

# Entwicklung und Test von einem photoakustischen Sensor für die photoakustische Spektroskopie an Biofilmen

Karin Zell (Dipl.-Phys.), o. Univ.-Prof. Dr. R. Nießner

Technische Universität München, Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie, Lehrstuhl für Analytische Chemie

## 1 Einleitung

Der Biofilm ist die bevorzugte Lebensform der Mikroorganismen (Flemming and Wingender, 2001). Biofilm ist dabei eine andere Bezeichnung für mikrobielle Aggregate wie beispielsweise „Schleime“. Dabei sind Mikroorganismen in eine Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet, welche die Mikroorganismen zum einen zusammen hält und zum anderen an Oberflächen binden kann. Die EPS stellt neben den Zellen den Hauptbestandteil der Struktur dar. Beliebte Siedlungsräume der Biofilme sind Grenzflächen des Wassers.

Biofilme sind sowohl in der Natur als auch im medizinischen Bereich und in technischen Systemen zu finden. In Kläranlagen leisten sie einen bedeutenden Beitrag zur Abwasserreinigung durch den Abbau organischer Abfallprodukte. Im Gegensatz dazu führen sie beispielsweise in technischen Anlagen zu Verstopfungen von Rohrleitungen oder vermindern den Wärmeübertrag. Darüber hinaus bieten sie eine schützende Umgebung für Mikroorganismen, was insbesondere im medizinischen Bereich zu gesundheitlichen Problemen führen kann. Daher geht das allgemeine Bestreben dahin, der Ausbildung derartiger Beläge vorzubeugen oder zumindest periodisch die Ausbildung rückgängig zu machen.

Sowohl zur Optimierung von Biofilmbekämpfungsstrategien, als auch im Rahmen der biologischen Abwasserreinigung, ist eine Online- und *in situ*-Analytik notwendig, die eine zerstörungsfreie Überwachung von Biofilmen erlaubt. Die derzeit zur Verfügung stehenden spektroskopischen und nuklear-physikalischen Methoden sind jedoch teilweise nicht *in situ* anwendbar, da die Optoelektronik mit hohen Kosten verbunden sind und nuklear-physikalische Methoden atomrechtlicher Genehmigung bedürfen. Zudem bieten die wenigsten Methoden Informationen über die Schichtdicke des Biofilms, was für eine rechtzeitige Bekämpfungsmaßnahme wichtig wäre. Die Photoakustische Spektroskopie (PAS) könnte hier durch die Möglichkeit der Tiefenauflösung ein hilfreiches Tool darstellen. Zudem bietet die Methode die Möglichkeit *in situ* messen zu können und Prozesse zeitaufgelöst zu untersuchen. Erste Ergebnisse über die Überwachung von Biofilmbekämpfung mittels PAS wurden bereits beschrieben (Schmid *et al.*, 2004). Die photoakustischen Sensoren sind in der Bauweise vielfältig und können den Bedingungen angepasst werden.

Im Rahmen dieses Projektes wurde ein neu entwickelter photoakustischer Sensor für die medizinische Anwendung an Modellen auf Anwendbarkeit für das 3D tiefenaufgelöste *in situ*-Monitoring an Biofilmen getestet. Bei dem getesteten System ist eine Kombination aus PAS und einem konventionellen Ultraschallgerät. Das System bietet somit die Möglichkeit der dualen Messung sowohl photoakustisch als auch akustisch basiert. Es wurden in ersten Schritten die Unterscheidbarkeit

verschiedener Absorptionskoeffizienten sowie die spektrale Abhängigkeit desselben untersucht.

## 2 Photoakustische Spektroskopie

Photoakustik ist eine Kombination aus den beiden Disziplinen: Optik und Akustik. Der Photoakustische Effekt beschreibt die Erzeugung von akustischen Wellen durch Absorption von Laserstrahlung (Gusev and Karabutov, 1993). Die absorbierte Energie wird dabei über strahlungslose Relaxationsprozesse in Wärme umgewandelt. Durch die thermische Expansion wird eine Druckwelle (Schallwelle) induziert, welche von einem Mikrofon oder einem piezoelektrischen Schallwandler detektiert werden kann. Erfolgt die Anregung durch gepulste Laserstrahlung mit Pulsdauern im Nanosekundenbereich, so werden auf Grund des Photoakustischen Effekts Ultraschallpulse erzeugt, welche auch mit konventionellen Ultraschallwandlern aufgezeichnet werden können. Für die Druckamplitude gilt:

$$p \propto \frac{\beta c_s^2}{C_p} E_0 \mu_a,$$

wobei  $\beta$  der thermische Expansionskoeffizient,  $c_s$  die Schallgeschwindigkeit und  $C_p$  die Wärmekapazität der Probe ist. Die Größen sind dabei von der Probenmatrix abhängig. Beispielsweise werden im Falle von wässrigen Lösungen und biologischen Proben die physikalischen Eigenschaften von Wasser angenommen. Des Weiteren ist die Signalamplitude proportional zur eingestrahlten Energie und dem Absorptionskoeffizienten der Probe abhängig. Die Wellenlängenabhängigkeit des Absorptionskoeffizienten bietet die Grundlage zur Photoakustischen Spektroskopie (PAS). Auf Grund der direkten Abhängigkeit der Signalamplitude vom Absorptionskoeffizienten bietet die PAS im Gegensatz zu transmissionsspektroskopischen Methoden einen direkten Zugang zur Absorption einer Probe.

Durch die zeitaufgelöste Detektion der Drucksignale eröffnet sich zusätzlich die Möglichkeit der tiefenaufgelösten Messung. Die Tiefeninformation ergibt sich dabei aus der Laufzeit  $t$  und der Schallgeschwindigkeit  $c_s$  (medienspezifisch) der Druckwelle über die Beziehung:

$$z = c_s t,$$

wobei  $z$  den Abstand zwischen dem Entstehungsort und dem Ort der Detektion der Druckwelle und somit die Tiefe repräsentiert.

Die PAS vereinigt die Vorteile der optischen Tomographie mit denen der Ultraschalltomographie. Durch die Detektion von Schallwellen ist die Methode von Streuung nahezu unabhängig und resultiert in eine Ortsauflösung vergleichbar mit der von Ultraschalltomographie. Andererseits bietet die PAS einen optischen Kontrast welcher höher ist als der rein Akustische, da sich Regionen in biologische Medien stärker in ihrer Absorption als in ihrer Reflektivität von Ultraschallwellen unterscheiden. Auf diese Weise können Verteilungen von Stoffen unterschiedlicher Absorption in einer Probe visualisiert werden.

## 3 OPUS-System

### 3.1 Systembeschreibung

Das OPUS-System (QPtoacoustic UltraSound) wurde in einer Industriekooperation mit InnoLas (Laserentwicklung) und GE-Gobal Research (Modifizierung eines konventionellen Ultraschallgerätes, Entwicklung der Bildrekonstruktion) entwickelt, wobei die PA-Bildgebung als Add-On zu einem konventionellen Ultraschall realisiert wurde, um auch die Ultraschallbildgebung zusätzlich nutzen zu können. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 1 skizziert. Dieses Gerät wurde im Rahmen eines Projektes für die medizinische Anwendung entwickelt und vom Bayerischen Staatsministerium für Wirtschaft, Verkehr und Technologie gefördert.

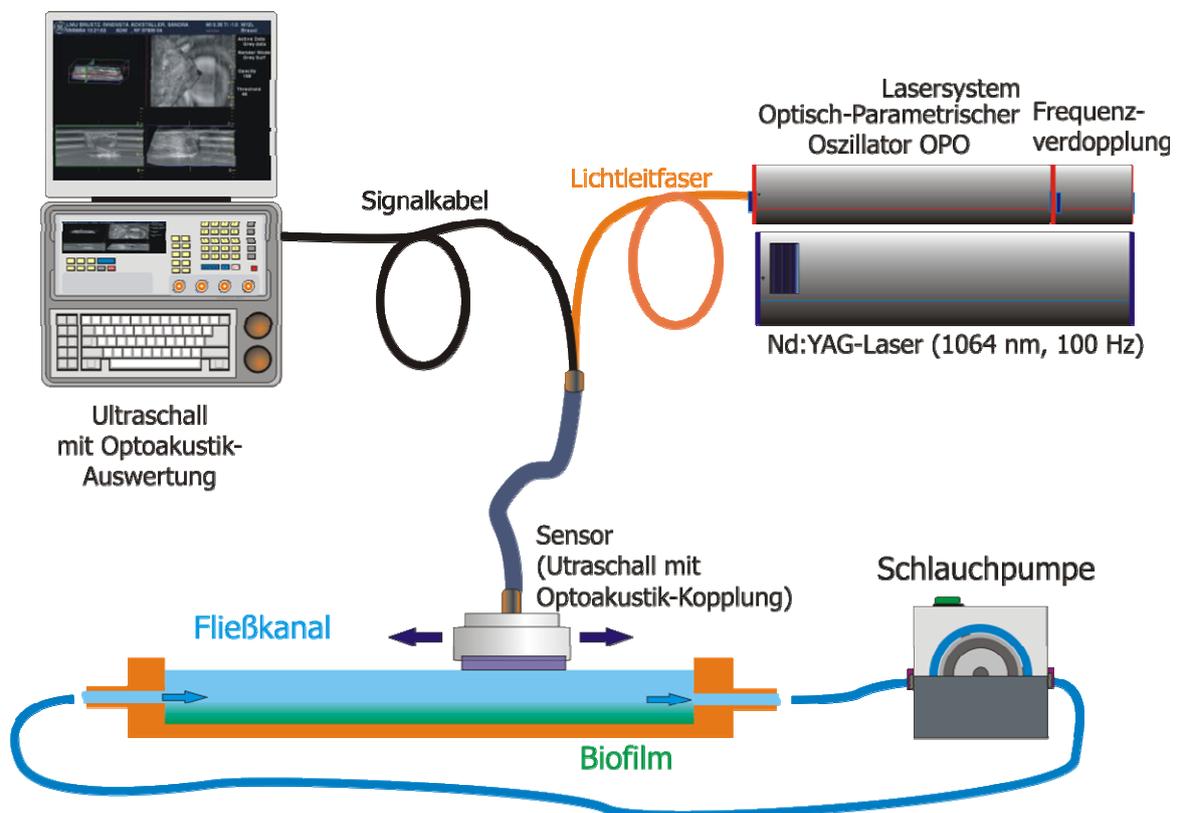
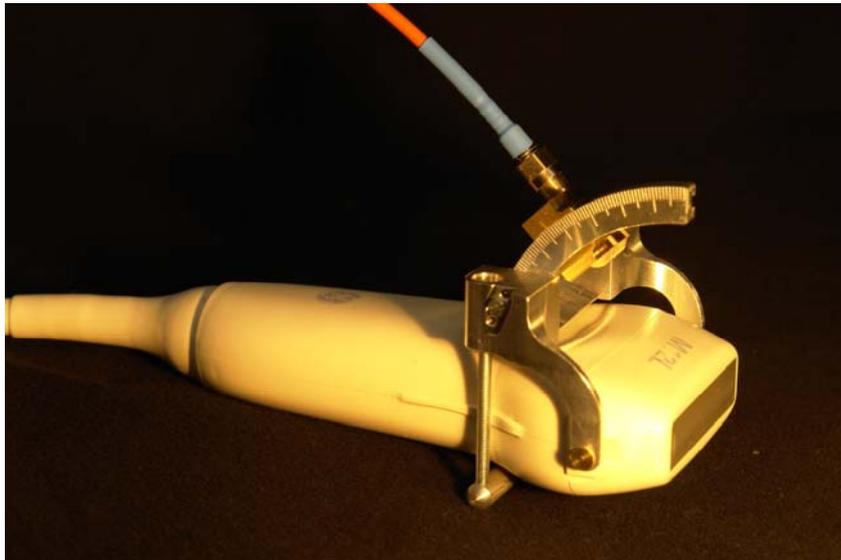


Abbildung 1 Schematischer Aufbau des kombinierten Ultraschall-PA Systems.

Als Lichtquelle dient ein frequenzverdoppelter Nd:YAG-Laser (@532 nm) (Spotlight Hybrid, InnoLas, Krailling, Deutschland) mit einer Repetitionsrate von 100 Hz und einer Pulsdauer von 15 ns. Die Besonderheit dieses Lasers, der von der Firma InnoLas eigens für dieses Projekt entwickelt wurde, liegt in der Hybridtechnik von Diodengepumpten Oszillator und Blitzlampen gepumpten Verstärker, welche die thermischen Energieschwankungen reduziert. Dem Laser ist eine Optisch-Parametrischer-Oszillator (OPO, versaScan-L. GWU, Erfstadt, Deutschland) nachgeschaltet, der wellenlängenabhängige Messungen im Naheninfrarobereich (700 nm – 870 nm) ermöglicht. Die Laserpulse werden faseroptisch zum Ultraschallkopf und dort in die Probe geleitet. Die Laserstrahlung tritt dabei in einem Winkel zur Probenoberfläche in die Probe ein. Die optische Einheit (siehe Abb. 2)

wurde so konstruiert, dass sie am den Schallkopf befestigt werden kann und über Linsen die Geometrie des Strahls verändern kann.

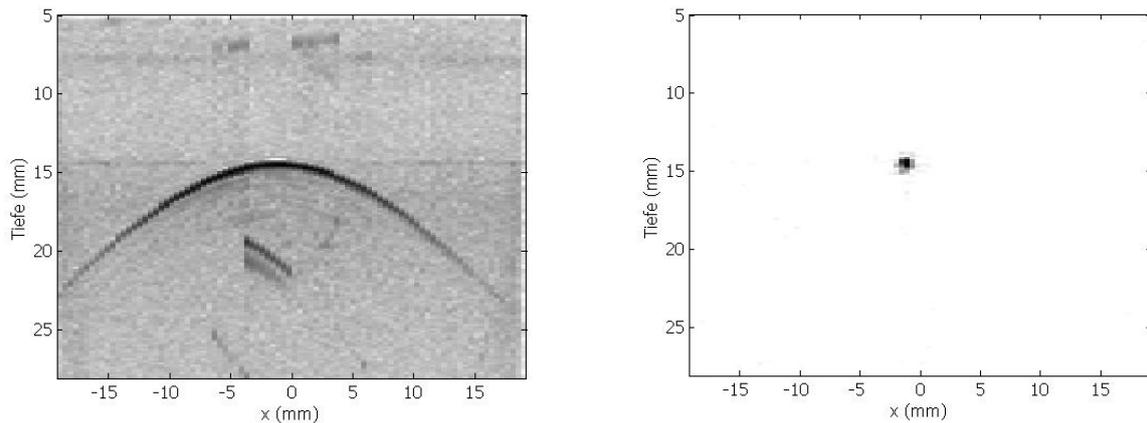


**Abbildung 2** Kombination eines konventionellen Ultraschallkopfes und einer einstellbaren optischen Einheit für die photoakustische Bildgebung.

Für die Detektion der Ultraschallwellen wird ein konventionelles Ultraschallgerät mit einer Bildrate von 83 Hz im Ultraschallmodus (Logiq9, GE-Global Research, Garching, Deutschland) und ein Schallwandler mit 190 Kanälen (M12L, GE-Global Research) verwendet. Zur Synchronisation des Lasers mit dem Ultraschall, werden Triggersignale des Ultraschallgeräts über eine vom Projektpartner GE entwickelte Triggereinheit umgeformt und zum Laser geleitet. Nachdem die A-Scans der Kanäle des Ultraschallkopfes nacheinander ausgelesen werden, wird bei einer Repetitionsrate des Lasers von 100 Hz während der Aufnahme eines Ultraschallbilds ein bis zwei photoakustische A-Scans aufgenommen. Dadurch ergibt sich eine photoakustische Bildrate von 1,1 Hz. Die Aufnahme ist so eingerichtet, dass sowohl ultraschall- als auch photoakustische Messungen durchgeführt werden können und die Bilder online überlagert dargestellt werden können.

### 3.5 Rekonstruktionsalgorithmus

Die photoakustischen Daten, die vom Ultraschallgerät ausgegeben werden, sind Rohdaten und müssen daher für das photoakustische Bild und die Evaluierung im Nachhinein rekonstruiert werden. An den zu verwendenden Algorithmus werden Ansprüche hinsichtlich Zeitaufwand und vor allem der geometrischen Rekonstruktion gestellt, d.h. wie groß wird der Absorber im Bild im Vergleich zur reellen Größe abgebildet. Aus der Evaluierung von vier zur Verfügung stehenden Algorithmen (Fourier Transformation, Hough Transformation, Delay-and-Sum und Circular Backprojection) hat sich der auf die Fourier Transformation basierende Algorithmus insbesondere in der Größenrekonstruktion als der für unsere Zwecke Optimale herausgestellt (Sperl *et al.*, 2007). Ein photoakustisches Rohdatenbild sowie das dazugehörige rekonstruierte Bild einer Punktquelle sind in Abbildung 3 a) und b) dargestellt.



a)

b)

**Abbildung 3** Photoakustisches Bild einer Bleichstiftmine mit einem Durchmesser vom 0,55 mm dargestellt als a) Rohdatenbild, b) Rekonstruiertes Bild.

### 3.3 Datenevaluierung

Für die quantitative Auswertung der Signale nach der Rekonstruktion, müssen die signifikanten Signale rausgefiltert werden. Zu diesem Zweck wird ein Schwellenwert aus dem Median und der dreifachen Standardabweichung eines Bildes berechnet. Werte die über diesem Schwellenwert liegen, werden (abzüglich des Schwellenwertes) zur Evaluierung verwendet und aufsummiert. Zu statistischen Zwecken wurde jeweils über fünf Messungen gemittelt.

## 4 Modelle

Bevor neue Systeme am realen Objekt zum Einsatz kommen, müssen sie zuerst an Modellen hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit getestet werden. Diese Modelle werden auch als Phantome bezeichnet und sollen die relevanten physikalischen Eigenschaften simulieren. D.h. im Falle von PAS müssen die Phantome sowohl akustische als auch optische Eigenschaften der realen Probe simulieren. Zur Simulation von biologischen Materialien werden die Eigenschaften von Wasser angenommen. Absorptionskoeffizienten werden von separaten Absorbern verschiedener Konzentration simuliert.

Die hier beschriebenen Tests wurden an Polyvinylalkoholgel-Phantomen (PVA) durchgeführt. Für die Herstellung einer wässrigen PVA-Lösung wurde PVA-Granulat mit einem Hydrolysegrad von 99,0–99,8 mol% und einem Molekulargewicht von ungefähr 145000 Da (Fluka, Buchs SG, Schweiz). Für klare Phantome wird der PVA-Lösung noch Dimethylsulfoxid (DMSO, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland) zugesetzt. Die PVA-Lösung wird für 2 h unter ständigem Rühren in einem Ölbad auf eine Temperatur von 140°C gebracht und anschließend in eine Form gegossen. Diese wird dann bei der mit DMSO versetzten Lösungen für 24 h eingefroren um die feste Form zu erhalten. Für die Streuphantome wird je nach gewünschtem Streukoeffizienten das Phantom in 24 h Zyklen für 12 h eingefroren und dazwischen aufgetaut. Eine genauere Beschreibung der Herstellung und der akustischen Charakterisierung ist in (Zell *et al.*, 2007) dargestellt. Diese Veröffentlichung entstand im Rahmen dieser Arbeit.

Die Absorptionskoeffizienten wurden unter Verwendung von Farbstoffen simuliert. Dazu wurde zum einen schwarze Zeichentusche (Pelikan, Hannover, Deutschland) zur Untersuchung einer Absorptionsreihe und somit der Unterscheidbarkeit von Absorptionsunterschieden verwendet. Zum anderen wurde Indocyanin Grün (ICG, Fluka, Buchs SG, Schweiz) zur Messung von Spektren sowie der Winkelabhängigkeit verwendet. Unter Winkelabhängigkeit versteht man dabei die Signalamplitude in Abhängigkeit von Einfallswinkel der Laserstrahlung in Bezug auf die Probenoberfläche. ICG weist in dem Wellenlängenbereich des OPUS-Systems zwei Maxima auf, welche in eine UV-Vis-spektroskopischen Messung bei 720 nm und 780 nm bestimmt wurden.

## 5 Versuchsaufbau

Für die Tests des Systems werden PVA-Phantome als Modelle verwendet. Diese haben Kanäle bei verschiedenen tiefen eingearbeitet. Der Ultraschallkopf steht bei den Versuchen auf dem Phantom senkrecht zur langen Seite der Kanäle (siehe Abb. 4 links). Die entstehenden Bilder sind somit Schnittbilder in die Tiefe über die gesamte Länge des Schallkopfes. Der Laserstrahl wird an der langen Seite des Schallkopfes in einem Winkel ins Phantom eingekoppelt. Die Winkel werden vom Lot auf die Phantomoberfläche aus bezeichnet. Es ergeben sich Winkel zwischen 20° (nahezu senkrechter Einfall) und 80° (flacher Eintrittswinkel). Es ist ersichtlich, dass für einen Absorber in einer bestimmten Tiefe, das Signal maximal sein sollte, wenn der Eintrittswinkel so gewählt, dass der Absorber in dem Abschnitt beleuchtet wird, der sich direkt unterhalb des Schallkopfes befindet (vgl. Abb. 4 rechts).

Um das Winkelverhalten zu Charakterisieren und den optimalen Winkel für künftige Messungen zu finden, wurde in verschiedenen Tiefen die Winkelabhängigkeit an mit ICG gefüllten Kanälen untersucht (siehe Abb. 5). Die Messung wurde bei einer Wellenlänge von 780 nm durchgeführt, wobei die ICG-Lösung bei dieser Wellenlänge einen Absorptionskoeffizienten von  $2,6 \text{ cm}^{-1}$  aufweist.

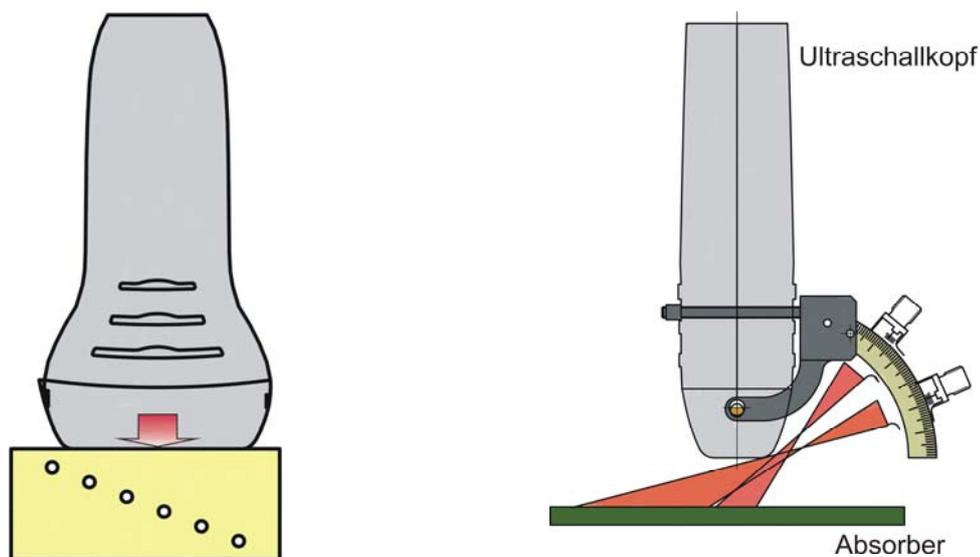
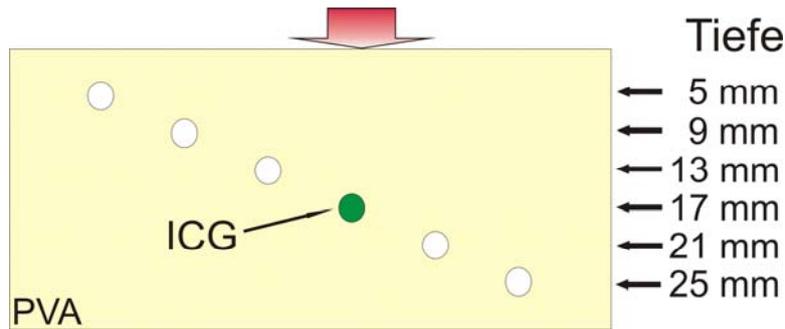


Abbildung 4 Schemata Phantomversuche (links) und photoakustische Einheit mit Ultraschallkopf und verschiedenen Winkleinstellungen (rechts).



**Abbildung 5** Schema eines PVA-Phantoms zu Untersuchung der Winkelabhängigkeit, spektralen Abhängigkeit und Absorptionsreihen mit Kanälen auf unterschiedlichen Tiefen.

Des Weiteren wurde das spektrale Verhalten einer ICG-Lösung mit einem Absorptionskoeffizienten von  $20,3 \text{ cm}^{-1}$  im Wellenlängenbereich von  $700 \text{ nm} - 870 \text{ nm}$  untersucht und mit den Resultaten aus UV-Vis-spektroskopischen Messungen verglichen.

Für analytische Messungen mit PAS ist es wichtig zu wissen, welche Absorptionsunterschiede mit der Messapparatur aufgelöst werden können. Dies wurde an (Absorptions-) Konzentrationsreihen von Tuschelösungen untersucht.

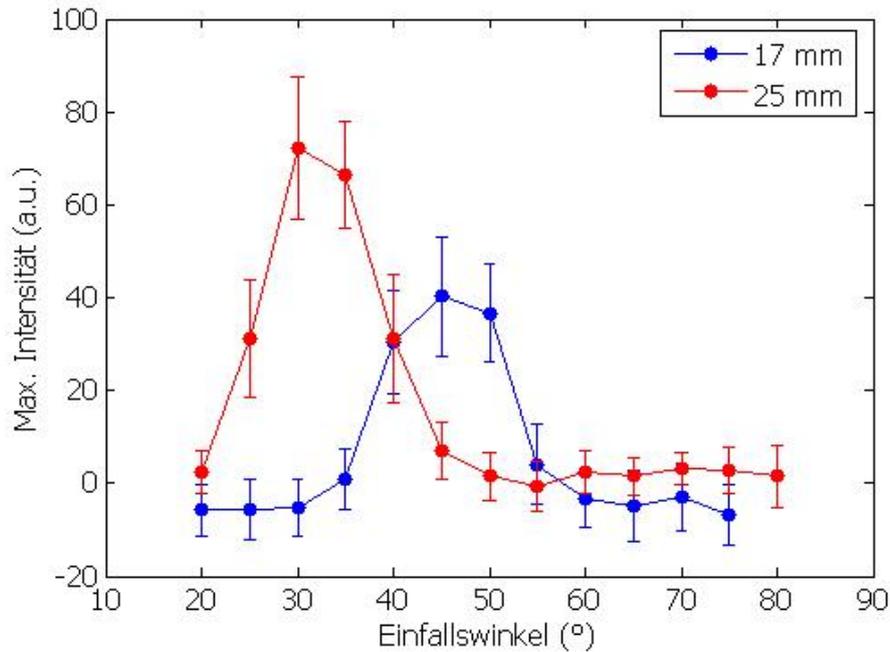
## 6 Ergebnisse und Diskussion

### 6.1 Winkelabhängigkeit

Die Ergebnisse, die sich aus der Messung der Winkelabhängigkeit ergeben haben sind in Abbildung 6 graphisch dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass es für jede Tiefe einen optimalen Winkel gibt, bei dem das Signal maximal ist. Aus praktischen Gründen, ist es sinnvoll, wenn ein größerer Tiefenbereich von ca. 1 cm untersucht werden soll, einen Winkel zu wählen der für alle Tiefen eine gleichermaßen gut Ausleuchtung bringt, anstatt für jeden Millimeter einen optimalen Winkel einzustellen. Dies ist auch wichtig für quantitative Messungen, um keinen Verlust an Vergleichbarkeit zu erleiden.

Für einen Tiefenbereich von bis zu 10 mm hat sich ein Winkel von  $60^\circ$  und zwischen 10 mm und 20 mm ein Winkel von  $45^\circ$  als sinnvoll erwiesen. Zu größeren Tiefen verschiebt sich das Gewicht nur noch gering weiter zu kleineren Winkeln. Bei der Wahl des Winkels, muss daher bei der Anwendung am Fließkanal dessen Tiefe beachtet werden, damit die zu untersuchenden Grenzflächen unterhalb des Sensors gut ausgeleuchtet sind.

Die im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Ergebnisse wurden in (Zell *et al.*, 2008) veröffentlicht.

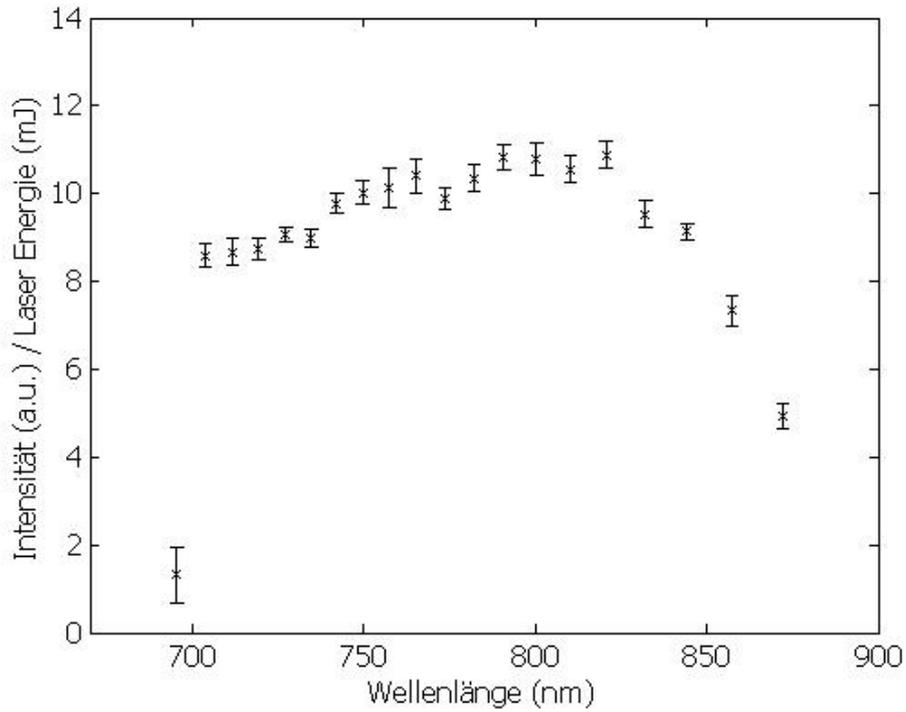


**Abbildung 6**      **Abhängigkeit des photoakustischen Signals vom Einfallswinkels der Laserstrahlung bei zwei verschiedenen Tiefen für ICG mit  $\mu_a = 2,6 \text{ cm}^{-1}$  bei 780 nm.**

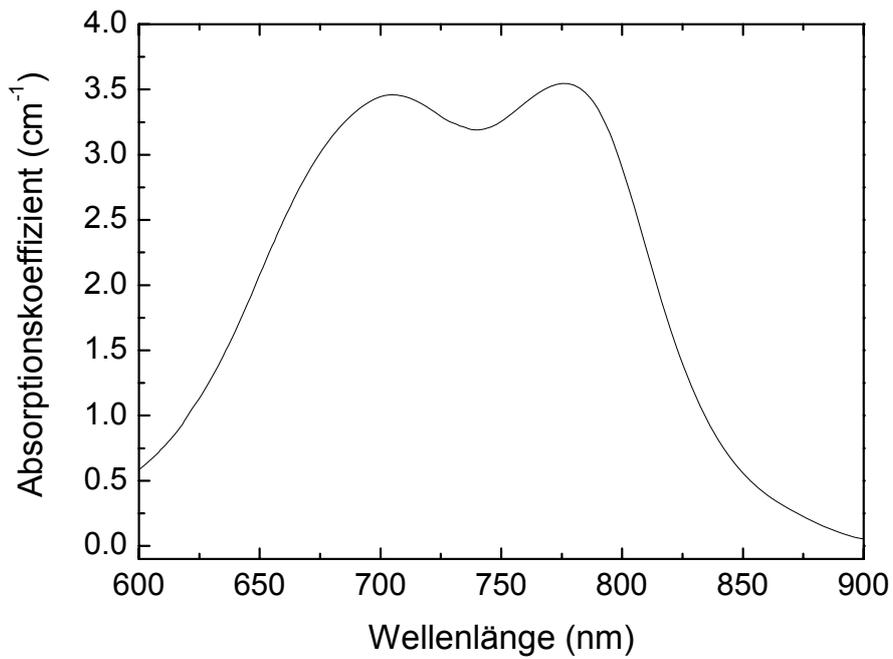
## 4.2 Spektrale Abhängigkeit

Abbildung 7 zeigt das mit dem OPUS-System gemessene Spektrum einer 50 mg/L ICG-Lösung. Auf Grund der Wellenlängenabhängigkeit der Energie des OPOs, wurden die gemessenen Signalintensitäten durch die der Wellenlänge zugehörigen Energie dividiert. Im Vergleich mit dem UV-Vis-Spektrum (siehe Abb. 8) ist zu erkennen, dass die höchste Absorption im Wellenlängenbereich von 700 nm bis 820 nm. Die im UV-Vis-Spektrum bestimmten Maxima sind jedoch nicht eindeutig identifizierbar. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Energie am Austritt des OPOs und nicht nach der Faser gemessen wurde, wodurch die Energiekorrektur ebenfalls in den Systematischen Fehler eingeht. Zum anderen hat auch die durch motorgesteuerte Kristalldrehung erreichte Wellenlänge einen Fehler von  $\pm 5 \text{ nm}$ . Die Wellenlänge kann jedoch bei diesem System nicht online überprüft werden.

Dieses Spektrum deutet darauf hin, dass eine spektrale Abhängigkeit des Absorptionskoeffizienten mit dem OPUS-System gemessen werden kann. Zudem zeigt die Messung, dass in dem mit dem OPUS-System zugänglichen Wellenlängenbereich ICG mit seinen Absorptionseigenschaften einen möglichen Farbstoff für die Färbung bzw. Markierung von Biofilmen darstellt.



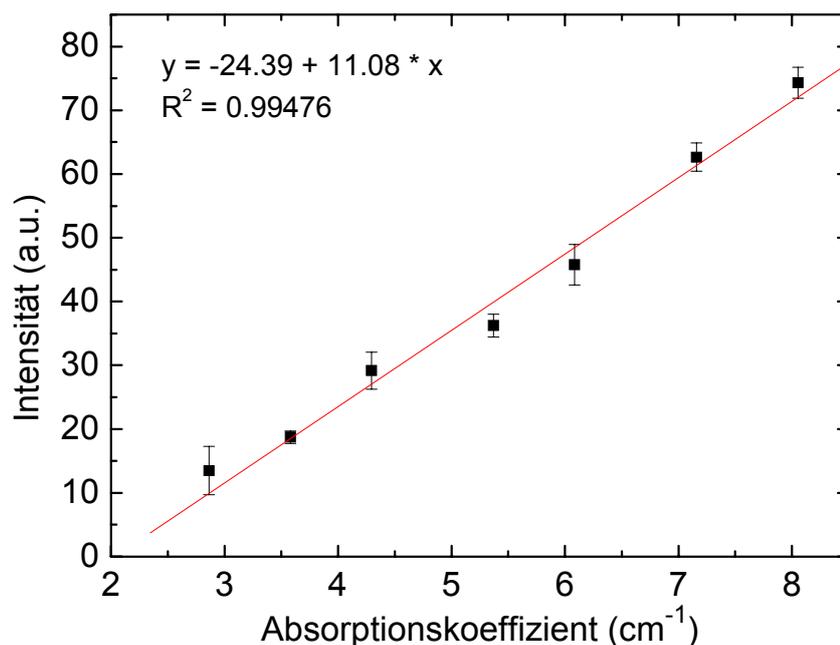
**Abbildung 7** Spektrum einer 50 mg/L ICG-Lösung korrigiert auf die Laserenergie der entsprechenden Wellenlänge.



**Abbildung 8** Spektrum einer 20 mg/L ICG-Lösung am UV-Vis-Spektrometer gemessen.

### 4.3 Absorptionsreihe

Ein wichtiger Aspekt für die quantitative Analyse mittels PAS ist die Unterscheidbarkeit bzw. Auflösung unterschiedlicher Absorptionskoeffizienten. Dies spielt ebenfalls eine Rolle bei der Separation von sich kontaktierenden Materialien unterschiedlicher Absorptionskoeffizienten, wie beispielsweise von Biofilm der auf einer ebenfalls absorbierenden Oberfläche wächst. Abbildung 9 zeigt die Resultate einer Messung von einer Reihe unterschiedlicher Absorptionskoeffizienten. Ähnlich wie in UV-Vis-spektroskopischen Messungen ist hier ein linearer Zusammenhang zwischen Absorptionskoeffizient und photoakustischem Signal klar zu erkennen. Dies spiegelt auch die in den Erläuterungen zum Photoakustischen Effekt beschriebene Proportionalität zwischen Druckamplitude und Absorptionskoeffizient wieder. Aus der Messung geht hervor, dass Unterschiede im Absorptionskoeffizienten von bis zu  $0,5 \text{ cm}^{-1}$  unterschieden werden können. Eine genauere Untergrenze der Unterscheidbarkeit könnte durch eine weitere Verfeinerung der Absorptionsstufen bestimmte werden.



**Abbildung 9** Photoakustische Signalamplitude einer Absorptionsreihe von einer schwarzen Tuschelösung bei 780 nm mit dem OPUS-System gemessen.

## 7 Zusammenfassung

Die mit dem OPUS-System durchgeführten Tests haben gezeigt, dass Absorber in verschiedenen Tiefen zweidimensional abgebildet werden können. Dazu muss ein Bildrekonstruktionsverfahren angewandt werden, welches die Rohdaten in die Strukturen der Absorber umformt. Dabei können sowohl spektrale Abhängigkeiten als auch Unterschiede in den Absorptionskoeffizienten gemessen werden. Dies ermöglicht quantitative analytische Untersuchungen mit dem System an absorbierenden Materialien wie beispielsweise Biofilm. Das Gerät bietet zudem die Möglichkeit simultan photoakustische und Ultraschallbilder aufzuzeichnen. Jedoch muss, um die Strukturen von Biofilm besser auflösen zu können, die Tiefenauflösung, die bei 400 µm bei einem Pixel liegt, erhöht werden. Dies konnte wegen der Steuerung des Lasers durch das Ultraschallgerät in dem zeitlichen Rahmen noch nicht geändert werden.

## Literatur

- Flemming H-C and Wingender J 2001 Biofilme - die bevorzugte Lebensform der Bakterien *Biologie in unserer Zeit* **3**
- Gusev V E and Karabutov A A 1993 Laser Optoacoustics (New York: AIP Press)
- Schmid T, Panne U, Adams J and Niessner R 2004 Investigation of Biocide Efficacy by Photoacoustic Biofilm Monitoring *Water Research* **38** 1189-96
- Sperl J I, Zell K, Menzenbach P, Haisch C, Ketzer S, Marquart M, Koenig H and Vogel M W 2007 Photoacoustic Image Reconstruction - A Quantitative Analysis *Proc. of SPIE* **6631**
- Zell K, Sperl J I, Vogel M W, Niessner R and Haisch C 2007 Acoustical properties of selected tissue phantom materials for ultrasound imaging *Phys. Med. Bio.* **52**
- Zell K, Vogel M W, Menzenbach P, Niessner R and Haisch C 2008 First Practical Experiences with the Optoacoustic/Ultrasound System OPUS *Proc. of SPIE* **6856**

## **Danksagung**

Aus diesem Projekt sind die zwei bereits im Bericht genannten Veröffentlichungen hervorgegangen. Des Weiteren sind noch Veröffentlichungen zur Rekonstruktion und über das System geplant. Zu diesem Erfolg hat auch die finanzielle Unterstützung der Max-Buchner-Stiftung, die mir im Rahmen meiner Doktorarbeit das Arbeiten an einem solch interessanten Thema gestattet hat, entscheidend beigetragen. Dafür möchte ich mich herzlich bei der Max-Buchner-Stiftung für den Erhalt des Stipendiums bedanken.