" elektronenschil, ze vertonen dan ook een hoge reactiviteit en hebben een korte levensduur.

Gedurende de snelle koeling na de implosie reageren de radicalen snel terug naar waterstofperoxide ( $H_2O_2$ ) en waterstof moleculen ( $H_2$ ). Als er andere stoffen in het medium aanwezig zijn, zoals organische moleculen, kunnen deze reageren of onderlinge reacties beïnvloed worden door deze moleculen [Crowell, 2007] [Gogate, 2002].

### **Sonoluminescentie**

Als er cavitatie optreedt in een medium kan het zwak licht gaan geven, sonoluminescentie genoemd. Hoewel dit effect geen direct praktische toepassingen heeft is het wel een interessant resultaat. Er zijn verschillende theorieën over hoe dit proces eigenlijk te werk gaat. Sommige onderzoekers beweren dat de recombinatie van door cavitatie gegenereerde radicalen de oorzaak is terwijl andere het effect toewijzen aan hitte, wat chemoluminescentie zou veroorzaken [Brennen, 1995] [Matula, 1999] [Thompson en Doraiswamy, 1999].

### **Organisch chemische reacties**

Ultrasoon geluid en cavitatie hebben invloed op veel organisch chemische reacties, deze kunnen geïnitieerd, geremd, versneld of zelfs een hele andere route ingestuurd worden. Dit resultaat van sonicatie is min of meer een effect van andere effecten, vooral radicaalvorming, drukverhogingen, verhitting, menging en de elektrische effecten zijn hierbij van belang [Thompson en Doraiswamy, 1999].

### **Erosie**

Wanneer er cavitatie optreedt in de nabijheid van het oppervlak van een vast object in vloeistof kan er erosie optreden. De aanwezigheid van dit object verstoort namelijk de normale, symmetrische en sferische implosies. De resulterende implosie is asymmetrisch en er ontstaat een waterstraal gericht op het vaste oppervlak, waarbij de snelheid van de waterstraal kan oplopen tot 400 kilometer per uur. Dit is te zien in figuur 4.1 waar er een duidelijke straal te zien is. Deze waterstraal, gecombineerd met de hitte, druk en schokgolven van cavitatie zorgen voor erosie bij deze vaste objecten door een scala aan mechanische krachten, chemische reacties en temperatuurveranderingen. Deze erosie is dan ook een groot probleem in bijvoorbeeld de scheepvaart, waar de schroeven van het schip hydrodynamische cavitatie veroorzaken en zichzelf daardoor zwaar beschadigen [Gogate, 2002].



**Figuur 4.1** Waterstraal in microbel bij vast oppervlak [Gogate, 2002].

### **Microstroming**

Inertiële cavitatie veroorzaakt microstroming. Het oscilleren van de stabiele bellen en, als deze aanwezig zijn andere objecten zoals celmembranen, hangt af van de frequentie waarmee de bel resonanceert met de sonicatie. De wrijving van het contactoppervlak tussen het gas en het medium in de bel door de trilling veroorzaakt kleine, relatief sterke, vloeistofstromen wat dan ook cavitatie microstroming of akoestische microstroming genoemd wordt [Davidson en Riley, 1971] [Hui Liu et al., 2003].

### **Menging**

Als ultrageluid wordt toegepast op een medium dat bestaat uit twee in elkaar onoplosbare vloeistoffen, zoals olie en water, kan het deze vloeistoffen mengen en een emulsie creëren. Dit gebeurt doordat de schokgolven van de cavitatie en de compressie en expansie van de vloeistof druppels van de ene vloeistof in de andere brengt. Deze druppels, van bijvoorbeeld olie in water, worden dan alsnog opgebroken door de compressie en rarefactie, zodat er alsmear kleinere druppels ontstaan en er een emulsie tot stand komt. Daarnaast worden stoffen meer homogeen verspreid en aggregaten van vast materiaal, zoals slib, verbroken en gemixt met het medium. Deze menging bevordert natuurlijk chemische reacties doordat het contactoppervlak groter wordt [Gogate, 2002].

## Hoofdstuk 5

# Het effect van cavitatie en sonicatie op micro-organismen

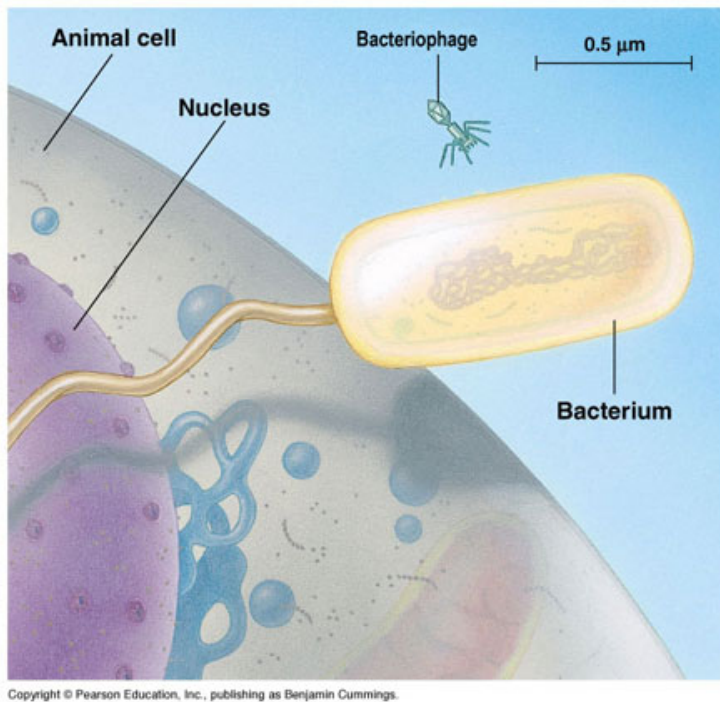
Micro-organismen zijn, zoals de naam al suggereert, organismen die microscopisch klein zijn, dat wil zeggen, ze zijn te klein om met het blote oog te zien. Hier vallen de cellen van bacteriën, schimmels, dieren en planten onder, maar virussen niet. Deze worden namelijk niet als levend beschouwd. In dit onderzoek zullen virussen wel als micro-organismen beschouwd worden.

Micro-organismen zijn eencellige organismen, met enkele uitzonderingen, en komen vrijwel overal op aarde voor. De algemene opbouw van en verschillen tussen virussen, pro- en eukaryotische cellen zullen eerst beschreven worden, vervolgens zal worden ingegaan op de verschillen tussen Archaea, Gram-positieve en Gram-negatieve bacteriën, de verschillen tussen plantaardige, dierlijke en schimmelcellen en tot slot zullen de effecten van sonicatie en cavitatie op micro-organismen beschreven worden [Campbell, Reese, 2004].

### 5.1 Algemene opbouw van cellen en virussen

Alle echte organismen op aarde kunnen verdeeld worden in bacteriën, archaea en eukaryoten. Zoals al eerder genoemd vallen virussen daarbuiten, het zijn namelijk geen organismen. De bacteriën en archaea zijn prokaryoten, terwijl alle andere cellen eukaryoten zijn. Prokaryotisch betekent letterlijk "voor de kern" terwijl eukaryotisch "echte kern" betekent, deze termen beschrijven letterlijk het verschil tussen de twee. Het DNA van eukaryotische cellen is namelijk verzameld in een organel, een soort orgaan in de cel, genaamd een celkern, hierin bevindt zich het hele, en zeer complexe, genoom van de cel. Dit organel beschermt het genoom tegen allerlei gevaren en is dan ook nodig voor een genoom dat zo groot is. Prokaryotische cellen hebben dit orgaan echter niet, deze cellen zijn veel kleiner en simpeler dan eukaryotische cellen, zoals te zien in figuur 5.1. Prokaryoten hebben zelfs helemaal geen organellen, en ze zijn dan ook veel kleiner en minder complex dan eukaryoten. Prokaryoten zijn niet als meercellig organisme opgebouwd, in tegenstelling tot veel eukaryoten, maar prokaryoten planten zich wel veel sneller voort en kunnen makkelijk onderling DNA uitwisselen. Vooral deze laatste twee eigenschappen maken ze gevaarlijk als ziekteverwekkers. Het is dan ook niet zo vreemd dat prokaryoten de meest voorkomende levensvormen op aarde zijn en familieleden hebben in bijna elke niche in de ecologie. Eukaryoten komen weliswaar minder voor, maar zijn veel complexer en vullen niches die de prokaryoten niet kunnen bereiken. Planten, dieren, schimmels en zelfs amoeben zijn eukaryoten, terwijl bacteriën en archaea prokaryotisch zijn.

Sommige soorten micro-organismen, zoals bepaalde planten, bacteriën en schimmels, kunnen sporen vormen in geval van nood. Deze zijn cellen die in een soort winterslaap verkeren en zeer resistent zijn tegen allerlei invloeden, zoals temperatuur, druk, antibiotica en dergelijke. Deze sporen zijn dan ook vaak een probleem omdat ze zo moeilijk te doden zijn [Campbell, Reese, 2004].



**Figuur 5.1** Een vergelijking van een dierlijke cel, bacterie en bacteriofaag. Een bacteriofaag is een virus dat alleen bacteriën infecteert [Cummings, B., 2007].

Zoals al eerder besproken, zijn virussen eigenlijk geen levende wezens, ze doen namelijk op zichzelf niets. Virussen zijn niet veel meer dan een stuk DNA in een schil. Ze zijn compleet afhankelijk van andere cellen, zoals pro- als eukaryotische, voor hun voortplanting en verspreiding. Virussen dringen namelijk een cel binnen en “kapen” de enzymen en organellen van het slachtoffer voor hun eigen voorplanting. De cel zal dan compleet nieuwe virussen gaan produceren en uitscheiden, de cel gaat dan ook meestal zelf ten onder, een proces dat door virussen zelf wordt ingeleid.

Doordat virussen zo simpel in elkaar zitten zijn ze zeer klein en stug, er kan simpelweg minder aan kapot gaan en ze komen minder snel in aanraking met gifstoffen. Daarnaast zijn sommige in een relatief zeer sterke envelop (een membraan) verpakt [Campbell, Reese, 2004].

## 5.2 De verschillen tussen archaea, Gram-positieve en Gram-negatieve bacteriën.

Zoals besproken zijn prokaryoten alle micro-organismen zonder celkernen of andere complexe celorganen; ze zijn dan ook veel kleiner en simpeler dan eukaryoten. Deze kernloze micro-organismen zijn vrijwel altijd eencellig en de meest voorkomende levensvormen op aarde.

Archaea zijn micro-organismen die eigenlijk tussen bacteriën en de later genoemde eukaryoten vallen. Ze vertonen veel eigenschappen van elk van de twee soorten maar hebben geen celkern, dus vallen alsnog onder de prokaryoten. Deze micro-organismen zijn goed aangepast aan extreme omgevingen en zijn dan ook als enige levensvorm te vinden in geisers, zeevulkanen en andere onvriendelijke omgevingen, mensen komen er echter vrij weinig in contact mee en dus zijn de effecten van cavitatie op archaea niet bestudeerd.



Bacteriën zijn ook prokaryoten, maar ze komen overal voor, behalve in de extreme niches die door de Archaea opgenomen worden. Bacteriën vervullen een belangrijke rol in allerlei omzettings- en afbraakprocessen. Zij zijn onder andere essentieel voor de spijsvertering van mensen. Ook zijn er allerlei industriële toepassingen, bijvoorbeeld in de waterzuivering. Bacteriën kunnen echter ook overlast veroorzaken of ziektes overbrengen. Daarom zijn allerlei manieren van sterilisatie, waaronder ultrasonische, ook zorgvuldig bestudeerd [Campbell, Reese, 2004].

Bacteriën zijn onder te verdelen in twee groepen: Gram-negatief en Gram-positief. Deze classificatie is gebaseerd op de manier waarop de celwanden van de twee soorten op een bepaalde kleuring reageren; ze hebben een andere celwandstructuur. Er zijn namelijk twee soorten "muren" van een cel: celwanden en celmembranen. Alle cellen hebben membranen en bijna alle niet-dierlijke cellen hebben celwanden. Celmembranen zijn vliesjes rond de cel die wel bescherming bieden, maar lang niet zoveel als celwanden. Dit zijn stugge beschermende wanden die om het membraan heen zitten. De hele structuur van celmembraan en wand wordt de celenvolp genoemd. Gram-positieve bacteriën hebben een celwand met een zeer dikke laag van peptidoglycaan, een organische polymeer, terwijl Gram-negatieve celwanden een dunne peptidoglycaanlaag hebben en een tweede membraan dat vrij negatief geladen is. De eigenschappen van de Gram-negatieve celwand is vaak ook de reden dat deze bacteriën resistent zijn tegen diverse schadelijke stoffen als bijvoorbeeld antibiotica [Campbell, Reese, 2004].

### 5.3 Planten, schimmels en dieren

Eukaryotische cellen bevatten een celkern en andere complexe celorganellen, ze zijn dan ook veel groter dan prokaryoten. Het DNA van deze cellen zit verpakt in een organel genaamd de celkern en eukaryoten hebben nog veel meer complexe celorganellen. Eukaryoten zijn dan ook de enige levensvormen die multicellulaire organismen kunnen vormen; al het met het oog zichtbare leven is eukaryotisch. Binnen de eukaryoten vallen nog 3 verschillende vormen: planten, schimmels en dieren [Campbell, Reese, 2004].

De cellen van planten hebben een celwand bestaande uit cellulose en eiwitten, een samenstelling die uniek is voor planten, en ze staan onderling in contact door middel van poriën in de celwand genaamd plasmodesmata. In de cel is een groot water "bassin" aanwezig waar water wordt opgeslagen voor verschillende celfuncties. Ten slotte bevatten ze chloroplasten, een soort symbiotische micro-organismeachtige celorganellen die voor fotosynthese en de groene kleur van planten zorgen en planten zijn dan ook de enige eukaryoten die fotosynthese vertonen [Campbell, Reese, 2004].

Schimmels hebben ook een celwand, maar deze is opgebouwd uit glucanen en chitine, dezelfde stof die in het pantser van insecten zit. Schimmels zijn heterotrofe organismen. Dat betekent dat ze leven van organische stoffen gevormd door andere organismen, zoals planten en dieren. Schimmels vervullen belangrijke rollen in het ecosysteem doordat ze symbiose aangaan met planten en de resten van andere organismen afbreken zodat deze gerecycled worden. Sommige schimmels, zoals de alom bekende voetschimmel, zijn echter pathogeen; ze zijn infectieus voor mensen, dieren en planten [Campbell, Reese, 2004].

Dierlijke cellen zijn misschien wel de meest kwetsbare van alle soorten; ze hebben namelijk geen celwand maar alleen een celmembraan. Hierdoor hebben ze weinig bescherming maar wel veel meer mobiliteit. Alle dieren zijn heterotroof; ze leven van andere levensvormen. Dieren zijn bijna altijd multicellulair, maar er zijn ook eencellige dieren, zoals amoeben. Deze laatste leven van andere micro-organismen en zelfs soms parasiteren op multicellulaire organismen waar ze ziektes zoals malaria veroorzaken [Campbell, Reese, 2004].

## **5.4 De algemene effecten van sonicatie en cavitatie op micro-organismen**

Ultrasonicatie en cavitatie brengen zeer grote energieën en krachten teweeg, het is dan ook niet zo vreemd dat deze micro-organismen kunnen beschadigen. De manier waarop deze beschadigingen of zelfs doding veroorzaakt worden blijken over het algemeen zeer overeen te komen. Wel blijken er enkele soorten micro-organismen te zijn, zoals virussen en sporen, die bijzonder resistent zijn en alleen goed bestreden kunnen worden in combinatie met andere technieken. Hieronder staan de effecten van sonicatie en cavitatie beschreven.

### **Drukverandering**

De gigantische drukverhogingen die door de sonicatie en cavitatie ontstaan, verstoren de membranen en verhogen permeabiliteit. Zo blijken micro-organismen onder sonicatie interne eiwitten en moleculen los te laten, zonder dat hun membranen kapot gaan. Dit werd aangetoond toen bleek dat bij ultrasonicatie allerlei stoffen vrijkwamen, zoals calcium, stikstof, zuren, glycopeptides, vetzuren, glycolipiden en andere moleculen [Piyasena et al. 2003]. In dit lijstje ontbreken echter de fosfolipiden, de bouwstenen van de membranen van alle cellen. De membranen zijn dus nog intact, maar toch diffunderen er veel meer moleculen. Ook gaat er water de cel in, zodat de hitteresistentie omlaag gaat. Daarnaast penetreren andere stoffen, zoals antibiotica, de micro-organismen veel beter. Ook zorgen de drukveranderingen voor de mechanische effecten van cavitatie, zoals schokgolven, schuifspanning en microstroming [Blume, 2004] [Earnshaw et al., 1995] [Kondo en Kano, 1998] [Oster, 1947] [Raman en Abbas, 2007].

Sporen zwellen ook op doordat er water naar binnen stroomt door de osmotische druk. Door de grotere concentratie water in de sporen wordt de hitteresistentie lager; er is meer vloeistof om sporen op te warmen.

### **Mechanische stress**

De combinatie van compressie, expansie, cavitatiele drukverhogingen, schokgolven en zelfs microstroming zorgen voor gigantische spanningen op alle deeltjes in het medium. De krachten die deze spanning veroorzaken zijn vaak parallel aan de longitudinale golven die ontstaan bij sonicatie, schokgolven, microstroming en andere cavitatiele effecten. Deze krachten zorgen voor zogenaamde schuifspanning; een spanning die materialen vervormt parallel aan het vlak van de richting van de kracht. Deze spanning beïnvloed celmembranen, celwanden, organellen en zelfs grote moleculen zoals DNA en RNA en deze worden dan ook vaak beschadigd of zelfs uiteen gereten.

Dit blijkt dan ook het belangrijkste mechanisme te zijn in het sterven van de micro-organismen. Individuele moleculen kunnen beschadigd worden of breken. Voorbeelden hiervan zijn membraanmoleculen, maar ook DNA en hele virusdeeltjes.

De krachten die spelen bij sonicatie en cavitatie mengen het medium ook zeer effectief; ophopingen en klompen van slib, micro-organismen en andere vaste en vloeibare onderdelen in het medium worden opgesplitst en verspreid. Dit effect is vooral zeer nuttig in combinatie met andere technieken doordat het reactieoppervlak veel groter wordt; er kunnen meer chemische reacties optreden en dus meer micro-organismen gedood worden [Ananta et al., 2005] [Blume en Neis, 2004] [Boucher et al, 1967] [Brambilla, 2006] [Burgos et al, 1972] [Dahi, 1976] [Deshpande en Prausnitz, 2007] [Furuta, 2004] [Earnshaw et al., 1995] [Gogate, 2002] [Piyasena et al. 2003] [Qian et al, 1999] [Raman en Abbas, 2007] [Vollmer, 1999].

### **Waterstralen**

Zoals in hoofdstuk vier besproken, ontstaan er bij cavitatie in de buurt van vaste oppervlakken niet-symmetrische bellen, die zeer sterke waterstralen creëren. Deze stralen hebben zodanig hoge snelheden dat ze zelfs metaal kunnen beschadigen. Deze stralen kunnen dan ook micro-organismen beschadigen door de membranen te penetreren en moleculen te breken. Dit effect is echter zeer lokaal en kan misschien versterkt worden door bijvoorbeeld relatief grote vaste deeltjes in het medium te suspenderen [Vollmer, 1999].

### **Menging**

Dit effect van cavitatie is zeer handig, vooral in niet homogene systemen. De samenstelling van het medium wordt gemengd, stoffen worden homogener verspreid en aggregaten van vast materiaal, zoals slib, worden verbroken. Dit effect is zeer nuttig doordat contactoppervlakten worden vergroot; er kunnen veel meer reacties optreden en meer cellen beïnvloed worden [Suslick, 1989].

### **Temperatuur**

Temperatuur werd vroeger gedacht de belangrijkste factor te zijn in de afdoding van organismen door middel van cavitatie. Dat blijkt niet zo te zijn, de hotspots zijn zeer lokaal en de hitte diffundeert zeer snel. Toen de verhitting van het medium gedurende ultrasonificatie teniet werd gedaan door Ananta et al. bleek de sterfte van micro-organismen niet merkbaar te veranderen; Ondanks het ontbreken van extreme verhitting, bleef de effectiviteit van ultrasonificatie hetzelfde. De hotspots zijn dus duidelijk niet een belangrijke factor in de sterfte van micro-organismen, ze doden wel wat micro-organismen maar lang niet genoeg [Ananta et al., 2005] [Pitt, 2005].

### **Elektrische stroom**

Over het algemeen is de generatie van elektrische potentialen bij cavitatie even effectief als de verhitting; het is wel schadelijk voor micro-organismen maar de potentialen zijn zeer lokaal en hebben dus meestal niet veel effect. Deze stroom is echter wel belangrijk voor het beïnvloeden van organisch chemische reacties [Gimenez, 1979].

### **Radicaalvorming**

Bij de implosie van de microbellen komen radicalen vrij, moleculen en atomen met een zeer hoge reactiviteit. Radicalen zijn zeer dodelijk voor micro-organismen en ze worden dan ook door bijvoorbeeld witte bloedcellen gebruikt om ziekteverwekkers te doden. Daarnaast beïnvloeden ze veel organische chemische reacties. Radicalen werden dan ook eerst verwacht een belangrijke rol te spelen bij het doden van micro-organismen. Dit bleek echter niet het geval te zijn, in ieder geval niet bij bacteriën en sporen; radicalen spelen wel een rol, maar zelfs zonder deze moleculen en atomen blijkt er nog grote sterfte onder de micro-organismen te zijn. Radicalen hebben echter wel invloed bij het breken van DNA door mechanische stress, de fragmenten zijn zeer gevoelig voor radicalen en versterken dan ook dit effect [Ananta et al., 2005] [Earnshaw et al., 1995] [Furuta, 2004] [Hua, 2000] [Kondo en Kano, 1998] [Piyasena et al. 2003] [Qian et al, 1999].

### **Organisch chemische reacties**

Zoals eerder besproken worden veel organisch chemische reacties beïnvloed door sonicatie en cavitatie, deze kunnen geïnitieerd, geremd, versneld of zelfs een heel andere route ingestuurd worden. Dit effect verstoort natuurlijk het metabolisme van veel cellen maar het speelt geen grote rol in het doden van cellen [Oster, 1947]. Het zou misschien mogelijk kunnen zijn dit effect te versterken door substraten in het medium aan te brengen die via sonicatie het metabolisme verder verstoren maar het is de vraag of dit rendabel zou zijn.

## **5.5 De invloed op specifieke micro-organismen**

### **Bacteriën**

Bacteriën worden over het algemeen zeer effectief gedood door sonicatie en cavitatie.

Het schadelijke effect van ultrasonificatie en cavitatie wordt vooral veroorzaakt door de mechanische stress op membranen, als de kracht van deze stress groter wordt dan de trekkracht van de membranen kunnen deze scheuren.

Membranen, zowel in de cel als om de cel heen, zijn essentieel voor de integriteit van micro-organismen, als deze onherstelbaar beschadigd wordt is de cel ten dode opgeschreven doordat de permeabiliteitsbarrière wegvalt en ze geen elektrochemische gradiënt over het membraan kunnen aanhouden en geen metabolisme meer kunnen onderhouden. Beschadiging van dit membraan door cavitatie is dan ook vaak de oorzaak van sterilisatie door sonicatie, gedode bacteriën vertonen vaak grote gaten. Dit hoeft echter niet de oorzaak te zijn; Ananta et. al toonden aan dat een deel van de bacteriën die gedood waren nog intacte membranen hadden, het schadelijke effect zal waarschijnlijk komen doordat de membranen niet zozeer kapot gaan maar wel veel permeabeler worden.

Er zit een duidelijk verschil in de gevoeligheid voor sonicatie en cavitatie tussen Gram-negatieve en Gram-positieve bacteriën. Zo bleek *E. coli*, een Gram-negatieve bacterie, twee keer zo snel te sterven onder invloed van ultrasonicatie dan de Gram-positieve *L. rhamnosus*. Dit verschil blijkt niet zozeer te komen door de veel dikkere en dichtere celwand maar doordat de ultrasonicatie een zeer sterk effect heeft op de membranen van de Gram-negatieve bacterie doordat de lipopolysaccharide laag van het buitenste membraan verstoord wordt. Dit is zeer voordelig omdat deze soorten zeer resistent zijn tegen de meeste behandelingen, inclusief antibiotica, en vaak zeer pathogeen zijn [Ananta et al., 2005] [Blume en Neis, 2004] [Boucher et al, 1967] [Brambilla, 2006] [Burgos et al., 1972] [Burlison, 1975] [Dahi, 1976] [Deshpande en Prausnitz, 2007] [Earnshaw et al., 1995] [Foladori et al. 2007] [Furuta, 2004] [Hua, 2000] [Hughes, 1961] [Jyoti en Pandit, 2004] [Qian et al, 1999] [Piyasena et al. 2003] [Scherba, et al. 1991] [Vollmer, 1999].

### **Sporen**

Sporen zijn zo resistent tegen sonicatie dat deze techniek ook wel gebruikt wordt om suspensies te zuiveren waar de sporen wel in gewenst zijn. Sonicatie heeft echter wel een beschadigend effect; het laat de sporen opzwellen en beschadigt het oppervlak. Deze opzwellings komt doordat de drukveranderingen en mechanische stress de sporen meer permeabel maken, hierdoor worden de sporen veel minder resistent tegen andere technieken [Burgos et al., 1972] [Piyasena et al. 2003].

### **Dierlijke cellen**

Het blijkt zo te zijn dat grotere cellen meer beschadigd worden door sonicatie en cavitatie doordat ze een groter reactieoppervlak hebben. Dierlijke cellen zijn, zoals alle eukaryoten, zeer groot vergeleken met prokaryoten en virussen. Dierlijke cellen hebben, in tegenstelling tot cellen van andere organismen, geen celwand. Hierdoor hebben beschadigingen aan het celmembraan waarschijnlijk nog grotere effecten, omdat de vorm en integriteit van enkel dit plasmamembraan afhangen.

Naast het verstoren van de membranen is bij eukaryoten DNA schade een grote factor in het doden van dierlijke cellen; het blijkt dat veel dode cellen nog volledig intact zijn en zelfs nog voorlopig levend zijn, ze kunnen zich echter niet reproduceren of eiwitten maken en zijn dus stervende [Kondo en Kano, 1998].

### **Planten**

Het toepassen van ultrasonicatie bij planten begint tegenwoordig steeds meer belangstelling te krijgen, vooral bij algen. Het blijkt dat, zelfs bij een korte behandeling, ultrasonicatie extreem effectief is tegen algen. Deze cellen drijven namelijk op het water door middel van vacuolen, een soort microscopische blaasjes, gevuld met gas. De mechanische stress en drukveranderingen door ultrasonicatie beschadigt deze blaasjes en zorgt ervoor dat de algen zinken en dus sterven [Mahvi et al. 2005].

Hogere planten hebben, net als de andere eukaryoten, grote, complexe cellen en zijn dus zeer gevoelig voor ultrasonicatie. Het is zelfs mogelijk dat planten nog gevoeliger zijn omdat ze water opslaan in grote gecentraliseerde vacuolen. Deze blaasjes zijn ten eerste gevoeliger voor sonicatie doordat, als ze beschadigt raken, de osmotische potentiaal van de cel verstoren. Daarnaast worden er allerlei stoffen, zoals enzymen, ionen en zelfs giftige

bijproducten in opgeslagen. Als deze vrijkomen is dat rampzalig voor de cel. Ten slotte zorgen deze grote vacuolen ook voor de vorm van de cel; normaliter is de cel tegen de celwand aangedrukt, de celwand zorgt ervoor dat de cel zijn vorm behoudt. Deze druk van de cel tegen de celwand wordt door de vacuole verzorgd, als deze lek raakt zal de cel zijn vorm verliezen [Campbell, Reese, 2004].

### **Schimmels**

Hoewel er niet veel onderzoek is gedaan naar het effect van sonicatie en cavitatie op schimmels, is wel bekend dat ze wel duidelijk minder groei vertonen na ultrasonicatie. Het mechanisme is waarschijnlijk grotendeels hetzelfde als dat van bacteriën en eukaryoten: beschadiging van DNA en verhoging van de permeabiliteit van membranen zodat het interne milieu van de organismen verstoord wordt [Scherba, et al. 1991].

### **Virussen**

Veel virussen zijn zeer resistent tegen de effecten van ultrasonicatie en cavitatie maar met name envelopvirussen zijn relatief meer gevoelig. Zo blijkt de infectiviteit van alfavirussen duidelijk te verminderen door ultrasonicatie, waarschijnlijk door beschadiging van de virale envelop, een membraan om het virus heen. Deze envelop is essentieel in het besmetten van gastheercellen en beschadigingen inactiveren het virus. Sommige virussen hebben echter geen envelop maar een capsid. Deze capsid is heel wat steviger dan de envelop en het blijkt dan ook dat deze virussen veel minder beïnvloed worden door ultrasonicatie [Scherba, et al. 1991].

Als de virusdeeltjes klein genoeg zijn kunnen ze ook breken. Zo bleken deeltjes van het tabakmozaïekvirus simpelweg in meerdere fragmenten gesplitst te worden. De mate van fragmentatie bleek af te hangen van de mate van cavitatie [Newton, 1951] [Oster, 1947] [Scherba, et al. 1991].

## Hoofdstuk 6

# Waarmee kan ultrasonificatie gecombineerd worden?

Ultrasonificatie is effectief tegen verscheidene micro-organismen maar lang niet tegen allemaal. Het blijkt echter dat sonificatie zeer effectief is in combinatie met andere sterilisatie technieken. Deze technieken zijn vaak gecombineerd veel effectiever en energie efficiënter dan apart. Hieronder staan de belangrijkste combinatiebehandelingen.

### **Pre- en post-sonificatie**

Het medium, vaak een levensmiddel of bederfelijk product, kan met ultrasoon geluid behandeld worden voordat er andere conserveermethodes, zoals hitte of druk sterilisatie, worden toegepast. Voorbehandeling kan de resistentie van micro-organismen en enzymen tegen de andere methodes verminderen, zodat ze volledig geïnactiveerd worden. Het is echter effectiever en efficiënter om de technieken tegelijk toe te passen [Gogate, 2002].

### **Thermosonificatie**

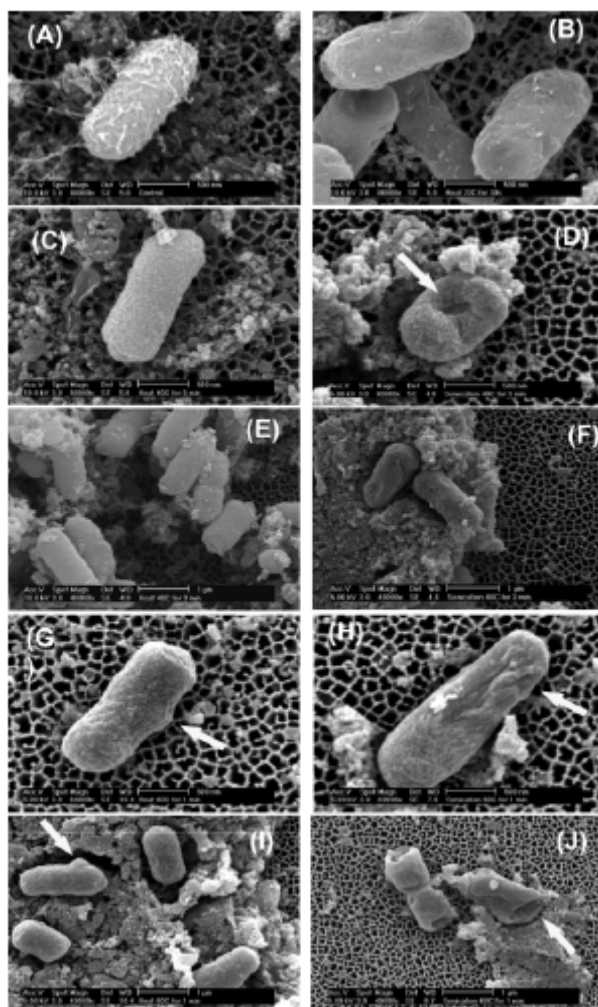
Hierbij wordt ultrasoon geluid gecombineerd met matige temperatuurverhoging, dit is een effectieve combinatie, tot op een zekere hoogte. Als de temperatuur namelijk te hoog wordt zal deze de effecten van cavitatie doen verminderen [Kuldiloke, 2002].

De temperatuurverhoging bij thermosonificatie verlaagt de resistentie tegen ultrasonificatie en visa versa. Het blijkt dan ook dat zelfs tegen zeer sonificatie-resistente organismen zeer effectief te doden zijn, zo bleek de sporenvormende bacterie *B. subtilis* 43% minder hitte resistent te zijn bij sonificatie in een medium van 70 tot 95 graden Celsius. Matige thermosonificatie is zeer goed toepasbaar in de voedselindustrie, waar hoge sterilisatie temperaturen, drukken en chemische middelen de kwaliteit van het product (bijvoorbeeld smaak, textuur uiterlijk) kunnen verminderen [Burgos et al., 1972] [Earnshaw et al., 1995]. In figuur 6.1 zijn de effecten van verhitting, sonificatie en thermosonificatie op *E. coli* gedurende verschillende tijdsperiodes te zien.

### **Manosonificatie**

Dit is de combinatie van ultrasonificatie en een matige, niet op zichzelf dodelijke, drukverhoging. Deze verhoging zorgt ervoor dat de effecten van een imploderende microbel versterkt worden en heeft ook nog invloed op de micro-organismen zelf. Manosonificatie wordt meestal, op thermomanosonificatie na, beschouwd als de meest effectieve en interessante combinatiebehandeling. Manosonificatie is het meest effectief bij Gram-positieve bacteriën, waar sonificatie minder invloed op heeft. Manosonificatie wordt niet beïnvloed door de hiteresistentie van het organisme en is dus zeer effectief tegen robuuste micro-organismen.

Een lagere pH versterkt het effect terwijl heat shocks, een normaal zeer effectieve combinatie, geen effect hebben. Het effect van manosonificatie wordt hoger als de druk hoger wordt, tot een maximum van 500 kPa, waarna de sterfte van micro-organismen weer omlaag gaat [Kuldiloke, 2002].



**Figuur 6.1** Met verschillende technieken behandelde *E. coli* bacteriën bekeken door middel van scanning elektron microscopie: (A) controle, (B) verhitting 72 °C gedurende 3 minuten, (C) verhitting 40 °C gedurende 3 minuten (80.000 maal vergroting), (D) sonicatie bij 40 °C gedurende 3 minuten, (E) verhitting 40 °C gedurende 3 minuten (40.000 maal vergroting), (F) sonicatie bij 40 °C gedurende 3 minuten (40.000 maal vergroting), (G) verhitting 60 °C gedurende 1 minuut (80.000 maal vergroting), (H) sonicatie bij 60 °C gedurende 1 minuut (80.000 maal vergroting), (I) verhitting 60 °C gedurende 1 minuut (40.000 maal vergroting) en (J) sonicatie bij 60 °C gedurende 1 minuut (40.000 maal vergroting) [Ugarte-Romero et al. 2006].

### Thermomanosonicatie

Deze combinatie van ultrasonatie, matige verhitting en matige drukverhoging is het meest effectief; het is alles in één. Deze verbetering is exponentieel doordat de methoden elkaar beïnvloeden en doordat elke afzonderlijke techniek de resistentie tegen de andere verlaagd [Kuldiloke, 2002].

### Zuurgraad

Er is nog veel discussie tussen onderzoekers welk effect de pH heeft op de toepassingen van sonicatie. Sommige onderzoekers beweren dat het de resistentie van micro-organismen tegen ultrasonatie kan verlagen, terwijl anderen dit tegenspreken [Piyasena et al. 2003].

### **Sonozonificatie**

Het blijkt de combinatie van ozon en ultrasonificatie zeer effectief is. Dit is niet verwonderlijk aangezien ozon al jaren in de industrie gebruikt wordt als middel om micro-organismen te bestrijden. In combinatie met ultrasonificatie zullen de oxidatieve moleculen deels desintegreren tot radicalen, hetgeen ook al een redelijk dodelijk effect is van cavitatie. Ook zal de sonificatie de permeabiliteit van celwanden en membranen verhogen, waardoor de moleculen de micro-organismen beter kunnen binnendringen. Sonozonificatie is zeer effectief en efficiënt, het verlaagt de benodigde ozon met vijftig procent ten opzichte van normale ozonisatie, en is dan ook een van de meest populaire sonificatie technieken [Burlison, 1975] [Dahi, 1976] [Jyoti en Pandit, 2004].

### **Bestraling met ultraviolet licht**

Ultraviolet licht wordt al veel gebruikt bij sterilisatie en het combineert goed met sonificatie doordat het medium gemengd wordt. Hierdoor wordt het homogener en dus het oppervlak van de micro-organismen en andere stoffen in het medium veel groter. Daarnaast penetreert het UV licht dieper, door de opsplitsing van bijvoorbeeld contaminaties of slib. Ultraviolet licht werkt alleen bij directe bestraling; het werkt niet als de micro-organismen niet direct beschenen worden. Sonificatie zorgt ervoor dat er meer en homogener UV licht wordt opgevangen door de micro-organismen.

### **Antibiotica en andere chemische middelen**

Antibiotica en andere chemicaliën zijn ideaal om te combineren met ultrasonificatie. Ultrasoon geluid en cavitatie mengen ten eerste het medium tot meer homogene suspensies, hierdoor worden micro-organismen, slib en chemische stoffen beter verspreid en wordt het reactieoppervlak groter. Ten tweede wordt het membraan van de micro-organismen beschadigd. Dit membraan is de belangrijkste barrière tegen deze middelen, als deze verstoord of permeabeler is, kunnen deze stoffen veel makkelijker de cel binnendringen. Vooral bij Gram-negatieve bacteriën is dit effectief, de tweede celmembraan maakt deze bacteriën zeer resistent tegen antibiotica. Als deze beschadigd is, zijn de cellen echter vrij zwak en makkelijk te bestrijden. Ten slotte verzwakken sonificatie en chemische middelen de micro-organismen natuurlijk zodat ze minder resistent zijn tegen beide technieken [Ananta et al., 2005] [Blume en Neis, 2004] [Boucher et al, 1967] [Jyoti en Pandit, 2003].



## Hoofdstuk 7

# Discussie en conclusie

Ultrasonicatie en cavitatie zijn zeer interessante methodes voor allerlei toepassingen. Zij zijn vooral effectief in het bestrijden van micro-organismen. Er is besproken dat de compressie en expansie van het medium door de longitudinale golven van sonicatie, inertiële en non-inertiële cavitatie veroorzaken. Deze tijdelijke en stabiele bellen veroorzaken een breed scala aan effecten, zoals extreme druk- en temperatuurverhogingen. Daarnaast zijn er zeer veel factoren van invloed op cavitatie, waardoor deze nauwkeurig bestuurd kan worden.

Sonicatie en cavitatie bleken veel effecten op micro-organismen te hebben en effectief te zijn in sterilisatie. Vooral de drukverhogingen en mechanische stress op celmembranen en virale enveloppen zorgt voor ernstige beschadigingen en een verhoging in permeabiliteit. In combinatie met andere technieken is sonicatie dan ook zeer effectief als sterilisatie methode.

Er zijn natuurlijk zeer veel toepassingen voor sonicatie en cavitatie te bedenken. Vooral het feit dat het geen chemische stoffen achterlaat en dat het, mits goed onder controle gehouden, vaste materialen deels onaangetast laat. Zo kan ultrasonicatie zeer goed toegepast worden in de voedselindustrie, waar producten effectief gesteriliseerd moeten worden zonder dat de smaak of textuur aangetast worden.

Het feit dat het medium gemengd wordt, maakt deze techniek zeer geschikt voor het schoonmaken van afvalwater en waterleidingen. Dit bevat namelijk van zeer divers afval, zoals hoge concentraties van contaminanten, slib, brokken en andere aggregaten. Deze worden afgebroken en gemengd in het medium, zodat er betere doorstroming zal optreden en andere methodes veel beter de micro-organismen kunnen bestrijden.

Daarnaast zijn de technieken goed toepasbaar in de medische of technologische industrie waar veel instrumenten en hulpmiddelen, zoals scalpels, protheses en zelfs microchips, goed schoongemaakt moeten worden zonder aangetast te worden. Vooral biofilms zijn vaak een probleem. Dit zijn dikke en resistente kolonies van bacteriën. Sonicatie en cavitatie zijn zeer effectief om deze op te breken en los te maken. Daarnaast wordt cavitatie ingezet om bijvoorbeeld nierstenen in vivo te behandelen en wordt er nu onderzoek gedaan naar het bevorderen van eiwitopname van cellen.

Ten slotte vinden sonicatie en cavitatie ook een plaats in biomoleculair onderzoek, het zorgt er namelijk voor dat cellen makkelijker getransfecteerd kunnen worden met DNA.

Er zijn echter een paar problemen met sonicatie en cavitatie: Ten eerste is het moeilijk om dit op grote schaal toe te passen. Het feit dat cavitatie het meest effectief is als het medium homogeen met ultrageluid behandeld wordt, maakt het moeilijk om het in reactors toe te passen. Daarnaast is het een techniek die veel energie kost. Ook zijn de precieze effecten op veel micro-organismen nog deels onduidelijk. Het is echter wel een veelbelovende techniek omdat er veel factoren van invloed zijn. Zo kan het proces nauwkeurig bestuurd worden en blijven er geen chemische stoffen in het medium achter. Tegen sommige resistente micro-organismen blijkt ultrasonicatie zeer effectief, vooral in combinatie met andere behandelingen.

Ultrasonicatie en cavitatie zijn veelbelovende methodes met veel effecten en toepassingen, maar er is meer onderzoek nodig naar behandelingsmethoden, optimale omstandigheden en de effecten op micro-organismen voordat het op grote schaal optimaal toegepast kan worden.

## Literatuurlijst

**Ananta, E., D. Voigt, M. Zenker, V. Heinz and D. Knorr (2005)**

Cellular injuries upon exposure of *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* to high-intensity ultrasound. *J. Appl. Microbiol.* 99, 271-278 (2005).

**Blume, T. and U. Neis (2004)**

Improved wastewater disinfection by ultrasonic pre-treatment. *Ultrason. Sonochem.* 11, 333-336 (2004).

**Boucher, R.M.G., M. A. Pisano, G. Tortora and E. Sawicki (1967)**

Synergistic Effects in Sonochemical Sterilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 15, 1257-1261 (1967).

**Brambilla, E., M. G. Cagetti, G. Belluomo, L. Fadini and F. Garcia-Godoy (2006)**

Effects of sonic energy on monospecific biofilms of cariogenic microorganisms. *Am. J. Dent.* 19, 3-6 (2006)

**Brennen, C.E. (1995)**

Cavitation and Bubble Dynamics 294 (Oxford University Press, New York, 1995).

**Burgos, J., J. A. Ordonez and F. Sala (1972)**

Effect of ultrasonic waves on the heat resistance of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* spores. *Appl. Microbiol.* 24, 497-498 (1972).

**Burleson, G.R., T. M. Murray and M. Pollard (1975)**

Inactivation of viruses and bacteria by ozone, with and without sonication. *Appl. Microbiol.* 29, 340-344 (1975).

**Campbell, N. and J. Reese (2004)**

Campbell Biology sixth edition 1312 (Pearson education limited, U.K., 2004).

**Crowell, B. (2007)**

Vibrations and Waves [www.lightandmatter.com/html\\_books/3vw/ch03/ch03.html](http://www.lightandmatter.com/html_books/3vw/ch03/ch03.html). 08/06/2007

**Cummings, B. (2007)**

Een vergelijking van de grootte van een bacteriofaag, een prokaryote en eukaryote cel. <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/proceuc/c18x1cell-size-compare.jpg>. 20/06/2007

**Davidson, B.J. and N. Riley, (1971)**

Cavitation microstreaming. J. Sound Vib. 15, 217-233 (1971).

**Dahi, E. (1976)**

Physicochemical aspects of disinfection of water by means of ultrasound and ozone. Water Res. 10, 677-684 (1976).

**Deshpande, M.C. and M. R. Prausnitz (2007)**

Synergistic effect of ultrasound and PEI on DNA transfection in vitro. J. Control. Release 118, 126-135 (2007).

**Earnshaw, R.G., J. Appleyard and R. M. Hurst (1995)**

Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. Int. J. Food Microbiol. 28, 197-219 (1995).

**Foladori, P. , B. Laura, A. Gianni, and Z. Giuliano (2007)**

Effects of sonication on bacteria viability in wastewater treatment plants evaluated by flow cytometry--Fecal indicators, wastewater and activated sludge. Water Res. 41, 235-243 (2007).

**Furuta, M., M. Yamaguchi, T. Tsukamoto, B. Yim, C. E. Stavarache, K. Hasiba and Y. Maeda (2004)**

Inactivation of Escherichia coli by ultrasonic irradiation. Ultrason. Sonochem. 11, 57-60 (2004).

**Gimenez, G. (1979)**

Electrical pulses produced by cavitation bubbles. J. Phys. D 12, 25-27 (1979).

**Gogate, P.R. (2002)**

Cavitation: an auxiliary technique in wastewater treatment schemes. Adv. Environ. Res. 6, 335-358 (2002).

**Hua, I. (2000)**

Inactivation of Escherichia coli by sonication at discrete ultrasonic frequencies. Water Res. 34, 3888-3893 (2000).

**Henderson, T. (2007)**

Waves [www.glenbrook.k12.il.us/gbssci/Phys/Class/waves/u10l1c.html](http://www.glenbrook.k12.il.us/gbssci/Phys/Class/waves/u10l1c.html)12/06/2007

**Hughes, D.E. (1961)**

The disintegration of bacteria and other micro-organisms by the M.S.E.-Mullard Ultrasonic disintegrator. Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering 3, 405-433 (1961).

**Hui Liu, R., R. Lenigk, R. Druyor-Sanchez, J. Yang and P. Grodzinski (2003)**

Hybridization Enhancement Using Cavitation Microstreaming. Anal. Chem. 75, 1911-1917 (2003)

**Jyoti, K. K. and A. B. Pandit (2003)**

Hybrid cavitation methods for water disinfection: simultaneous use of chemicals with cavitation. Ultrason. Sonochem. 10, 255-264 (2003).

**Jyoti, K. K. and A. B. Pandit (2004)**

Ozone and cavitation for water disinfection. Biochem. Eng. J. 18, 9-19 (2004).

**Kondo, T. and E. Kano (1998)**

Effect of free radicals induced by ultrasonic cavitation on cell killing. *Int. J. Radiat. Biol.* 54, 475-486 (1988)

**Kuldiloke, J. (2002)**

Effect of Ultrasound, Temperature and Pressure Treatments on Enzyme Activity and Quality Indicators of Fruit and Vegetable Juices. Dr Dissenation (2002).

**Leighton, T.G. (2007)**

What is ultrasound? *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 93, 3-83 (2007).

**Lepoint, T. and F. Mullie (1994)**

What exactly is cavitation chemistry? *Ultrason. Sonochem.* 1, S13-S22. (1994)

**Mahvi, A. and M. Dehghani (2005)**

Evaluation of Ultrasonic Technology in Removal of Algae from Surface Waters. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 8, 1457-1459 (2005).

**Matula, T.J. (1999)**

Inertial Cavitation and Single-Bubble Sonoluminescence. *Philosophical Transactions: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 357, 225-249 (1999).

**Mason, D. (2007)**

An introduction to Sonochemistry 12/06/2007 [www.sonochemistry.info/research.html](http://www.sonochemistry.info/research.html)

**Moy, C. (2007)**

The Elements of musical perception 11/06/2007 [www.headwize.com/tech/elements\\_tech.htm](http://www.headwize.com/tech/elements_tech.htm)

**Newton, N. (1951)**

Some Effects of High-Intensity Ultrasound on Tobacco Mosaic Virus. *Science* 114, 185-186 (1951).

**Oster, G. (1947)**

Studies on the Sonic Treatment of Tobacco Mosaic Virus. *J. Gen. Physiol.* 31, 89-102 (1947).

**Pitt, W.G. (2005)**

Removal of oral biofilm by sonic phenomena. *Am. J. Dent.* 18, 345-352 (2005).

**Piyasena, P., E. Mohareb, and R. C. McKellar (2003)**

Inactivation of microbes using ultrasound: A review. *Int. J. Food Microbiol.* 87, 207-216 (2003).

**Pond, D. (2007)**

Cavitation 10/06/2007 [www.keelynet.com/keely/cavity1.txt](http://www.keelynet.com/keely/cavity1.txt)

**Qian, Z., R. D. Sagers and W. G. Pitt (1999)**

Investigation of the mechanism of the bioacoustic effect. *J. Biomed. Mater. Res.* 44, 198-205 (1999).

**Raman, V. and A. Abbas (2007)**

Experimental investigations on ultrasound mediated particle breakage. *Ultrason. Sonochem.* (2007).

**Scherba, G., R. M. Weigel and W. D. O'Brien ,Jr. (1991)**

Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2079-2084 (1991).

**Suslick, K.S. (1994)**

The Chemistry of Ultrasound [www.scs.uiuc.edu/suslick/britannica.html](http://www.scs.uiuc.edu/suslick/britannica.html). 14/06/2007

**Suslick, K.S. (1989)**

The chemical effects of ultrasound. *Sci. Am.* 2, 62-68 (1989).

**Thompson, L.H. and L. K. Doraiswamy (1999)**

Sonochemistry: Science and Engineering. *Ind. Eng. Chem. Res.* 38, 1215-1249 (1999).

**Ugarte-Romero, E. H. Feng, S. E. Martin, K. R. Cadwallader and S. J. Robinson (2006)**

Inactivation of *Escherichia coli* with Power Ultrasound in Apple Cider. *J. Food Sci.* 71, E102-E108 (2006).

**Vollmer, A.C., S. Kwakye, M. Halpern and E. C. Everbach (1998)**

Bacterial Stress Responses to 1-Megahertz Pulsed Ultrasound in the Presence of Microbubbles. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3927-3931

