

ИЗУЧЕНИЕ ЭЛЕКТРОКИНЕТИКИ В ЧИП-ФОРМАТАХ С ИТО МИКРОЭЛЕКТРОДАМИ ОКТАГОНАЛЬНОГО И ПРЯМОУГОЛЬНОГО ТИПА ДЛЯ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

²Т. И. Ореховская, ¹В. А. Лобан, ¹А. И. Драпеза, ²С.К.Лазарук,
¹А.И. Хмельницкий, ¹Д. А. Руденко, ³Г. А. Скороход, ³Е. И. Гудкова

¹Белорусский государственный университет

²Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники

³Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск, Республика Беларусь

*Показано, что для 5 % раствора глюкозы в процессе последовательного воздействия электрических режимов микроорганизмы *S.albicans* могут быть сконцентрированы вблизи осевой линии проводящих микроэлектродных дорожек практически на всей поверхности чип-формата прямоугольного типа. Отмечено, что при аналогичных с 5 %-ым раствором глюкозы электрических режимах воздействия, на всей поверхности ИТО-микроэлектродов в среде ТСБ концентрируется приблизительно 70 % микроорганизмов *S.albicans* и 30 % – в зазоре, что обусловлено, скорее всего, более высокой проводимостью используемой среды ТСБ (6,0 мС/см). Изучено влияние электрических режимов на изменение направления и скорости электрокинетического перемещения микроорганизмов *S.aureus* в среде ТСБ путем регистрации и PIV-обработки видеоматериалов с использованием октагонального чип-формата. Показано, что при параметрах электрического режима ($U_{см} = -0,6 В$; $U_{пер} = 7,0 В$; $f = 49,6 кГц$) увеличиваются скорости перемещения микроорганизмов *S.aureus* и происходит более плотная локализация конвекционно-диффузионного транспорта в верхней части центрального электрода.*

Ключевые слова: электрокинетика, конвекционно-диффузионный транспорт, PIV-анализ, 5 % раствор глюкозы, среда ТСБ, прямоугольный и октагональный чип-формат, микроорганизмы *S.aureus* и *S.albicans*

THE STUDY OF ELECTROKINETIC IN THE CHIP FORMATS WITH THE ITO MICROELECTRODES OCTAGONAL AND RECTANGULAR TYPE FOR THE CONCENTRATION OF MICROOGANISMS

²T. I. Orekhovskaya, ¹V. A. Loban, ¹A. I. Drapeza, ²C. K. Lazaruk,
¹A. I. Khmelnitsky, ¹D. A. Rudenko, ³G. A. Skorokhod, ³E. I. Gudkova

¹Belarusian State University

²Belarusian State University of Informatics and Radioelectronics

³Belorussian State Medical University
Minsk, Republic of Belarus

It is shown that for 5 % glucose solution in the process of successive exposure to electrical regimes, C. albicans microorganisms can be concentrated near the axial line of conducting microelectrode paths practically on the whole surface of a chip-format of rectangular type. It is noted that in the case of electrical exposure regimes analogous to the 5 % solution of glucose, approximately 70 % of C.albicans microorganisms concentrate on the whole surface of ITO microelectrodes in the medium of TSB, and 30 % – in the gap, which is most likely due to the higher conductivity of the used medium of TSB (6.0 mS / cm). The effect of electric regimes on the change in the direction and rate of electrokinetic movement of S. aureus microorganisms in the TSC medium was studied by recording and PIV processing of video materials using an octagonal chip format. It is shown that at the parameters of the electrical regime ($U_{cm} = -0.6$ V, $U_{per} = 7.0$ V, $f = 49.6$ kHz), the rates of movement of S. aureus microorganisms increase and a more dense localization of convection-diffusion transport occurs in the upper part of the central electrode.

Keywords: electrokinetics, convection-diffusion transport, PIV-analysis, 5% glucose solution, medium TSB, rectangular and octagonal chip format, microorganisms S.aureus and C.albicans

E-mail: drapeza@bsu.by

Введение

Наиболее перспективным и альтернативным направлением научного приборостроения в области создания информационных технологий для ускоренного обнаружения и дифференциации микроорганизмов является создание портативных микрофлидных чип-анализаторов аппаратно-программного типа на основе биопроцессорных чип-форматов.

Для создания биопроцессорных чип-форматов требуется всестороннее изучение электрокинетического транспорта живых клеток, с учетом состава применяемых питательных сред, предлагаемых топологических рисунков микроэлектродных конструкций и их материала, параметров электрического режима для реализации конвективно-диффузионного транспорта клеток в заданные области, поиск путей фиксации и сохранения полученных условий в питательной среде, например, при сепарации и концентрировании клеток [1–4].

Поэтому целью настоящей работы является изучение электрокинетики в чип-форматах с ITO (Indium-Tin-Oxide) микроэлектродами октагонального и прямоугольного типа для концентрирования микроорганизмов.

Материалы и методы исследований

Для проведения электрокинетических исследований использовали разведения 10^6 КОЕ/мл односуточных культур микроорганизмов *C.albicans* и *S.aureus* в 5 %-ом растворе глюкозы и триптиказо-соевом бульоне (ТСБ). Исследование проводили на основе планарно-емкостных чип-форматов октагонального и прямоугольного типа (рис. 1).

Толщина ITO слоя в 100 нм была получена на стеклянной подложке с помощью высокочастотного (ВЧ) магнетронного распыления в вакууме мишени из сплава In(90 %)-Sn(10 %) в газовой смеси аргона Ar и кислорода O_2 (соотношение 90 %: 10 %). Режимы получения пленки: давление $2.5 \cdot 10^{-1}$ Па, температура подложки 150 °С, мощ-

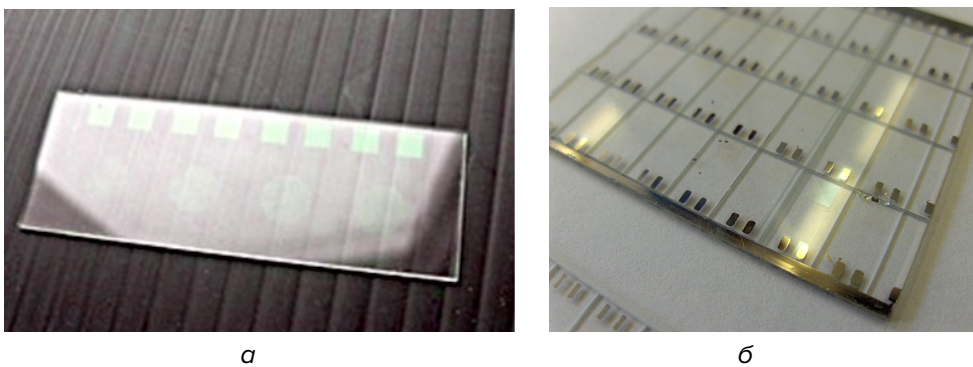


Рис. 1. Фотографии общего вида планарных чип-форматов с ИТО микроэлектродами октагонального (а) и прямоугольного (б) вида

ность ВЧ магнетронного разряда 300 Вт, время нанесения пленки – 2 часа. Измеренные характеристики ИТО микроэлектродов: удельное сопротивление $150 \pm 25 \text{ Ом} \cdot \text{см}$, оптическое пропускание в видимом диапазоне света составляет более 80 %.

Топологический рисунок микроэлектродных конструкций формировался технологиями фотолитографии. Полный размер топологического рисунка чувствительной области чип-формата в виде эквидистантной спирали Архимеда для октагональной структуры составлял 6 мм в диаметре, а прямоугольной – $4 \times 4 \text{ мм}$. Для октагональной структуры ширина электрода равна ширине зазора и имеет размер 50 мкм. Прямоугольная структура имеет одинаковые размеры электрода и зазора, которые равны 25 мкм.

Для проведения электрокинетических исследований была использована экспериментальная установка аппаратно-программного типа [5] и одноразовая измерительная ячейка (рис. 2, а, б), разработанная для работы с ней. Объектив цифровой фотокамеры был сфокусирован вблизи исследуемой микроэлектродной поверхности.

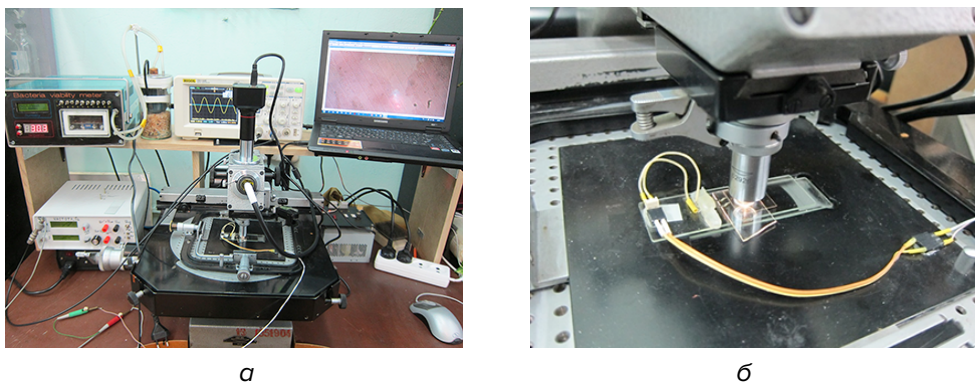


Рис. 2. Фотографии общего вида:
а – экспериментальной установки; б – одноразовой измерительной ячейки

Функциональные возможности и характеристики экспериментальной установки приведены в указанной работе [5]. Одноразовые ячейки, изготовленные для октагонального и прямоугольного чип-форматов, имеют соответственно объем приблизительно 4,0 мкл и 2,3 мкл. Для стенок камеры ячейки использовались кольца высотой $h = 80 \text{ мкм}$ с внутренними диаметрами 8 мм и 6 мм для октагональных и прямоугольных конструкций чип-форматов соответственно. Внешние диаметры колец были соответственно равны 10 мм и 8 мм. Верхняя часть камер ячеек с исследуемыми растворами закрывались покровным стеклом.

Методика работы с экспериментальной установкой состоит в выборе и соответствующей подготовке среды, изготовлении одноразовых измерительных ячеек для проведения экспериментов, адекватном заполнении ячеек и закрытии камеры ячейки покровным стеклом (без воздушных пузырей и подтеков), получении соответствующих видеоматериалов в исследуемой области чип-формата и программной их обработке для получения набора фотоматериалов, которые используют для вычисления направлений и скоростей микрожидкостных потоков клеток с помощью программного приложения PIV (Particle Image Velocimetry) к MATLAB (7.10.0, R2 010a), дополнительной обработке фотоматериалов графическим редактором PhotoMix, по которым проводят анализ режимов управления электрокинетическим транспортом клеток на предмет пригодности исследуемой среды и конструкции чип-формата для возможного их использования в целях концентрирования и сепарации клеток.

Результаты исследований и обсуждение

Исследования электрокинетики перемещения микроорганизмов *S.albicans* были проведены в питательных средах (ТСБ, 5 %-ый раствор глюкозы) с использованием прямоугольных конструкций чип-форматов. Значения проводимости 5 %-го раствора глюкозы и среды ТСБ на частоте 1 МГц были равны 64,0 мкСм/см и 6,0 мСм/см соответственно.

Электрические режимы задавались с помощью функционального генератора, входящего в состав установки [5], и подавались на контакты исследуемого чип-формата в режиме «сумматора». Схемотехнически данный режим работы поясняется с помощью рис. 3. Указанный режим позволяет поддерживать на одном из электродов исследуемого чипа всегда нулевой потенциал. При этом на втором электроде с помощью генераторов постоянного и переменного напряжений задаются различные электрические режимы, обеспечивающие электрокинетический транспорт исследуемых клеток конвекционно-диффузионного типа.

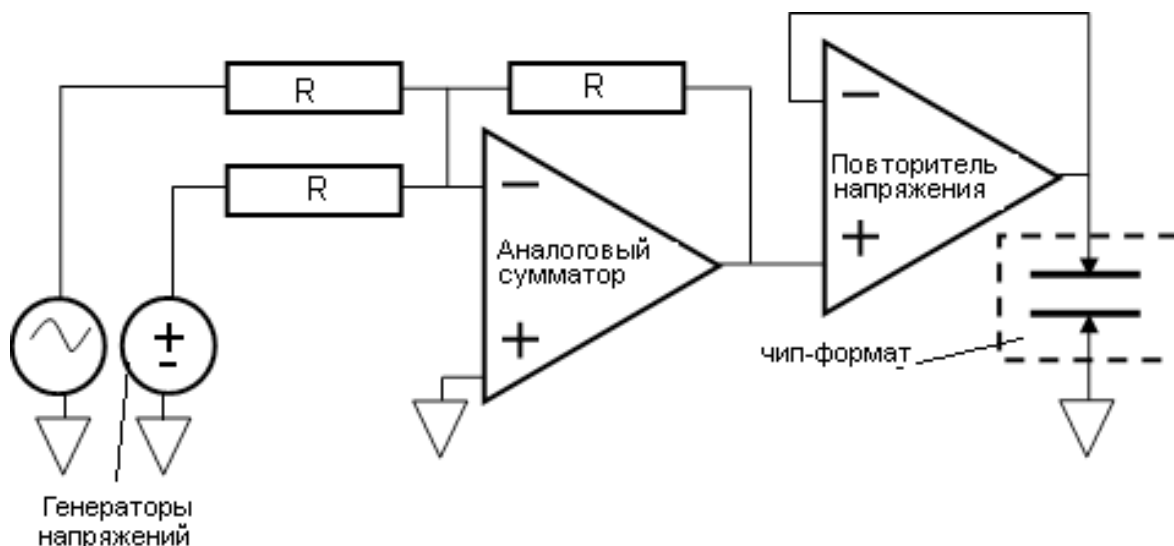


Рис. 3. Обобщенная структурная схема узла суммирования напряжений

В табл. 1 приведены параметры электрических режимов, используемых для манипуляции перемещения микроорганизмов *S.albicans* в средах ТСБ и 5 %-ом растворе глюкозы. Время записи видеоматериалов $t_{\text{зв}}$ для каждой среды и каждого электрического режима составляет 10 минут.

Табл. 1

Параметры электрических режимов манипуляции электрокинетическим транспортом микроорганизмов *C.albicans* в среде ТСБ и 5 %-ом растворе глюкозы

№ режима	$U_{см}$, В	$U_{пер}$, В (от пика до пика)	f , Гц
1	0,4	2,0	10,0
2	- 0,4	2,0	10,0
3	0,4	4,0	10,0
4	- 0,4	6,8	10,0
5	- 0,4	6,8	1000,0

Для указанных случаев запись видеоматериалов проводилась в области центрального электрода. После окончания записи видеоматериалов, для последнего режима воздействия, были сделаны фотографии и в других участках исследуемого чип-формата.

Полученные результаты научных исследований показали, что для 5 % раствора глюкозы в процессе последовательного воздействия заданных режимов микроорганизмы *C.albicans* располагаются вблизи осевой линии проводящей микроэлектродной дорожки в районе центрального микроэлектрода. Фотографии, сделанные на других участках поверхности данного чип-формата, показывают аналогичную картину расположения *C.albicans* (рис. 4).

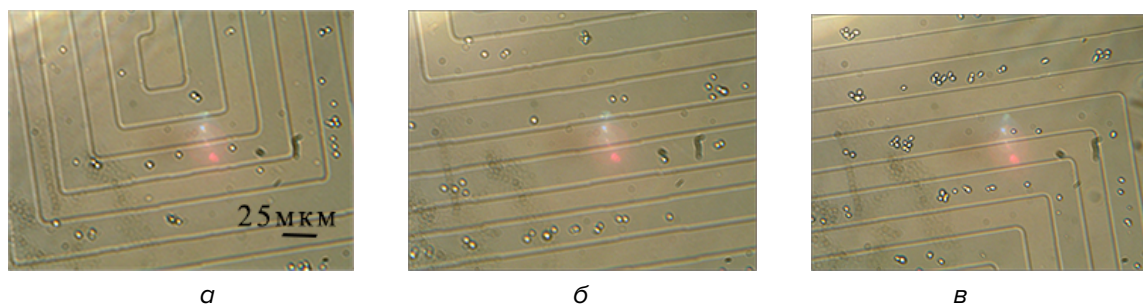


Рис. 4. Расположение микроорганизмов *C.albicans* после окончания воздействий: а – в центральной части; б, в – в других областях чип-формата

Из приведенных рис. 4, а, б, в видно также, что микроорганизмы *C.albicans* расположились на поверхности всех микроэлектродов и ближе к их центру, хотя одни из микроэлектродов находились при нулевом потенциале. Это может быть объяснено изменением полярности напряжения смещения в задаваемых режимах, что приводило к изменению направления напряженности постоянного электрического поля и к изменению направления конвекционно-диффузионной составляющей микрогидродинамических потоков, вызванных переменным электрическим полем, которые подтягивают микроорганизмы в зазоре, находящиеся ближе к микроэлектродам с нулевым потенциалом.

Что касается исследований электрокинетического перемещения микроорганизмов *C.albicans* в среде ТСБ, то результаты этих исследований показали, что при аналогичном алгоритме изменений электрических режимов тип перемещений *C.albicans* похож на перемещения в 5 %-ом растворе глюкозы. Однако, количество микроорганизмов *C.albicans* в процентном соотношении электрод/зазор, в пределах всей чувствительной области чип-формата, составляет приблизительно 70/30 за аналогичное, как и в предыдущем случае, время записи видеоматериалов $t_{зв}$. Это может быть об-

условлено, скорее всего, более высокой проводимостью используемой среды ТСБ (6,0 мСм/см) [2].

Нами проведено также изучение влияния электрических режимов на изменение направления и скорости электрокинетического перемещения микроорганизмов *S.aureus* в среде ТСБ с использованием октагонального чип-формата и программного продукта PIV (Particle Image Velocimetry). Задание электрических параметров для этих исследований проводилось также в режиме суммирования переменного и постоянного напряжений, аналогично предыдущим исследованиям. Все исследования были проведены в области центрального электрода, который находился при нулевом потенциале. В табл. 2 представлена информация о значениях электрических параметров, которые подавались на другой электрод октагональной конструкции чип-формата. Время записи видеоматериалов $t_{зв}$ для каждой среды и каждого электрического режима составляет 5 минут.

Табл. 2

Электрические режимы манипуляции электрокинетическим транспортом микроорганизмов *S.aureus* в среде ТСБ

N режима	$U_{см}$, В	$U_{пер}$, В (от пика до пика)	f , Гц
1	- 0,4	3,2	300,0
2	- 0,3	3,2	600,0
3	- 0,6	3,2	800,0
4	- 0,6	7,0	800,0
5	- 0,6	7,0	49600,0

Результаты исследований, полученные с помощью PIV-анализа, приведены на рис. 5 для различных режимов, указанных в табл. 2.

На рис. 5.6 также показано типичное исходное распределение *S.aureus*, относительно которого проводился PIV-анализ.

В PIV-анализе форма линии со стрелкой показывает направление движения микроорганизмов, а длина линии со стрелкой отражает скорость V их перемещения, которую можно оценить, для нашего случая, с помощью калибровочного соотношения $V = 102 \cdot 10^{-9} \text{ м}/(\text{pixel} \cdot t_{зв})$, где м – метр и $t_{зв}$ – время записи видеоматериала.

Полученные графические результаты PIV-обработки фактически характеризуют конвективную диффузию, под которой понимают суммарный массоперенос за счет диффузии и конвекции, обусловленную внешним воздействием [1].

Представленные на рис. 5.1 графические результаты исследований режима 1 показывают, что электрические параметры воздействия на октагональный чип-формат практически не приводят к направленному электрокинетическому транспорту *S.aureus* в среде ТСБ.

При внешнем воздействии электрического режима 1 микроорганизмам *S.aureus* не удается преодолеть барьер сил их бактериального окружения, что и видно на рис. 5.1, поскольку линии векторов имеют практически одинаковую небольшую длину и равномерно направлены в области 360° практически по всем направлениям.

На рис. 5.2 отражено влияние электрического режима 2 на конвективную диффузию микроорганизмов *S.aureus*. В режиме 2, относительно режима 1, незначительно снижено значение напряжения смещения до минус 0,3 В и увеличена частота до 600 Гц. При параметрах электрического режима 2 более высокие значения направ-

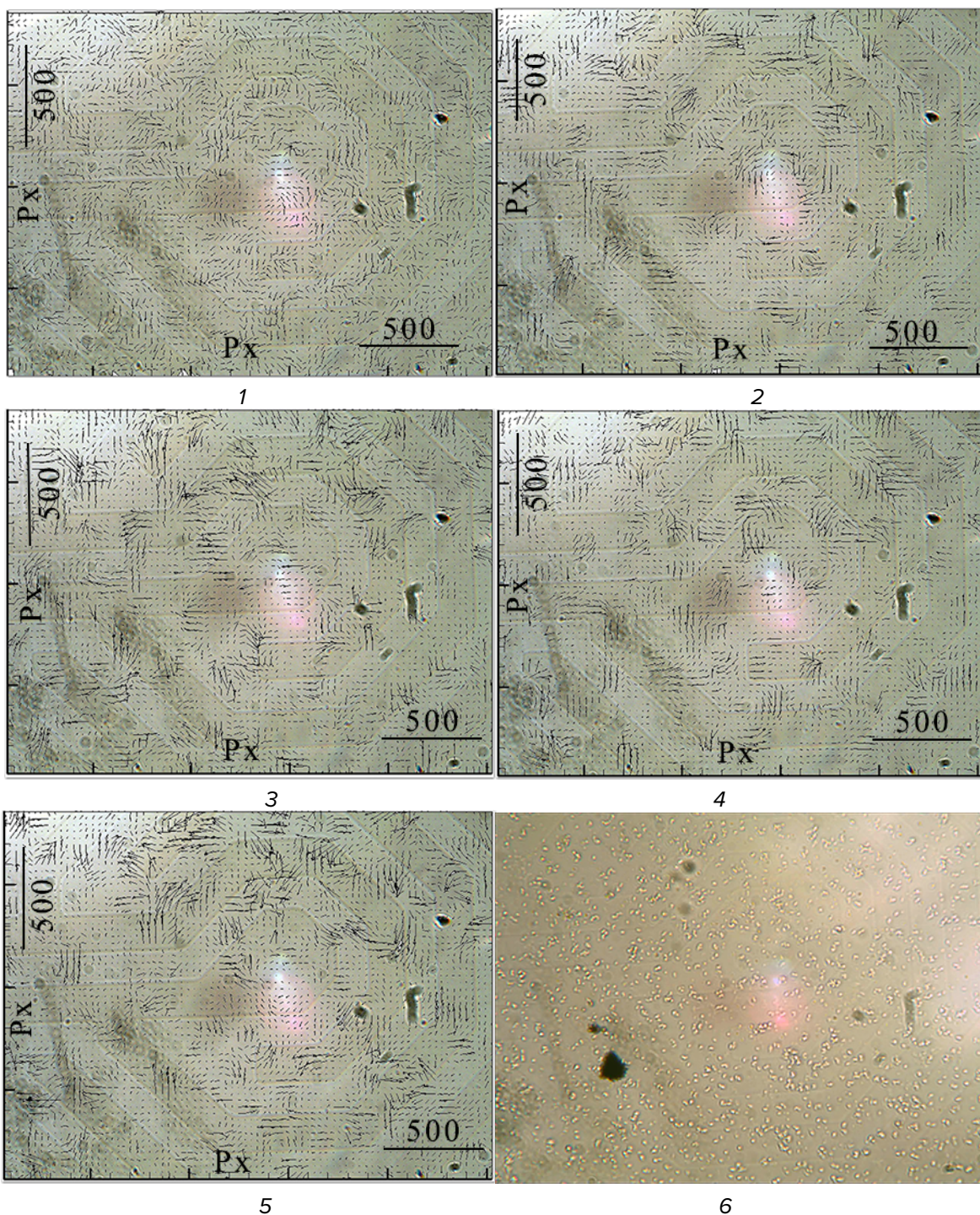


Рис. 5. Результаты PIV-анализа перемещения *S.aureus* в среде ТСБ в области центрального электрода октагонального чип-формата в зависимости от параметров электрического режима (Рис. 5.1–5.5) и типичное исходное распределение *S.aureus* (Рис. 5.6)

ленной силы, относительно броуновских сил, проявляются в появлении конвекционно-диффузионного транспорта микроорганизмов *S.aureus*. На рис. 5.2 можно видеть, что данный вид транспорта более значительный вверху центрального электрода, который представляет собой многоугольник неправильной формы, где неоднородность электрического поля выражена наиболее сильно. Логично предположить, что наблю-

даемые проявления более высоких значений направленной силы вызваны более высокими значениями частоты.

Это подтверждается и результатами, представленными для электрического режима 3. В данном режиме частота и напряжение смещения повышены до значений 800 Гц и минус 0,6 В соответственно. Из результатов, представленных на рис. 5.3 видно, что в этом режиме линии векторов имеют большую длину, что говорит о большей скорости перемещения микроорганизмов *S.aureus*. Кроме того, наблюдается значительное изменение направления конвекционно-диффузионного транспорта микроорганизмов *S.aureus*, т.е. транспорт практически локализован в верхней части и вблизи центрального электрода.

При увеличении переменного напряжения до 7,0 В (от пика до пика) на частоте 800 Гц и напряжении смещения минус 0,6 В (рис. 5.4) происходит значительное уменьшение длины линий векторов и направлений локализации конвекционно-диффузионного транспорта микроорганизмов *S.aureus*. Наблюдается незначительное число направлений, которые не локализованы, а размещены по всей площади вокруг центрального электрода практически равномерно. Это обусловлено, скорее всего, тем, что амплитуда переменного напряжения ответственна за конвекционную часть электрокинетического транспорта. Высокие ее значения при низкой частоте могут усреднить силу направленного действия, что и подтверждается результатами электрического режима 5, в котором частота увеличена до значения 49,6 кГц.

При параметрах электрического режима 5, что видно на рис. 5.5, произошла еще более плотная локализация, чем при параметрах режима 3, конвекционно-диффузионного транспорта микроорганизмов *S.aureus* в верхней части центрального электрода. При этом длина векторных линий увеличилась и стала даже больше, чем на рис. 5.3.

Заключение

Таким образом, полученные результаты исследований показывают, что для 5 % раствора глюкозы в процессе последовательного воздействия электрических режимов микроорганизмы *C.albicans* могут быть сконцентрированы вблизи осевой линии проводящих микроэлектродных дорожек практически на всей поверхности чип-формата прямоугольного типа. Отмечено, что при аналогичных с 5 %-ым раствором глюкозы электрических режимах воздействия, на всей поверхности ИТО-микроэлектродов в среде ТСБ концентрируется приблизительно 70 % микроорганизмов *C.albicans* и 30 % – в зазоре, что обусловлено, скорее всего, более высокой проводимостью используемой среды ТСБ (6,0 мС/см). Изучено влияние электрических режимов на изменение направления и скорости электрокинетического перемещения микроорганизмов *S.aureus* в среде ТСБ путем регистрации и PIV-обработки видеоматериалов с использованием октагонального чип-формата. Показано, что при параметрах электрического режима ($U_{см} = -0,6$ В; $U_{пер} = 7,0$ В; $f = 49,6$ кГц) увеличиваются скорости перемещения микроорганизмов *S.aureus* и происходит более плотная локализация конвекционно-диффузионного транспорта в верхней части центрального электрода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кухтевич, И.В. Микрофлюидные устройства для исследования клеток (Обзор) / И.В. Кухтевич, А.А.Евстратов, А.С. Букатин // Научное приборостроение, 2013, том23, №4, с.66–75.
2. Евстратов, А.А. Физические методы управления движением и разделением микрочастиц в жидких средах. I. Диэлектрофорез, фотофорез, оптофорез, оптический пинцет / А.А. Евстратов // Научное приборостроение, 2005, том15, №1, с. 3–20.
3. Казанкин, Д.С. Электрокинетические методы прижизненного исследования клеток. Практическая информация. Теоретическая информация и математические выкладки / Д.С. Казанкин. – Режим доступа: <http://ikar.udm.ru>

4. I-Fang Cheng, Hsien-Chang Chang et al. Rapid (<5 min) identification of pathogen in human blood by electrokinetic concentration and surface-enhanced Raman spectroscopy // Scientific Reports. 2013. 3:2365. DOI:10.1038/strep02365
5. Экспериментальная установка для электрокинетического управления разделением и концентрированием клеток на поверхности планарной конструкции микрочипа из микрокапли суспензий / Т. И. Ореховская [и др.] // Современные методы и технологии создания и обработки материалов: сб. научных трудов. В 3 кн. Кн. 2. Технологии и оборудование механической и физико-технической обработки/ редкол.: А.В.Белый (гл. ред.) [и др.]. — Минск: ФТИ НАН Беларуси, 2017. — С. 229–237.

REFERENCES

1. Kukhtevich I.V., Yevstratov A.A., Bukatin A.S. Mikrofluidnyye ustroystva dlya issledovaniya kletok (Obzor) [Microfluidic devices for cell studies: (Review)] // Nauchnoye priborostroyeniye [Scientific Instrumentation], 2013, V.23, iss.4, pp.66–75. (in Russ.)
2. Yevstratov A.A. Fizicheskiye metody upravleniya dvizheniyem i razdeleniyem mikrochastits v zhidkikh sredakh. I. Dielektroforez, fotoforez, optoforez, opticheskiy pintset [Physical methods of microparticle transport and separation control in liquid media. I. Dielectrophoresis, photophoresis, optophoresis, optical tweezers] // Nauchnoye priborostroyeniye [Scientific Instrumentation], 2005, V.15, iss.1, pp.3–20. (in Russ.)
3. Kazankin D.S. Elektrokineticheskiye metody prizhiznennogo issledovaniya kletok. Prakticheskaya informatsiya. Teoreticheskaya informatsiya i matematicheskiye vykladki [Electrokinetic methods of intravital cell research. Practical information. Theoretical information and mathematical calculations], <http://ikar.udm.ru> (in Russ.)
4. I-Fang Cheng, Hsien-Chang Chang [et al.] Rapid (<5 min) identification of pathogen in human blood by electrokinetic concentration and surface-enhanced Raman spectroscopy // Scientific Reports, 2013, 3:2365. DOI:10.1038/strep02365
5. Loban B. A., Drapeza A. I., Lazaruk C. K., Orekhovskaya T. I., Khmelniitsky A. I., Rudenko D. A., Skorokhod G. A., Gudkova E. I. Ehksperimental'naya ustanovka dlya ehlektrokineticheskogo upravleniya razdeleniem i koncentrirovaniem kletok na poverhnosti planarnoy konstrukcii mikrochipa iz mikrokapli suspensij [Laboratory made instrument for electrokinetic control separation and concentration of cells on surface of planar microchip structures out of a suspensions microdrop] / Sovremennyye metody i tekhnologii sozdaniya i obrabotki materialov [Advanced Methods and Technologies of Materials Development and Processing]. Collection of scientific papers, Minsk, FTI NAN Belarusi [PTI NAS Belarus], A.V. Byeli (ed.), 2017, vol. 2, pp. 229–237. (in Russ.)

Статья поступила в редакцию в окончательном варианте 28.04.18