

УДК 691.175.5/.8

DOI: 10.21779/2542-0321-2023-38-4-89–97

*А.А. Рабаданова, К.Э. Рамазанова, З.А. Омарова, Ф.Ф. Оруджев*

## **Пьезоэлектрически индуцированные антибактериальные свойства пористой мембраны из поливинилиденфторида (ПВДФ)**

*Дагестанский государственный университет; Россия, 367000, г. Махачкала, ул. М. Гаджиева, 43а; rabadanova.alinka@mail.ru*

**Аннотация.** Совмещенным методом термоиндуцированной инверсии фаз и инверсии фаз из нерастворителя (NIPS–TIPS) с помощью техники ракельного ножа была получена пористая мембрана на основе сегнетоэлектрического полимера ПВДФ. Мембрана была охарактеризована методами сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), Ик-спектроскопии с Фурье преобразованием (Ик-Фурье) и были исследованы пьезосвойства. Доля электроактивной фазы составила 93 %. Антибактериальную активность исследовали на культуре кишечной палочки штамма *M-17 (B-2929 Escherichia coli M-17)* в ходе УЗ-стимуляции. Значение антимицробной активности составило 64 и 62 % в сравнении с контрольными экспериментами. Показано, что наиболее вероятными механизмами инактивации бактерий являются электростимуляция и генерация гидроксильных и супероксидных анионных радикалов.

**Ключевые слова:** пьезопотенциал, поливинилиденфторид (ПВДФ), ультразвуковая стимуляция, антибактериальные свойства.

### **Введение**

Бактериальные инфекции являются серьезной проблемой в медицине, особенно при лечении ран и ожогов: бактерии могут проникать в рану и вызывать воспаление, задерживая процесс заживления и увеличивая риск осложнений. Одним из известных подходов к лечению инфекционных заболеваний является лечение антибиотиками. Однако частое их использование может способствовать повышению устойчивости бактерий к ним, что в дальнейшем повлечет за собой возможные проблемы со здоровьем [1]. Весьма интересным является подход в изучении пьезоэлектрических композиционных биоматериалов, за счет своих функциональных возможностей. Пьезоэлектрические материалы могут быть органическими (в основном полимерами), генерирующими электрический заряд в ответ на приложенное механическое напряжение. Сонопьезоэлектрический эффект, который относится конкретно к пьезоэлектрическому эффекту, активируемый механическим напряжением, возникающим под действием ультразвуковых частот, проявляется в неорганических и органических наноматериалах [2]. Материал наделяется функцией мостового соединения между механическим напряжением и электрической энергией [3]. Локализованный электрический заряд накапливается на поверхности и тем самым влияет на потенциал клеточной оболочки.

Бактерии могут чувствовать окружающую среду и изменять свой фенотип в ответ на нее за счет влияния механической вибрации на поверхностную адгезию, пролиферацию и вирулентность. Однако о влиянии на поведение бактерий электрических сигналов, создаваемых электроактивным материалом, а не акустомеханических волн, почти не сообщалось. Разработка такого рода материалов [4], а именно обладающих пьезоэлектрической активностью, широко изучается в регенеративной медицине, главным образом для заживления ран посредством биопленок.

В многочисленных исследованиях [5; 6] сообщалось об инактивации бактерий посредством пьезокатализа с использованием пьезоэлектрической керамики. Однако известно, что пьезоэлектрическая керамика хрупкая, и это ограничивает ее применение по сравнению с полимерными материалами. Поливинилиденфторид (ПВДФ) – полукристаллический пьезоэлектрик, обладающий спонтанной поляризацией и высоким пьезоэлектрическим откликом [7]. Кроме того, полимер имеет левостороннюю ориентацию спирали, как и естественные пьезоэлектрики в организме человека (коллаген, хитин и эластин) [8]. Он характеризуется пьезоэлектричеством в сдвиговой моде и электрической дипольной составляющей, распределенной по всей молекуле. Скручивание полимерной пленки приводит к ориентации молекулярных диполей и генерации электрического заряда [9], что может обеспечить противомикробный эффект. Было продемонстрировано [10], что низкое напряжение, вырабатываемое вследствие пьезостимуляции, способствует пролиферации и восстановлению тканей. Мембрана на основе ПВДФ была использована в качестве раневой повязки, благодаря своим антибактериальным свойствам, способствующим заживлению ран [11; 12].

В статье представлены результаты синтеза пористой мембраны ПВДФ с высокой долей полярной электроактивной фазы. Также была изучена зависимость воздействия ультразвуковой стимуляции на пьезоотклик мембраны и ее антибактериальная активность на грамположительных бактериях.

#### Материалы и методы

В исследовании использовалась полимерная мембрана ПВДФ толщиной 100 мкм, полученная методом термоиндуцированной инверсии фаз из нерастворителя (NIPS-TIPS). Раствор полимера ПВДФ («ГАЛОПОЛИМЕР», Пермь, РФ) с концентрацией 20 мас. % был приготовлен в растворителе диметилсульфоксида (DMSO). Полученную смесь перемешивали в шейкере (Vortex) в течение 10 минут до однородной консистенции. Затем обрабатывали в нагретой ультразвуковой ванне до образования гомогенного раствора. Суспензию переносили на стеклянную пластину и с помощью ракеля толщиной 100 мкм проводили до однородного растекания по всей области пластинки. Затем полученную пленку погружали в ванну с водой на 10 минут для формирования фаз. Затем отправляли в сушильную камеру при 80 °С на 24 часа для удаления оставшегося растворителя.

Пьезоэлектрическую постоянную  $d_{33}$  измеряли на приборе YE2730A  $d_{33}$  METER. Измерения образца проводили по 5 раз и результат усредняли. Измерения методом ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием (ИК-Фурье) проводили на приборе Vertex70v (Bruker, Billerica, MA, USA) в режиме пропускания с 512 итерациями и разрешением  $1 \text{ см}^{-1}$ . Спектры флуоресценции раствора регистрировались на спектрофотометре Hitachi F-4500 при длине оптического пути 1.0 см при возбуждении длиной волны 310 нм и регистрации пика эмиссии флуоресценции при 430 нм через фиксированные промежутки времени. Спектры поглощения в УФ-видимой области регистрировались на спектрофотометре СФ-2000. Ультразвуковая обработка производилась в ванне мощностью 120 Вт при частоте 40 кГц. Мембрана  $3 \times 1$  см. Морфология образцов была охарактеризована с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ, Asprex Express). Для оценки антибактериальной активности образцов мембран ПВДФ в качестве тест-объекта использовали культуру кишечной палочки штамма M-17 (B-2929 *Escherichia coli* M-17) из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур («ГКПМ – Оболенск» ФБУН ГНЦ ПМБ).

### Результаты и обсуждение

Для проведения комплексного анализа морфологии была использована сканирующая электронная микроскопия. На рис. 1 представлены СЭМ-изображения мембраны ПВДФ при различных увеличениях.

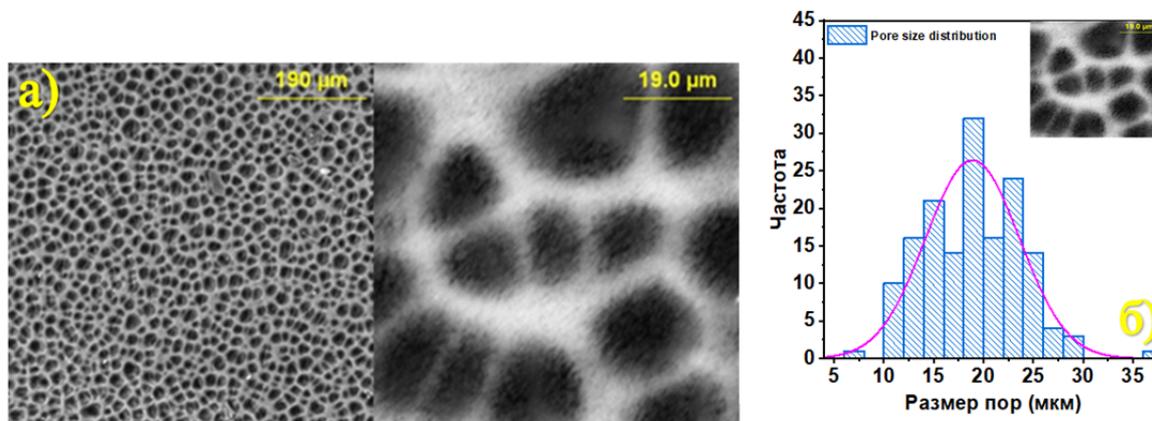


Рис. 1. а) СЭМ-изображения мембраны ПВДФ при различных увеличениях; б) Гистограмма распределения пор

Из снимков СЭМ можно увидеть, что мембрана имеет пористую структуру. Поры равномерно распределены по всей мембране и имеют квазисферическую форму. Образование пор или макропустот связано с вытеснением растворителя водой в процессе фазовой инверсии [13]. Также СЭМ-изображения были проанализированы с использованием программного обеспечения ImageJ для определения распределения пор по размерам. Из гистограммы распределения пор в мембране (рис. 1б) следует, что средний диаметр пор составляет порядка 20 мкм.

ПВДФ характеризуется 5 полиморфами ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ), среди которых  $\beta$  является наиболее электроактивной фазой, обладающей спонтанной поляризацией [14; 15]. В связи с этим необходимо было дать количественную оценку содержания полярных и неполярных фаз. Для расчетов количественных соотношений электроактивной и неполярных фаз использовали метод ИК-Фурье спектроскопии.

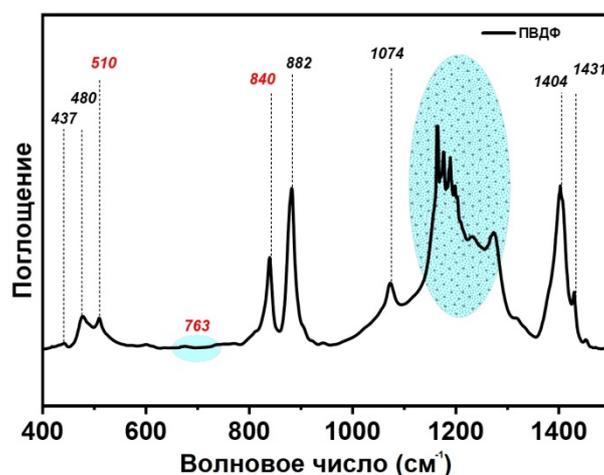


Рис. 2. ИК-Фурье спектр мембраны ПВДФ

На рис. 2 показаны ИК-Фурье спектры в диапазоне (от 400 до 1400)  $\text{см}^{-1}$ . Полосы поглощения, наблюдаемые при 976, 763, и 611  $\text{см}^{-1}$ , соответствуют неполярной  $\alpha$ -фазе ПВДФ, тогда как характерные пики при 1276, 1233 и 840  $\text{см}^{-1}$  соответствуют электроактивным  $\beta$ - и  $\gamma$ -фазам [16, 17]. Интенсивность всех полос поглощения, характеризующих неполярную  $\alpha$ -фазу, очень низкая, и спектр в основном описывается характеристическими полосами как  $\beta$ -, так и  $\gamma$ -фаз ПВДФ [18, 19].

Долю электроактивной фазы оценивали с помощью формулы:

$$F_{EA} = \frac{I_{EA}}{\left(\frac{K_{840^*}}{K_{763}}\right) * I_{763} + I_{EA}} * 100 \%,$$

где,  $I_{EA}$  и  $I_{763}$  – абсорбция при 840\* и 763  $\text{см}^{-1}$  соответственно;  $K_{840^*}$  и  $K_{763}$  – коэффициенты поглощения при соответствующих волновых числах, значения которых составляют  $7.7 \times 10^4$  и  $6.1 \times 10^4 \text{ см}^2 \text{ моль}^{-1}$  соответственно. Согласно уравнению, было оценено содержание электроактивной фазы в ПВДФ и установлено, что она составила 93.4 %.

### **Антибактериальный эффект воздействия импульсов пьезоэлектрического поля, генерируемого мембраной ПВДФ в отношении культуры бактерий *E. coli* M-17**

В качестве механического воздействия на мембраны ПВДФ для формирования импульсов пьезоэлектрического поля использовалась ультразвуковая стимуляция (УЗ). Культуральные свойства тест-объекта при росте на плотной питательной среде – круглые колонии кремоватого цвета с матовой поверхностью и ровными краями, морфологические и тинкториальные свойства – небольшие граммотрицательные палочки с закругленными концами. Суспензию бактерий тест-объекта получили из суточной культуры *E. coli* M-17 путем разведения (1:1000) стерильным физраствором (0.9 % NaCl) и разделили на 3 варианта обработки (по 10 мл):

**I вариант** – отрицательный контроль, в котором на протяжении эксперимента суспензия бактерий не имела контакта с мембранами ПВДФ и не была подвержена воздействию УЗ (контроль), необходим для определения исходного количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл суспензии;

**II вариант** – суспензия бактерий подверженная воздействию УЗ в отсутствии контакта с мембранами ПВДФ (УЗ),

**III вариант** – суспензия бактерий, подверженная воздействию УЗ в присутствии мембраны ПВДФ (УЗ + ПВДФ).

После обработки УЗ (15 мин) по 1 мл суспензии микроорганизмов из каждого варианта инокулировали методом горячей заливки в 20 мл стерильного, расплавленного и остуженного до  $t \sim 40\text{--}42 \text{ }^\circ\text{C}$  питательного агара (МПА). Инкубировали полученные образцы в чашках Петри при  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  в течение 36 часов. Полученные микроорганизмы по культуральным, тинкториальным и морфологическим свойствам соответствуют тест-культуре. Результаты эксперимента представлены на рисунках 3 и 4.

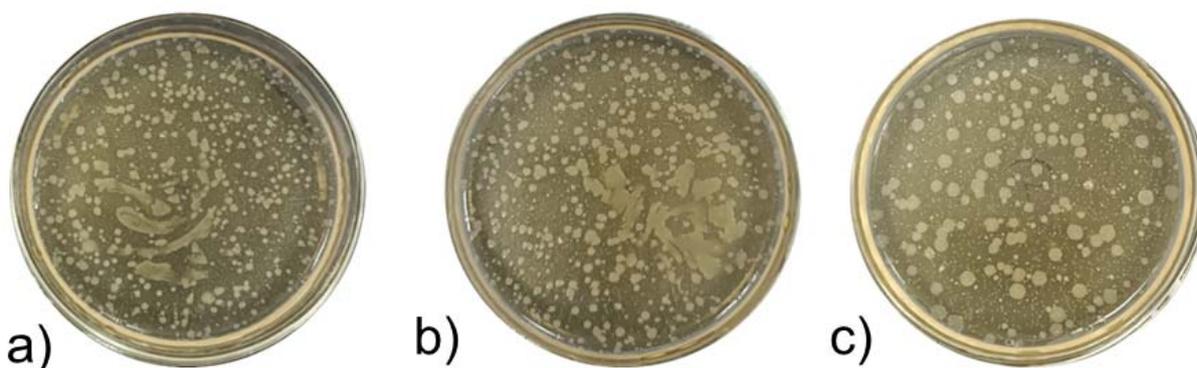


Рис. 3. Изображение чашек с колониями *E. coli* через 36 часов после инокуляции. Обозначение а) соответствует суспензии *E. coli* M-17 без контакта с ПВДФ и воздействия УЗ, б) – без ПВДФ и подверженная УЗ, в) подверженная УЗ в присутствии ПВДФ

Оценку антибактериальных свойств импульсов пьезоэлектрического поля осуществляли по количеству жизнеспособных бактерий *E. coli* в единице объема суспензии после контакта с мембранами ПВДФ в сравнении с исходным их количеством. Уровень антимикробной активности (AR, %) рассчитывали по формуле:

$$AR = 100 - \frac{КОЕ_{\text{эксперимент}}}{КОЕ_{\text{контроль}}} \times 100 \%$$

Для подсчета колоний использовали метод определения колониобразующих единиц (КОЕ) посредством программ Image J и DLgram (Nanoparticles).

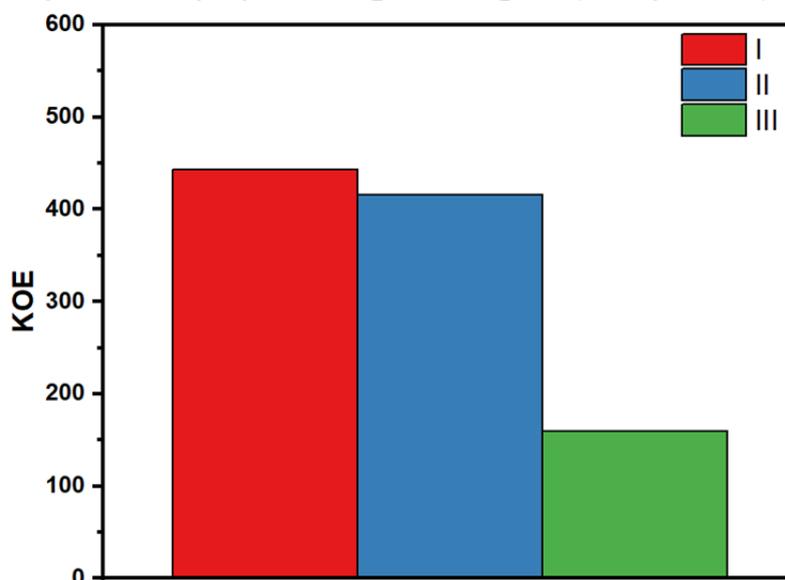


Рис. 4. Количество КОЕ *E. coli* M-17 в вариантах I–III через 36 часов после инокуляции

В 1 мл полученной нами суспензии (контроль) количество бактерий соответствовало 443 КОЕ (рис. 4, I). Обработка УЗ в течение 15 мин (вариант II) на количество жизнеспособных бактерий существенно не повлияла, величина AR составила 6 % (рис. 4, II). В противоположность этому, воздействие импульсов пьезоэлектрического поля, генерируемых мембранами ПВДФ при УЗ стимуляции, оказало значительное влияние на жизнеспособность бактерий *E. coli* (рис. 4, III). Значение AR в этом варианте составило 64 % при сравнении с контролем и 62 % в сравнении с вариантом УЗ без кон-

такта с мембраной ПВДФ. Полученные результаты подтверждают, что пьезоэлектрические мембраны ПВДФ проявляют уникальные свойства, которые могут быть использованы для ингибирования роста и уничтожения бактерий. Пьезоэлектрические мембраны обладают способностью генерировать электрическое поле под воздействием механических напряжений. Это означает, что при деформации мембран возникают электрические заряды и поля, которые могут воздействовать на бактерии. Изучение природы этого воздействия – отдельная и интересная задача для исследования. Электрическое поле, возможно, негативно влияет на целостность клеточных мембран бактерий, что в свою очередь влияет на метаболизм и приводит к нарушению физико-химического равновесия, и, как следствие, к их гибели [20].

Известно, что пьезоэлектрические материалы могут воздействовать на бактерии посредством различных процессов, таких, как электропорация [8], индуцированная трансмембранным током, и генерация активных форм кислорода (АФК) [21]. Для определения возможного механизма было проведено измерение пьезоэлектрической постоянной  $d_{33}$  мембраны с помощью квазистатического пьезоэлектрического тестера YE2730A  $d_{33}$  METER. Результат показал, что величина  $d_{33}$  составляет порядка 1.5 пКл/Н.

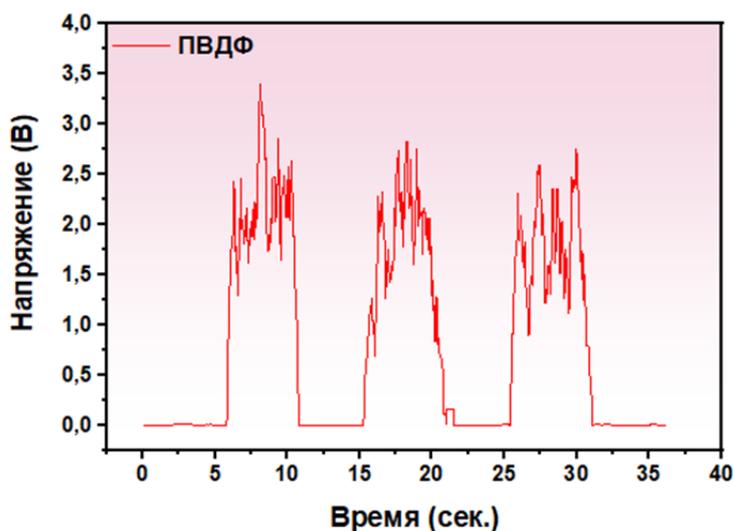


Рис. 5. Напряжение разомкнутой цепи наногенератора для пленки ПВДФ

Для подтверждения возникновения пьезоэлектрического потенциала при ультразвуковом воздействии был создан пьезоэлектрический наногенератор. На рисунке 5 изображены сигналы, полученные с помощью наногенератора. Механическое воздействие производилось с использованием УЗ ванны мощностью 120 Вт и частотой 40 кГц, которая также использовалась для антибактериальных экспериментов. Продолжительность и задержка между стимуляциями составляли 5 секунд. Как видим, максимальный пьезопотенциал, генерируемый при этом, составляет порядка 3.5 В. Однако при этом не исключена и генерация АФК в процессе УЗ стимуляции.

В наших предыдущих работах было показано, что основным АФК являются гидроксильные и супероксидные анионные радикалы [22; 23]. Для обнаружения возможных АФК ( $\cdot\text{OH}$  и  $\text{O}_2\cdot^-$ ) в процессе УЗ стимуляции была использована флуоресцентная и УФ-видимая спектроскопия с использованием терефталевой кислоты и хлорид нитросинего тетразолия (NBT) в качестве молекулярных зондов соответственно. Результаты представлены на рисунке 6. Отсутствие явного пика в начале эксперимента (рис. 6а)

указывает на то, что  $\cdot\text{OH}$  нет в реакционном растворе. Однако после 15 минут УЗ стимуляции характерный пик флуоресценции при длине волны 425 нм повышается из-за реакции молекул терефталевой кислоты с  $\cdot\text{OH}$  с образованием флуоресцентного 2-гидрокситерефталевой кислоты.

На рис. 6б характерный пик поглощения на длине волны 259 нм непрерывно уменьшается по ходу эксперимента из-за образования формазана в результате реакции между NBT и  $\cdot\text{O}_2^-$ . Учитывая то, что пиковая интенсивность на длине волны 259 нм медленно уменьшается со временем реакции, генерацию  $\cdot\text{O}_2^-$  также нельзя игнорировать. Таким образом, эти результаты подтверждают, что оба радикала  $\cdot\text{OH}$  и  $\cdot\text{O}_2^-$  образуются в процессе УЗ стимуляции.

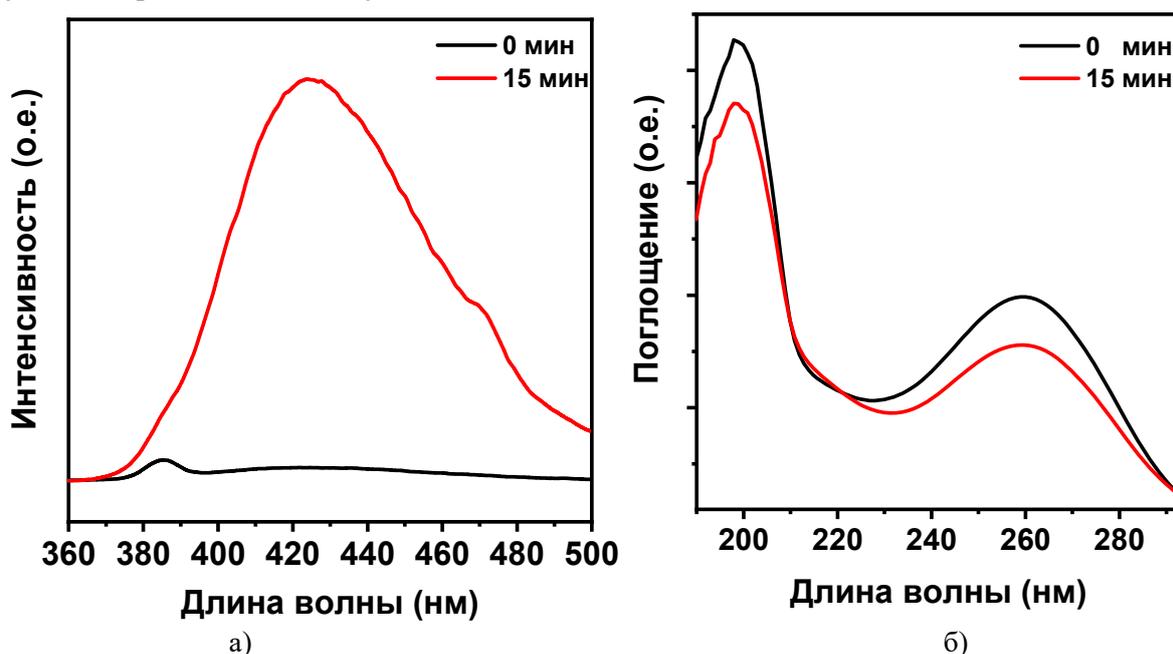


Рис. 6. а) Спектры флуоресценции 2-гидрокситерефталевой кислоты для обнаружения  $\cdot\text{OH}$ . б) УФ-видимые спектры поглощения раствора хлоридом нитросинего тетразолия для обнаружения  $\cdot\text{O}_2^-$

### Выводы

Таким образом мы продемонстрировали, что совмещением методов термоиндуцированной инверсии фаз и инверсии фаз из нерастворителя (NIPS-TIPS) с помощью техники рабельного ножа можно получить высокопористую мембрану ПВДФ с очень высокой долей электроактивной фазы (более 90 %). Показали, что воздействие импульсов пьезоэлектрического поля, генерируемых мембраной ПВДФ при УЗ стимуляции, оказало значительное влияние на жизнеспособность бактерий *E. Coli*. Значение антимикробной активности составило 64 и 62 % в сравнении с контрольными экспериментами. Данные о генерации пьезопотенциала в условиях УЗ стимуляции и эксперименты по регистрации с помощью молекулярных зондов АФК продемонстрировали, что наиболее вероятными механизмами инактивации бактерий являются электростимуляция и генерация гидроксильных и супероксидных анионных радикалов. Полученные результаты подтверждают, что пьезоэлектрические мембраны ПВДФ проявляют уникальные свойства, которые могут быть использованы для ингибирования роста и уничтожения бактерий.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ, проект № 22-73-10091.

### Литература

1. *Labricciosa F.M. et al.* Emergency surgeons' perceptions and attitudes towards antibiotic prescribing and resistance: a worldwide cross-sectional survey // *World journal of emergency surgery*. 2018. Vol. 13, no. 1. – Pp. 1–9.
2. *Marino A. et al.* Piezoelectric effects of materials on bio-interfaces // *ACS applied materials & interfaces*. 2017. Vol. 9, no. 21. – Pp. 17663–17680.
3. *Chen D. et al.* Recent development and perspectives of optimization design methods for piezoelectric ultrasonic transducers // *Micromachines*. 2021. Vol. 12, no. 7. – P. 779.
4. *Orudzhev F. et al.* Ultrasound and water flow driven piezophototronic effect in self-polarized flexible  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> containing PVDF nanofibers film for enhanced catalytic oxidation // *Nano Energy*. 2021. Vol. 90. – P. 106586.
5. *Feng J. et al.* Significant improvement and mechanism of ultrasonic inactivation to escherichia coli with piezoelectric effect of hydrothermally synthesized t-BaTiO<sub>3</sub> // *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2018. Vol. 6, no. 5. – Pp. 6032–6041.
6. *Masimukku S. et al.* High efficient degradation of dye molecules by PDMS embedded abundant single-layer tungsten disulfide and their antibacterial performance // *Nano Energy*. 2018. Vol. 46. – Pp. 338–346.
7. *Orudzhev F. et al.* 1D/2D Electrospun Polyvinylidene Fluoride Nanofibers/Carbon Flakes Hybrid Nonmetal Polymeric Photo- and Piezocatalyst // *ChemistrySelect*. 2023. Vol. 8, no. 43. – P. e202303318.
8. *Ando M. et al.* Piezoelectric antibacterial fabric comprised of poly (l-lactic acid) yarn // *Japanese Journal of Applied Physics*. 2017. Vol. 56, no. 10. – P. 10PG01.
9. *Wang X., Dai X., Chen Y.* Sonopiezoelectric Nanomedicine and Materdicine // *Small*. 2023. – P. 2301693.
10. *Song X. et al.* Nanomedicine-Enabled Sonomechanical, Sonopiezoelectric, Sonodynamic and Sonothermal Therapy // *Advanced Materials*. 2023. – P. 2212259.
11. *Shuai C. et al.* Functionalized BaTiO<sub>3</sub> enhances piezoelectric effect towards cell response of bone scaffold // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2020. Vol. 185. – P. 110587.
12. *Tong W. et al.* A highly sensitive hybridized soft piezophotocatalyst driven by gentle mechanical disturbances in water // *Nano Energy*. 2018. Vol. 53. – Pp. 513–523.
13. *Magomedova A.G. et al.* Combination NIPS/TIPS Synthesis of  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and  $\alpha/\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Doped PVDF Composite for Efficient Piezocatalytic Degradation of Rhodamine B // *Molecules*. 2023. Vol. 28, no. 19. – P. 6932.
14. *Orudzhev F. et al.* Porous Hybrid PVDF/BiFeO<sub>3</sub> Smart Composite with Magnetic, Piezophotocatalytic, and Light-Emission Properties // *Catalysts*. 2023. Vol. 13, no. 5. – P. 874.
15. *Orudzhev F.F. et al.* Hydrogen Bond-Induced Activation of Photocatalytic and Piezophotocatalytic Properties in Calcium Nitrate Doped Electrospun PVDF Fibers // *Polymers*. 2023. Vol. 15, no. 15. – P. 3252.
16. *Kanik M. et al.* Spontaneous high piezoelectricity in poly (vinylidene fluoride) nanoribbons produced by iterative thermal size reduction technique // *ACS nano*. 2014. Vol. 8, no. 9. – Pp. 9311–9323.
17. *Cai X. et al.* A critical analysis of the  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  phases in poly (vinylidene fluoride) using FTIR // *RSC advances*. 2017. Vol. 7, no. 25. – Pp. 15382–15389.

18. *Rabadanova A. et al.* Piezo-, photo- and piezophotocatalytic activity of electrospun fibrous PVDF/CTAB membrane // *Chimica Techno Acta*. 2022. Vol. 9, № 4. – P. 20229420.
19. *Tewatia K. et al.* Enhanced optical properties of recycled Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> reinforced in PVDF nanocomposite thin films for energy harvesting // *Materials Today: proceedings*, 2023.
20. *Khalil A. M. et al.* Innovative antibacterial electrospun nanofibers mats depending on piezoelectric generation // *Scientific Reports*. 2022. Vol. 12, no. 1. – P. 21788.
21. *Tan G. et al.* Surface-selective preferential production of reactive oxygen species on piezoelectric ceramics for bacterial killing // *ACS applied materials & interfaces*. 2016. Vol. 8, no. 37. – Pp. 24306–24309.
22. *Edge R., Truscott T.G.* The reactive oxygen species singlet oxygen, hydroxy radicals, and the superoxide radical anion—examples of their roles in biology and medicine // *Oxygen*. 2021. Vol. 1, no. 2. – Pp. 77–95.
23. *Campos Chiste R. et al.* Superoxide anion radical: generation and detection in cellular and non-cellular systems // *Current medicinal chemistry*. 2015. Vol. 22, no. 37. – Pp. 4234–4256.

*Поступила в редакцию 23 ноября 2023 г.*

*Принята 7 декабря 2023 г.*

UDC 691.175.5/.8

DOI: 10.21779/2542-0321-2023-38-4-89–97

### **Piezoelectrically-Induced Antibacterial Properties of Porous Polyvinylidene Fluoride (PVDF) Membrane**

*A.A. Rabadanova, K.E. Ramazanova, Z.A. Omarova, F.F. Orudzhev*

*Dagestan State University; Russia, 367000, Makhachkala, M. Gadzhiev st., 43a; rabadanova.alinka@mail.ru*

**Abstract.** Using the doctor blade technique, a porous membrane made of PVDF polymer was prepared through a combination of thermally induced phase inversion and non-solvent phase inversion method (NIPS-TIPS). The membrane underwent characterization via scanning electron microscopy (SEM) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Additionally, its piezoelectric properties were investigated. The electroactive phase was found to be 93 %. The antibacterial activity was investigated on the culture of *Escherichia coli* strain M-17 (B-2929 *Escherichia coli* M-17) during ultrasonic stimulation. The antimicrobial activity was found to be 64 % and 62 % compared to control experiments. The study suggests that bacterial inactivation is most likely due to electrostimulation and the generation of hydroxyl and superoxide anion radicals.

**Keywords:** piezopotential, polyvinylidene fluoride (PVDF), ultrasonic stimulation, antibacterial properties.

*Received 23 November, 2023*

*Accepted 7 December, 2023*