



Politechnika Wroclawska

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Czujniki impedancyjne  
w pomiarach warstw  
mikrobiologicznych**

Konrad Andrzej Chabowski

# ROZPRAWA DOKTORSKA

Czujniki impedancyjne w pomiarach  
warstw mikrobiologicznych

AUTOR:

Konrad Andrzej Chabowski

PROMOTOR:

prof. dr hab. inż. Karol Nitsch  
Wydziałowy Zakład Nanometrologii

*Autor rozprawy składa serdeczne podziękowania wszystkim osobom, które przyczyniły się do powstania niniejszej pracy:*

*prof. dr. hab. inż. Karolowi Nitschowi za wszechstronną pomoc okazaną w trakcie realizacji badań i redagowania rozprawy, cenne wskazówki oraz opiekę dydaktyczną,*

*dr. inż. Tomaszowi Piaseckiemu za cenne konsultacje merytoryczne i wsparcie techniczne,*

*dr. n. med. Adamowi Junce i mgr Danucie Rurańskiej-Smutnickiej z Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej Wydziału Farmacji Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu za owocną współpracę w zakresie badań mikroorganizmów,*

*mgr Katarzynie Halubek-Gluchowskiej i dr Katarzynie Kapczyńskiej z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu za owocną współpracę w zakresie badań warstw białek,*

*oraz wszystkim koleżankom i kolegom z Zakładu Nanometrologii Wydziału Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki Politechniki Wrocławskiej za pomoc podczas wykonywania eksperymentów, życzliwość, poświęcony czas i motywację.*

# Spis treści

Spis treści	3
Wykaz najważniejszych oznaczeń i akronimów	5
1. Wstęp	6
1.1. Warstwy mikrobiologiczne	9
1.1.1. Białka	11
1.1.2. Biofilm	12
1.2. Impedancyjne metody badawcze warstw mikrobiologicznych	15
1.2.1. Czujniki impedancyjne	16
1.2.2. Biosensory	18
1.2.3. Eksperymentalne systemy pomiarowe	20
1.2.4. Systemy komercyjne	21
1.3. Cele pracy	25
2. Materiały i metody	26
2.1. Czujniki impedancyjne	26
2.1.1. Mikrocujniki impedancyjne na podłożu szklanym i krzemowym	27
2.1.2. Czujniki impedancyjne w technologii PCB	30
2.1.3. Czujniki impedancyjne w technologii LTCC	31
2.1.4. Mikrocujniki impedancyjne na mikrodźwigni krzemowej	32
2.2. Spektroskopia impedancyjna	33
2.2.1. Impedancja i jej pomiar	34
2.2.2. Modelowanie EEC i interpretacja wyników	37
2.2.3. Specyfika pomiarów w cieczy	40
2.3. Komercyjne analizatory impedancji	40
2.3.1. Analizator impedancji Agilent 4294A	41
2.3.2. Analizator odpowiedzi elektrycznej Solartron FRA1260	41
2.3.3. Precyzyjny mostek GW Instek LCR-8101G	41
2.4. Własne konstrukcje analizatorów impedancji	42
2.4.1. Analizator impedancji MP-AD5933	43
2.4.2. Analizator impedancji IMP-STM32	53
2.5. Oprogramowanie	55

2.5.1.	ZView	55
2.5.2.	ZFitter Turbo	56
2.5.3.	ImpeDancer	57
2.6.	Sprzęt pomocniczy	57
2.6.1.	Multiplekser 8-kanałowy	58
2.6.2.	Multiplekser 24-kanałowy	58
3.	Charakteryzacja i zastosowanie czujników impedancyjnych	60
3.1.	Badanie podstawowych właściwości czujników impedancyjnych	60
3.1.1.	Wyznaczenie podstawowych parametrów czujników	60
3.1.2.	Pomiary impedancyjne w wodnych roztworach heksacyjanożelazianów jako środowisk modelowych	64
3.1.3.	Struktura elektrody czujnika wykonanego w technologii PCB	69
3.2.	Pomiary adhezji białek do powierzchni elektrod	70
3.2.1.	Materiały i metody	71
3.2.2.	Pomiary za pomocą AFM	72
3.2.3.	Monitoring adsorpcji białek za pomocą pomiarów impedancji	75
3.2.4.	Wyniki i wnioski	80
3.3.	Pomiary wzrostu i degradacji biofilmu	81
3.3.1.	Zastosowanie mikroczujników impedancyjnych na podłożu szklanym do monitorowania wzrostu biofilmu <i>P. aeruginosa</i>	82
3.3.2.	Zastosowanie czujników impedancyjnych wykonanych w technologii PCB do monitorowania wzrostu biofilmu <i>P. aeruginosa</i>	87
3.3.3.	Zastosowanie czujników impedancyjnych wykonanych w technologii LTCC do monitorowania wzrostu biofilmu <i>P. aeruginosa</i>	93
3.3.4.	Wykorzystanie IMP-AD5933 oraz czujników wykonanych w technologiach PCB i LTCC do monitorowania wzrostu biofilmu <i>P. aeruginosa</i>	97
3.3.5.	Wykorzystanie IMP-AD5933 i czujników na podłożu PCB do monitorowania wzrostu biofilmu <i>C. albicans</i>	104
4.	Podsumowanie i wnioski	108
	Streszczenie	111
	Abstract (ENG)	113
	Bibliografia	115

# Wykaz najważniejszych oznaczeń i akronimów

Skrót	Znaczenie
ADC	<i>Analog to Digital Converter</i> – przetwornik analogowo - cyfrowy
CFU	<i>Colony Forming Unit</i> – jednostka tworząca kolonię
CPE	<i>Constant Phase Element</i> – element stałofazowy
CVC	<i>Current to Voltage Converter</i> – przetwornik prąd - napięcie
DAC	<i>Digital to Analog Converter</i> – przetwornik cyfrowo - analogowy
DDS	<i>Direct Digital Synthesis</i> – bezpośrednia synteza cyfrowa
DUT	<i>Device Under Test</i> – badana próbka/obiekt
DFT	<i>Discrete Fourier Transform</i> – dyskretna transformata Fouriera
EDS	<i>Energy-Dispersive Spectroscopy</i> - spektroskopia dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego
EEC	<i>Electrical Equivalent Circuit</i> – elektryczny model równoważny (elektryczny układ zastępczy)
EIS	<i>Electrochemical Impedance Spectroscopy</i> – elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> - test immunoenzymatyczny (immunoenzymosorpcyjny)
EPS	<i>Extracellular Polimeric Substances</i> – polimerowe substancje zewnątrzkomórkowe
FIB	<i>Focused Ion Beam</i> – zogniskowana wiązka jonów
IS	<i>Impedance Spectroscopy</i> – spektroskopia impedancyjna
LTCC	<i>Low Temperature Cofired Ceramics</i> - ceramika współwypalana niskotemperaturowo
MCU	<i>Microcontroller Unit</i> – mikrokontroler
PCB	<i>Printed Circuit Board</i> – obwód drukowany
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – reakcja łańcuchowa polimerazy
PGA	<i>Programmable Gain Amplifier</i> – wzmacniacz programowalny

# 1. Wstęp

Mikroorganizmy są powszechnym i nieodzownym elementem otaczającego nas świata, obejmują one bakterie, archeony, pierwotniaki i grzyby oraz inne obiekty wpisujące się w spektrum zainteresowania mikrobiologii. Drobnoustroje spełniają różnorakie role w przyrodzie będąc częściami różnych ekosystemów. Np. bakterie stanowią florę fizjologiczną większych organizmów (flora jelit i skóry), biorą udział w przetwarzaniu żywności, powodują procesy gnilne zapewniające obrót materii w środowisku naturalnym. Część z nich jest pożyteczna i potrafi wywierać dodatni wpływ na przeprowadzenie pewnych procesów, na przykład przy kiszeniu kapusty, ogórków, przy produkcji piwa, octu, pieczywa, kwaśnych napojów mlecznych. Po drugiej stronie barykady stoją szkodliwe dla ludzi i zwierząt mikroorganizmy chorobotwórcze, oraz inne drobnoustroje powodujące psucie się surowców i przetworów spożywczych, a także nietrwałość różnych artykułów przemysłowych takich jak drewno, skóry, włókna. Co prawda ten podział mikroorganizmów jest umowny i zależy od kontekstu sytuacji np. bakterie *Escherichia coli* stanowią element pożytecznej flory jelitowej człowieka, lecz poza tym miejscem rezydowania stają się drobnoustrojami chorobotwórczym. Niemniej drobnoustroje chorobotwórcze są bardzo istotnym elementem otaczającego nas środowiska, a chęć lepszego ich zbadania i poznania wymaga zaawansowanej technicznie aparatury. Ponadto wymyślane są wciąż nowe narzędzia do szybkiej detekcji mikroorganizmów oraz badania ich właściwości. W wymienione zagadnienia wpisuje się zjawisko biofilmu tj. specyficznej formy kolonii komórkowej, w której to zaadherowane do podłoża mikroorganizmy otoczone są macierzą zewnątrzkomórkowych substancji polimerowych chroniących je przed działaniem środowiska a co za tym idzie produktów biobójczych i leków.

W powszechnej praktyce laboratoryjnej często stosowane są klasyczne metody detekcji mikroorganizmów tj. hodowle komórkowe, testy łańcuchowej reakcji polimerazy oraz testy immunoenzymatyczne ELISA.

Hodowle komórkowe i pomiary efektywności tworzenia kolonii to grupa metod najbardziej rozpowszechnionych w komercyjnych laboratoriach mikrobiologicznych. Polegają one na inkubacji badanej próbki na selektywnych podłożach hodowlanych oraz określanie liczby wyrosłych kolonii bakterii. Każda kolonia wyrasta z jednostki tworzącej kolonie CFU. Jednostka ta może być albo pojedynczym mikroorganizmem, albo jego morfologiczną formą jak np. dwoinki czy gronkowce. Stąd też stężenie bakterii w próbce podaje się w jednostkach tworzących kolonie na ml — CFU/ml. Dla danego gatunku mikroorganizmu specyficzna jest możliwość wzrostu liczebności populacji na pożywce hodowlanej o danym składzie, tworzenie kolonii oraz ich kształt, kolor i faktura, oraz odbarwienia lub zabarwienia pożywki w pobliżu brzegów kolonii. Przy użyciu odpowiedniego zestawu pożywek, metody liczenia kolonii umożliwiają detekcje nawet pojedynczego mikroorganizmu. Największą wadą tej metody jest bardzo długi czas hodowli. Może ona trwać nawet dłużej niż 160 godzin. Pomiary efektywności tworzenia kolonii pozwalają na detekcje jedynie żywych bakterii.

Kolejną techniką jest PCR. Jest to fundamentalne narzędzie służące do badania kwasu DNA, stosowanym m.in. w badaniach medycznych, klinicznych czy kryminalistycznych. Polega ona na cyklicznym powielaniu liczby kopii danego fragmentu nici DNA. W wyniku reakcji uzyskuje się roztwór o znacznym stężeniu poszukiwanych łańcuchów par zasad. Możliwe jest potwierdzenie obecności w próbce nawet pojedynczej poszukiwanej cząsteczki. Przygotowanie próbek oraz detekcja drobnoustrojów przy PCR trwa o wiele krócej niż w wypadku metod polegających na hodowlach komórkowych i wynosi około 3-4 godzin. Wadami metody PCR jest jej hiperczułość oraz wysokie ceny odczynników. Bardzo łatwo jest zanieczyścić badaną próbkę zewnętrznym DNA, które następnie może ulec powieleniu i wpłynąć znacznie na wynik reakcji. Niepożądana jest również detekcja obecności zarówno żywych, jak i martwych drobnoustrojów.

Testy ELISA są metodą detekcji antygenów używaną powszechnie zarówno w laboratoriach badawczych, jak i diagnostycznych. Opiera się ona na powinowatości związków chemicznych, m.in. białek, polisacharydów lub immunoglobulin, o strukturze wiążącej się specyficznie z substancjami obecnymi na ścianie komórkowej bądź otocze danego mikroorganizmu. Test przeprowadzany jest w dwóch krokach. W pierwszym kroku poszukiwane mikroorganizmy wiąże się ze specyficznymi immunoglobulinami. Następnie przeciwciała te znakuje się, czyli dołącza się do nich substancje, których stężenie jest łatwiejsze do oznaczenia niż stężenie samych immunoglobulin bądź poszukiwanych patogenów. Jako znaczniki najczęściej używane są enzymy lub fluorofory. Pokrewną techniką testów ELISA jest badanie aglutynacji tj. reakcji łączenia się poszukiwanego patogenu w wielkocząsteczkowe kompleksy widoczne gołym okiem. Zajście reakcji aglutynacji wymaga zastosowania aglutynin, czyli wielowartościowych białek [1].

Obecnie popularne jest rozwijanie alternatywnych metod detekcji i monitorowania mikroorganizmów: optycznych, kalorymetrycznych, grawimetrycznych i elektrycznych. Niekiedy wymienione metody dzielą się na podgrupy ze względu na zastosowane podejście. Tym sposobem metody optyczne mogą wykorzystywać spektrofotometrię, elipsometrię, powierzchniowy rezonans plazmonowy bądź interferometrię, zaś grawimetryczne zmianę częstotliwości rezonansowej czujnika (mikrowagi i kamertony kwarcowe), zmianę ugięcia (mikrobelki) oraz propagację powierzchniowej fali akustycznej (czujnik piezoelektryczny). Metody elektryczne mogą wykorzystywać również kilka różnych podejść. W wypadku pomiarów potencjometrycznych mierzona jest siła elektromotoryczna powstająca między elektrodami będącymi w kontakcie z analizem, w warunkach braku przepływu prądu. Potencjał powstający pomiędzy tworzącymi się dwoma półogniwami galwanicznymi zależy m.in. od zawartości jonów i potencjału redoks substancji zawartych w medium. Mierzone napięcie elektryczne zmienia się w zależności od stężenia poszukiwanego analitu. W wypadku mikroorganizmów najczęściej są nim wydalane przez bakterie produkty przemiany materii. Istnieje duży problem z wytworzeniem zminiaturyzowanych elektrod potencjometrycznych o odpowiednich właściwościach elektrochemicznych. Drugim podejściem jest woltamperometria, która polega na pomiarze prądu przepływającego



przez próbkę w funkcji potencjału go wymuszającego. Pobudzeniem jest najczęściej sygnał liniowo narastający w czasie. Metody woltametryczne mogą jedynie dostarczyć informacji na temat reakcji elektrochemicznych zachodzących przy elektrodzie roboczej. Trzecim podejściem jest pomiar impedancji czyli uogólnionej miary oporu elektrycznego badanego obiektu. Obecny stan badanej próbki znajduje odzwierciedlenie w jej impedancji, a w zależności od częstotliwości pomiarowej mierzyć będzie się wartości impedancji związane z różnymi właściwościami fizykochemicznymi obiektu.

Z wymienionymi zagadnieniami nieodłącznie związany jest temat biosensorów, które same w sobie stanowią większą grupę czujników różnych wartości, a ich wspólną cechą jest wykorzystywanie w swojej konstrukcji bądź trybie działania biologicznie aktywnych elementów. Biosensory przeznaczone są do badania próbek zawierające dane cząstki biologiczne np. mikroorganizmy, płyny ustrojowe, składniki żywności a związane z nimi zagadnienia nieodłącznie wpisują się w obecne trendy badań naukowych. Biosensory oprócz biologicznych warstw receptorowych w swojej konstrukcji wymagają również odpowiednich elementów przetwornikowych.

Biorąc pod uwagę zagadnienia związane z rozwijanymi alternatywnymi metodami detekcji i monitorowania mikroorganizmów oraz zagadnienia konstrukcji biosensorów zarówno pod względem osadzania warstw receptorowych jak i konstruowania elementów przetwornikowych warto zwrócić uwagę na metody elektryczne (w szczególności impedancyjne) ze względu na ich zalety:

- detekcja bezpośrednia (bez markerów)
- metoda nieinwazyjna
- pomiar w czasie rzeczywistym
- w wyniku pomiaru i analizy uzyskuje się informację o właściwościach medium oraz o procesach przyelektrodowych.

Aktualność tej tematyki potwierdza opracowany na podstawie studiów literaturowych wykres liczby publikacji dotyczących wykorzystania pomiarów impedancji w systemach czujnikowych do detekcji i monitorowania mikroorganizmów (rysunek 1.1)<sup>1</sup>.

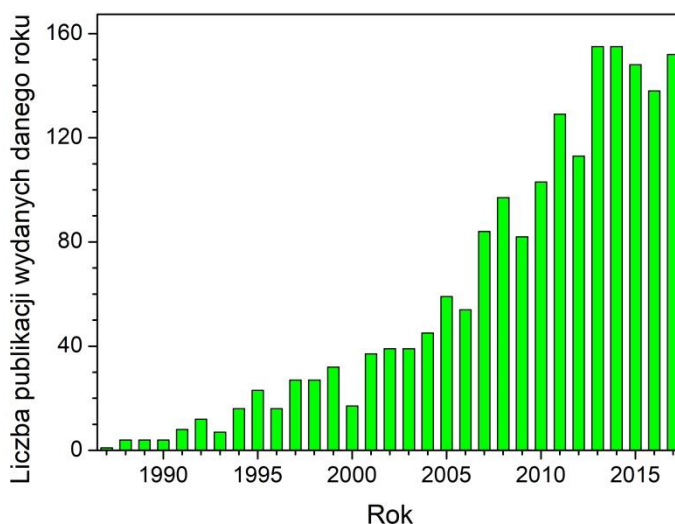
W rozprawie autor skupia się właśnie na jednej z metod elektrycznych, a dokładniej zastosowaniu spektroskopii impedancyjnej i czujników impedancyjnych do detekcji i monitorowania warstw mikrobiologicznych. Dalsza część wstępu przedstawia szerszy opis wspomnianych warstw. Kolejny podrozdział zawiera wprowadzenie do zagadnienia czujników impedancyjnych, przegląd ich zastosowań oraz ich rozwinięcia w postaci biosensorów a także eksperymentalnych i komercyjnych systemów pomiarowych. Następnie na podstawie przedstawionego przeglądu sformułowane zostają cele pracy.

Drugi rozdział dysertacji skupia się na zastosowanych w badaniach materiałach i metodach: opisuje czujniki impedancyjne własnego projektu, metodę spektroskopii

---

<sup>1</sup> Eksperyment literaturowy wykonany przy użyciu platformy Scopus, dane z lipca 2017 r.

impedancyjnej, komercyjne analizatory impedancji, własne projekty analizatorów i sprzętu pomocniczego – w tym obszerny opis ich konstrukcji, oraz oprogramowanie sterujące zestawianymi stanowiskami pomiarowymi.



**Rysunek 1.1.** Liczba publikacji dotyczących wykorzystania pomiarów impedancji do detekcji i monitorowania mikroorganizmów.

Trzeci rozdział poświęcony jest charakteryzacji podstawowych właściwości i zastosowaniu zaprojektowanych czujników impedancyjnych oraz sprzętu pomiarowego do monitorowania adhezji białek oraz faz wzrostu biofilmu bakteryjnego bakterii *Pseudomonas aeruginosa* i grzybów *Candida albicans*. Każdy podrozdział kończy się podsumowaniem uzyskanych wyników.

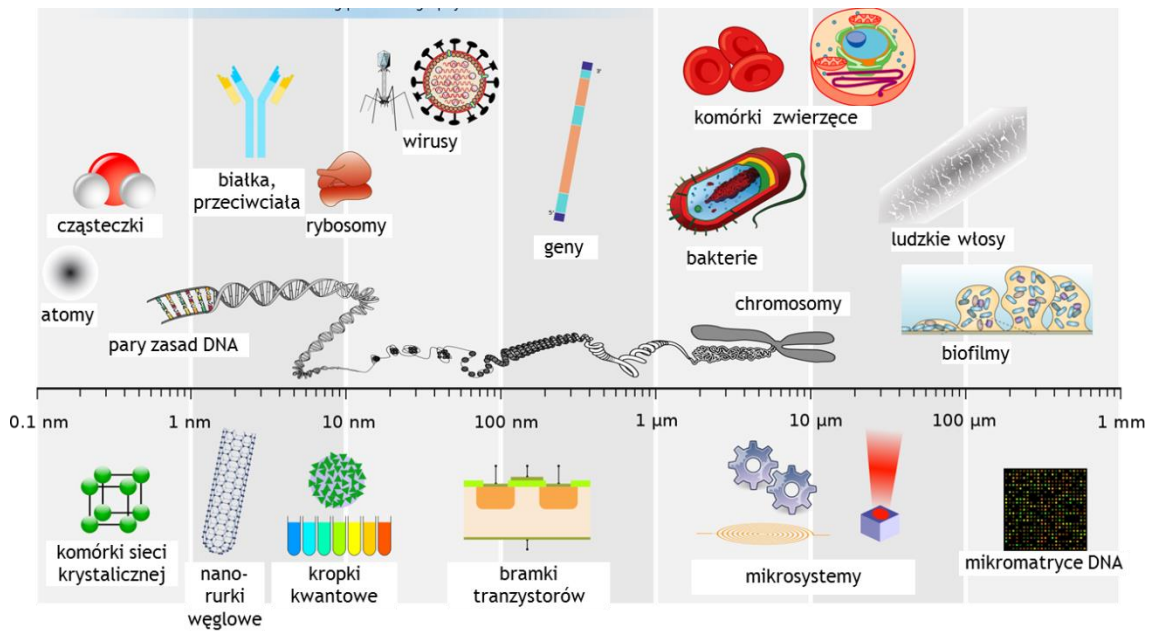
Ostatni, czwarty rozdział podsumowuje całą rozprawę odnosząc się do osiągnięcia wyznaczonych celów oraz przedstawia wyciągnięte wnioski i sugerowane kierunki rozwinięcia opracowanych metod badawczych.

Badania opisane w rozprawie doktorskiej były częściowo realizowane w ramach grantu „Czujniki i sensory do pomiarów czynników stanowiących zagrożenia w środowisku – modelowanie i monitoring zagrożeń”, finansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego i budżetu państwa (numer projektu POIG.01.03.01-02-002/08) [2] [3] oraz grantu Wydziału Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki Politechniki Wrocławskiej „Modyfikacja stanowiska do pomiarów właściwości elektrycznych warstw mikrobiologicznych” nr B40037W12 (okres realizacji: 1.10.2014r. - 30.09-2015r.).

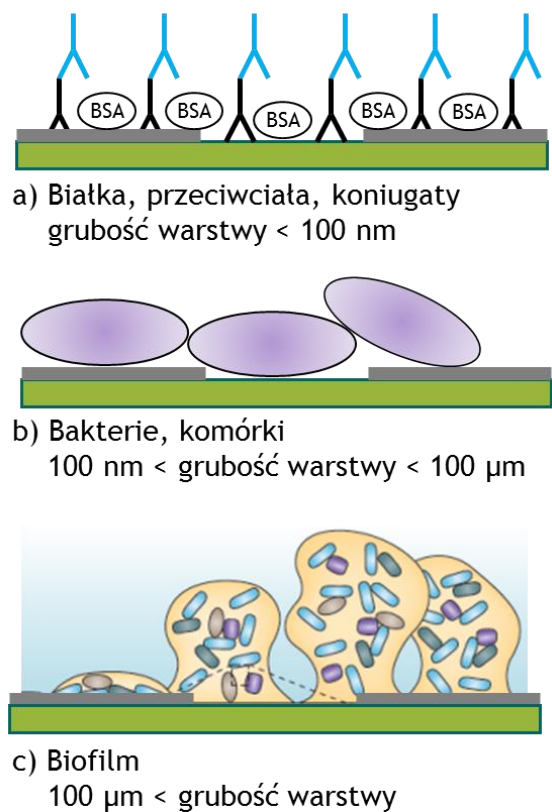
## 1.1. Warstwy mikrobiologiczne

Wszystkie mikroorganizmy i struktury biologiczne (grzyby, bakterie, wirusy, białka immunoglobuliny, enzymy, łańcuchy DNA) zaadherowane do danej powierzchni mogą stanowić warstwę mikrobiologiczną. Rozmiary obiektów, które można uznać za mikrobiologiczne rozciągają się na kilka rzędów wymiarów poczynając od nanometrowych cząstek i par zasad DNA, poprzez białka, wirusy, geny, komórki bakteryjne na makroskopowych strukturach biofilmowych kończąc. Rozpiętość

rozmiarów obiektów biologicznych w odniesieniu do wytworów techniki zaprezentowano na rysunku 1.2.



**Rysunek 1.2.** Nano i mikrostruktury biologiczne oraz ich wymiary w odniesieniu do wytworów techniki [4].



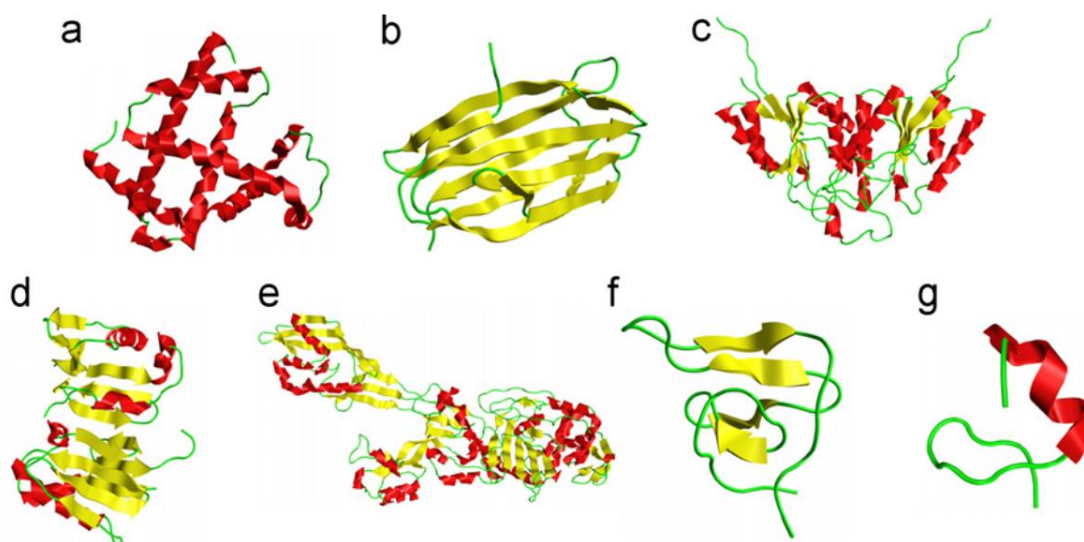
**Rysunek 1.3.** Warstwy mikrobiologiczne na powierzchni czujników impedancyjnych: a) białka, b) komórki bakteryjne, c) biofilm.

Obiektem zainteresowania autora rozprawy były białka i przeciwciała, mogące stanowić warstwy receptorowe biosensorów, których to adhezję do powierzchni czujnika badano metodą spektroskopii impedancyjnej oraz mikroskopii AFM, a także

bakterie i tworzone przez nie biofilmy, mierzone również za pomocą spektroskopii impedancyjnej i stanowiące najbardziej rozbudowany etap badawczy pracy. Warstwy mikrobiologiczne, składające się odpowiednio z białek, bakterii i biofilmów zobrazowano na rysunku 1.3.

### 1.1.1. Białka

Białka (proteiny) są wielkocząsteczkowymi (masa cząsteczkowa od ok. 10 000 do kilku mln Daltonów) biopolimerami, a właściwie biologicznymi polikondensatami, zbudowanymi z reszt aminokwasów połączonych ze sobą wiązaniami peptydowymi - CONH-. Występują we wszystkich żywych organizmach oraz wirusach, stanowią materiał budulcowy komórek. Synteza białek odbywa się przy udziale specjalnych organelli komórkowych zwanych rybosomami [5]. Białka stanowią najbardziej zróżnicowaną grupę związków organicznych pod względem właściwości i roli, jaką odgrywają w życiu organizmów żywych - są przenośnikami tlenu w organizmie (hemoglobina), uczestniczą w jego przechowywaniu (mioglobina); odgrywają istotną rolę w rozróżnianiu przez organizm substancji obcych od własnych (immunoglobuliny); przeciwciała o budowie białkowej uczestniczą w zwalczaniu infekcji wirusowych i bakteryjnych; białkami są niektóre hormony, odgrywają one rolę regulatorów metabolizmu (insulina), funkcji płciowych (gonadotropiny), procesów wzrostu (somatotropina) i in.; białka są niezbędnymi składnikami struktur komórkowych i tkankowych, u roślin — np. składnikami nasion, u zwierząt wchodzi w skład płynów ustrojowych, mięśni i in. tkanek [6]. Wyróżnia się cztery główne klasy strukturalne protein:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\alpha/\beta$ ,  $\alpha+\beta$  oraz klasy pomocnicze – przykładowe struktury białek przedstawiono na rysunku 1.4.



**Rysunek 1.4.** Ilustracja przedstawiająca siedem klas strukturalnych białek: a) all- $\alpha$ , b) all- $\beta$ , c)  $\alpha/\beta$ , d)  $\alpha+\beta$ , e)  $\mu$  (wielodomenowe), f)  $\sigma$  (małe białka) oraz g)  $\rho$  (peptydy) [7].

Szczególnie istotnym typem białek z punktu widzenia sensorów są immunoglobuliny (znane potocznie jako przeciwciała) i białka receptorowe. Przeciwciała jako część układu odpornościowego u człowieka i innych kręgowców odgrywają zasadniczą rolę

w obronie organizmu przed bakteriami, wirusami i pasożytami zewnątrzkomórkowymi oraz, w znacznie mniejszym stopniu, grzybami oraz pasożytami i bakteriami wewnątrzkomórkowymi - głównym zadaniem przeciwciał jest wiązanie danego antygeny, co z kolei umożliwia zachodzenie innych procesów neutralizujących antygen. Podobnie do przeciwciał białka receptorowe łączące się z określoną inną substancją (ligandem), taką jak np. neuroprzekaznik albo hormon, i inicjujące kaskadę przewodzenia sygnału i reakcji komórki w odpowiedzi na ligand. Budowa białkowych łańcuchów immunoglobulin przypomina kształt litery Y z 2 łańcuchami ciężkimi H (ang. *heavy*) biegnącymi od podstawy do końców rozgałęzionych ramion i z równoległe ułożonymi na zewnątrz łańcuchów ciężkich 2 krótszymi łańcuchami lekkimi L (ang. *light*), lokującymi się wzdłuż rozgałęzionych ramion; pary identycznych pod względem sekwencji aminokwasów łańcuchów ciężkich i lekkich są połączone wiązaniami disiarczkowymi. Bliższe podstawy Y sekwencje łańcuchów ciężkich i lekkich stanowią stały region przeciwciała (tzw. fragment Fc), który określa przynależność do jednej z 5 klas immunoglobulin (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD), jednej z 4 podklas IgG i jednej z 2 podklas IgA; poszczególne klasy i podklasy przeciwciał spełniają różne funkcje i wykazują różne powinowactwa lokalizacyjne [8]. Możliwość tworzenia zdefiniowanych warstw białkowych na danych powierzchniach, które to mogą służyć za warstwy receptorowe, jest szczególnie istotna dla wytwarzania biosensorów, inżynierii tkanek oraz badania podstawowych zagadnień związanych biologią komórki [9].

## **1.1.2. Biofilm**

### **1.1.2.1. Charakterystyka**

Zdecydowana większość występujących na świecie mikroorganizmów egzystuje w postaci zorganizowanej, osiadłej na danej powierzchni, kolonii nazywanej biofilmem [10]. Mikroorganizmy tworzące biofilm - w przeciwieństwie do swojej planktonicznej formy – zwykle osadzone są w zewnątrzkomórkowych substancjach polimerowych, składających się głównie z cukrów, białek i DNA, nazywanych macierzą biofilmu [11]. Macierz ta pełni rolę schronienia i tarczy, osłaniającej mikroorganizmy przed wpływem działania środowiska, lekami i innymi ksenobiotykami oraz aktywnymi elementami układu immunologicznego – w tym wypadku złożona struktura biofilmu i odmienne cechy fizjologiczne drobnoustrojów go tworzących, tłumaczą po części ich wysoką oporność na działanie różnych czynników bakteriobójczych, w tym oporność na antybiotyki.

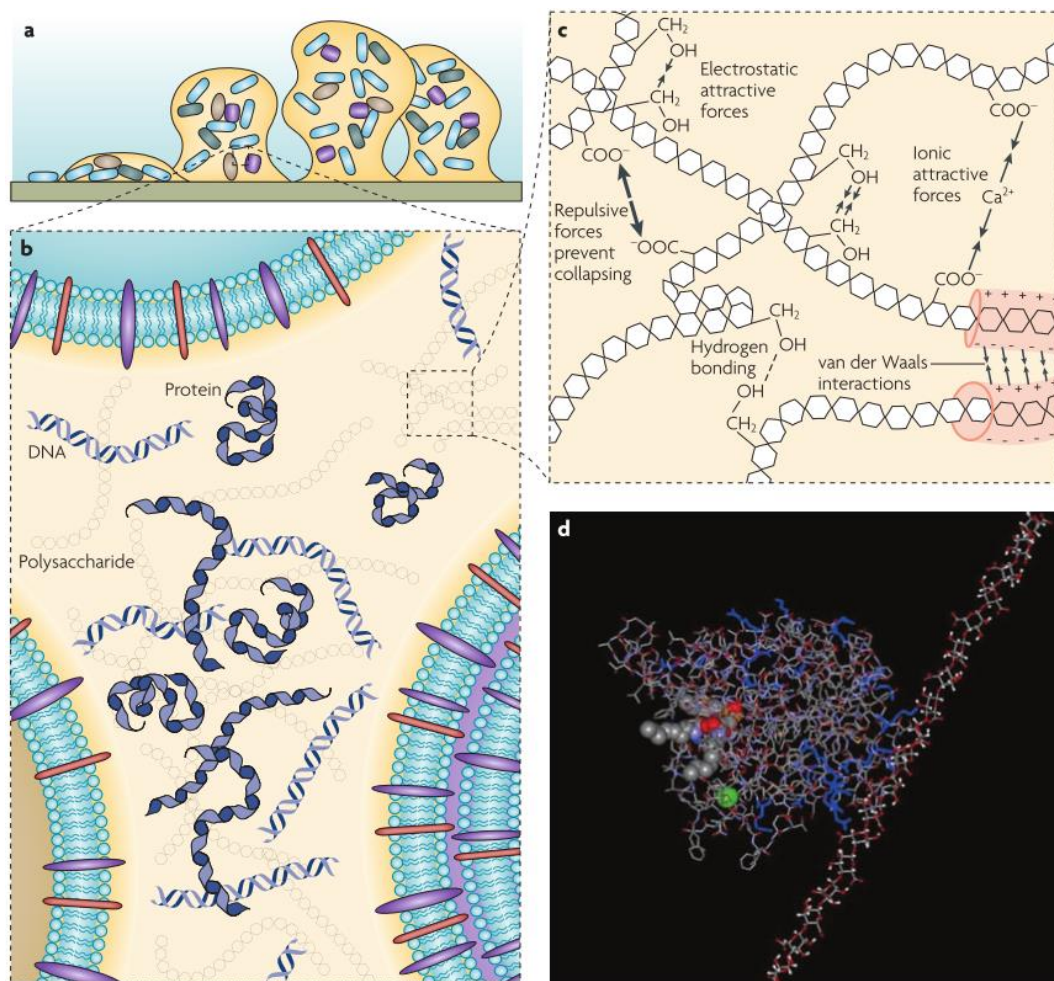
Biofilmy są zdolne do tworzenia się praktycznie na każdego rodzaju powierzchni, w tym na tkankach i abiotycznych biomateriałach wykorzystywanych do celów medycznych [12]. Stanowią one zagrożenie pośrednie lub bezpośrednie w każdej sferze ludzkiego życia, na każdym jego etapie, rozpoczynając od szkodliwego działania biofilmów bakteryjnych w systemach produkcji żywności, na chorobotwórczych jego właściwościach w medycynie kończąc. Szacuje się, że są one odpowiedzialne za do 80% zakażeń szpitalnych [13]. Szczególną rolę w tych zagrożeniach odgrywają bakterie takie jak: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, bakterie

z rodzaju *Streptococcus* tworzące biofilmy jamy ustnej oraz *Pseudomonas aeruginosa* rozwijający biofilmy u pacjentów z mukowiscydozą. W procesach produkcji żywności izolowano biofilmy *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* a także *Shigella* i *Salmonella* [14]. Wynika stąd pilna potrzeba opracowania nowych narzędzi pozwalających na szybkie wykrycie "biofilmu medycznego", ponieważ może to pozwolić na zastosowanie odpowiednich procedur jego zwalczania. Należy tu zauważyć, że narzędzia przeznaczone do szybkiego wykrywania biofilmów mogą być pomocne we wszystkich systemach przepływowych zagrożonych możliwością rozwoju mikrobów. Wśród przykładów takich systemów w środowisku szpitalnym znajdują się cewniki urologiczne, cewniki żywienia pozajelitowego, oraz rury dystrybucji wody w szpitalu [15]. Użycie czujników impedancji zapewnia możliwość nieinwazyjnego, nie wymagającego znaczników pomiaru w czasie rzeczywistym i jest obiecującym kierunkiem, które może być stosowane w sytuacjach klinicznych wymienionych powyżej.

#### **1.1.2.2. Macierz EPS**

Bardzo istotnym elementem każdej biofilmującej społeczności bakteryjnej jest zdolność do tworzenia polimerowej macierzy pozakomórkowej EPS, która spełnia wiele różnorodnych funkcji. Stanowi ona 90% suchej masy formującego się biofilmu.

Macierz jest materiałem zewnątrzkomórkowym, w większości produkowanym przez mikroorganizmy, który przykrywa komórki w biofilmie. W skład macierzy wchodzi różne biopolimery, które stanowią rusztowanie dla trójwymiarowej struktury biofilmu, jak również odpowiadają za adhezję do powierzchni i kohezję komórek wewnątrz biofilmu. Model komórek pokrytych EPS stanowiących biofilm przedstawiono na rysunku 1.5. Zewnątrzkomórkowe substancje polimerowe immobilizują komórki w biofilmie, utrzymując je w bliskim kontakcie, co umożliwia wymianę sygnałów pomiędzy nimi i tworzenie przez to synergistycznego mikrokonsorcjum. Poprzez utrzymywanie w jednej przestrzeni różnych enzymów, tworzony dodatkowo jest zewnętrzny system trawienny, co pozwala dostarczać źródeł węgla i energii budującym strukturę komórek. Macierz stanowi też centrum recyklingu, ponieważ zachowywane są w jej obrębie fragmenty i składniki zlizowanych komórek. Przechowywane jest w niej także DNA, które posłużyć może do późniejszego horyzontalnego transferu genów. EPS może dodatkowo służyć komórkom za źródło substancji odżywczych przy ich braku w środowisku. Rolą macierzy EPS jest również ochrona komórek przed wysychaniem, przed antybiotykami, metalami ciężkimi czy promieniowaniem ultrafioletowym [11] [16]. Komórki tworzące wspólnotę nie mogą być jednak całkowicie odizolowane od środowiska zewnętrznego, dlatego macierz poprzecinana jest kanałami wodnymi, którymi transportowane są substancje odżywcze oraz metabolity wtórne, toksyczne dla komórek [17].



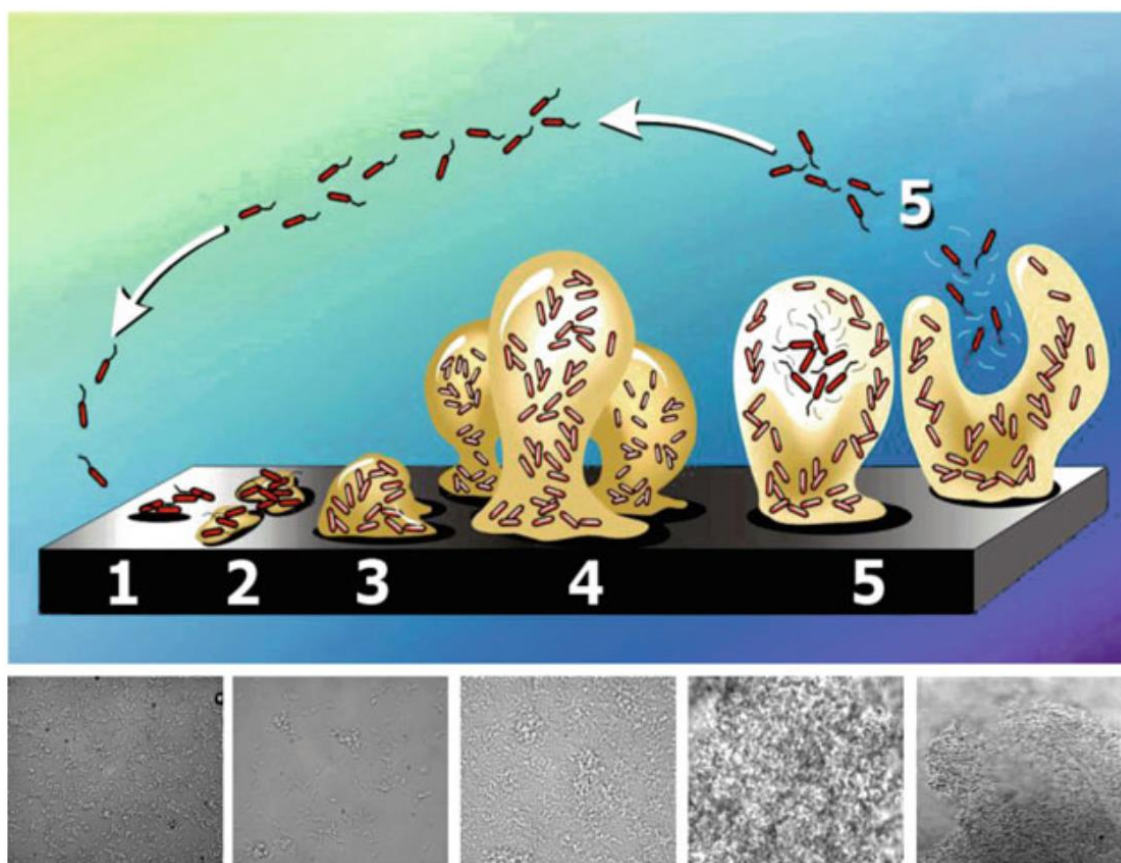
**Rysunek 1.5.** Model biofilmu bakteryjnego osiadłego na stałej powierzchni: a) struktura makrokolonii tj. komórki przykryte EPS, b) elementy składowe macierzy, c) przykłady oddziaływań i wiązań pomiędzy elementami składowymi macierzy EPS, oraz d) model interakcji łańcucha alginatu (po prawej) z zewnątrzkomórkowym enzymem - lipazą (po lewej) [11].

### 1.1.2.3. Fazy wzrostu i degradacji

Tworzenie się jak i degradacja biofilmu jest procesem skomplikowanym. Niemniej wyróżnić można pięć podstawowych faz wzrostu i degradacji biofilmu [16] [17] [18]:

1. **Adhezja początkowa** - bakterie planktoniczne aklimatyzują się poprzez wydzielanie molekuł zwiększających adhezję do kolonizowanej powierzchni. Komórki, posiadające zdolność do aktywnego poruszania, ulegają unieruchamianiu. Dochodzi do ich adsorpcji na powierzchni w co zaangażowane są elementy adhezyjne: białka adhezyjne, pilusy, wici, LPS, otoczki. Na tym etapie może dojść do adhezji odwracalnej, co oznacza, że część komórek może przekształcić się ponownie w formy planktoniczne w procesie desorpcji.
2. **Adhezja nieodwracalna** - Związane z powierzchnią komórki wydzielają molekuły sygnału produkcji i wydzielania zewnątrzkomórkowych biopolimerów, które staną się rusztowaniem trójwymiarowej struktury biofilmu.
3. **Dojrzewanie I** - Formują się mikrokolonie złożone z komórek pokrytych żelopodobną macierzą EPS, komórki dzielą się intensywnie.

4. **Dojrzewanie II** - Komórki wewnątrz biofilmu zwalniają swoje podziały, a metabolizm przestawiony zostaje na sekrecję polisacharydów, podstawowego komponentu macierzy. Biofilm osiąga trójwymiarową, dojrzałą formę.
5. **Rozproszenie** – Komórki znajdujące się na spodzie biofilmu osiągną przepętnienie co prowadzi do obniżonego dostępu substancji odżywczych i zwiększenia koncentracji odpadów, toksyn oraz metabolitów. Biofilm ulega reorganizacjom, co w konsekwencji prowadzić może do dyspersji komórek ze wspólnoty bądź całych fragmentów mikrokolonii (rysunek 1.6).



**Rysunek 1.6.** Cykl życia biofilmu. Górna część rysunku przedstawia pięć podstawowych faz wzrostu i degradacji biofilmu. Dolna część pokazuje odpowiadające im fotomikrografie [19].

## 1.2. Impedancyjne metody badawcze warstw mikrobiologicznych

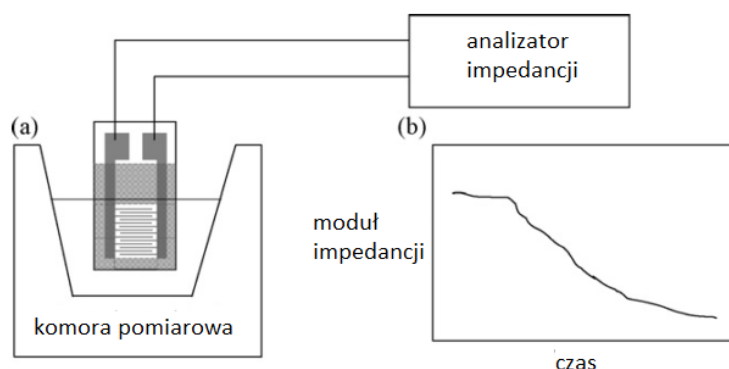
Istnieje wiele typów aparatury badawczej do pomiarów impedancyjnych obiektów biologicznych. W skład aparatury wchodzi zarówno czujniki, będące elementem bezpośrednio stykającym się z badanym obiektem, jak i urządzenia pomiarowe przetwarzające wielkości fizyczne na dane liczbowe. Niniejszy podrozdział prezentuje przegląd różnych wersji czujników (z i bez warstwy receptorowej) oraz eksperymentalne i komercyjne systemy pomiarowe.



### 1.2.1. Czujniki impedancyjne

Czujniki impedancyjne stanowią interfejs między urządzeniem pomiarowym a badanym obiektem bądź środowiskiem. Właściwości fizykochemiczne otoczenia czujnika oraz ich zmiany przekładają się na wartość jego impedancji mierzonej przy danej częstotliwości. W zależności od charakteru zmian otoczenia zmiany wartości impedancji mogą być zarówno duże, jak i pomijalnie małe. Stąd nie znając optymalnej częstotliwości pomiaru warto zastosować metodę spektroskopii impedancyjnej obejmującą pomiar w szerokim zakresie częstotliwości przy niskim sygnale pobudzenia i odpowiednią analizę otrzymanych wyników.

Sensory, których wartością wyjściową jest impedancja przyjmują wiele różnych form i zastosowań. Stosuje się czujniki dwu-, trzy- oraz czteroelektrodowe. Najprostszy układ dwuelektrodowy stosuje się głównie w czujnikach wilgotności oraz w systemach nie wymagających niwelacji wpływu zjawisk przyelektrodowych, natomiast metrologicznie bardziej złożone układy trzy- i czteroelektrodowe znajdują zastosowanie głównie w elektrochemii, gdzie ze względu na środowisko cieczowe występuje konieczność stabilizacji potencjału między elektrodami bądź eliminacji wpływu zjawisk przyelektrodowych na pomiar. Przykładowe stanowisko pomiarowe wykorzystujące dwuelektrodowy pomiar zawiesiny mikroorganizmów przedstawiono na rysunku 1.7.



**Rysunek 1.7.** Stanowisko do pomiaru zawiesiny mikroorganizmów: a) niebezpośredni pomiar impedancji mierzonego obiektu za pomocą czujnika z elektrodami palczastymi, b) zmiana wartości modułu impedancji w czasie spowodowana wzrostem liczby komórek bakteryjnych [20].

Czujniki impedancyjne wykazują obiecujące właściwości w zakresie możliwości monitorowania nimi warstw mikrobiologicznych w postaci białek [21] i biofilmów bakteryjnych [22] [23] [24] [25]. W tym wypadku impedancja czujnika odzwierciedla zdolność badanego obiektu biologicznego do przewodzenia prądu elektrycznego a także magazynowania energii w postaci pola elektrycznego. Wszystkie fizykochemiczne zmiany zachodzące w obiekcie biologicznym wiążą się ze zmianami ich właściwości elektrycznych a co za tym idzie ich impedancji. Do tego mikrobiologicznie istotne zjawiska takie jak fluktuacja koncentracji jonów w medium, podziały komórkowe oraz adhezja do powierzchni elektrod mogą być potencjalnie wykryte za pomocą czujników impedancyjnych [26] [27]. Największą zaletą metod impedancyjnych jest możliwość monitorowania wspomnianych zjawisk w czasie rzeczywistym. Kolejną zaletą jest

nieinwazyjność, brak konieczności stosowania markerów (*label-free detection*) i uzyskiwanie dodatkowych informacji nt. elektrycznych właściwości otoczenia czujnika.

Detekcja obecności bakterii za pomocą spektroskopii impedancyjnej może być potencjalnie przydatna we wszystkich systemach przepływowych zagrożonych namnażaniem się mikroobów. Przykładem takich systemów są w środowisku szpitalnym są np. cewniki, wkłucia centralne, a nawet rury doprowadzające wodę do pomieszczeń szpitalnych [15] [28].

W literaturze istnieją doniesienia nt. wykorzystania czujników impedancyjnych połączonych z zastosowaniem metody spektroskopii impedancyjnej do monitorowania adhezji mikroobów oraz formacji biofilmu. Szczególnie brane pod uwagę są szczepy bakterii powodujących zakażenia szpitalne, takie jak *Escherichia coli* [22] [29] [30] [31], *Staphylococcus aureus* [24] [29] [32], *Staphylococcus epidermis* [24] [33], *Pseudomonas aeruginosa* [15] [28] [34] [35], *Bacillus subtilis* [34], oraz *Salmonella typhimurium* [31] [36]. Do wspomnianych zastosowań wykorzystywane były również mikroczujniki impedancyjne z elektrodami o strukturze palczastej [24] [31] [33] [37] ze względu na swoje następujące zalety: małe wymiary czujników pozwalające na prowadzenie eksperymentu w małej skali z wykorzystaniem małej objętości próbki, szybki czas ustalania, niski omowy spadek potencjału, zwiększony współczynnik sygnału do szumu oraz wyższa czułość w porównaniu do konwencjonalnych makroelektrod.

Typowe czujniki z elektrodami palczastymi przeznaczone do badań mikrobiologicznych zwykle wykonywane są na krzemowych bądź szklanych podłożach z wykorzystaniem technik litograficznych [38]. Główną wadą tego typu rozwiązań jest wysoki koszt i skomplikowany proces produkcyjny. Ponadto w wypadku czujnika wykorzystywanego wielokrotnie obawiać można się jego szybkiego starzenia [30].

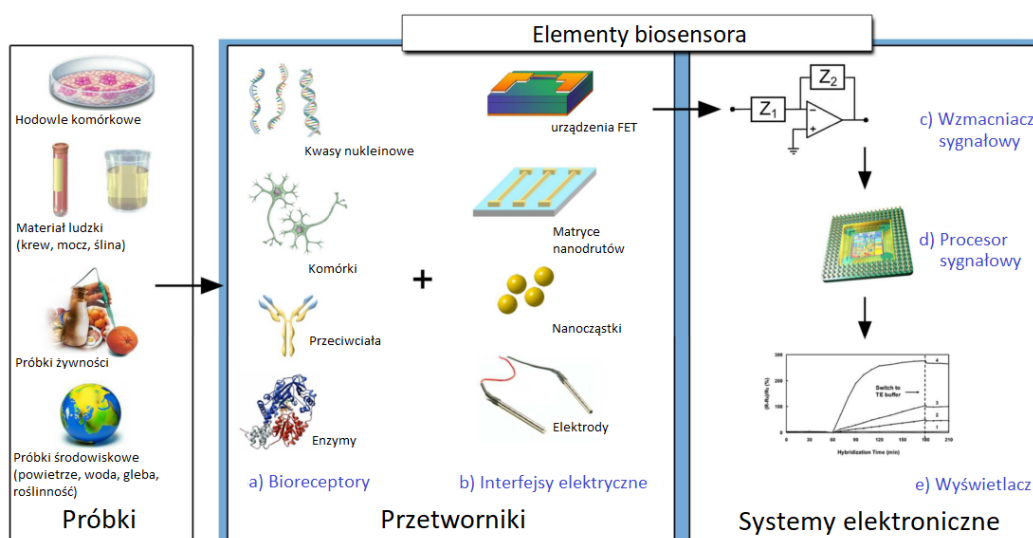
Czujniki impedancyjne wykonane w technologii PCB są obiecującą alternatywą ze względu na niskie koszty produkcji i dużą łatwość wytwarzania [39]. Czujniki na podłożu PCB były już badane pod kątem możliwości zastosowań w mikrobiologii, onkologii oraz immunologii, tj. wykrywania bakterii w moczu [29], analizy komórek nowotworu jelita grubego [40], oraz detekcji interleukiny-12 [39] [41]. Ponadto na podłożu PCB konstruowano konduktometryczne czujniki pH mające zastosowanie w detekcji enterobakterii wytwarzających karbapenemazę [42]. Czujniki impedancyjne wykonane w technologii LTCC również dają pewne spektrum zastosowań. Wg doniesień literaturowych przyrządy wykonane w technologii LTCC badane były pod kątem możliwości zastosowania ich w mikrobiologii tj. monitorowania stanu hodowli komórkowych [43], monitorowania roztworów wodnych [44], monitorowania koncentracji glukozy [45], stworzenia elektronicznego języka [46] oraz detekcji korozji [47]. Jednakże, wymienione przyrządy wykorzystywały do celów pomiarowych głównie metody woltamperometryczne unikając spektroskopii impedancyjnej.

## 1.2.2. Biosensory

Według Turnera, redaktora naczelnego czasopisma *Biosensors and Bioelectronics* oraz konstruktora pierwszego elektrochemicznego czujnika zawartości glukozy we krwi, poprawna jest następująca definicja biosensorów [48]:

*Biosensory to urządzenia analityczne zawierające materiał biologiczny (np. mikroorganizmy, tkanki, organelle, receptory, enzymy, przeciwciała, kwasy nukleinowe itp.), pochodzący z materiału biologicznego (np. przeciwciała rekombinowane, białka projektowane, aptamery itp.) lub materiał biomimiczny (np. syntetyczne receptory, biomimetyczne katalizatory, ligandy kombinatoryczne, polimery z odciskiem molekularnym itp.) bezpośrednio związany lub zintegrowany z fizykochemicznym przetwornikiem lub mikrosystemem przetwarzającym. Przetwarzanie może bazować na pomiarze optycznym, elektrochemicznym, termometrycznym, piezoelektrycznym lub magnetycznym.*

Jako główny element konstrukcyjny biosensorów wykorzystuje się zwykle przetwornik elektryczny np. czujnik impedancyjny [49] [50] [51], mikrorezonatory kwarcowe [52], mikrobilki krzemowe [53], matryce nanodrutów [54] lub urządzenia FET [55], który to wyposażony jest w odpowiednio przygotowaną warstwę receptorową. Takową warstwę mogą stanowić białka [56] [57], przeciwciała [39] [58], kwasy nukleinowe [59], aptamery [60] [61], enzymy [62] itp. Na rysunku 1.8 przedstawiono przykładowe elementy wchodzące w skład typowego biosensora: a) warstwa receptorowa selektywnie wiążąca się z analitem, b) interfejs służący jako czujnik, dający sygnał w momencie zajścia reakcji biologicznej, c) odpowiedni przetwornik (jako, że sygnałem z czujnika może być wszystko od wiązki lasera padającej pod zmiennym kątem po prąd wytwarzany na elektrodach), podający ustandaryzowany sygnał do toru przetwarzania, d) oprogramowanie komputerowe do dalszej analizy otrzymanych danych.

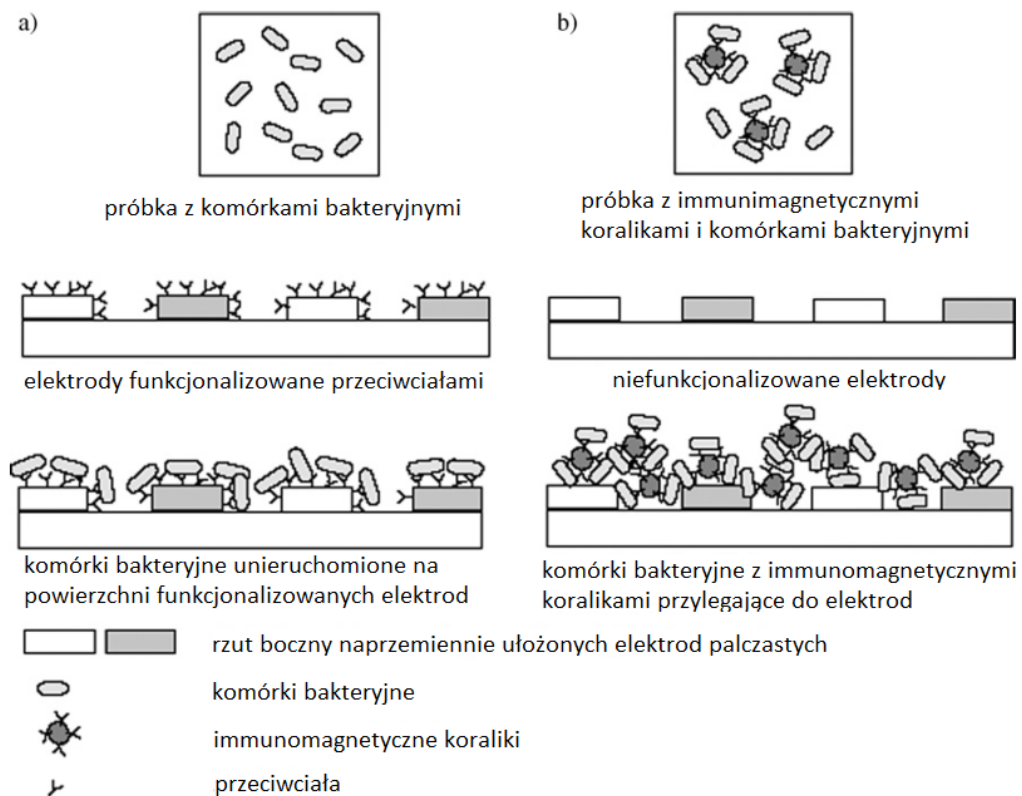


**Rysunek 1.8.** Przykładowe elementy konstrukcyjne biosensora [63].

Dwie przykładowe konstrukcje biosensora zrealizowane w oparciu o czujnik impedancyjny z elektrodami o strukturze palczastej przedstawiono na rysunku 1.9. W pierwszym wariantcie (rysunek 1.9a) warstwa receptorowa składa się z przeciwciał

immobilizowanych na elektrodach sensora. Obecność analitu (specyficznych komórek bakteryjnych) w próbce spowoduje związanie się komórek do warstwy receptorowej a co za tym idzie wpłynie na impedancję sensora. Drugi wariant biosensora (rysunek 1.9b) w swojej konstrukcji nie przewiduje chemicznej modyfikacji elektrod, lecz wykorzystuje ich właściwości fizyczne do zapewnienia bezpośredniego kontaktu sensora z analitem [64]. W omawianym wypadku warstwa receptorowa osadzona jest na powierzchni magnetycznych koralików mikroskopijnej wielkości, których zadaniem jest związanie analitu a następnie adhezja do powierzchni elektrod.

W ostatnich czasach popularne stają się stosowanie materiałów węglowych tj. grafitu, grafenu oraz nanorurek do wytwarzania bądź modyfikacji powierzchni elektrod czujników konduktometrycznych i impedancyjnych stanowiących bazę biosensora [60] [59] [61] [62]. Zastosowanie wymienionych materiałów konieczne jest do osadzenia pewnych typów warstw receptorowych oraz poprawy stabilności i produkcyjnej powtarzalność biosensorów. Poza zastosowaniami czujnikowymi modyfikacja elektrod grafenem znajduje zastosowanie w ogniwach paliwowych poprawiając ich wydajność [65].



**Rysunek 1.9.** Zasada działania biosensora impedancyjnego: a) wyposażonego w warstwę receptorową złożoną z immobilizowanych przeciwciał, b) opartego na niespecyficznej adsorpcji komórek bakteryjnych do powierzchni elektrod [20].

Oprócz popularyzujących się materiałów węglowych złoto wciąż pozostaje szeroko rozpowszechnionym substratem do wytwarzania elektrod czujników [66] [64], szczególnie, jeśli tiole (np. kwas 11-mekraptoundekanowy, 11-MUA) stanowią linker między elektrodą a biologicznie aktywnymi cząstkami [57].

### 1.2.3. Eksperymentalne systemy pomiarowe

W literaturze opisywane są autorskie systemy pomiarowe wykorzystujące pomiar impedancji do badania koncentracji bakterii w medium [67] [68] jak i wzrostu biofilmu [69]. Systemy te wykorzystują pomiar impedancji przy jednej częstotliwości pomiarowej. Skonstruowanie systemu potrafiącego mierzyć w szerokim zakresie częstotliwości jest zagadnieniem trudnym. Stąd szczególnie interesujące wydają się być konstrukcje oparte na układzie scalonym AD5933, i im właśnie poświęcony jest podrozdział 1.2.3.1.

#### 1.2.3.1. AD5933

Cytując dokumentację układu scalonego AD5933: „Układ AD5933 jest konwerterem impedancji o wysokiej precyzji, łączący w sobie generator przebiegi sinusoidalnego z 12-bitowym ADC. (...) Sygnał odpowiedzi pobudzanego obiektu próbkowany jest przez ADC a następnie przetwarzany za pomocą DFT” [70]. Napięcie pobudzenia generowane przez AD5933 jest programowalne, a komunikacja ze światem zewnętrznym zrealizowana jest za pomocą interfejsu I<sup>2</sup>C.

W literaturze istnieją doniesienia nt. prób zastosowania układu AD5933 w diagnostyce biomedycznej. Wykorzystywany był on m. in. do monitorowania hodowli komórkowych [71] [72], pomiarów pojedynczych komórek [73], wykrywania koagulacji krwi [74], pomiar biosensorów [75], ogólne pomiary bioimpedancji [76] [77] [78] [79] [80]. Inne zastosowania obejmowały monitorowanie obiektów technicznych jak konstrukcje stalowe i mosty [81] [82]. Należy tutaj zauważyć, że w celu uzyskania kompleksowych informacji dotyczących właściwości elektrycznych mierzonego obiektu i możliwości analizy danych pomiarowych za pomocą EEC impedancja musi być mierzona w szerokim zakresie częstotliwości [83].

Dane techniczne przykładowych mierników impedancji zbudowanych w oparciu o układ AD5933 wymieniono w tabeli 1.1. Z wymienionych konstrukcji jedynie trzy pozwalają na pomiar impedancji w zakresie częstotliwości większym niż trzy dekady. Typowy zakres mierzonej impedancji zawiera się w przedziale od 10  $\Omega$  do ponad 1 M $\Omega$ , jednakże w wielu wypadkach nie jest on określony. Większość z wymienionych mierników impedancji wymaga dodatkowego analogowego układu elektronicznego dla zapewnienia odpowiedniego interfejsu pomiędzy układem AD5933 a mierzonym obiektem.

Większość z cytowanych artykułów skupia się na aspekcie eksperymentalnym opisywanych badań i nie ujawnia szczegółów konstrukcyjnych mierników impedancji. Nawet dokumentacja i noty aplikacyjne układu scalonego AD5933 dostarczone przez producenta (Analog Devices) nie zawierają pewnych istotnych informacji. Autor rozprawy podejmuje temat konstrukcji własnego miernika opartego na układzie AD5933 (rozdział 2.4.1) i ze szczegółami przedstawia wszystkie etapy projektu, co może okazać się pomocne dla wszystkich konstruktorów budujących analizatory oparte o ten właśnie układ.

**Tabela 1.1.** Lista mierników impedancji bazujących na układzie AD5933.

<b>Autor</b>	<b>Zastosowanie</b>	<b>Zakres częstotliwości</b>	<b>Zakres impedancji</b>	<b>Błąd maksymalny</b>
C. J. Chen i in. [71]	Monitorowanie hodowli komórkowej	Tylko 10 Hz	Brak danych	Brak danych
T. Schwarzenberger i in. [72]	Monitorowanie hodowli komórkowej	100 Hz – 100 kHz	Brak danych	2 % - moduł, 2 % - argument
M. H. Wang i in. [73] (wykorzystano AD5934)	Pomiary pojedynczych komórek	0.1 Hz – 100 kHz	100 $\Omega$ – 10 M $\Omega$	Ponad 10% dla pomiarów komórek
J. Broeders i in. [75]	Pomiary biosensora	10 Hz – 100 kHz	10 $\Omega$ – 5 M $\Omega$	Brak danych
P. Bogóñez-Franco i in. [77]	Monitorowanie bioimpedancji	100 Hz – 200 kHz	10 $\Omega$ – 1 k $\Omega$	2.5 % - moduł, 4.5 % - argument
J. Ferreira i in. [78]	Pomiar bioimpedancji	5 kHz – 450 kHz	Brak danych	0.7 % - rezystancja, 17 % - reaktancja
C. Margo i in. [79]	Pomiar bioimpedancji	1 kHz – 100 kHz	Brak danych	2.5 % - moduł, 1.3 % - argum.
A. Melwin i K. Rajasekaran [80]	Pomiar składu ciała	Tylko 50 kHz	Brak danych	2 % (nie sprecyzowano)
J. Hoja i G. Lentka [81] [82]	Monitorowanie konstrukcji technicznych	0.01 Hz – 100 kHz	10 $\Omega$ – 10 G $\Omega$	1.6 % - moduł, 0.6 % - argument

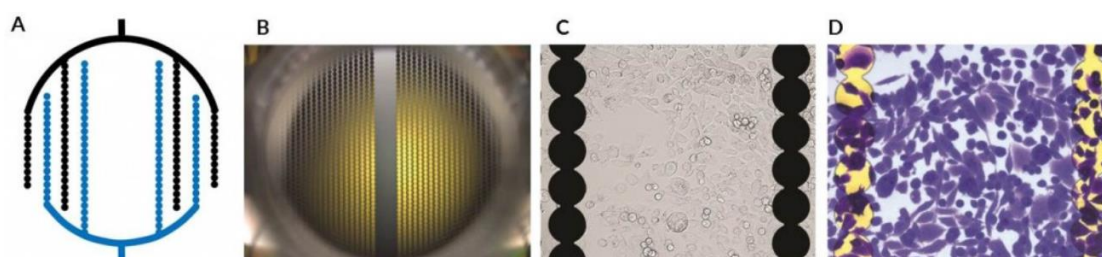
#### 1.2.4. Systemy komercyjne

Na rynku dostępne są komercyjne systemy pomiarowe przystosowane do zastosowań w mikrobiologii, bazujące na pomiarach impedancji. Wśród nich wyróżnić można dwa rodzaje systemów wykorzystujące:

1. planarne mikroczipy impedancyjne, nastawione na pomiar stanu warstwy mikrobiologicznej osiadającej (adhezja białek lub komórek) bądź wytwarzającej się na czujniku (np. wzrost biofilmu) - do tego rodzaju systemów należą xCELLignence RTCA i Bionas Discovery 2500,
2. klasyczne, podłużne makroelektrody rozmieszczone w relatywnie dużych odstępach, nastawione na pomiar całej zawiesiny mikroorganizmów i detekcję zwiększonej konduktancji medium na skutek aktywności metabolicznej danych komórek (wykorzystywane np. w badaniach bakterii nie tworzących biofilmu lub do monitorowania stanu hodowli komórkowej w bioreaktorze) - do tego rodzaju systemów należą: RABIT, BacTrac, FUTURA, iBiomass.

#### 1.2.4.1. *xCELLigence RTCA*

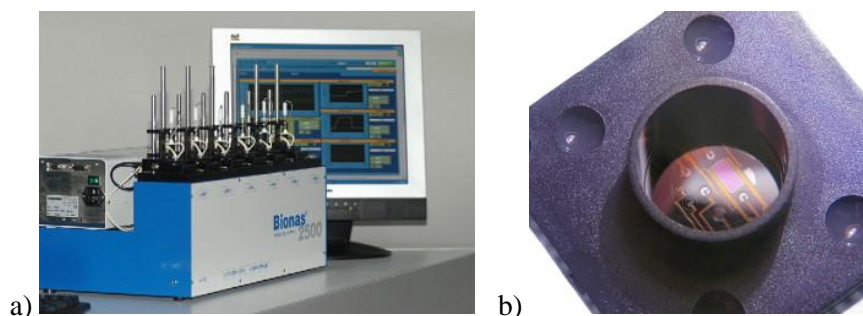
xCELLigence Real-Time Cell Analysis (RTCA) (ACEA Biosciences, Inc.) jest popularnym urządzeniem służącym do nieinwazyjnego monitorowania impedancji w czasie rzeczywistym, w celu określenia proliferacji komórek, ich zmian morfologicznych oraz adhezji, bez konieczności stosowania markerów [84] [85] [86]. W zależności od wersji wyposażone jest ono w płytki zawierające 16 lub 96 niezależnych celek pomiarowych zawierających mikroczujniki impedancyjne. Pojedynczą celkę pomiarową zaprezentowano na rysunku 1.10. Ważną cechą jest to, że wynik badania podawany jest w jednostkach arbitralnych określonych jako „Cell index”. Producent nie podaje też zakresu częstotliwości, w jakim operuje system – znane jest jedynie zmienne napięcie pobudzenia wynoszące 22 mV.



**Rysunek 1.10.** Pojedynczy dołek (1 z 96) płytki typu E-Plate: a) uproszczony rysunek elektrod, b) zdjęcie dołka, c) ludzkie komórki na powierzchni czujnika, d) komórki po wybarwieniu [84].

#### 1.2.4.2. *Bionas Discovery 2500 system*

Bionas Discovery 2500 (Bionas GmbH) jest złożonym systemem pomiarowym pozwalającym na monitorowanie w czasie rzeczywistym parametrów fizjologicznych komórek [87]. Wykorzystuje w tym celu chip Bionas SC1000, umożliwiający pomiar odczynu pH, poziomu natlenienia oraz impedancji badanego obiektu – chip wyposażony jest w mikroczujnik impedancyjny o strukturze palczastej. System pomiarowy może obsłużyć do 6 chipów [88]. System wraz z chipem przedstawiono na rysunku 1.11.



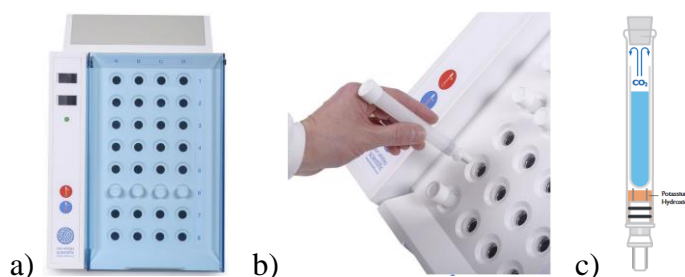
**Rysunek 1.11.** System pomiarowy i chip: a) Bionas Discovery 2500, b) Bionas SC1000.

Niestety podobnie jak w wypadku xCELLigence producent nie podaje, w jakim zakresie bądź przy jakiej częstotliwości wykonywany jest pomiar impedancji, podobnie

nieznany jest sygnał pobudzenia jak i wynik przedstawiany za pomocą jednostek arbitralnych.

#### 1.2.4.3. **RABIT - Rapid Automated Bacterial Impedance Technique**

RABIT (Don Whitley Scientific) jest systemem pomiarowym bazującym na pomiarze impedancji przeznaczonym do szybkiej detekcji bakterii, drożdżaków i grzybów [89]. System zapewnia regulowaną temperaturę inkubacji próbek, co przydaje się w wypadku badań mikrobiologicznych. System posiada 2 tryby pomiarowe: bezpośredni, bazujący na zwykłym pomiarze konduktancji między elektrodami zanurzonymi w próbce, której to konduktancja zmienia się w zależności od aktywności metabolicznej mikroorganizmów oraz tryb pośredni, w którym to elektrody są galwanicznie odseparowane od próbki, natomiast znajduje się między nimi materiał wrażliwy na dwutlenek węgla, który zmienia swoją impedancję w zależności od ilości CO<sub>2</sub> wyprodukowanego przez hodowlę. Tryb pośredni przydaje się do detekcji mikroorganizmów, których aktywność metaboliczna nie wpływa na rezystancję medium. Ponadto RABID posiada budowę modułową – pozwala na połączenie ze sobą aż 16 modułów po 32 celki pomiarowe każdy uzyskując w ten sposób quasi-jednoczesny pomiar 512 próbek [90]. System pomiarowy oraz celkę pomiarową do pomiaru pośredniego zaprezentowano na rysunku 1.12. Mimo nieznannej częstotliwości pomiarowej i sygnału pobudzenia wyniki pomiarów podawane są w simensach, co może być przeliczone na inne jednostki pochodne.



**Rysunek 1.12.** a) System RABIT, b) umieszczanie celki pomiarowej z próbką w urządzeniu, c) celka CO<sub>2</sub>-wrażliwa do pomiarów pośrednich.

#### 1.2.4.4. **BacTrac 4300 i BioTrac 4250**

BacTrac 4300 i BioTrac4250 (Sy-Lab Microbiology) są systemami pomiarowymi przeznaczonymi do badania płynnych próbek mikrobiologicznych – stosują pomiar impedancji badanego obiektu [91]. Pierwszy z nich jest większym systemem, z miejscem przewidzianym na 64 celki pomiarowe i dwie komory klimatyczne, potrafiący mierzyć metodą dwu- i czteroelektrodową. Drugi system jest wersją uproszczoną, posiadająca miejsce na 21 celek pomiarowych, jedną komorę klimatyczną, oraz potrafi mierzyć tylko dwuelektrodowo [92]. Wymienione systemy pomiarowe wraz z celkami pomiarowymi zaprezentowano na rysunku 1.13. Jako wynik pomiaru otrzymuje się dwie wartości arbitralne: „M-value” oraz „E-value”. Powiązane są one



odpowiednio ze stanem medium oraz elektrod. Niestety również nie są znane parametry sygnału pomiarowego.



**Rysunek 1.13.** Urządzenia: a) BacTrac 4300 i b) BioTrac 4250, c) celki pomiarowe cztero i dwuelektrodowa oraz d) wizualizacja elementów biologicznych w celce [92].

#### 1.2.4.5. FUTURA

FUTURA (Aber Instruments) jest systemem pomiarowym o dużej elastyczności i możliwościach konfiguracji, gdyż może się na niego składać wiele różnych urządzeń, aczkolwiek sondy przeznaczone są do współpracy z dużymi bioreaktorami. Wyróżnia się trzy podstawowe komponenty: sonda z czujnikiem, umieszczana w hodowli komórkowej; moduł komunikacyjny, potrafiący obsłużyć od 1 do 8 czujników; jednostkę przetwarzającą dane otrzymywane z modułu komunikacyjnego (rysunek 1.14). Oprócz zróżnicowanego zestawu elementów podstawowych producent oferuje różne warianty oprogramowania. Sądząc pod danych katalogowych sond system przewidziany jest do pomiaru impedancji w zakresie od 50 kHz do 20 MHz w układzie dwu- lub czteroelektrodowym. Dane wyjściowe mogą być podawane w simensach na centymetr lub w zdefiniowanych przez producenta jednostkach określających liczbę komórek bądź ich masę w jednostce objętości (komórek na litr lub gramów na litr) [93].



**Rysunek 1.14.** Przykładowe elementy składowe systemu FUTURA: a) sonda o średnicy 25 mm przeznaczona do dużych bioreaktorów, b) aktywny uchwyt do sondy, c) moduł komunikacyjny na 8 czujników [93].

#### 1.2.4.6. iBiomass

iBiomass (Fogale Biotech) jest siostrzanym systemem produktów FUTURA opisanym w podrozdziale 1.2.4.5. Posiada również modułową budowę, obsługę wielu czujników, pomiar w układzie dwu- lub czteroelektrodowym oraz jest przeznaczony do współpracy z bioreaktorami. Dane katalogowe nie podają zakresu częstotliwości pomiaru, lecz ich wynik podawany jest w simensach na cm lub faradach na cm [94].

#### **1.2.4.7. Bactometer i Malthus**

Bactometer Microbial Monitoring System firmy bioMerieux i Malthus Microbiological Analyzer firmy Malthus Instruments Ltd. są historycznymi, niedostępnymi obecnie w sprzedaży systemami do impedancyjnego pomiaru próbek mikrobiologicznych. Wyniki pomiaru podawane były w simensach. Systemy te wykorzystywane były głównie do pomiaru wzrostu hodowli komórek [95], w tym bakteryjnych [96] [97] [98].

### **1.3. Cele pracy**

Przegląd informacji dotyczących impedancyjnych metod badawczych warstw mikrobiologicznych doprowadził autora do sformułowania następujących celów badawczych:

1. Opracowanie miniaturowego czujnika impedancyjnego wysokiej jakości, wykonanego technikami mikroelektronicznymi, zdolnego do monitorowania adhezji i wzrostu warstw mikrobiologicznych oraz stanowiącego bazę do dalszych badań.
2. Ze względu na wymagania i wysokie koszty produkcji technikami mikroelektronicznymi kolejny cel stanowił znalezienie alternatywy – opracowanie taniego w produkcji miniaturowego czujnika zdolnego do monitorowania adhezji i wzrostu warstw mikrobiologicznych, który mógłby być używany jednorazowo.
3. Opracowanie systemu pomiarowego, umożliwiającego pomiar impedancji w szerokim zakresie częstotliwości i zdolnego obsłużyć jednocześnie wiele czujników.
4. Wykorzystanie metody spektroskopii impedancyjnej wraz z modelowaniem EEC do identyfikacji zjawisk przewodnictwa i polaryzacji wpływających na zmiany kształtu widma impedancji czujnika podczas badania warstw mikrobiologicznych

Realizacja wyznaczonych celów opisana została w dalszych rozdziałach rozprawy. Wymagała ona teoretycznego zapoznania się z metodą spektroskopii impedancyjnej, poznania komercyjnego jak i konstrukcji własnego sprzętu pomiarowego oraz sprzętu pomocniczego i oprogramowania sterującego. Ponadto zaprojektowano i zlecono wykonanie czujników impedancyjnych wykorzystywanych później w badaniach. Wszystkie materiały i metody opisano w rozdziale 2.

Kolejnym krokiem realizacji celów było przeprowadzenie badań nad zastosowaniem czujników impedancyjnych w pomiarach warstw mikrobiologicznych, począwszy od wyznaczenia podstawowych parametrów czujników, poprzez pomiary adhezji białek do powierzchni czujników, a na pomiarach wzrostu i degradacji biofilmów kończąc. Przeprowadzone badania opisano w rozdziale 3.

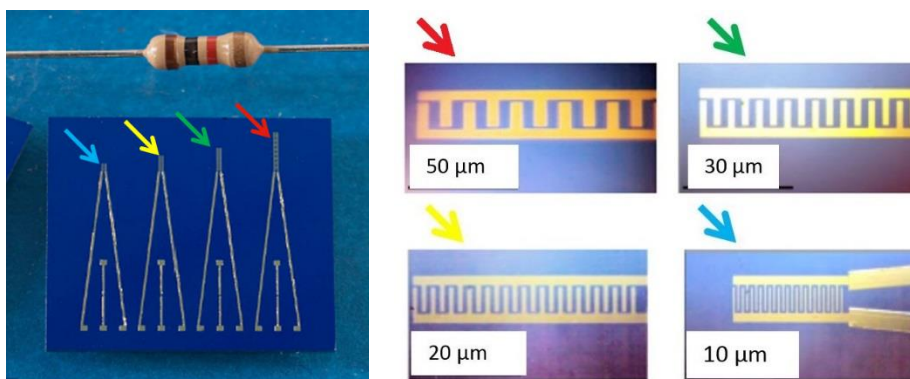
Rozprawa zwięzła jest podsumowaniem rozliczającym realizację wyznaczonych celów zawartym w rozdziale 4.

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Czujniki impedancyjne

Czujniki impedancyjne stanowią interfejs między urządzeniem pomiarowym a badanym obiektem. Zmiany fizykochemiczne zachodzące w ośrodku przylegającym do elektrod sensora (np. zmiana wilgotności otoczenia, stężenia jonów w roztworze wodnym, odczynu pH) powodują zmiany jego impedancji.

Opisywane w rozprawie badania stanowią kontynuację prac dra inż. Mateusza Wrońskiego z Zakładu Nanometrologii WEMiF PWr, obejmujących zastosowanie miniaturowych czujników impedancyjnych z elektrodami o strukturze palczastej do pomiaru zmian właściwości fizykochemicznych pożywek i zawiesin bakteryjnych [1] [2] [99]. Używane w tym celu były dedykowane mikroczujniki impedancyjne o różnych rozstawach elektrod na podłożu krzemowym wykonywane w Instytucie Technologii elektronowej w Warszawie przedstawione na rysunku 2.1. Efektem prac było zidentyfikowanie zjawisk zachodzących w badanych próbkach oraz opracowanie zestawu fizykalnych elektrycznych modeli równoważnych aproksymujących uzyskane widma impedancji. Prowadzone pomiary pozwoliły na zebranie widm impedancji typowych pożywek i buforów hodowlanych oraz na zbadanie zależności impedancji od wielu parametrów, m.in. temperatury, ilości cieczy nad elektrodami czy zawartości jonów. Określono też strukturę dwóch podstawowych modeli równoważnych pozwalających na aproksymacje wszystkich uzyskanych widm impedancji.

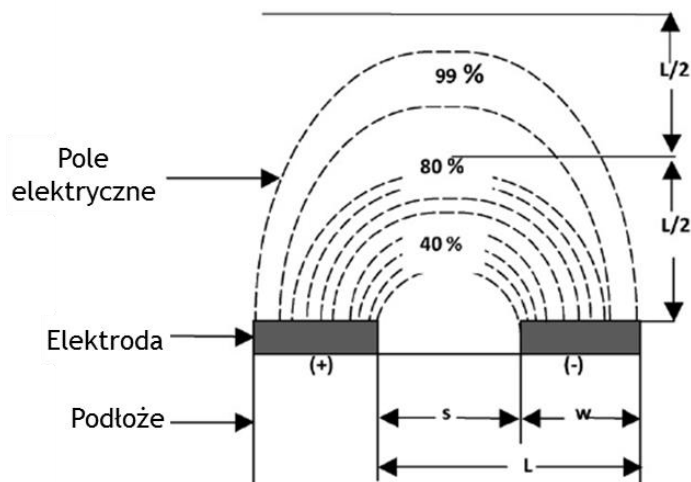


**Rysunek 2.1.** Mikroczujniki impedancyjne na podłożu krzemowym [1]. Liczby na prawym obrazku oznaczają równe sobie szerokości palców elektrod i odległości między nimi.

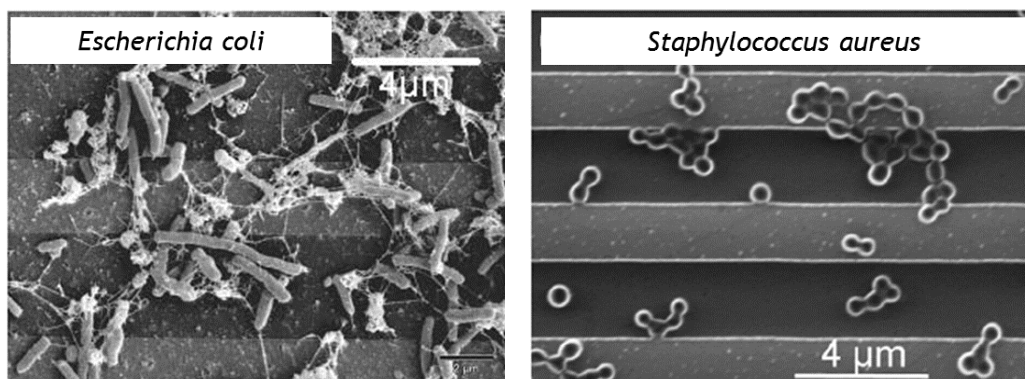
Zaprezentowane czujniki posiadają miniaturowe rozmiary. Dzięki nim charakteryzowały się następującymi cechami [100]:

- Zakładając, że ośrodek otaczający czujnik jest jednorodny, to pole elektryczne będzie zamykać się na wysokość równą sumie odległości między elektrodami i szerokości elektrody jak przedstawiono na rysunku 2.2, a co za tym idzie pomiar wykonywany będzie bardzo lokalnie.
- Szybki czas ustalania
- Duży SNR (brak konieczności stosowania elektrody referencyjnej jak w klasycznej elektrochemii)

- Szerokość i rozstaw elektrod powinny być wymiarami zbliżone do mierzonego obiektu jak na rysunku 2.3.



**Rysunek 2.2.** Rozkład linii pola elektrycznego między elektrodami planarnymi w jednorodnym środowisku. W odległości  $L$  od powierzchni elektrod zawiera się 99% linii pola [50].



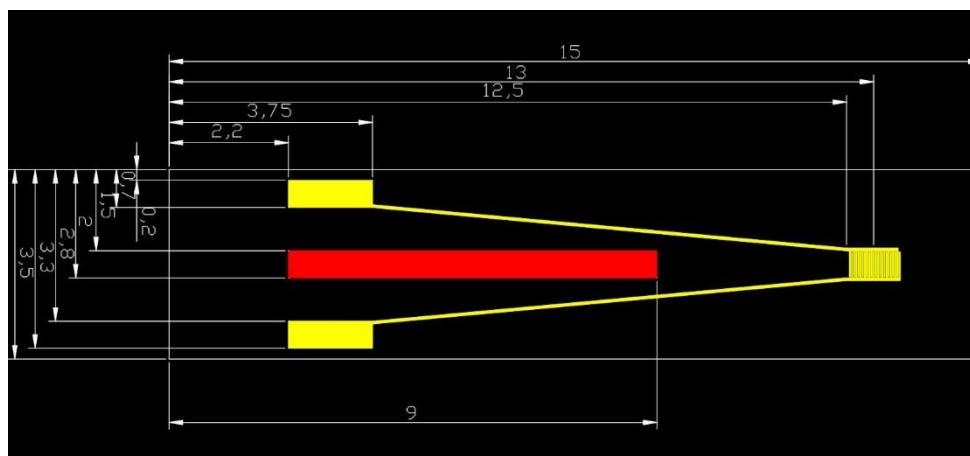
**Rysunek 2.3.** Przykłady bakterii na czujniku impedancyjnym [50] [51].

Przedmiotem badań autora rozprawy były różne rodzaje czujników impedancyjnych z elektrodami o strukturze palczastej. Różniły się przede wszystkim podłożem a co za tym idzie technologią wykonania oraz rozmiarami i sposobem wykonania elektrod. Poniższe podrozdziały szczegółowo opisują przetestowane sensory.

### 2.1.1. Mikrocujniki impedancyjne na podłożu szklanym i krzemowym

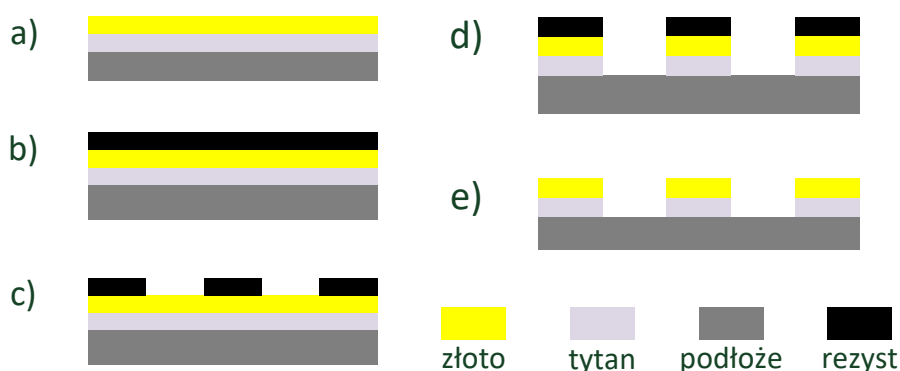
Mikrocujniki impedancyjne na podłożu szklanym i krzemowym wykonano Instytucie Technologii Elektronowej w Warszawie [101].

Przed podjęciem procesu produkcyjnego czujniki zaprojektowano w programie AutoCAD (format DWG) jak pokazano na rysunku 2.4. Geometria rozstawu złączy jak i samej grubości krzemu przewidywała możliwość podłączenia czujnika do złącza typu micro USB B, eliminując tym samym konieczność klejenia czujnika do płytki nośnej i czasochłonnego lutowania złączy, która miała miejsce w poprzedniej generacji czujników.

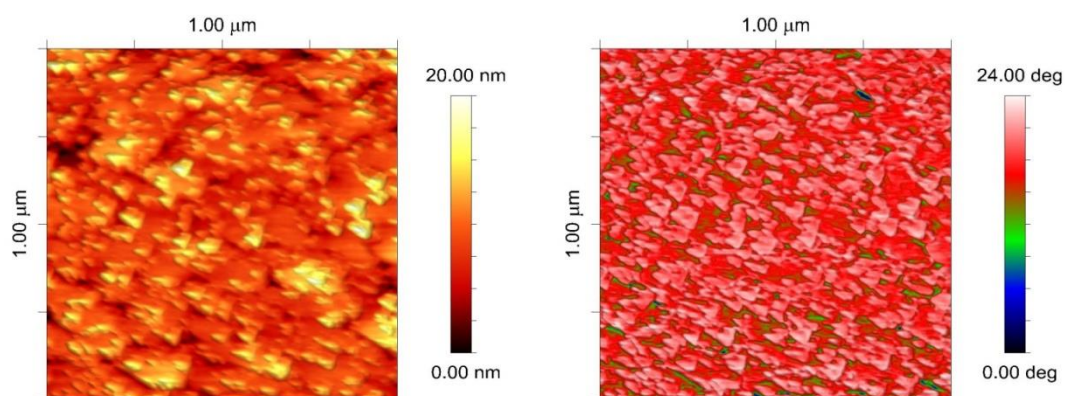


**Rysunek 2.4.** Projekt CAD czujnika z elektrodą ochronną na podłożu krzemowym. Kolorem żółtym zaznaczono metalizację dwutlenku krzemu na powierzchni podłoża, kolorem czerwonym metalizację kontaktu omowego do dolnej warstwy krzemu.

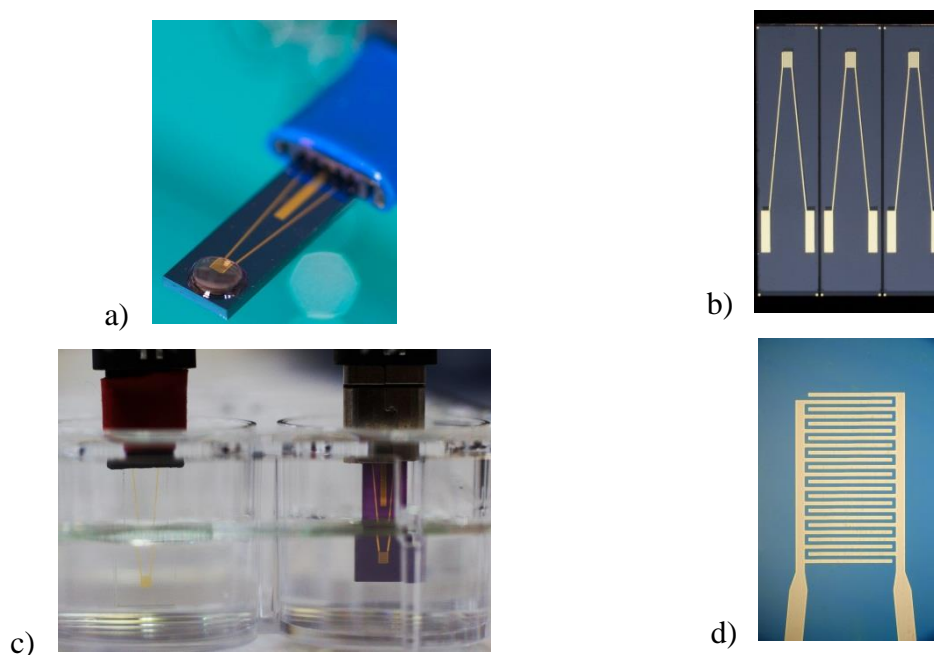
Pierwszy rodzaj z wymienionych wyżej czujników wykonano na szkłe typu PYREX, a drugi na utlenionym podłożu krzemowym. W obydwu wypadkach proces technologiczny formowania elektrod palczastych wyglądał podobnie. W pierwszej kolejności na podłożu naporowano 10 nm warstwę adhezyjną tytanu i 650 nm warstwę złota. Następnie w procesie fotolitografii bezmaskowej (ang. *Direct writing lithography*) zdefiniowano strukturę czujników i przeprowadzono mokre trawienie warstwy złota i tytanu. Po trawieniu usunięto emulsję światłoczułą. Schemat procesu technologicznego przedstawiono na rysunku 2.5. Jakość wykonania elektrod określono za pomocą mikroskopu sił atomowych – wyniki pomiaru topografii powierzchni elektrod jak i kontrastu fazowego zaprezentowano na rysunku 2.6. Ostatni etap procesu wytwarzania czujników na utlenionym krzemie obejmował formowanie kontaktów omowych do podłoża. Na rysunku 2.7 zaprezentowano zdjęcia wykonanych czujników impedancyjnych oraz sposób ich mocowania za pomocą wtyczki micro USB.



**Rysunek 2.5.** Schemat procesu technologicznego czujników impedancyjnych: a) naporowanie tytanu i złota na podłożu, b) nałożenie emulsji światłoczułej, c) zdefiniowanie wzoru, d) mokre trawienie złota i tytanu, e) usunięcie emulsji światłoczułej.

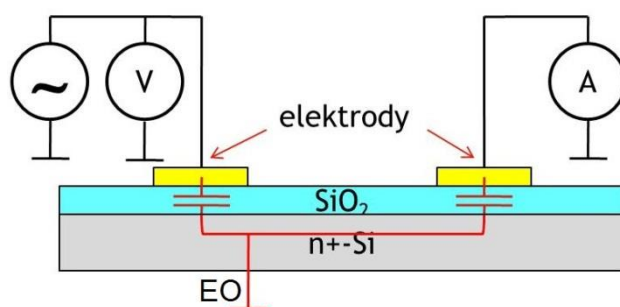


**Rysunek 2.6.** Topografia (lewy) i przesunięcie fazowe (prawy) powierzchni złotej elektrody czujnika zbadane mikroskopem sił atomowych.



**Rysunek 2.7.** Mikroczujniki impedancyjne: a) wykonane na krzemie, b) wykonane na szkle, c) zamontowany we wtyczce micro USB, d) zbliżenie na strukturę elektrod.

Wydłużony kształt czujników pozwala na ich pionowe umieszczenie w dołkach płytki titracyjnej, co jest istotne w pomiarach próbek biologicznych (rysunek 2.7c). Odległość pomiędzy elektrodami i szerokość palców elektrod wynosiły  $20\ \mu\text{m}$ , zaś pole elektrod miało wymiary  $0,6 \times 1\ \text{mm}^2$ . Czujniki wykonane na warstwie  $\text{SiO}_2$  posiadały dodatkową, środkową elektrodę – elektrodę ochronną (EO), podłączaną do masy. Zadaniem EO, wykonanej jako kontakt omowy do krzemowego podłoża, jest eliminacja wpływu pasożytniczego sprzężenia pojemnościowego elektrod przez przewodzące podłoże. Ilustrację zjawiska sprzężenia pojemnościowego w czujniku na utlenionym krzemie i sposób podłączania EO przedstawiono na rysunku 2.8.

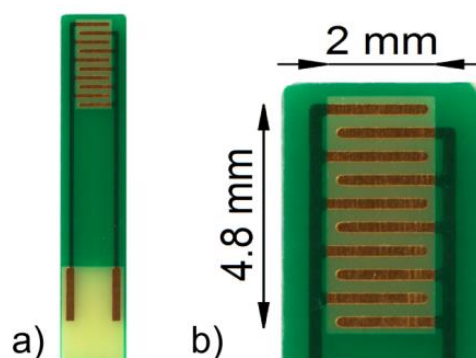


**Rysunek 2.8.** Przekrój czujnika impedancyjnego na utlenionym krzemie w układzie pomiarowym z elektrodą ochronną podłączoną do masy.

### 2.1.2. Czujniki impedancyjne w technologii PCB

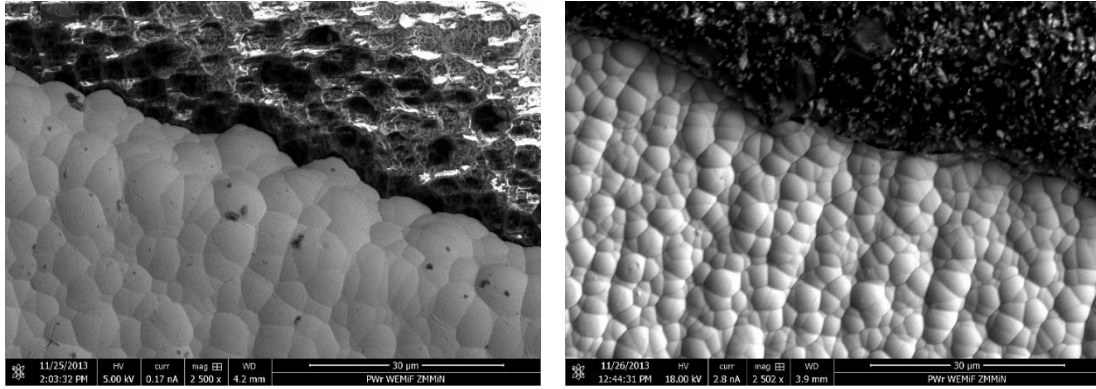
Ze względu na wysokie koszty produkcji czujników technologią mikroelektroniczną autor rozprawy zdecydował się poszukać tańszego rozwiązania. Pierwszym pomysłem było zaprojektowanie czujnika w ogólnodostępnej technologii, który byłby konstrukcyjnie podobny do przedstawionego w poprzednim podrozdziale pierwowzoru.

Układ czujnika został zaprojektowany w programie Eagle (CadSoft). Projekt przewidywał obecność elektrod o strukturze palczastej jako interfejs z otoczeniem sensora. Każda z elektrod składała się z pięciu palców o długości 1,9 mm i szerokości 0,25 mm. Czujniki wyprodukowano w firmie Satland Prototype (Gdańsk) w technologii obwodu drukowanego PCB na powszechnie wykorzystywanym w elektronice laminacie epoksydowym typu FR-4. Grubość warstwy miedzi na laminacie wynosiła 35  $\mu\text{m}$ . Dla zapewnienia stabilności powierzchni zastosowano złote pokrycie elektrod, wykonane jeszcze na etapie produkcyjnym. Dzięki niskiemu kosztowi produkcji sensory przewidziane były jako jednorazowego użytku zapewniając tym samym możliwie najlepiej powtarzalny stan początkowy czujnika a co za tym idzie warunki początkowe pomiaru. Czujniki zaprezentowano na rysunku 2.9.



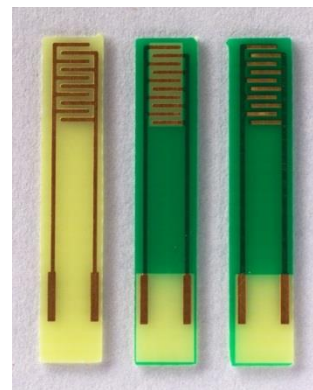
**Rysunek 2.9.** Czujniki impedancyjne wykonane w technologii PCB: a) widok ogólny, b) zbliżenie na elektrody.

Oględziny czujnika pod SEM przedstawione na rysunku 2.10 wykazały możliwą porowatość laminatu (podłoża) PCB. Stąd pomysł stworzenia trzech wersji sensora różniących się powierzchnią pokrycia soldermaski. Pierwszy typ sensora nie był pokryty soldermaską, drugi posiadał wycięcie na pole elektrod posiadając jedynie zabezpieczone doprowadzenia, trzeci przewidywał pokrycie całej powierzchni czujnika z wyjątkiem samych palców elektrod i styków. Trzy wersje sensora przedstawiono na rysunku 2.11.



**Rysunek 2.10.** Obraz SEM czujnika: krawędź elektrody i podłoża PCB (lewy), krawędź elektrody i soldermaski (prawy).

**Rysunek 2.11.** Trzy typy czujników wykonanych w technologii PCB. Bez pokrycia soldermaską (lewy), z pokrytymi doprowadzeniami elektrycznymi (środek) i całkowitym pokryciem soldermaską z wyjątkiem samych palców elektrod i styków.

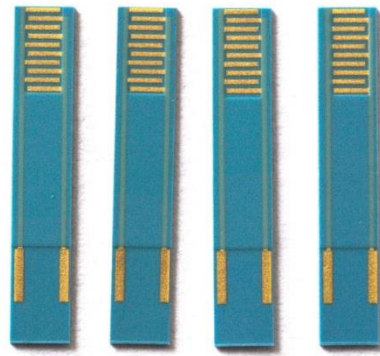


### 2.1.3. Czujniki impedancyjne w technologii LTCC

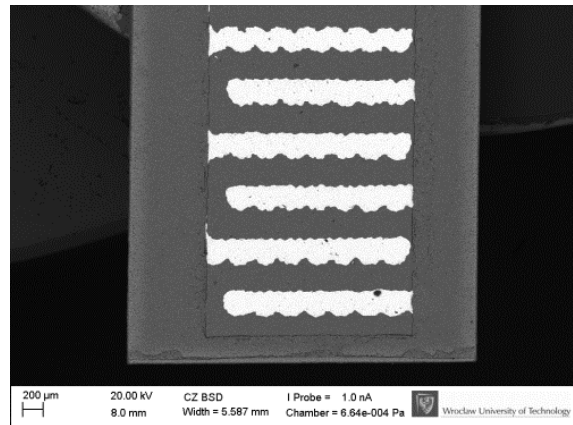
Projekt i układ czujnika jest identyczny jak opisano w sekcji 2.1.2. Sensory wykonano w Zakładzie Mikrosystemów i Fotoniki Wydziału Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki Politechniki Wrocławskiej w technologii LTCC. Jako podłoże zastosowano 4 warstwy ceramiki GreenTape™ 951 (DuPont). Pożądany kształt uzyskano poprzez cięcie wiązką lasera (LPKF Protolaser U cutting system). Elektrody i ich doprowadzenia elektryczne zostały naniesione na ceramiczne podłoże metodą sitodruku (złota pasta przewodząca ESL 8880-H, Electroscience Laboratories). Na wierzch naniesiona została dodatkowa warstwa ceramiki celem odizolowania doprowadzeń elektrycznych. Gotowe czujniki przedstawiono na rysunku 2.12.

Ogłędziny czujnika pod skaningowym mikroskopem elektronowym zaprezentowane na rysunku 2.13 ujawniły nierównomiernie uformowane brzegi elektrod czujników, jednakże jest to wynik ograniczeń technologicznych zastosowanej maszyny oraz rozdzielczości zastosowanego sita i nie stanowi przeszkód w zastosowaniu aplikacyjnym.





**Rysunek 2.12.** Czujniki impedancyjne wykonane w technologii LTCC.



**Rysunek 2.13.** Obraz SEM elektrod czujnika na podłożu LTCC.

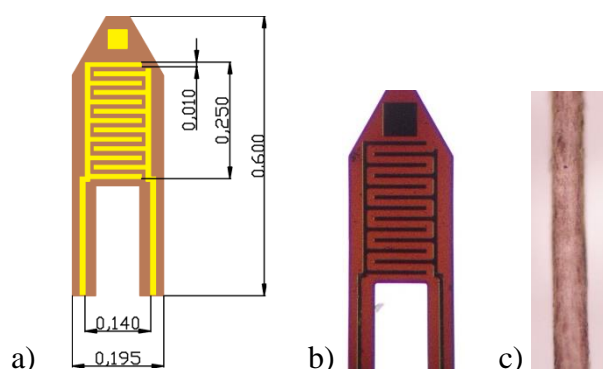
#### 2.1.4. Mikrocujniki impedancyjne na mikroźwigni krzemowej

W Zakładzie Nanometrologii Wydziału Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki Politechniki Wrocławskiej we współpracy głównie z Instytutem Technologii Elektronowej (Warszawa) i Instytutem Immunologii i Terapii Doświadczalnej (Wrocław) od dekady rozwijane są metody pomiarowe mające za zadanie wykorzystanie mikroźwigni krzemowych jako czujników biochemicznych [102]: badane są sposoby nanoszenia warstw receptorowych [103] [104], metody odczytu ugięcia mikrobelek [105] jak i sposoby wytwarzania samych mikroźwigni [106]. Jednym z głównych osiągnięć w tym zakresie jest skonstruowanie matrycy mikroźwigni krzemowych do detekcji i rozpoznawania endotoksyn bakterii gram-ujemnych [53].

Trzonem prezentowanego czujnika jest mikrobełka krzemowa o grubości 1  $\mu\text{m}$ . Jej kształt i wymiary w milimetrach zaprezentowano na rysunku 2.14. Dla zapewnienia separacji galwanicznej powierzchnię mikrobełki pokryto cienką warstwą dwutlenku krzemu. Na powierzchnię izolatora zostały naniesione dwie złote elektrody o strukturze palczastej. Grubość warstwy złota wynosiła około 280 nm. Szerokość palców elektrody i odstęp między nimi wynosiły 10  $\mu\text{m}$ . Zaprojektowano mikroźwignie prostokątne i trójkątne, w obydwu przypadkach na podwójnym zawieszeniu, ze względu na wymiary elektrod i konieczność obniżenia stałej sprężystości źwigni.

Ideą przyświecającą tego typu rozwiązaniu była chęć sprzężenia pomiaru impedancyjnego z pomiarem mechanicznym wynikającym z ugięcia mikroźwigni jak

w mikroskopie sił atomowych AFM. Czujniki tego typu przewidziane były do pomiarów w systemie przepływowym. Niestety po udanych wstępnych pomiarach zaprezentowanych w [107] zdecydowano nie rozwijać dalej tego typu sensorów ze względów praktycznych. Bardzo pracochłonne okazało się montowanie mikroźwigni na podstawie, lutowanie styków elektrycznych oraz izolacja galwaniczna styków za pomocą PDMS. Biorąc dodatkowo pod uwagę dostępność mikroźwigni wymienione czynniki praktycznie uniemożliwiały wykonywanie prób na większej liczbie tego typu czujników. Pozostałe problemy napotkane przy wykonanych badaniach obejmowały nieszczelności celki pomiarowej oraz duże sprzężenie pojemnościowe przez krzemowe podłoże, wpływające negatywnie na czułość sensora.



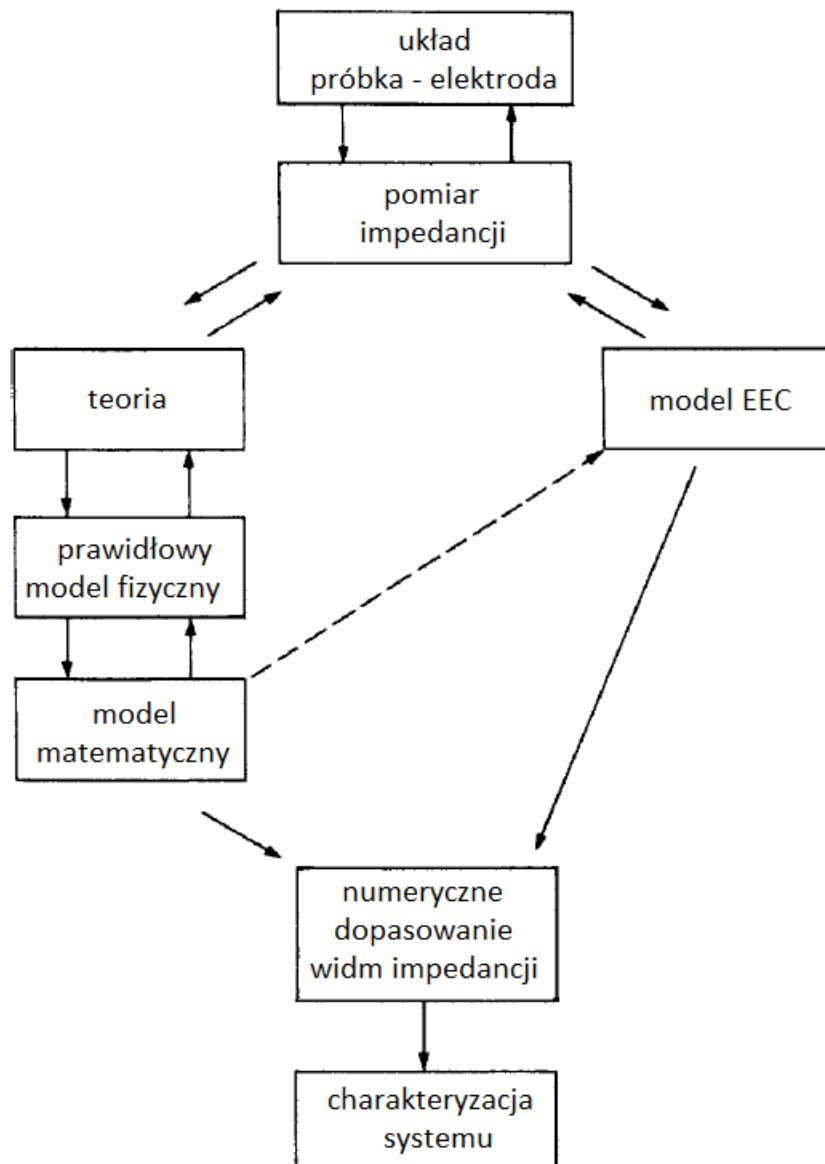
**Rysunek 2.14.** Mikrobjelka krzemowa z elektrodami palczastymi wykonana w ITE Warszawa: a) rysunek z wymiarami, b) zdjęcie z mikroskopu optycznego podświetlanego od spodu, c) włos ludzki dla porównania.

## 2.2. Spektroskopia impedancyjna

Spektroskopia impedancyjna (IS) jest to pomiar odpowiedzi badanej próbki na pobudzenie sygnałem elektromagnetycznym (napięcie lub prąd) o szerokim spektrum częstotliwości, a także następująca po pomiarze analiza wyników. Analiza polega na skorelowaniu właściwości elektrycznych obiektu z właściwościami fizykochemicznymi materiału z jakiego jest on wykonany [108]. Według Macdonalda [109] spektroskopię impedancyjną obiektów o dominującym przewodnictwie jonowym (a takim właśnie jest pożywka z zawiesiną bakterii) powinno nazywać się elektrochemiczną spektroskopią impedancyjną (EIS).

Zastosowanie spektroskopii impedancyjnej do pomiarów zawiesin bakterii w płynach jak i struktur biofilmowych pozwala na identyfikacje ewentualnie zachodzących przy elektrodach i w objętości zjawisk transportu ładunków i polaryzacji elektrycznej [1].

Badanie obiektu metodą IS jest procesem wieloetapowym. Obejmuje on przygotowania próbki do pomiarów, pomiaru widm impedancyjnych, prezentacji wyników pomiarów, sporządzenia elektrycznego modelu równoważnego i aproksymację wyników pomiarów dostosowanym modelem a następnie charakteryzacji systemu z interpretacją wyników (rysunek 2.15).

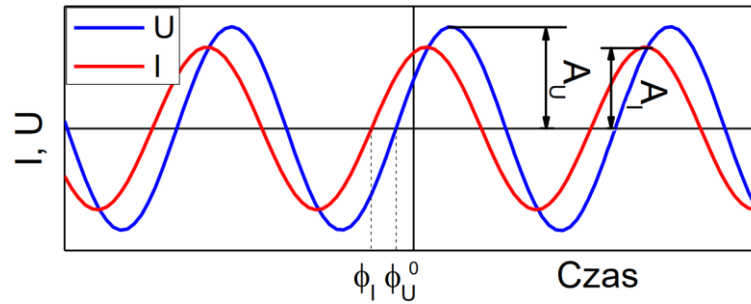


**Rysunek 2.15.** Schemat blokowy kolejnych czynności badania próbki metodą spektroskopii impedancyjnej [110].

### 2.2.1. Impedancja i jej pomiar

Impedancja jest wielkością fizyczną, będącą miarą oporu elektrycznego na przepływ prądu zmiennego. Uwzględnia ona opór wynikający ze strat energii w postaci ciepła (rezystancja), oraz magazynowania energii w postaci pola elektrycznego (reaktancja pojemnościowa) i magnetycznego (reaktancja indukcyjna). Impedancję opisuje się za pomocą liczb zespolonych. Aby pomiar impedancji był prawidłowy, mierzony obiekt musi być liniowy i stacjonarny z elektrycznego punktu widzenia.

Przy pobudzeniu obiektu liniowego sygnałem sinusoidalnym o pulsacji  $\omega$ , wartości chwilowe prądów ( $I$ ) i napięć ( $U$ ) na badanym obiekcie również zmieniają się sinusoidalnie w miarę upływu czasu  $t$  (rysunek 2.16) - w tym układzie napięcie i prąd opisane są odpowiednio równaniami (2.1) i (2.2).



**Rysunek 2.16.** Przebieg napięcia (U) i prądu (I) w badanym obiekcie.

$$U(t) = A_U \sin(\omega t + \phi_U) \quad (2.1)$$

$$I(t) = A_I \sin(\omega t + \phi_I) \quad (2.2)$$

Korzystając ze wzoru Eulera okresowo zmienne napięcie i prąd mogą być również opisane symbolicznie za pomocą liczb zespolonych jak w równaniach (2.3) i (2.4). W tym wypadku impedancję  $Z$  definiuje się jako stosunek spadku napięcia na mierzonym obiekcie do płynącego przez niego prądu (2.5).

$$U = A_U e^{j\phi_U} \quad (2.3)$$

$$I = A_I e^{j\phi_I} \quad (2.4)$$

$$Z = \frac{U}{I} = \frac{A_U}{A_I} e^{j(\phi_U - \phi_I)} \quad (2.5)$$

Jako, że impedancja jest wartością zespoloną, na wzorze (2.5) zapisaną w postaci wykładniczej, przedstawić można ją jako moduł  $|Z|$  i argument  $\arg(Z)$  (2.6).

$$|Z| = \frac{A_U}{A_I}, \quad \arg(Z) = \phi_U - \phi_I \quad (2.6)$$

Impedancja może być przedstawiona również w postaci kanonicznej liczby zespolonej, gdzie część rzeczywista odpowiadać będzie rezystancji  $R$  zaś urojona reaktancji  $X$  (2.7).

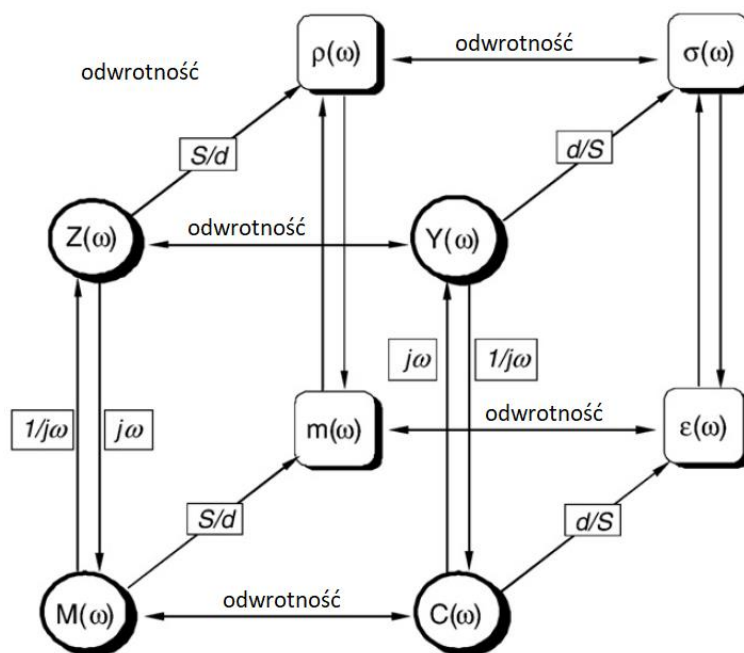
$$Z = R + jX \quad (2.7)$$

Przyjmując  $\phi = \phi_U - \phi_I$  zależności między postaciami wykładniczą i kanoniczną opisują równania (2.8) i (2.9).

$$R = |Z| \cos \phi, \quad X = |Z| \sin \phi \quad (2.8)$$

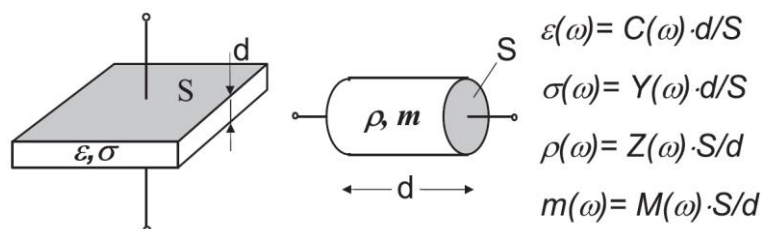
$$|Z| = \sqrt{R^2 + X^2}, \quad \phi = \tan^{-1} \frac{X}{R} \quad (2.9)$$

Impedancja nieodłącznie związana jest z innymi elektrycznymi wartościami fizycznymi: admitancją  $Y$ , pojemnością  $C$ , funkcji modułowej  $M$ ; oraz wartościami wyrażającymi objętościowe właściwości elektryczne danego materiału: rezystywnością  $\rho$ , konduktywnością  $\sigma$ , przenikalnością elektryczną  $\varepsilon$  i modulem elektrycznym  $m$ . Zależności między wszystkimi wymienionymi wartościami zobrazowano na rysunku 2.17.



**Rysunek 2.17.** Podstawowe wielkości opisujące dynamiczne właściwości mierzonego obiektu w dziedzinie częstotliwości [111].

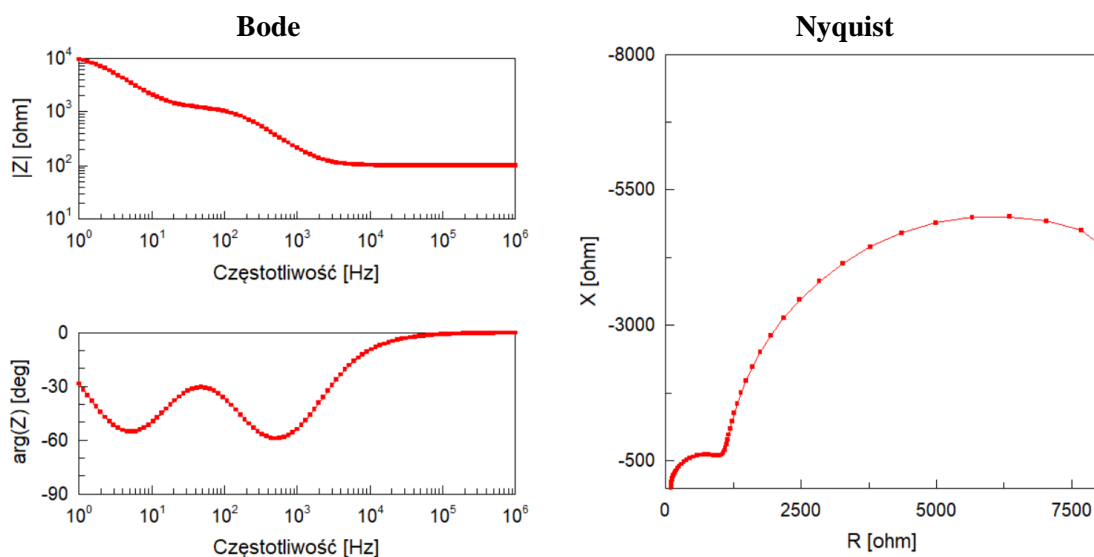
Do wyznaczania objętościowe właściwości elektryczne badanej próbki konieczna jest jeszcze znajomość powierzchni elektrod  $S$  oraz odległości między nimi  $d$  (rysunek 2.18).



**Rysunek 2.18.** Sposób określania objętościowych parametrów materiałowych przy pomiarze impedancji [112].

Należy tutaj dodać, że impedancja i wszystkie jej pochodne są wartościami zależnymi od częstotliwości (bądź pulsacji  $\omega$ ) sygnału pobudzającego użytego do pomiaru.

Typowymi metodami prezentacji danych pomiarowych są widma impedancji, przedstawiane w postaci wykresów Bodego lub Nyquista (rysunek 2.19). Wykresy Bodego pokazują składowe impedancji (bądź innej wartości pochodnej) w funkcji częstotliwości, natomiast wykresy Nyquista przedstawiają współrzędne impedancji (bądź innej wartości pochodnej) na płaszczyźnie zespolonej.



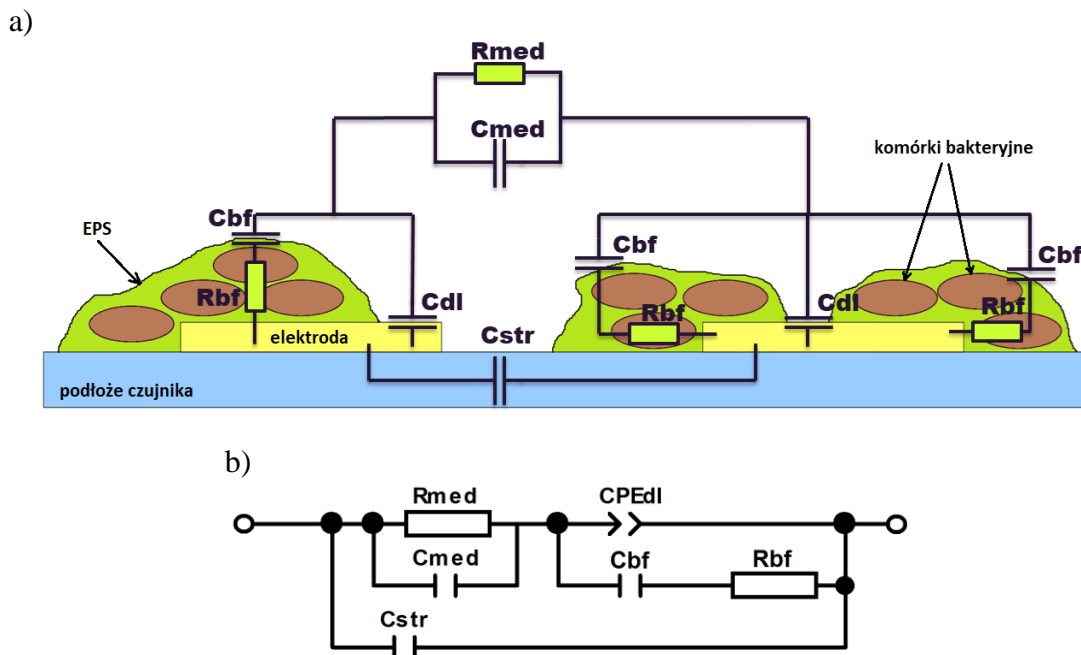
**Rysunek 2.19.** Przykładowy sposób prezentacji danych pomiarowych - wykresy Bodego i Nyquista.

### 2.2.2. Modelowanie EEC i interpretacja wyników

Modelowanie badanego obiektu za pomocą elektrycznego obwodu równoważnego EEC jest zaawansowaną metodą analizy widm impedancji [110]. Polega ono na numerycznym dopasowaniu impedancji modelu EEC do zmierzonego widma. Dla danego widma dopasowywana jest wartość każdego elementu modelu. Ponieważ każdy z elementów EEC skorelowany jest ze zjawiskami przewodnictwa i polaryzacji zachodzącymi w badanym materiale. Modelowanie EEC pozwala na identyfikację i oddzielenie wpływu poszczególnych zjawisk na mierzoną impedancję.

Metoda ta nie jest szeroko stosowana w analizie odpowiedzi czujników impedancyjnych mimo niepodważalnej zalety, że dostarczyć może szczegółowych informacji o właściwościach elektrycznych mierzonego obiektu [23] [35] [37] [64] [113]. Niemniej dzięki zawieraniu przez producentów w oprogramowaniu sterującym analizatorami gotowych modułów do dopasowywania widm impedancji do modelu EEC metoda ta staje się coraz bardziej popularna [58] [59] [60] [61] [66] [114].

Strukturę EEC dobiera się przede wszystkim na podstawie wyobrażenia struktury fizycznej mierzonego obiektu oraz kształtu zmierzonego widma impedancji. W wypadku modelowania widma impedancji czujnika pokrytego biofilmem bakteryjnym znajdującego się w płynnej pożywce należy pod uwagę wziąć:  $R_{med}$  – rezystancję medium,  $C_{med}$  – pojemność elektryczną wnoszoną przez medium,  $R_{bf}$  – rezystancję biofilmu,  $C_{bf}$  – pojemność elektryczną biofilmu,  $C_{dl}$  – pojemność warstwy podwójnej oraz  $C_{str}$  – pojemność podłoża czujnika – całość zobrazowano na rysunku 2.20a. Przedstawiony model zawiera symetryczne gałęzie złożone z tych samych komponentów tj.  $C_{bf}$  i  $R_{bf}$  dzięki czemu można go zmodyfikować sprowadzając do prostszej formy zaprezentowanej na rysunku 2.20b. Ewentualne dalsze uproszczenia wynikać będą z kształtu widma impedancji, czy dany element EEC widoczny jest w widmie.



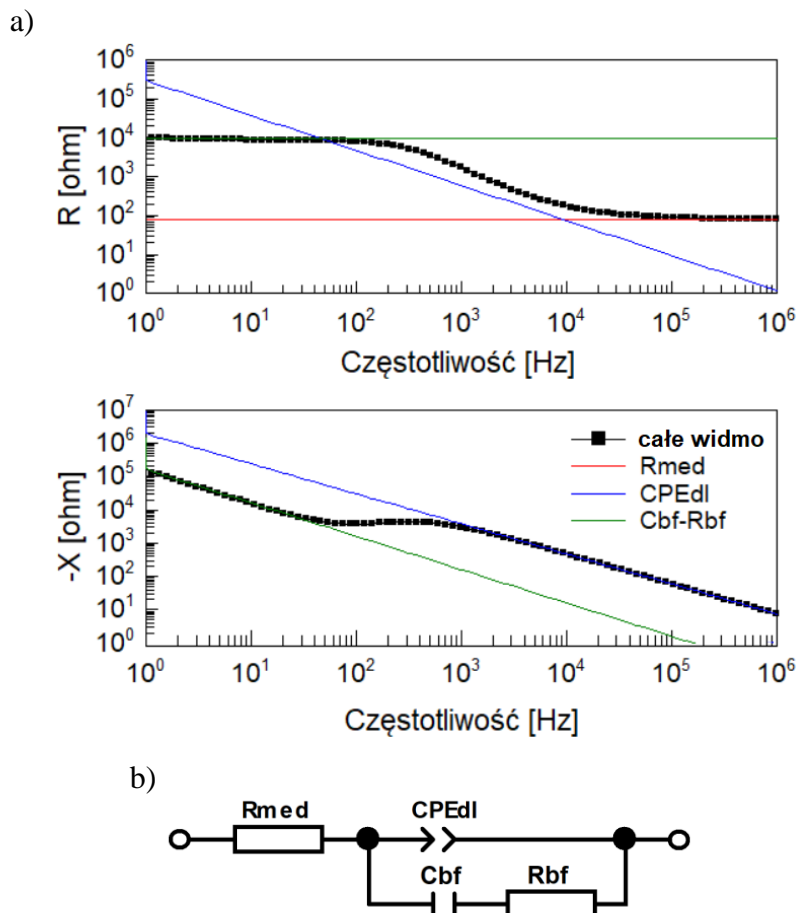
**Rysunek 2.20.** a) Struktura biofilmu bakteryjnego znajdującego się w medium i osadzonego na powierzchni czujnika impedancyjnego oraz wynikający z niej model równoważny. b) Ten sam model po uproszczeniu poprzez eliminację symetrycznych gałęzi obwodu.

Kolejnym etapem dobierania modelu EEC jest dopasowanie jego struktury do zmierzonego widma impedancji. W praktyce często zdarza się tak, że pewne elementy wcześniej skonstruowanego EEC nie mają swojego odzwierciedlenia w widmie. Wynikać może to z niewystarczająco szerokiego zakresu częstotliwości pomiarowych bądź pomijalnie małych wartości spodziewanego elementu. Przykładowe dopasowanie struktury modelu z rysunku 2.20 do zmierzonego widma impedancji przedstawiono na rysunku 2.21a. W widmie impedancji widoczny jest wyraźny wpływ elementów  $R_{med}$ ,  $CPE_{dl}$ , oraz gałęzi  $C_{bf}$ - $R_{bf}$ , brak jest natomiast widocznego wpływu elementów  $C_{med}$  i  $C_{str}$ . Stąd wynika uproszczenie modelu, który ostatecznie przyjmuje formę z rysunku 2.21b.

Niekiedy przy wstępnym konstruowaniu modelu EEC spodziewana jest obecność elementu pojemnościowego, którego faktyczna struktura fizyczna odpowiadałaby skomplikowanej sieci RC (elementów rezystancyjnych i pojemnościowych). W efekcie dany element z elektrycznego punktu widzenia zachowywałby się podobnie do kondensatora, lecz wynikające z jego obecności w obwodzie przesunięcie prądu względem napięcia było by mniejsze niż  $90^\circ$ . Taki element EEC modeluje się za pomocą elementu stałofazowego CPE [110]. Jego admitancja  $Y_{CPE}$  zależna jest od częstotliwości kątovej  $\omega$  sygnału pobudzającego oraz dwóch parametrów:  $Q$  oraz  $n$  i dana jest wzorem (2.10).

$$Y_{CPE} = Q(j\omega)^n \quad (2.10)$$

Modelując za pomocą CPE pasywne obiekty fizyczne występujące w przyrodzie wartość parametru  $n$  powinna zawierać się w zakresie od 0,5 do 1, przy czym w wypadku  $n$  równego 1 CPE może być zastąpiony kondensatorem.



**Rysunek 2.21.** a) Przykładowe widmo impedancji czujnika pokrytego biofilmem i znajdującego się w medium oraz oddziaływanie poszczególnych składowych modelu na kształt widma. b) Uproszczenie modelu EEC wynikające z kształtu widma impedancji.

Należy tutaj nadmienić, że opisany przez autora sposób dobierania modelu EEC jest tylko jednym z możliwych. Odwrócenie kolejności tj. wpierw analiza kształtu zmierzonego widma impedancji i wnioskowanie na jego podstawie o strukturze modelu, a następnie dopasowywanie go do cech fizycznych mierzonego obiektu również jest prawidłowym podejściem. Konieczność zmian interpretacji elementów modelu EEC wynikać może również z wartości parametrów już po numerycznym dopasowaniu do widma, gdyż EEC stanowi pewien „zespół naczyń połączonych”. Przykładowo obecność dwóch elementów pojemnościowych w sąsiadujących gałęziach EEC jak np.  $CPE_{dl}$  i  $C_{bf}$  na rysunku 2.21b może doprowadzić do wzajemnej zamiany ich wartości przez algorytm numerycznego dopasowania w taki sposób, że  $CPE_{dl}$  przyjmuje wartość  $C_{bf}$  i odwrotnie. W tym konkretnym wypadku należałoby wtedy oszacować wartość pojemności warstwy podwójnej ( $dl$ ) bo jest to możliwe do wykonania (w przeciwieństwie do szacunku wartości pojemności elektrycznej biofilmu) i na jej podstawie prawidłowo przyporządkować elementy do modelowanych wartości.

Analiza danych uzyskanych z modelowania EEC polega przede wszystkim na wykorzystaniu poszczególnych wartości elementów modelu. Pozwala to na zidentyfikowaniu zjawiska istotnego dla badacza. Autor rozprawy brał pod uwagę zmiany wartości w czasie poszczególnych elementów modelu i korelował



je ze zjawiskami zachodzącymi w badanym obiekcie. W tym kontekście pełna analiza danych uzyskanych z modelowania EEC zawarta została w rozdziałach 3.1.2, 3.2.3.1 i 3.3.

### 2.2.3. Specyfika pomiarów w cieczy

W wypadku pomiaru impedancji czujnika zanurzonego w cieczy interfejs elektroda-medium jest obszarem, na którym następuje zmiana charakteru przewodnictwa z elektronowego (ciało stałe, metal) na jonowe (ciecz). Elektroda jest w tym wypadku zarówno donorem jak i akceptorem elektronów, natomiast sam transfer elektronów jest dosyć istotnym procesem, w którym to elektroda wymienia ładunki z jonami znajdującymi się w cieczy lub jonizuje substancje obojętne (drugi mechanizm transferu ładunku polega na utlenianiu elektrody metalowej - atomy metalu opuszczają powierzchnię jako kationy i przechodzą do roztworu). Bez transferu elektronów nie zachodzą reakcje chemiczne na elektrodzie, niemożliwy jest przepływ prądu stałego i prądu faradajowskiego. Na powierzchni elektrody zanurzonej w medium gromadzą się jony i tym samym tworzy się elektryczna warstwa podwójna – w niej właśnie odbywa się transfer elektronów. Warstwa podwójna odznacza się statystycznie nierównomiernym rozmieszczeniem elektronów lub jonów w taki sposób, że warstwa o ładunku dodatnim przylega do warstwy o ładunku ujemnym, powodując powstawanie różnicy potencjałów [83].

Obiekt mierzony metodą spektroskopii impedancyjnej powinien być z elektrycznego punktu widzenia liniowy i stacjonarny aby pomiar był prawidłowy. Sprowadza się to do wymagania aby odpowiedź elektryczna badanego obiektu na sumę dwóch oddzielnych wejściowych sygnałów pomiarowych zastosowanych równocześnie była sumą odpowiedzi sygnałów stosowanych oddzielnie. Konsekwencja tego powinno być, że zastosowanie sygnału monochromatycznego  $\sin(\omega t)$  nie prowadzi do powstania harmonicznych na wyjściu, czyli składowych o częstotliwościach  $n\omega$  dla  $n = 2, 3, \dots$  - bądź w najgorszym wypadku harmoniczne te są bardzo małe. Większość występujących w przyrodzie układów typu elektroda-materiał lub elektroda-ciecz jest w nieliniowa – jest to szczególnie widoczne przy wysokiej wartości sygnału pobudzenia (napięcia lub prądu). Niemniej, jeśli amplituda napięcia pobudzenia  $V_m$  jest mniejsza niż napięcie na interfejsie elektroda-obiekt  $V_T$  wynikające z temperatury (równanie (2.11)):

$$V_T \equiv \frac{R T}{F} \equiv \frac{k T}{e}, \quad (2.11)$$

tj. około 25 mV w 25 °C, to można wykazać, że podstawowe równania różniczkowe, opisujące odpowiedź systemu stają się liniowe i nadające do aproksymacji. W równaniu (2.11)  $k$  jest stałą Boltzmanna,  $T$  temperaturą bezwzględną,  $e$  ładunkiem elementarnym,  $R$  stałą gazową, a  $F$  stałą Faradaya. Zatem, jeśli zastosowana amplituda  $V_m$  jest mniejsza od  $V_T$ , system odpowie liniowo [110].

## 2.3. Komercyjne analizatory impedancji

W trakcie wykonywania procedur badawczych autor pracy korzystał z różnych komercyjnych analizatorów impedancji.

### 2.3.1. Analizator impedancji Agilent 4294A

Agilent 4294A to komercyjny analizator impedancji elektrycznej z bardzo precyzyjnym generatorem sygnałów sinusoidalnych o częstotliwościach od 40 Hz do 110 MHz. Rozdzielczość częstotliwości w całym generowanym zakresie wynosi 1 mHz. Mierzalna impedancja zawiera się w zakresie od 25 m $\Omega$  do 40 M $\Omega$  i zależy od częstotliwości pomiarowej [115]. Jest to urządzenie laboratoryjne, o znacznych gabarytach i masie (rysunek 2.22).

Analizator wykorzystywany był przez autora głównie jako pomocnicze i referencyjne urządzenie pomiarowe.



**Rysunek 2.22.** Analizator impedancji Agilent 4294A.

### 2.3.2. Analizator odpowiedzi elektrycznej Solartron FRA1260

Solartron FRA1260 to komercyjny analizator, który umożliwia pomiar impedancji elektrycznej w zakresie częstotliwości od 10  $\mu$ Hz do 32 MHz. W zależności od zakresu rozdzielczość częstotliwości wynosi od 10  $\mu$ Hz do 1 Hz. Mierzalna impedancja zawiera się w zakresie od 100 m $\Omega$  do 10 M $\Omega$  przy zachowaniu dokładności 1 % i zależy od częstotliwości pomiarowej [116]. Jest to urządzenie laboratoryjne, o znacznych gabarytach i masie (rysunek 2.23).

Analizator wykorzystywany był przez autora do pomiaru podstawowych właściwości czujników impedancyjnych w cieczach oraz jako pomocnicze i referencyjne urządzenie pomiarowe.



**Rysunek 2.23.** Analizator impedancji Solartron FRA1260.

### 2.3.3. Precyzyjny mostek GW Instek LCR-8101G

Przestawiony na rysunku 2.24 precyzyjny mostek RLC pozwala na pomiar impedancji w zakresie częstotliwości od 20 Hz do 1 MHz. Zakres pomiaru impedancji jaką deklaruje producent wynosi od 0,1 m $\Omega$  do 100 M $\Omega$ . Dzięki swoim umiarkowanym rozmiarom oraz jego relatywnie niedużej masie nadaje się on do transportu i dlatego

może być częścią składową stanowiska pomiarowego *in situ*. Cechy te są niezwykle istotne przy przemieszczaniu elementów składowych a następnie uruchamianiu stanowiska pomiarowego w miejscu zwykle nie posiadającym analizatora impedancji np. laboratorium mikrobiologicznym a także przy demontażu stanowiska i ponownym transporcie jego elementów składowych w miejsce składowania.

Mostek był wykorzystywany przez autora jako urządzenie pomiarowe w badaniach zastosowania mikroczujników impedancyjnych na podłożu szklanym do pomiaru wzrostu biofilmu bakteryjnego.



**Rysunek 2.24.** Precyzyjny mostek RLC typu GW InstekLCR-8101G.

## 2.4. Własne konstrukcje analizatorów impedancji

Analizator impedancji wykorzystywany do pomiaru obiektów biologicznych w warunkach laboratorium mikrobiologicznego *in situ* musiał spełniać założenia odnośnie szerokości pasma częstotliwości, amplitudy pobudzenia, dokładności pomiarowej oraz mobilności. Komercyjne analizatory impedancji mimo dużej dokładności i dużym zakresie częstotliwości pomiarowych posiadają znaczne gabaryty, co mocno utrudnia zestawianie stanowisk pomiarowych i stwarza problemy logistyczne przy ich ustawianiu – szczególnie w sytuacjach, kiedy stanowiska muszą być mobilne, dostosowywane do danego miejsca w laboratorium. Wynikła stąd potrzeba skonstruowania własnego miernika impedancji, oferującego szeroki zakres częstotliwości pomiarowych, niskie napięcie pobudzenia bez składowej stałej nadające się do pomiarów obiektów biologicznych oraz posiadającego niewielkie gabaryty. Prace konstrukcyjne prowadzono w Zakładzie Nanometrologii Wydziału Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki Politechniki Wrocławskiej.

Zakład posiada duże doświadczenie w opracowywaniu metod pomiarów elektrycznych i konstruowaniu aparatury badawczej. Zajmowano się m. in. automatyzacją pomiarów materiałów dielektrycznych na pobudzenie skokiem jednostkowym [117], algorytmami i systemami szybkiego pomiaru impedancji w zakresie małych i bardzo małych częstotliwości [118] [119] [120], szerokopasmowymi systemami pomiaru impedancji [121], a także konstrukcją uniwersalnych analizatorów impedancji [122] i bioimpedancji [123].

W związku z potrzebą skonstruowania własnego analizatora do pomiaru właściwości dwuelektrodowych czujników impedancyjnych pod uwagę wzięto dwie koncepcje rozwiązań technicznych:

- konstrukcja oparta na układzie scalonym AD5933, z dodatkowym torem analogowym poprawiającym parametry sygnału generowanego i odbieranego przez układ AD5933 oraz prostym, 8-bitowym mikrokontrolerem sterującym,

- konstrukcja oparta na wysokowydajnym, 32-bitowym mikrokontrolerze z rdzeniem ARM, z własnym torem analogowym i algorytmami pomiaru impedancji zaimplementowanymi w mikrokontrolerze.

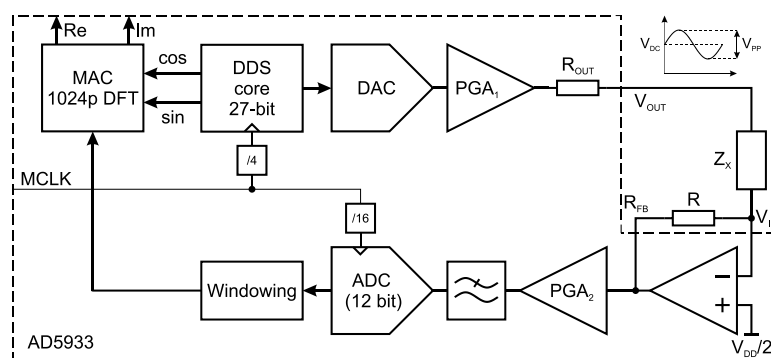
Założenia projektowe przewidywały możliwość pomiaru impedancji od  $10\ \Omega$  do  $1\ \text{M}\Omega$  w zakresie częstotliwości od 1 Hz do 100 kHz. Głównym konstruktorem miernika opartego na wysokowydajnym mikrokontrolerze z rdzeniem ARM został dr inż. Tomasz Piasecki, a miernika opartego na układzie AD5933 mgr inż. Konrad Chabowski. Poniższe podrozdziały prezentują charakterystykę wymienionych konstrukcji.

### 2.4.1. Analizator impedancji MP-AD5933

IMP-AD5933 jest małym gabarytowo miernikiem, spełniającym wymienione wcześniej założenia projektowe, wykorzystującym regulowane, niskie napięcie pobudzenia [124]. Podczas budowy prototypu napotkano wiele ograniczeń wynikających z konstrukcji układu scalonego AD5933, na którym bazowany jest miernik. Podrozdział ten opisuje problemy z którymi autor rozprawy musiał się zmierzyć w trakcie realizacji kompletnego urządzenia pomiarowego wykorzystującego układ AD5933.

#### 2.4.1.1. Układ scalony AD5933

Układ scalony AD5933 został zaprojektowany jako kompletny system do pomiaru impedancji (rysunek 2.25). Składa się on z 27-bitowego bloku bezpośredniej syntezy cyfrowej (DDS), sinusoidalnego napięcia pobudzającego ( $V_{\text{out}}$ ), przetwornika cyfrowo-analogowego (DAC) i programowalnego wzmacniacza 1 ( $\text{PGA}_1$ ), który determinuje amplitudę  $V_{\text{out}}$ . Stopień wejściowy składa się z przetwornika prąd/napięcie (CVC), programowalnego wzmacniacza 2 ( $\text{PGA}_2$ ) i filtra dolnoprzepustowego. Blok cyfrowego przetwarzania danych zawiera 12-bitowy przetwornik ADC i 1024-punktowy moduł dyskretnej transformaty Fouriera (DFT) z okienkowaniem sygnału wejściowego i jednostką MAC (ang. *multiply-accumulate unit*). Jako wynik transformaty Fouriera układ AD5933 zwraca liczbę zespoloną, której moduł i argument jest proporcjonalny do natężenia i fazy prądu płynącego przez nieznaną, mierzoną impedancję  $Z_x$ , a co za tym idzie przy stałym napięciu pobudzającym proporcjonalną do admitancji  $Z_x$ . Interfejs I<sup>2</sup>C zapewnia komunikację z mikrokontrolerem.



Rysunek 2.25. Uproszczony schemat blokowy układu AD5933 [70].

#### **2.4.1.2. Skonstruowane urządzenie**

Dedykowany system pomiarowy został zaprojektowany, zbudowany, przetestowany i zaprezentowany na rysunku 2.26. Składał się on z cyfrowego sterownika, układu scalonego AD5933 i dodatkowego interfejsu analogowego (ang. *analog front-end*). Cyfrowy sterownik został stworzony w oparciu o mikrokontroler ATmega32 (MCU). System zawierał ponadto źródło sygnału zegarowego 16 MHz wraz z przełączanymi dzielnikami częstotliwości ( $/2^0 \div /2^{15}$ ) do taktowania układu AD5933, wyświetlacz LCD oraz konwerter UART-USB. System pomiarowy został wyposażony w żeńskie gniazdo goldpin do bezpośredniego podłączania mierzonego obiektu bądź dodatkowego interfejsu analogowego, który zawierał układ usuwający składową stałą sygnału pobudzającego, dodatkowe gniazdo do podłączania mierzonego obiektu (DUT) oraz zewnętrzny przetwornik CVC z przełączanym opornikiem sprzężenia zwrotnego  $R_{FB}$ . Zapewniono oddzielne zasilanie części cyfrowej (VCC) i analogowej (AVCC) systemu pomiarowego.

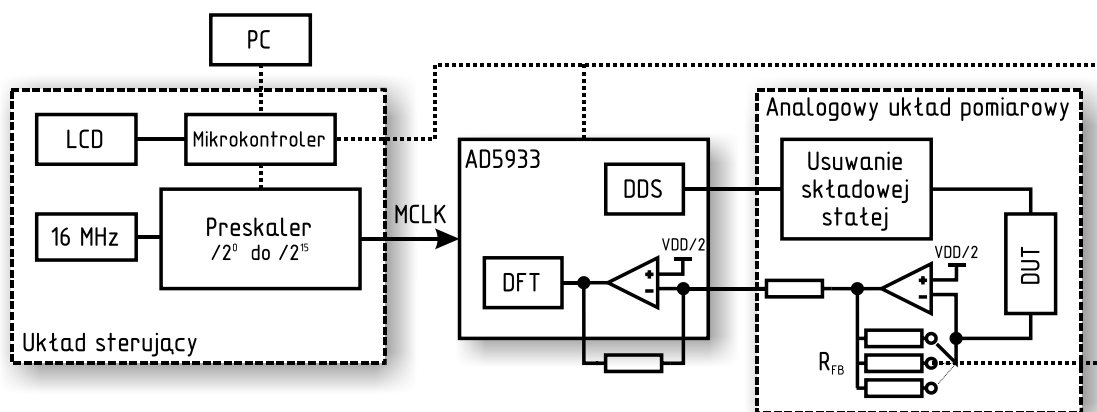
#### **2.4.1.3. Napięcie pobudzające**

Układ scalony AD5933 zapewnia cztery poziomy napięć pobudzających o różnych składowych stałych (tabela 2.1). Należy zauważyć, że napięcie na wejściu CVC jest stałe i wynosi zawsze połowę napięcia zasilania. Rozbieżności między składową stałą sygnału pobudzającego i napięcie na wejściu CVC powoduje niepożądaną polaryzację mierzonego obiektu. Jest to nieodpowiednie do pomiaru obiektów biologicznych ze względu na ich jonowy charakter przewodnictwa [83]. W tym wypadku napięcie pobudzające powinno być pozbawione składowej stałej i odpowiednio niskie, aby nie powodować elektrolizy – natężenie pola elektrycznego nie powinno przekraczać  $1 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$  [125]. Dodatkowo obecność rezystancji wyjściowej (tabela 2.1) ogranicza dolny zakres mierzonej impedancji.

Rozwiązanie wymienionych problemów wymagało zastosowania dodatkowego interfejsu analogowego. Jego zadaniem było usuwanie składowej stałej sygnału pobudzającego bez ograniczania pasma częstotliwości, tłumienie napięcia pobudzającego do pożądanego poziomu i minimalizacja rezystancji wyjściowej. Schemat elektryczny dodatkowego interfejsu analogowego (front-end) zaprezentowano na rysunku 2.27.

Moduł usuwający składową stałą zaproponowany przez Analog Devices był wykorzystywany w opisywanych w literaturze miernikach impedancji [75], [79]. Moduł ten, będący w istocie filtrem górnoprzepustowym RC nie nadaje się do prowadzenia pomiarów w szerokim zakresie częstotliwości. Stała czasowa filtra RC powinna być znacznie większa niż najdłuższy okres sygnału pobudzającego, co przekłada się na długi czas ustalania.

a)



b)

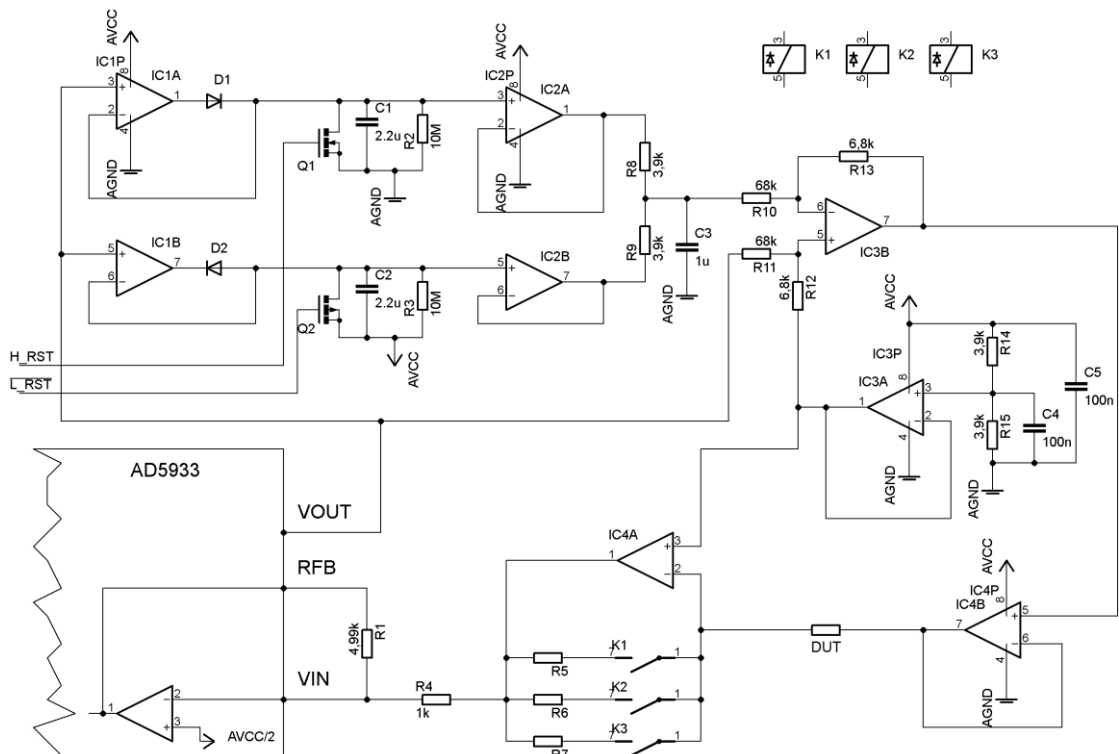


**Rysunek 2.26.** Prosty miernik impedancji z szerokim zakresem częstotliwości zbudowany w oparciu o układ scalony AD5933: a) schemat blokowy, b) widok ogólny.

**Tabela 2.1.** Napięcia wyjściowe układu scalonego AD5933 przy zasilaniu 3,3 V [70].

Zakres	Napięcie wyjściowe	Składowa stała	Rezystancja wyjściowa
1	1.98 V <sub>pp</sub>	1.48 V	200 Ω
2	0.97 V <sub>pp</sub>	0.76 V	2.4 kΩ
3	383 mV <sub>pp</sub>	0.31 V	1 kΩ
4	198 mV <sub>pp</sub>	0.173V	600 Ω

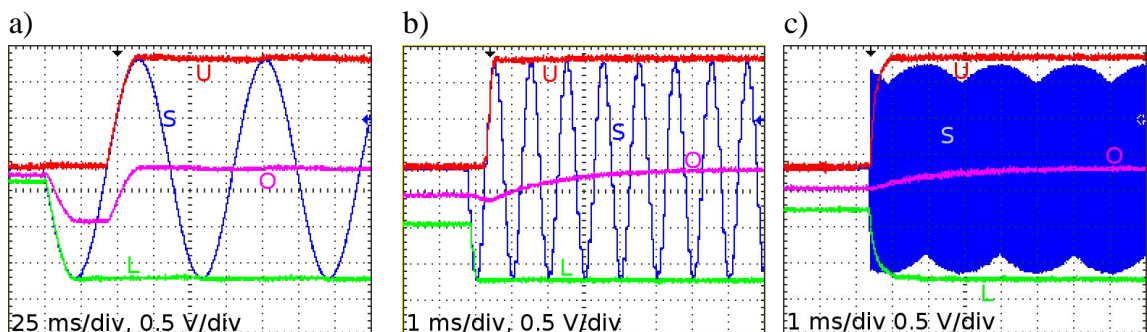
Autor zaproponował inne podejście konstrukcji modułu usuwania składowej stałej (rysunek 2.27). Składa się on z detektora szczytowego (IC1A, IC2A) i dołkowego (IC1B, IC2B), które wyznaczają szczytowe wartości napięcia pobudzającego. W razie potrzeby mogą one być zresetowane za pomocą tranzystorów Q1 i Q2. Napięcie wyjściowe detektorów jest uśredniane na rezystorach R8 i R9 i odpowiada składowej stałej sygnału pobudzającego. Działanie opisanego detektora składowej stałej przedstawiono na rysunku 2.28. Przy niskich częstotliwościach prawidłowa wartość składowej stałej jest wykrywana po jednym okresie przebiegu sygnału pobudzenia.



**Rysunek 2.27.** Schemat dodatkowego interfejsu analogowego (front-end) dla prostego miernika impedancji zbudowanego w oparciu o układ AD5933.

Napięcie wyjściowe  $V_{out}$  z układu AD5933 jest tłumione dziesięciokrotnie, a jego składowa stała jest ustawiana do wartości  $AVCC/2$  w IC3B (rysunek 2.27). W wyniku tego działania napięcie wyjściowe z IC3B posiada taką samą składową stałą jak wewnątrz CVC w AD5933 a jego amplituda jest na tyle mała, że nadaje się do pomiaru obiektów biologicznych. Dla zminimalizowania rezystancji wyjściowej zastosowano bufor IC4B.

Wzmacniacz IC4A stanowi zewnętrzny przetwornik CVC ze znanymi parametrami, zdolny do pomiaru impedancji od  $10 \Omega$ . Wewnętrzny przetwornik CVC nie jest używany – jego wzmacnienie jest ustalone na 5. Należy zauważyć, że dodanie dodatkowego CVC odwraca fazę sygnału pomiarowego.



**Rysunek 2.28.** Oscylogramy przedstawiające działanie detektora składowej stałej dla: a) 10 Hz, b) 1 kHz, c) 100 kHz. Detektor szczytowy (U) i dołkowy (L) wyznaczają obwiednię sygnału (S) i generują średnią (O) odpowiadającą składowej stałej sygnału. Układ potrafi działać w szerokim zakresie częstotliwości.

#### 2.4.1.4. Zakres mierzonych impedancji

Przetwornik CVC znajdujący się w stopniu wejściowym może pracować jedynie w ograniczonym zakresie wartości modułu mierzonej impedancji, zależnie od wartości rezystora w pętli sprzężenia zwrotnego.

Ze względu na ograniczoną dynamikę 12-bitowego przetwornika analogowo-cyfrowego w AD5933 amplituda napięcia na jego wejściu powinna być większa od 15 mV (ustalono eksperymentalnie). W konsekwencji napięcie wyjściowe z zewnętrznego CVC w naszym obwodzie (rysunek 2.27) powinno być większe od 0,6 mV ze względu na 25-krotne wzmocnienie.

Napięcie wyjściowe zewnętrznego przetwornika CVC zależy od współczynnika przetwarzania i nie powinno być większe od  $V_{OUT}$ , które podawane jest na mierzoną próbkę DUT. W wypadku gdy przetwornik CVC zbudowany jest w oparciu o wzmacniacz operacyjny, a jego wzmocnienie utrzymywane jest poniżej jedności, jego pasmo przenoszenia nie zależy od mierzonej impedancji. Dla właściwego działania wartość rezystora  $R_{fb}$  w pętli sprzężenia zwrotnego CVC musi być mniejsza aniżeli wartość modułu impedancji DUT. Dodatkowo amplituda napięcia podawanego na wejście ADC znajdującego się wewnątrz układu AD5933 nie może przekraczać wartości połowy napięcia zasilania.

Minimalne i maksymalne wartości modułu mierzonej impedancji przedstawione są odpowiednio równaniem (2.12) i (2.13):

$$|Z|_{x \min} = \frac{V_{OUT} \cdot R_{fb}}{V_{CVC \max}} \quad (2.12)$$

$$|Z|_{x \max} = \frac{V_{OUT} \cdot R_{fb}}{V_{CVC \min}} \quad (2.13)$$

gdzie  $V_{OUT}$  stanowi amplitudę napięcia pobudzającego DUT,  $R_{fb}$  jest wartością rezystora w pętli sprzężenia zwrotnego CVC,  $V_{CVC \min}$  jest najmniejszą amplitudą napięcia wyjściowego CVC (0,6 mV) a  $V_{CVC \max}$  jest największą amplitudą napięcia wyjściowego CVC (równą  $V_{OUT}$ , w naszym wypadku 30 mV). Aby rozszerzyć zakres mierzonej impedancji,  $R_{fb}$  może być przełączany przez przełączniki jak pokazano na rysunku 2.27 (elementy R5, R6, R7 oraz K1, K2, K3). Naturalnie liczba przełączników może być większa.

#### 2.4.1.5. Dokładność dyskretnej transformaty Fouriera w AD5933

Dyskretna transformata Fouriera zaimplementowana w AD5933 nazywana jest jednopunktową. Oznacza to, że analiza korelacji częstotliwości w jednostce MAC jest zawsze przy tej samej częstotliwości, co obecna częstotliwość napięcia pobudzenia. W wypadku gdy liczba okresów sygnału wejściowego, zawierających się w 1024 próbkach, jest liczbą całkowitą istnieje płynne przejście między końcem jednego okresu a początkiem drugiego. Jeśli liczba okresów próbkowanego sygnału nie jest liczbą całkowitą to nie ma płynnego przejścia między końcem jednego okresu a początkiem drugiego co skutkuje wyciekami widma, wprowadzanym przez nieciągłość DFT [126].



Aby uzyskać dokładne wyniki DFT i uniknąć wycieków widma konieczne jest spełnienie warunku odnośnie czasu próbkowania  $T_S$  danego równaniem:

$$T_S = \frac{1024}{\frac{MCLK}{16}}, \quad (2.14)$$

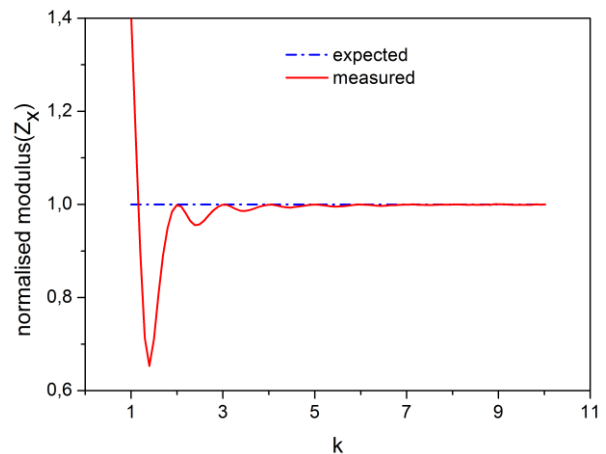
żeby ten stanowił całkowitą wielokrotność okresu generatora DDS:

$$T_S = k \cdot T_{DDS} = k \frac{2^{27}}{DDS \cdot \frac{MCLK}{4}}, \quad (2.15)$$

gdzie  $k$  oznacza liczbę okresów generatora DDS ( $T_{DDS}$ ) przypadających na czas próbkowania,  $MCLK$  jest częstotliwością zegara taktującego AD5933 a  $DDS$  jest słowem ustawiającym generator DDS. Z równania (2.15) wynika:

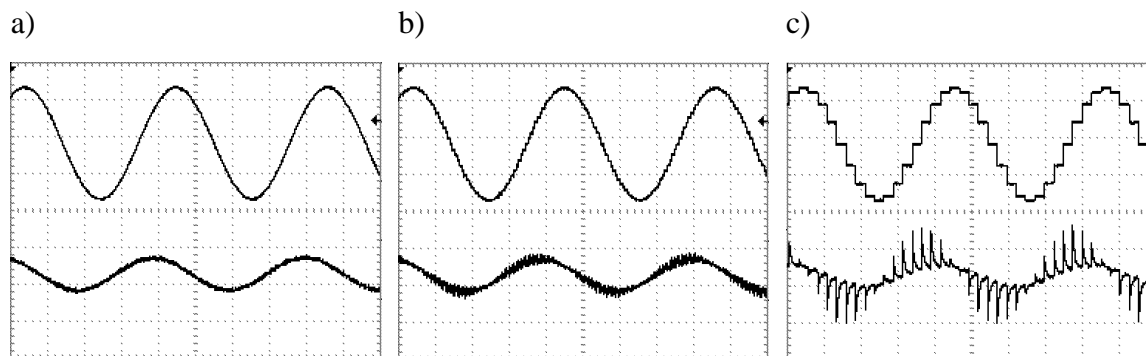
$$k = \frac{DDS}{2^{15}}. \quad (2.16)$$

Zjawisko wycieku widma minimalizowane jest przez okienkowanie sygnału. Wynik ustawiana częstotliwości generatora DDS bez uwzględnienia zjawiska wycieku przedstawiono na rysunku 2.29.



**Rysunek 2.29.** Błąd pomiaru będący efektem wycieku widma obecnego w DFT zaimplementowanym w AD5933, dla danej liczby  $k$  okresów sygnału generatora DDS przypadających na czas próbkowania.

Dla dużych wartości  $k$  (a tym samym dużych wartości słów sterujących generatorem DDS) występuje dodatkowy problem. Duże wartości słów sterujących DDS powodują, że z każdym cyklem zegarowym wyjście DDS zmienia się znacznie, co skutkuje obecnością schodków w generowanym sygnale (rysunek 2.30). Jeśli obwód zastępczy DUT zawiera np. gałęzie RC, których stałe czasowe są podobne do okresu generowanych schodków w sygnale pobudzenia, pojawiają się szpilki napięciowe na przetworniku CVC. Zakłócenia te są spowodowane prądem ładowania gałęzi RC.



**Rysunek 2.30.** Oscylogramy sygnału wyjściowego z AD5933 (górny przebieg) i sygnału wyjściowego z CVC (dolny przebieg) w trakcie pomiaru szeregowej sieci RC przy 976 Hz: a)  $k=16$  MCLK=1 MHz, b)  $k=64$  MCLK=250 kHz, c)  $k=256$  MCLK = 62.5 kHz c). Podstawa czasu: 250  $\mu$ s/div.

#### 2.4.1.6. Błąd systematyczny pomiaru AD5933

Dane wyjściowe z układu scalonego AD5933 obciążone są systematycznym, zależnym od częstotliwości, błędem pomiaru argumentu admitancji, który to użytkownik musi skompensować. Zależność argumentu danych wyjściowych generowanych przez AD5933 podczas pomiaru 10 k $\Omega$  rezystora z 10 k $\Omega$   $R_{FB}$  od słowa sterującego DDS zaprezentowano na rysunku 2.31. Pomiar został wykonany bez użycia dodatkowego interfejsu analogowego z rysunku 2.27.

Dla rezystora, argument danych wyjściowych powinien być niezależny od częstotliwości pomiarowej i wynosić 0 lecz AD5933 zwraca wartości, które są liniowo zależne od słowa sterującego DDS i przesunięte w fazie o 90°. Analog Devices zaleca usuwanie tych artefaktów przez kalibrację [70] [126]. Inny sposób na poradzenie sobie ze wspomnianymi artefaktami przedstawiony został w systemie pomiarowym zaproponowanym przez Hoję i Lentkę wykorzystującym dwa układy AD5933 w nowej konfiguracji, innej niż zalecanej w nocie aplikacyjnej producenta [81] [82], gdzie zastosowano jednoczesny pomiar napięcia i prądu eliminując tym samym konieczność kalibracji i usuwając błąd systematyczny. Autor rozprawy podjął się analizy czynników wpływających na błąd systematyczny i jego matematyczną kompensację.

Przesunięcie fazowe 90° wynika z zastosowania DFT do analizy sygnału sinusoidalnego. W wypadku gdy DDS generuje sygnał kosinusoidalny problem nie występuje. Zależny od częstotliwości błąd systematyczny argumentu jest wynikiem opóźnienia na próbkowaniu sygnału wejściowego przez przetwornik ADC i dostarczaniu wyników konwersji do bloku DFT. W każdym cyklu zegarowym blok DFT przetwarza obecną wartość wygenerowaną przez DDS z danymi wyjściowymi ADC przesuniętymi o kilka cykli zegarowych (rysunek 2.31b). Opóźnienie to może być spowodowane czasem potrzebnym na przetworzenie danych wejściowych przez ADC i czasem potrzebnym na okienkowanie sygnału.

Częstotliwość DDS dana jest wzorem:

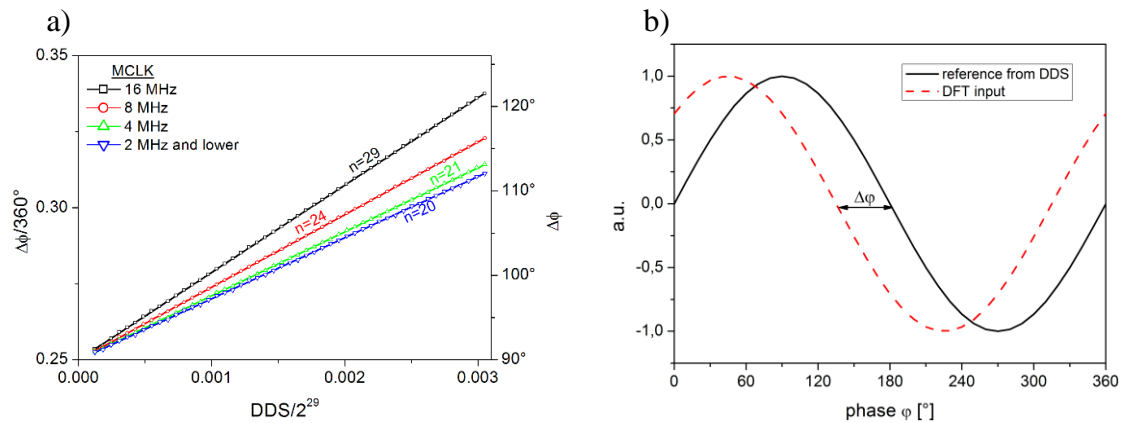
$$f = \frac{DDS \cdot MCLK}{2^{29}} \quad (2.17)$$

gdzie  $DDS$  jest 24-bitowym słowem sterującym,  $f$  częstotliwością wyjściową generatora,  $MCLK$  jest częstotliwością sygnału zegarowego podawanego do AD5933. Wspomniane opóźnienie na torze ADC-DFT powoduje przesunięcie argumentu danych wyjściowych  $\Delta\varphi$  z AD5933 zależne od okresu sygnału:

$$\frac{\Delta\varphi}{360^\circ} \cdot \frac{1}{f} = \Delta t = n \cdot \frac{1}{MCLK} \quad (2.18)$$

gdzie  $\Delta t$  jest czasem opóźnienia. Z drugiej strony powinno być możliwe wyrażenie opóźnienia w liczbie cykli sygnału zegarowego MCLK (liczba  $n$  w poprzednim równaniu). Łącząc równania (2.17) i (2.18) otrzymujemy:

$$\frac{\Delta\varphi}{360^\circ} = n \cdot \frac{DDS}{2^{29}} \quad (2.19)$$



**Rysunek 2.31.** Zależność błędu systematycznego a) argumentu  $\Delta\varphi$  danych wyjściowych z AD5933 od wartości słowa sterującego DDS oraz b) ilustracja opóźnienia pomiędzy sygnałem pobudzenia generowanym przez DDS a docierającym do bloku transformaty DFT.

W tym miejscu po narysowaniu wykresu zależności  $\Delta\varphi/360^\circ$  od  $DDS/2^{29}$  otrzymać można wartość opóźnienia w liczbie cykli MCLK poprzez dopasowanie linii prostej do wykresu i wyznaczenie jej nachylenia. Pozwala to na wyznaczenie wartości korekcyjnej dla argumentu danych wyjściowych z AD5933. Dopasowanie linii prostej pokazano na rysunku 2.31a. Omawiane opóźnienie wydaje się również być zależne od częstotliwości MCLK. Wynosi ono 29 cykli dla zegara 16 MHz, 24 dla zegara 8 MHz, 21 dla zegara 4 MHz oraz 20 dla zegara 2 MHz i mniejszych częstotliwości zegarowych.

#### 2.4.1.7. Przykładowy pomiar

Dla przetestowania urządzenia pomiarowego jak i sposobu przetwarzania danych wyjściowych z układu AD5933 opisanych w 2.4.1.5 i 2.4.1.6 został przeprowadzony pomiar prostego układu RLC. Wykorzystany został dodatkowy interfejs analogowy. W pierwszej kolejności dokonano jednopunktowej kalibracji dla wyskalowania

przetwornika CVC jako że błąd systematyczny argumentu danych wyjściowych jest znany.

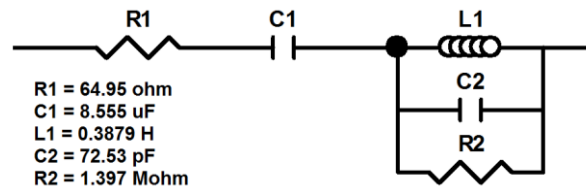
Dla danego poziomu napięcia pobudzającego i stanu PGA<sub>2</sub> moduł liczby zespolonej (danych wyjściowych) odczytanej z AD5933 proporcjonalny jest do modułu admitancji  $|Y|$  mierzonego obiektu:

$$M = C \cdot R_{fb} \cdot |Y| \quad (2.20)$$

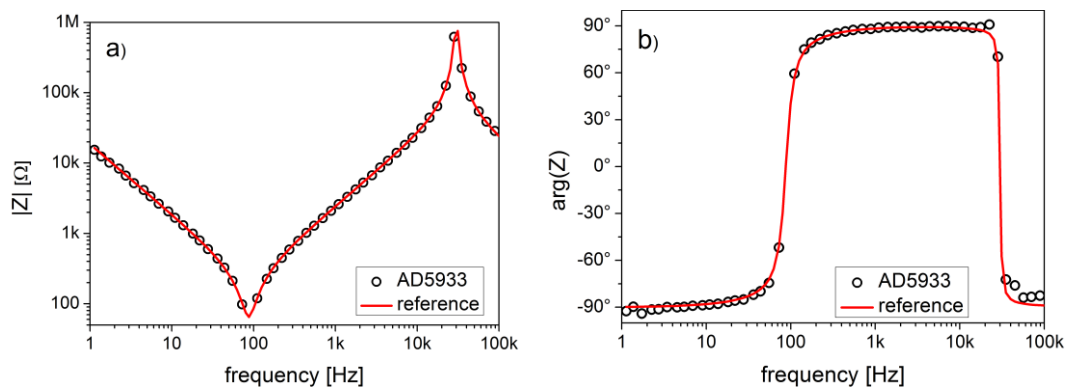
Kalibracja przeprowadzona została przy napięciu pobudzającym o częstotliwości 1 kHz i amplitudzie 2 V<sub>pp</sub> z wykorzystaniem rezystora 10 kΩ jako referencji i rezystora 3,3 kΩ jako R<sub>fb</sub> oraz włączonego PGA<sub>2</sub> ze wzmacnieniem 5. Współczynnik skalujący  $C$  został wyznaczony na 1119. Równanie (2.20) może zostać przekształcone tak, aby wyznaczyć z niego wartość modułu admitancji bądź impedancji mierzonej próbki bazując na znajomości zmierzonej wartości  $M$  i znanego współczynnika skalującego:

$$|Z| = \frac{1}{|Y|} = \frac{C \cdot R_{fb}}{M} \quad (2.21)$$

Aby zademonstrować działanie systemu pomiarowego wykonano pomiar sieci RLC danej modelem równoważnym przedstawionym na rysunku 2.32. Wartości elementów składowych modelu zostały określone poprzez pomiar widma impedancji za pomocą analizatora Agilent 4249A i dopasowania modelu równoważnego za pomocą oprogramowania Zview (Scribner Assoc., 2010). Następnie widmo impedancji sieci RLC zostało zasymulowane i wykorzystane jako wartość referencyjna.



**Rysunek 2.32.** Sieć RLC użyta w teście system pomiarowego.



**Rysunek 2.33.** Wykresy Bodego przedstawiające a) moduł i b) argument impedancji sieci RLC w szerokim zakresie częstotliwości i impedancji zmierzone systemem pomiarowym bazowanym na AD5933 (kropki) i w idealnym przypadku (linie).

Widmo impedancji tego samego modelu zostało również zmierzone przy użyciu analizatora impedancji bazowanego na układzie AD5933 z wykorzystaniem opisanej

metody kalibracji i usuwania błędu systematycznego. Wyniki pomiaru przedstawiono na rysunku 2.33.

Porównanie wyniku pomiaru z referencją wykazuje dużą zgodność w szerokim zakresie częstotliwości i impedancji. Określono standardową niepewność pomiaru – wynosi ona 3,5% dla modułu impedancji i 2,8 stopnia dla argumentu impedancji.

#### **2.4.1.8. Podsumowanie nt. AD5933**

Zaprezentowano działający model prostego miernika impedancji opartego na układzie scalonym AD5933. Pozwala on na pomiar impedancji od 10  $\Omega$  do 1 M $\Omega$  w zakresie częstotliwości od 1 Hz do 100 kHz co wystarczające jest do pomiaru próbek biologicznych.

Zaproponowano algorytm do wybierania słów sterujących generatorem DDS i częstotliwości sygnału zegarowego MCLK. Pozwala on na uniknięcie dwóch niepożądanych efektów: szpilek napięciowych na wyjściu przetwornika CVC i wycieków widna przy transformacji DFT. Większość szerokozakresowych pomiarów impedancji odbywa się z logarytmiczną zmianą częstotliwości pomiarowej. Algorytmy tego typu nie są zaimplementowane w układzie AD5933, stąd w zaprezentowanym systemie algorytm został zaimplementowany w MCU. Niezależnie od typu przemiatania częstotliwościowego (liniowe, logarytmiczne) pomiar w każdym punkcie częstotliwościowym odbywa się w ten sam sposób:

- a. Określenie zadanej częstotliwości pomiarowej  $f_w$ .
- b. Wybranie odpowiedniego preskalera  $MCLK$  dla ograniczenia  $k$  (opisane w sekcji 2.4.1.5) w zakresie od 16 do 32 dla ograniczenia szpilek napięciowych na wyjściu przetwornika CVC. Wykorzystywane jest równanie (2.22):
- c. Dla danego preskalera wybranie najbliższej częstotliwości, która może zostać zmierzona bez wycieku widma, innymi słowy częstotliwość, dla której  $k$  jest liczbą całkowitą
- d. Ustawienie słowa sterującego DDS na wartość wyliczoną z równania (2.15) utrzymując jednocześnie  $k$  jako liczbę całkowitą i rozpoczęcie pomiaru.

$$k = \frac{f_w \cdot 1024}{\frac{MCLK}{16}} \quad (2.22)$$

Układ scalony AD5933 stanowi niemal kompletny system do pomiaru impedancji. Niestety nie jest on pozbawiony wad, które muszą być poprawione. W wypadku pomiarów obiektów biologicznych konieczne jest obniżenie amplitudy napięcia pobudzającego  $V_{out}$  i usunięcie składowej stałej za pomocą dodatkowego zewnętrznego układu analogowego. Dla polepszenia dokładności pomiaru konieczne jest zmniejszenie impedancji wyjściowej AD5933 przez zastosowanie wtórnika napięcia bądź zastosowanie dwóch układów AD5933 – jeden do pomiaru prądu a drugi do pomiaru napięcia na mierzonej próbce. Rozszerzanie zakresu mierzonej impedancji może być osiągnięte poprzez przełączanie rezystora  $R_{fb}$  w pętli sprzężenia zwrotnego przetwornika prąd-napięcie. Niestety wymaga to kolejnych dodatkowych elementów analogowych i stanowi zwiększenie stopnia złożoności całego urządzenia. System pomiarowy ponadto wymaga oddzielnego zasilania części analogowej i cyfrowej

ze względu na zakłócenia. Oprogramowanie sterujące układem AD5933 musi zawierać dane kalibracyjne zarówno dla mierzonego modułu impedancji jak i dla jego argumentu, który jest zależny od częstotliwości pomiarowej. Argument impedancji nie jest wartością stałą ze względu na opóźnienie występujące na torze przetwornik ADC – blok transformaty DFT. Dla zapewnienia dobrej dokładności pomiarowej konieczne jest spełnienie warunku aby liczba okresów sygnału docierającego do DFT była liczbą całkowitą co minimalizuje wycieki widma.

#### **2.4.2. Analizator impedancji IMP-STM32**

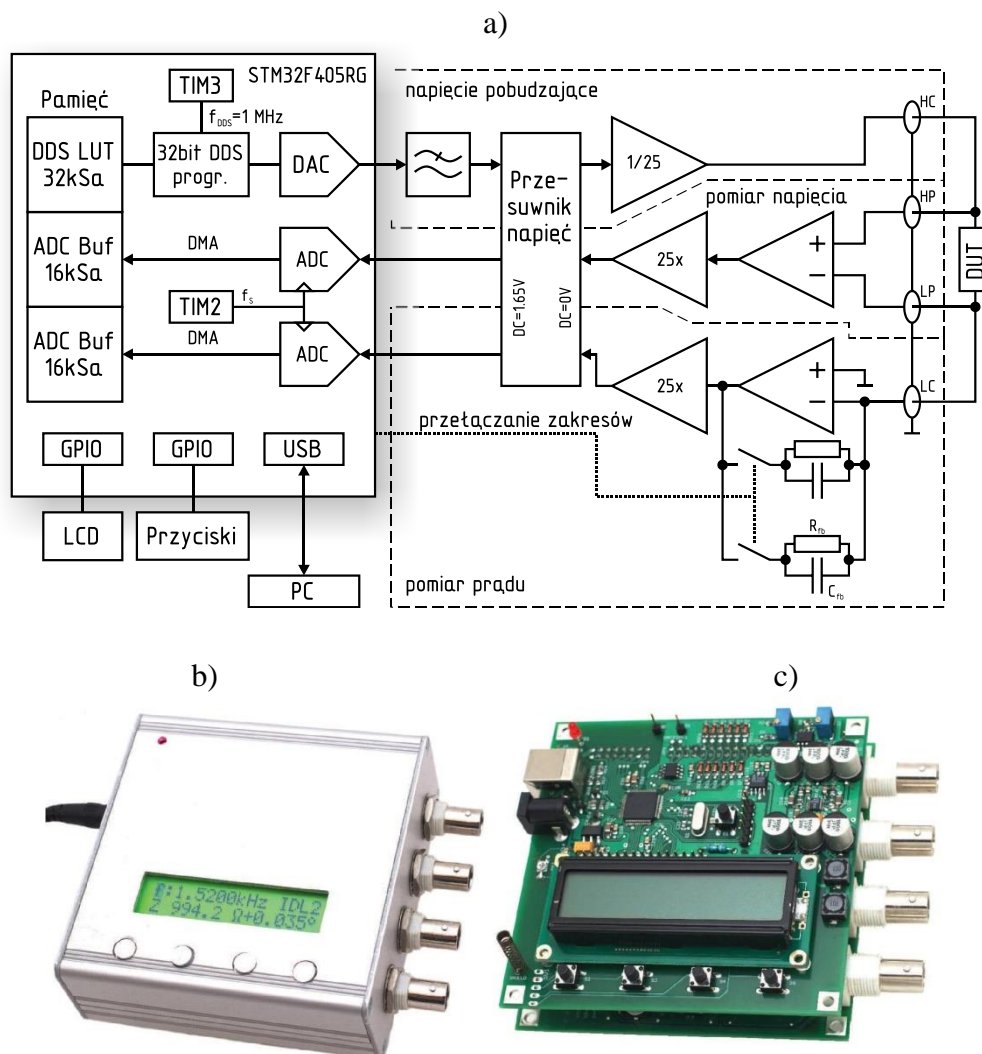
IMP-STM32 został zaprojektowany jako prosty, mały i uniwersalny analizator impedancji przeznaczony do pomiaru biosensorów impedymetrycznych. Zbudowanie miernika impedancji w oparciu o wysokowydajny mikrokontroler, podobnie jak w wypadku IMP-AD5933, było próbą stworzenia mobilnej platformy do szerokopasmowego pomiaru impedancji. Miernik ten z powodzeniem obsługuje szerszy zakres częstotliwości i modułu impedancji od podanego w założeniach projektowych [127].

Sercem analizatora IMP-STM32 jest niedrogi a jednocześnie wydajny 32-bitowy mikrokontroler STM32F405RG wyposażony w rdzeń ARM Cortex-M4 taktowany z maksymalną częstotliwością 168 MHz, z wbudowanymi przetwornikami DAC i ADC, 192 kB pamięcią SRAM oraz jednostką zmiennoprzecinkową FPU o pojedynczej precyzji, która jest odpowiednia do szybkiego przetwarzania sygnału. Schemat blokowy i zdjęcie urządzenia przedstawiono na rysunku 2.34.

DAC wewnątrz mikrokontrolera stanowi źródło sygnału pobudzającego, który jest filtrowany, przytłumiany do wartości 25 mV RMS, i podawany na jeden z czterech wyprowadzeń (HC, HP, LP, LC na rysunku 2.34a) do których podłączana jest badana próbka (DUT). Mierzony jest spadek napięcia i prąd płynący przez DUT a ich wartości chwilowe są równocześnie próbkowane przez dwa niezależne przetworniki ADC. Zebrane dane są następnie analizowane przez algorytmy przetwarzania sygnałów zaimplementowane w mikrokontrolerze.

IMP-STM32 został zaprojektowany w taki sposób, aby wyeliminować trzy najpopularniejsze niedociągnięcia występujące w analizatorach impedancji wykorzystujących układ scalony AD5933:

- brak pomiaru aktualnej wartości napięcia na DUT, które w systemach pomiarowych z AD5933 może być rozwiązane poprzez przełączanie [79] lub zastosowanie dwóch konwerterów impedancji [81],
- trudności z użyciem filtra antyaliasingowego, którego brak powoduje znaczne błędy w wypadku pomiaru DUT o charakterze pojemnościowym [124],
- długi czas trwania pomiaru impedancji przy niskiej częstotliwości spowodowane ograniczeniami algorytmów przetwarzania [81], [124], [70].



**Rysunek 2.34.** Analizator impedancji IMP-STM32: a) schemat blokowy, b) widok ogólny, c) cyfrowe i analogowe moduły wewnątrz urządzenia.

Sygnal pobudzający w IMP-STM32 generowany jest przy wykorzystaniu zaimplementowanej w oprogramowaniu bezpośredniej syntezy częstotliwości DDS. Tablica (LUT – ang. *lookup table*) zawiera 32768 12-bitowych próbek sygnału sinusoidalnego dla wykorzystania pełnych możliwości przetwornika DAC. Słowo sterujące DDS ma 32 bity długości a częstotliwość pracy DDS wynosi 1 MHz. Wynika stąd, że rozdzielczość sygnału pobudzającego wynosi  $1 \text{ MHz}/2^{32} = 0,23 \text{ mHz}$ , jednakże ze względów praktycznych zakres mierzonych częstotliwości został programowo ograniczony do przedziału od 1 mHz do 100 kHz. Wygenerowany przebieg jest filtrowany filtrem Butterwortha czwartego rzędu. Wartość napięcia sygnału pobudzającego jest wybieralna i zawiera się w zakresie od 5 mV do 42 mV RMS. Taki zakres odpowiedni jest do pomiaru próbek biologicznych, co jest głównym obszarem zastosowań zaprezentowanego miernika.

Napięcie i prąd przepływający przez DUT mierzone są jednocześnie. Samo napięcie mierzone jest między złączami HP i LP za pomocą wzmacniacza pomiarowego. 16384 próbek wartości chwilowych napięcia zebranych za pomocą 12-bitowego ADC

i zapisywanych jest w zaalokowanym buforze za pomocą kanału bezpośredniej dostępu do pamięci (DMA – *ang. direct memory access*).

Prąd przepływający przez DUT mierzony jest na złączu LC za pomocą przetwornika prąd-napięcie (CVC). Zakresy CVC przełączane są poprzez zmianę rezystora  $R_{FB}$  w pętli sprzężenia zwrotnego za pomocą przełącznika elektronicznego. CVC posiada 7 zakresów w których  $R_{FB}$  zmienia się od  $10\ \Omega$  do  $10\ M\Omega$ . Kondensatory dołączone równolegle do oporników  $R_{FB}$  poprawiają stabilność CVC oraz zmniejszają szum przy pomiarach dużych impedancji kosztem jej zakresu.

Spróbkowane i zbuforowane wartości chwilowe napięcia i prądu wykorzystywane są przez zaimplementowany w mikrokontrolerze algorytm trzyparametrowego dopasowania sinusoidy (TPSF – *ang. three parameters sine fitting*) do odtworzenia przebiegów napięcia i prądu [128]. Algorytm TPSF posiada kilka zalet przeważających nad powszechnie stosowaną dyskretną transformatą Fouriera (DFT). Przede wszystkim w wypadku DFT próbki muszą być okienkowane dla uniknięcia wycieków widma, do tego przy niskich częstotliwościach pomiarowych gdzie czas jednego okresu przebiegu pobudzającego jest zauważalny TPFS można zastosować nawet dla niepełnego okresu sygnału pobudzenia co skraca czas pomiaru [120].

Urządzenie wyposażone jest w wyświetlacz LCD oraz przyciski pozwalające na ręczne zmiany parametrów pomiaru. Wynik pomiaru pokazywany jest również na wyświetlaczu. IMP-STM32 jest zaprojektowany tak, aby można było go sterować z poziomu komputera PC za pomocą dedykowanego oprogramowania. Kontroler USB 2.0 znajdujący się w mikrokontrolerze jest zaprogramowany na pracę jako USB CDC (Communication Device Class) [129]. Wymiana komunikatów między urządzeniem a komputerem następuje za pomocą wirtualnego portu szeregowego. Komendy kompatybilne są ze standardem SCPI-99.

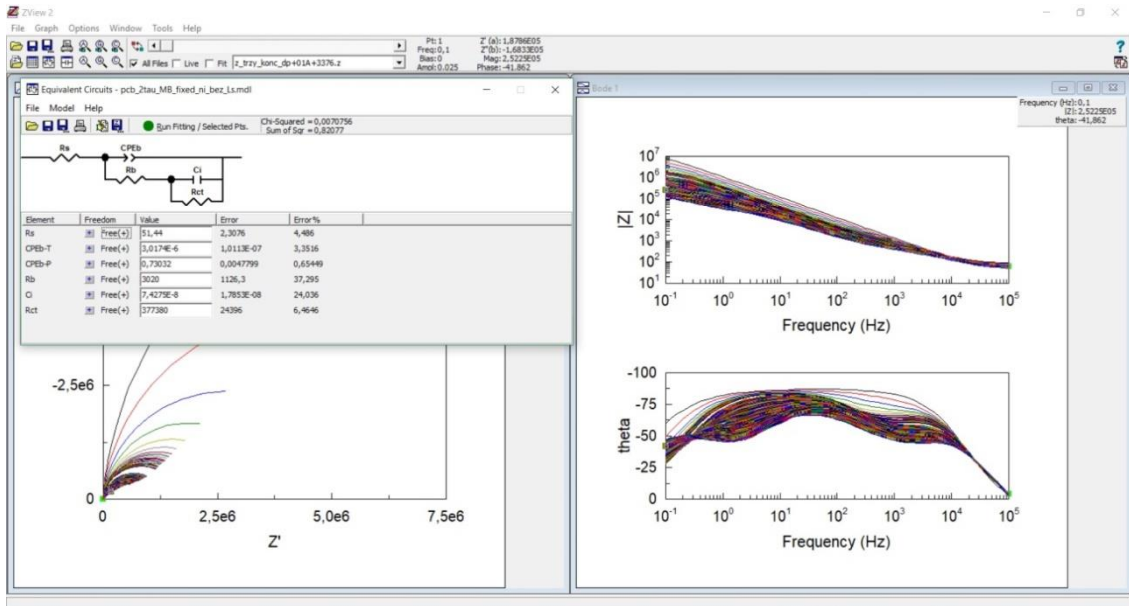
Szerszy opis urządzenia wraz z dodatkowymi informacjami zaprezentowano w publikacji [127].

## 2.5. Oprogramowanie

### 2.5.1. ZView

ZView firmy Scribner jest programem służącym do prezentacji widm impedancji w postaci niemalże dowolnie modyfikowalnych wykresów Bodego i Nyquista. Ponadto umożliwia konstruowanie elektrycznych modeli równoważnych EEC oraz dopasowywanie wartości ich elementów wybranymi metodami numerycznymi. Przydatną funkcją programu jest możliwość aproksymacji modelem EEC całej serii widm, co umożliwia później łatwe prześledzenie zmian wartości parametrów EEC w czasie. Interfejs użytkownika programu ZView z otwartym oknem do budowania modelu EEC przedstawiono na rysunku 2.35.

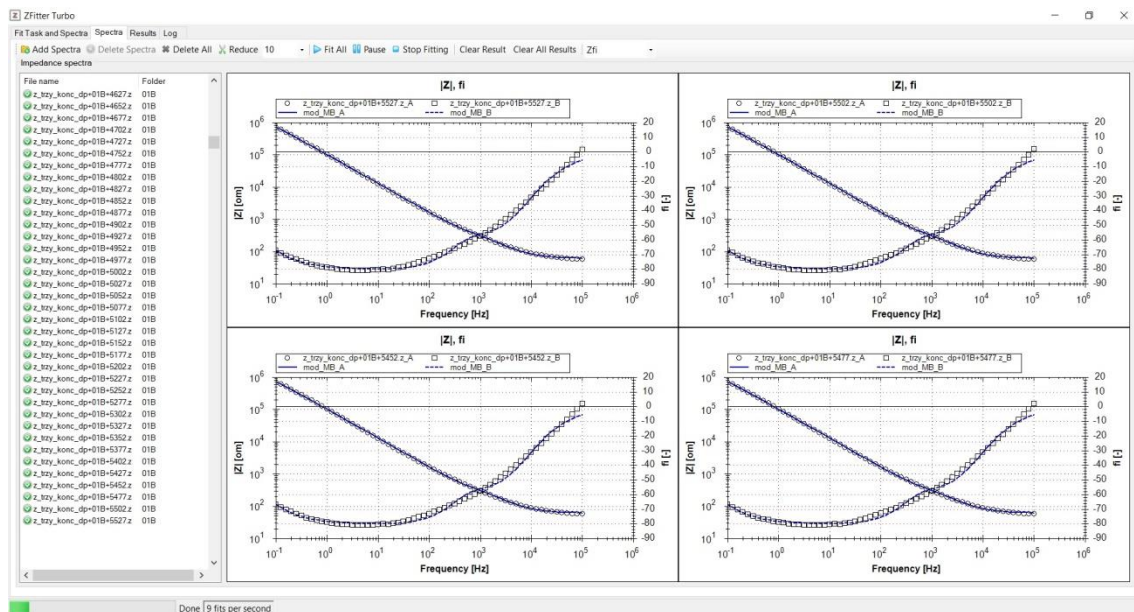




Rysunek 2.35. Interfejs użytkownika programu ZView.

## 2.5.2. ZFitter Turbo

ZFitter Turbo jest oprogramowaniem rozwijanym w Laboratorium Badań Elektrycznych Materiałów Zakładu Nanometrologii Wydziału Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki Politechniki Wrocławskiej pod kierownictwem dr inż. Tomasza Piaseckiego. ZFitter służy do numerycznego dopasowywania wartości elementów modelu EEC do zadanego zestawu widm impedancji. Jest on niejako rozwinięciem funkcjonalności ZView gdyż jako dane wejściowe, oprócz danych pomiarowych, przyjmuje model EEC stworzony w ZView. Główna cecha ZFitter Turbo to w porównaniu do ZView stosunkowo szybki czas dopasowywania widm wynikający z zastosowania wielowątkowości.

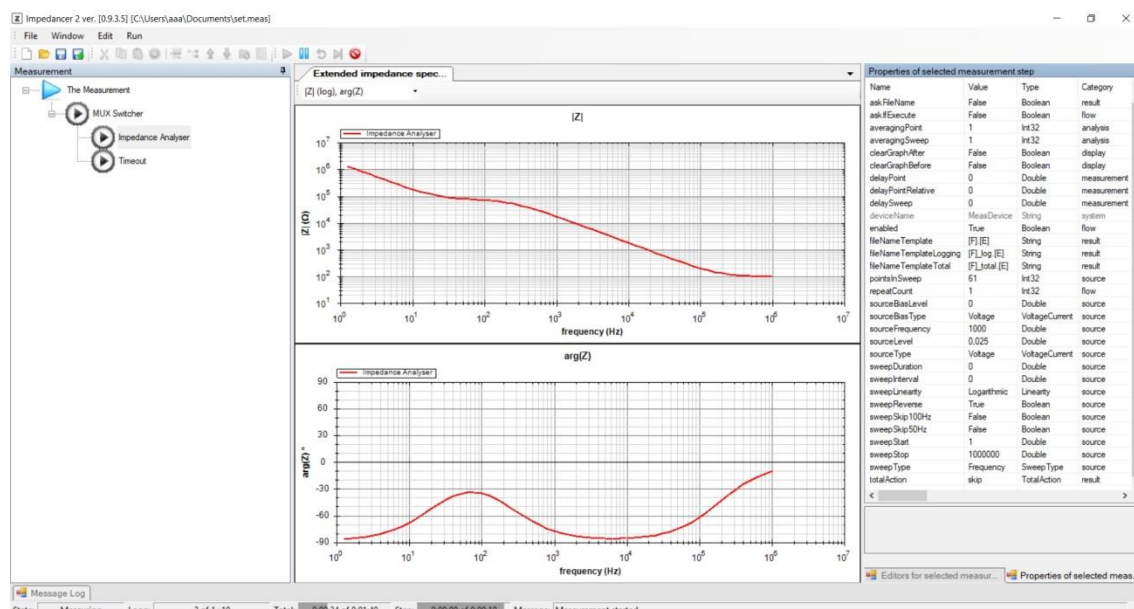


Rysunek 2.36. Interfejs użytkownika programu ZFitter Turbo.

ZFitter Turbo posiada jeszcze kilka innych funkcji niedostępnych w ZView np. możliwość dopasowywania kilku EEC na raz i automatyczne odrzucanie niewłaściwych dopasowań. Interfejs użytkownika programu ZFitter Turbo w trakcie dopasowywania widm impedancji przedstawiono na rysunku 2.36.

### 2.5.3. ImpeDancer

ImpeDancer podobnie jak ZFitter Turbo również jest oprogramowaniem rozwijanym w Laboratorium Badań Elektrycznych Materiałów Zakładu Nanometrologii Wydziału Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki Politechniki Wrocławskiej pod kierownictwem dr inż. Tomasza Piaseckiego. Jest to oprogramowanie wielofunkcyjne, pozwalające na sterowanie wszystkimi typami urządzeń pomiarowych i pomocniczych znajdujących się na wyposażeniu Laboratorium. Dzięki temu zestawione stanowisko pomiarowe może być kontrolowane z poziomu jednego programu a sam pomiar może być zautomatyzowany. Interfejs użytkownika z ustawieniami sekwencyjnego pomiaru za pomocą IMP-STM32 i multiplexera 24 kanałowego przedstawiono na rysunku 2.37.



Rysunek 2.37. Interfejs użytkownika programu ImpeDancer.

## 2.6. Sprzęt pomocniczy

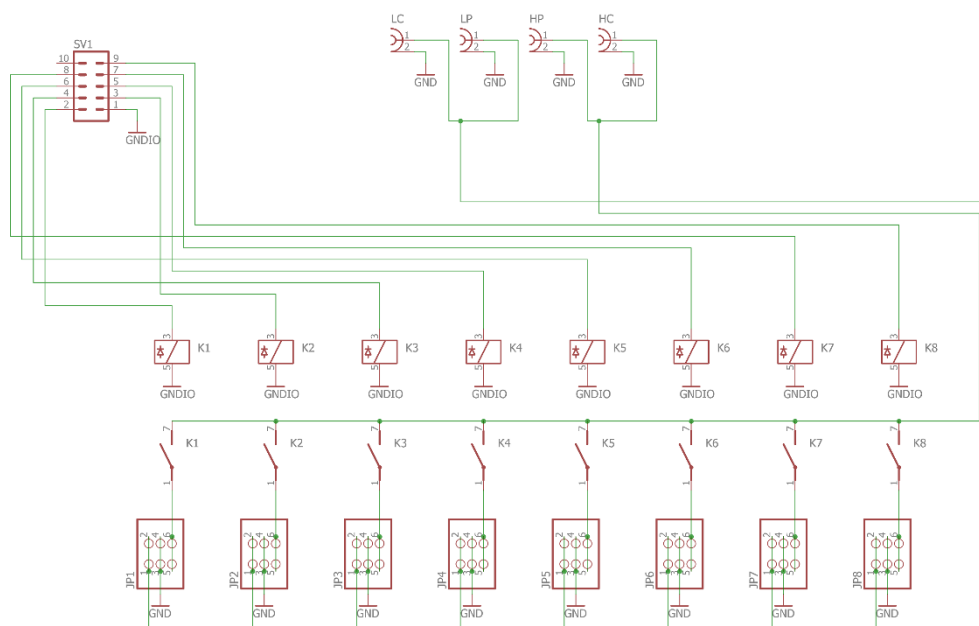
Badanie odpowiedzi czujników impedancyjnych zarówno w środowiskach modelowych jak i na adsorpcję białek bądź obecność biofilmu bakteryjnego wymagało skonstruowania dedykowanych uchwytów, przełączników oraz odpowiedniego sprzętu pomiarowego. Uchwyty musiały umożliwiać bezproblemowe umieszczanie czujników *in situ* tj. w dołkach płytki titracyjnej. Ze względu na liczbę czujników odpowiadającą liczbie dołków w 24-dołkowej płytce titracyjnej potrzebny był dedykowany przełącznik, który umożliwiał sekwencyjny pomiar impedancji wielu czujników jednym urządzeniem pomiarowym.

## 2.6.1. Multiplexer 8-kanalowy

Przedstawiony multiplexer jest pierwszą wersją przełącznika umożliwiającego sekwencyjny pomiar 8 czujników. Jego wymiary geometryczne dobrane są tak, aby dało się w nim umieścić standardową płytkę titracyjną (rysunek 2.38). Do przymocowania czujników do multiplexera przewidziano dedykowane uchwyty wyposażone we wtyczkę micro-USB, kompatybilną z czujnikami opisanymi w rozdziale 2.1. Schemat elektryczny multiplexera przedstawiono na rysunku 2.39. Konstrukcja jest prosta, posiada jedynie złącza i 8 niezależnie sterowanych przełączników.



Rysunek 2.38. Multiplexer 8-kanalowy z czujnikami w uchwytach i płytką titracyjną.

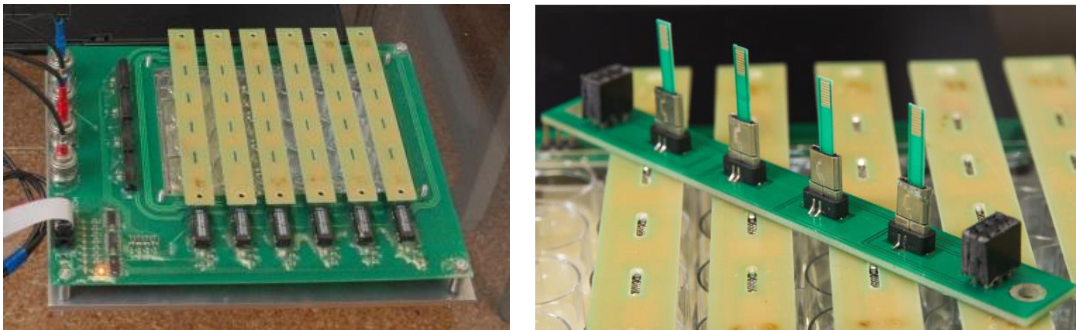


Rysunek 2.39. Schemat elektryczny multiplexera 8-kanalowego.

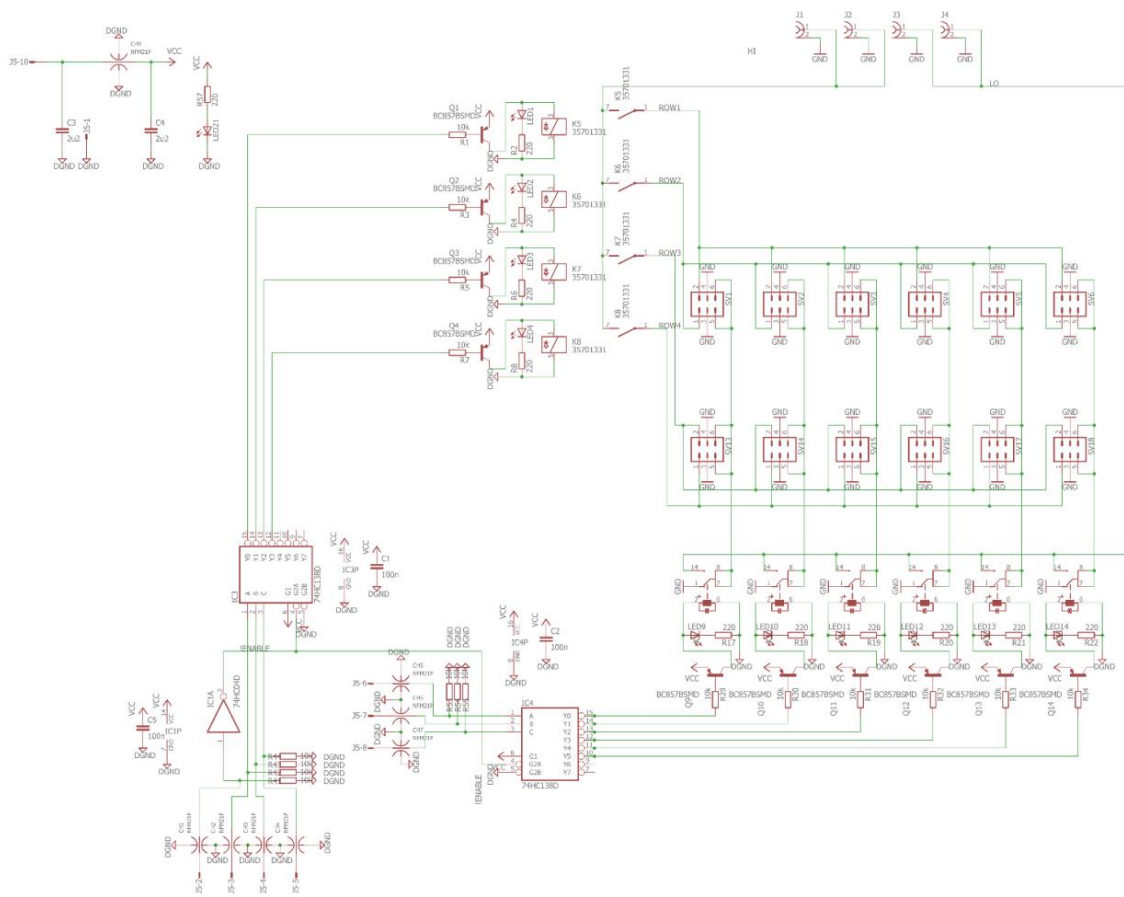
## 2.6.2. Multiplexer 24-kanalowy

Zaprezentowana konstrukcja jest rozwinięciem multiplexera 8 kanałowego. Zmiany konstrukcyjne pozwoliły na obsługę 24 czujników idealnie dopasowując się do 24-dółkowej płytki titracyjnej. Zmienione zostały również uchwyty mieszczące teraz cztery czujniki. Całość konstrukcji przedstawiono na rysunku 2.40. Z uwagi na większą liczbę przełączników i zachowania kompatybilności 10-pinowego złącza zmieniono sposób

sterowania nimi. Zamiast bezpośredniego sterowania wykorzystano multiplexery cyfrowe kontrolujące przełączniki. Schemat elektryczny multiplexera pokazano na rysunku 2.41.



**Rysunek 2.40.** Multiplexer 24-kanalowy z czujnikami w uchwytach i płytką titracyjną.



**Rysunek 2.41.** Schemat elektryczny multiplexera 24-kanalowego.

## **3. Charakteryzacja i zastosowanie czujników impedancyjnych**

Zaprezentowano tutaj wszystkie badania wynikające ze zdefiniowanych celów rozprawy i stosujące wszystkie materiały i metody opisane w poprzednim rozdziale. Do realizacji celów badawczych pracy konieczne było zbadanie podstawowych właściwości stosowanych czujników impedancyjnych, a następnie zastosowanie ich do badania zjawiska adhezji białek oraz monitorowania wzrostu i degradacji biofilmów z wykorzystaniem analizatorów impedancji autorskiej konstrukcji, o czym to traktują poniższe rozdziały.

### **3.1. Badanie podstawowych właściwości czujników impedancyjnych**

Rozdział ten omawia eksperymenty, którym poddawane były używane w pracy czujniki impedancyjne celem lepszego poznania ich właściwości. Obejmowały one spektroskopię impedancyjną wszystkich czujników w środowiskach modelowych oraz w wypadku czujników na podłożu PCB badanie jakości elektrod ze względu na ich złożoność konstrukcyjną.

Środowiska modelowe stanowiły ciecze: woda destylowana, wodne roztwory heksacyjanożelazianów z dodatkiem chlorku sodu lub bez. Zasadniczą różnicą wybranych środowisk modelowych jest zdolność do przewodzenia prądu elektrycznego. Woda destylowana posiada bardzo niewielką koncentrację jonów i uznać można ją za ciecz nieprzewodzącą. Inaczej sytuacja ma się w wypadku pozostałych roztworów – czym większe stężenie rozpuszczonych substancji tym większa koncentracja jonów a co za tym idzie przewodnictwo prądu elektrycznego. Dodatkowo obecność jonów w cieczy modelowej wpływa na inną konstrukcję modelu równoważnego niż dla czujnika w wodzie destylowanej, gdyż w tym pierwszym wypadku widoczne będzie zjawisko transferu ładunków elektrycznych poprzez warstwę podwójną a więc i model będzie bardziej złożony.

Badania jakości elektrod czujników na podłożu PCB obejmowały umieszczenie czujnika w korozyjnie agresywnym środowisku, a następnie zbadanie jakości powierzchni za pomocą mikroskopii SEM i spektroskopii EDS.

#### **3.1.1. Wyznaczenie podstawowych parametrów czujników**

Czujniki umieszczano w środowiskach modelowych: powietrzu, wodzie oraz wodnym roztworze 0,9% NaCl, a następnie mierzono ich impedancję przy częstotliwości 1 MHz za pomocą analizatora impedancji Agilent 4294A opisanego w podrozdziale 2.3.1, stosując pobudzenie napięciowe o amplitudzie 25 mV. Uchwyty z czujnikami montowane były bezpośrednio do analizatora, bez wykorzystania multipleksera.

Otrzymane wyniki zaprezentowano w tabelkach, w których podano również spodziewane wartości teoretyczne uzyskanych pomiarów. Obliczenia stałej celki czujników zrobiono wg wzorów opisanych w [130]. Przy obliczaniu pojemności elektrycznej czujników w wodzie destylowanej przyjęto przenikalność względną wody równą 80 [131].

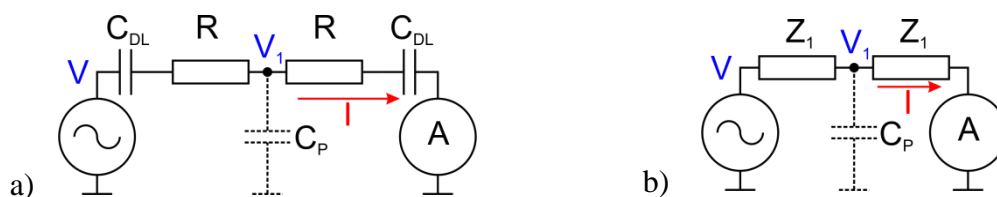
### 3.1.1.1. Mikroczujniki impedancyjne na podłożu szklanym i krzemowym z elektrodą ochronną [101]

Parametry elektryczne mikroczujników zaprezentowano w tabeli 3.1.

**Tabela 3.1.** Parametry elektryczne czujników na podłożu szklanym i krzemowym.

Elektrody czujnika	Na szkle		Na utlenionym krzemie bez EO		Na utlenionym krzemie z EO	
	Teoretyczna	Zmierzona	Teoretyczna	Zmierzona	Teoretyczna	Zmierzona
Wartość						
Stała celki $k$ [ $\text{cm}^{-1}$ ]	1,61	1,70	1,61	1,77	1,61	2,30
Pojemność w powietrzu @ 1MHz [pF]	0,23	1,03	-	68,50	0,05	0,17
Pojemność w wodzie destylowanej @ 1MHz [pF]	4,63	5,65	-	75,04	4,40	2,20
Pojemność w wodnym roztworze 0,9% NaCl @ 1MHz [pF]	-	517,51	-	412,01	-	195,90

Czujniki na utlenionym krzemie bez uziemionej elektrody ochronnej posiadają stosunkowo duże pasożytnicze sprzężenie pojemnościowe przez podłoże co negatywnie wpływa na ich czułość. Efekt ten wyraźnie mniejszy jest przy zastosowaniu podłoża szklanego. Uziemienie elektrody ochronnej niweluje wspomniane sprzężenie, niestety wprowadza też dodatkowy efekt uboczny. Polegające na sprzężeniu pojemnościowym pomiędzy przewodzącą cieczą a elektrodą ochronną. W wypadku czujnika impedancyjnego z elektrodami palczastymi w przewodzącej cieczy z uziemioną elektrodą ochronną zjawisko to można przybliżyć modelem przedstawionym na rysunku 3.1.



**Rysunek 3.1.** Model elektryczny czujnika na utlenionym krzemie w układzie pomiarowym z uziemioną EO umieszczonego w elektrolicie: pełny a), uproszczony b).

Z elektrycznego punktu widzenia następuje szeregowe połączenie dwóch impedancji  $Z_1$  składających się z szeregowo dołączonych pojemności elektrycznej warstwy podwójnej na jednej elektrodzie  $C_{DL}$  i rezystora  $R$  modelującego połowę sumarycznej rezystancji elektrolitu. Między impedancjami  $Z_1$  znajduje się kondensator pasożytniczy  $C_P$  zwarty do masy układu pomiarowego przez EO. Modeluje on w uproszczeniu efekt

wynikający z faktu, iż elektrolit zachowuje się jak przewodnik a  $C_P$  stanowi pojemność elektryczną interfejsu elektrolit/SiO<sub>2</sub>/uziemione podłoże n<sup>+</sup>-Si. Zaprezentowane niżej obliczenia pokazują, jak zmieniona będzie impedancja pokazywana przez analizator impedancji w stosunku do rzeczywistej. Analizator pobudzają mierzony układ napięciem  $V$  i mierząc prąd  $I$  wyznacza impedancję  $Z$  (3.1). W analizie tej przyjęto założenie, że analizator impedancji na wejściu, z którego wynika jaki prąd płynie, ma pozorną masę.

$$Z = \frac{V}{I}. \quad (3.1)$$

Dla uproszczenia obliczeń zastąpiono szeregowe połączenie  $C_{DL}$  i  $R$  impedancją  $Z_1$  (rysunek 3.1b):

$$Z_1 = R + \frac{1}{j\omega C_{DL}}. \quad (3.2)$$

Przy takim założeniu schemat się upraszcza. Prąd mierzony przez analizator impedancji to:

$$I = \frac{V_1}{Z_1}. \quad (3.3)$$

Równoległe połączenie  $Z_1$  oraz  $C_P$  ma impedancję:

$$Z_2 = \frac{1}{\frac{1}{Z_1} + j\omega C_P}. \quad (3.4)$$

a napięcie  $V_1$  można obliczyć na podstawie równania dzielnika napięć:

$$V_1 = V \frac{Z_2}{Z_1 + Z_2} = V \frac{1}{2 + j\omega C_P Z_1}. \quad (3.5)$$

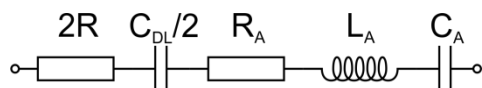
Ostatecznie równanie opisujące impedancję widzianą przez analizator otrzymuje postać:

$$Z = \frac{V}{I} = \frac{V}{V_1} Z_1 = 2Z_1 + j\omega C_P Z_1^2 = 2Z_1 + \frac{2RC_P}{C_{DL}} + j\omega C_P R^2 + \frac{1}{j\omega \frac{C_{DL}^2}{C_P}}. \quad (3.6)$$

Okazuje się, że wskazywana przez analizator impedancji wartość będzie to prawidłowe  $2Z_1$  ale powiększone o trzy czynniki. Pierwszy to pozorna rezystancja  $R_A = \frac{2RC_P}{C_{DL}}$ , drugi to pozorna indukcyjność równa  $L_A = C_P R^2$  a trzeci to pozorna pojemność  $C_A = \frac{C_{DL}^2}{C_P}$ .

Przeprowadzona analiza udowadnia, że podczas pomiaru impedancji czujnika z EO pojawiają się trzy dodatkowe człony: pseudorezystancyjny  $R_A$ , pseudoindukcyjny  $L_A$  i pseudopojemnościowy  $C_A$  (rysunek 3.2) ściśle związane ze sprzężeniem pojemnościowym do elektrody ochronnej i zaburzające pomiar impedancji. Jest to właściwość zaprezentowanego układu pomiarowego. Sprzężenie pojemnościowe do EO nie byłoby problemem przy pomiarze wspomnianego czujnika w układzie

trójelektrodowym. W tym wypadku EO pełniła by rolę elektrody pracującej, jedna z elektrod palczastych byłaby elektrodą referencyjną a druga przeciwelektrodą. Niestety przy pomiarze trójelektrodowym czujnik ten przestaje być mikroczujnikiem i staje się sensorem makroskopowym ze względu na znacznie większy obszar oddziaływania.



**Rysunek 3.2.** Elektryczny model zastępczy czujnika z uziemioną EO umieszczonego w elektrolicie.

Podsumowując, czujniki na utlenionym krzemie bez uziemionej elektrody ochronnej posiadają pasożytnicze sprzężenie pojemnościowe przez podłoże co negatywnie wpływa na ich czułość. Uziemienie elektrody ochronnej niweluje wspomniane sprzężenie, niestety wprowadza też dodatkowy efekt uboczny. Gdy elektrody czujnika zanurzone są w przewodzącej cieczy bardzo mocno uwidacznia się wpływ sprzężenia pojemnościowego medium z elektrodą ochronną. Mierzony obiekt staje się układem złożonym – czwornikiem – o pewnej impedancji efektywnej  $Z$ . Otrzymana zależność  $Z$  w równaniu (3.6) wyjaśnia anomalne wyniki pomiarów impedancji czujnika z uziemioną elektrodą ochronną. Porównanie właściwości czujników impedancyjnych na krzemie i szkle wypada wyraźnie na korzyść tych drugich, stąd tylko czujniki na szklanym podłożu zostały użyte w badaniach aplikacyjnych.

### 3.1.1.2. Czujniki impedancyjne w technologii PCB

Zmierzone parametry elektryczne czujników przedstawiono w tabeli 3.2.

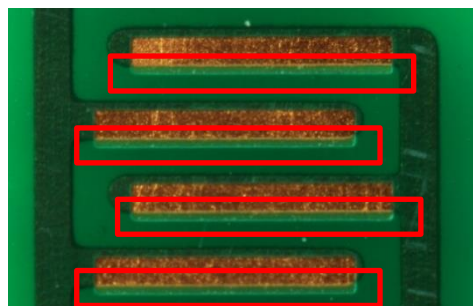
**Tabela 3.2.** Parametry elektryczne czujników na podłożu z laminatu.

Pokrycie soldermaską	Brak	Doprowadzenia elektryczne	Brak na palcach elektrod
Stała celki $k$ [ $\text{cm}^{-1}$ ]	1,00	1,11	1,11
Pojemność w powietrzu @ 1MHz [pF] (teoret.)	0,48	0,44	0,44
Pojemność w wodzie destylowanej @ 1MHz [pF] (zmierz.)	13,55	11,51	9,69
Pojemność w wodnym roztworze 0,9% NaCl @ 1MHz [pF] (zmierz.)	229,9	207,9	155,3

Czujniki bez pokrycia soldermaską wykazują zauważalnie większą pojemność elektryczną w cieczach co wskazuje na niepomijalny wpływ doprowadzeń elektrycznych, które powinny być zaizolowane. Do rozważenia pozostały jeszcze czujniki pokryte soldermaską. Przy projektowaniu czujnika całego pokrytego soldermaską z wyjątkiem samych palców elektrod intencją autora było odizolowanie się od wpływu domniemanej porowatej struktury podłoża. Dokładniejsze oględziny wymienionych czujników pod mikroskopem optycznym ujawniły niedoskonałości technologiczne w postaci delikatnego przesunięcia soldermaski względem podłoża zaprezentowane na rysunku 3.3. Efekt ten powoduje znielowanie założonego odizolowania podłoża soldermaską a dodatkowo zmienia ustaloną powierzchnię palca elektrody. Można spodziewać się, że próba całkowitego pokrywania czujnika



soldermaską z jedynie odkrytymi palcami elektrod może doprowadzić do zwiększenia negatywnego efektu rozrzutu parametrów elektrycznych czujników między kolejnymi seriami produkcyjnymi. Biorąc pod uwagę wszystkie wymienione czynniki, do zastosowań mikrobiologicznych wybrano czujnik w pierwotnym typie konstrukcyjnym, przedstawiony na rysunku 2.9.



**Rysunek 3.3.** Przesunięcie soldermaski względem podłoża w czujniku z odkrytymi palcami elektrod jako efekt niedoskonałości technologicznej.

### 3.1.1.3. Czujniki impedancyjne w technologii LTCC

Zmierzone parametry elektryczne czujników przedstawiono w tabeli 3.3.

**Tabela 3.3.** Parametry elektryczne czujników na podłożu LTCC.

Stała celki $k$ [ $\text{cm}^{-1}$ ]	1,11
Pojemność w powietrzu @ 1MHz [pF] (teoret.)	0,70
Pojemność w wodzie destylowanej @ 1MHz [pF] (zmierz.)	11,05
Pojemność w wodnym roztworze 0,9% NaCl @ 1MHz [pF] (zmierz.)	203,9

Sensory wykonane w technologii LTCC z racji wymiarów geometrycznych mają taką samą stałą celki jak czujniki PCB z soldermaską. Wyniki pomiarów w środowisku wody destylowanej oraz roztworu NaCl również są podobne do czujników PCB. Ze względu na dużą dokładność wykonania i jakość materiałów nie występują w nich dodatkowe nieprzewidziane zjawiska jak w opisanych w poprzednich podrozdziałach sensorach.

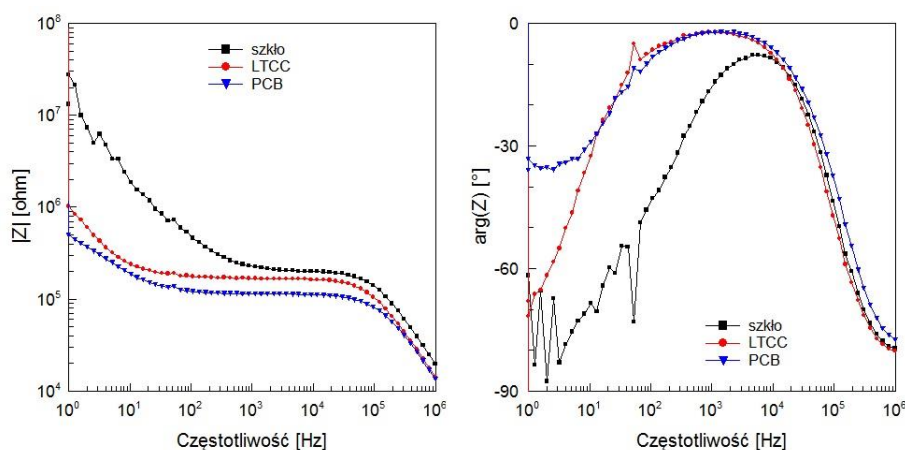
### 3.1.2. Pomiary impedancyjne w wodnych roztworach heksacyjanożelazianów jako środowisk modelowych

Przeprowadzono badania trzech typów czujników: na podłożu szklanym, PCB oraz LTCC, opisanych odpowiednio w rozdziałach 2.1.1, 2.1.2 i 2.1.3. Celem było poznanie ich elektrycznych właściwości po umieszczeniu w znanym środowisku. Należy mieć tu na uwadze, że wykonane różnymi technikami elektrody czujników, z niby tą samą złotą powierzchnią, mogą w mniejszym lub większym stopniu wpływać na wynik uzyskiwanego pomiaru danego obiektu.

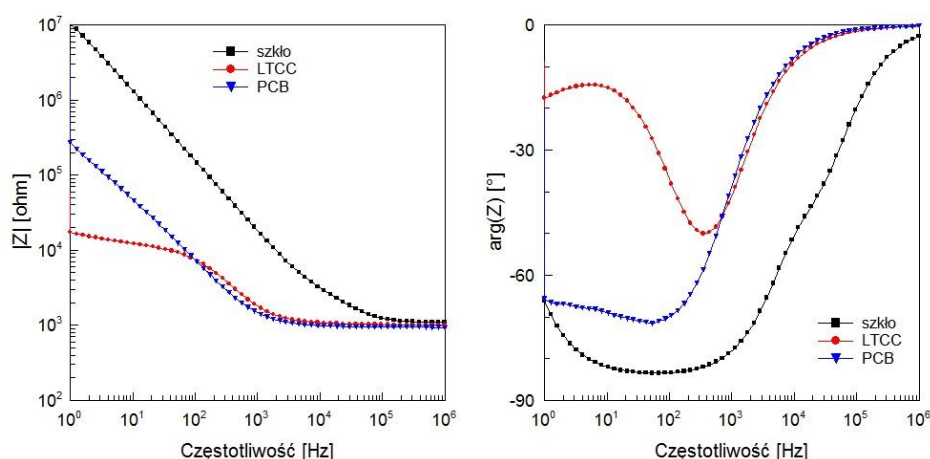
Stanowisko pomiarowe składało się z analizatora impedancji Solartron FRA1260 opisanego w rozdziale 2.3.2 oraz multipleksera 8 kanałowego. Jako płyny modelowe wykorzystano:

- wodę destylowaną
- heksacyjanożelazian(II) potasu 0,5 mM + heksacyjanożelazian(III) potasu 0,5 mM na 1 ml w wodzie
- heksacyjanożelazian(II) potasu 0,5 mM + heksacyjanożelazian(III) potasu 0,5 mM na 1 ml w 0,09% wodnym roztworze chlorku sodu
- heksacyjanożelazian(II) potasu 5 mM + heksacyjanożelazian(III) potasu 5 mM na 1 ml w wodzie
- heksacyjanożelazian(II) potasu 0,5 mM + heksacyjanożelazian(III) potasu 5 mM na 1 ml w 0,9% wodnym roztworze chlorku sodu

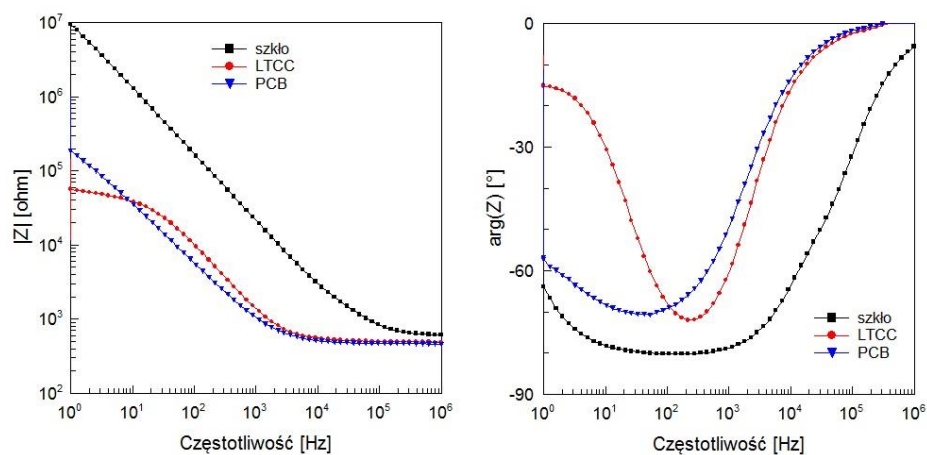
Po uprzednim oczyszczeniu wodą, etanolem i acetonem czujniki zostały zamocowane w multiplekserze. Dołki płytki titracyjnej przynależące do danych czujników zostały wypełnione 2 ml danej cieczy, po czym zmierzono widmo impedancji każdego z nich w zakresie częstotliwości od 1 Hz do 1 MHz. Wyniki pomiarów czujników na podłożu szklanym (szkło) oraz wykonanych w technologiach PCB i LTCC znajdujących się w danym środowisku modelowym przedstawiono na rysunkach 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, i 3.8.



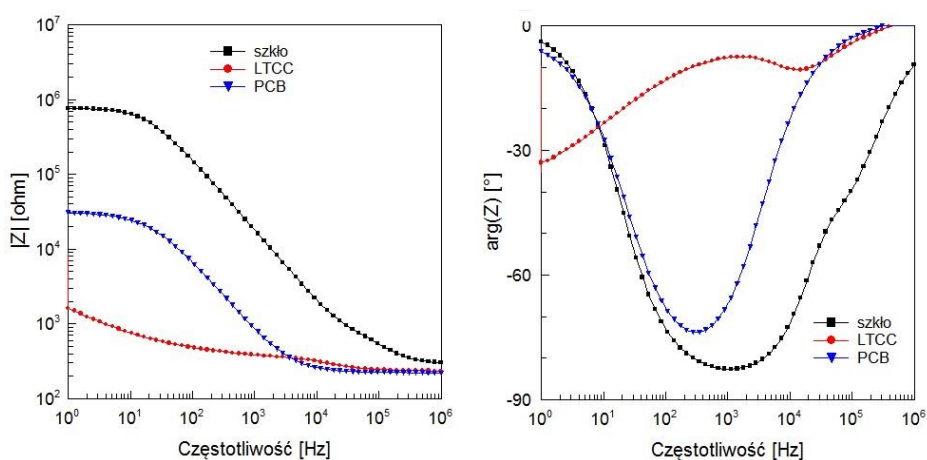
**Rysunek 3.4.** Widma impedancji czujników w wodzie destylowanej.



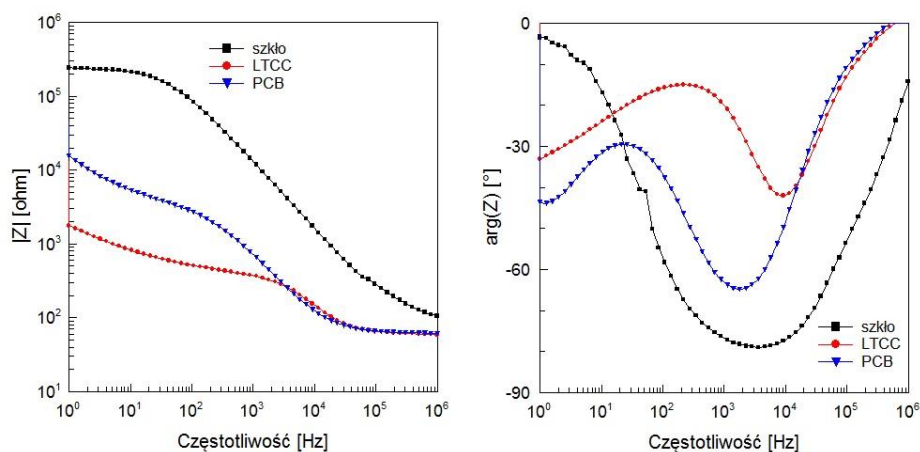
**Rysunek 3.5.** Widma impedancji czujników w heksacyjanożelazianie(II) potasu 0,5 mM + heksacyjanożelazianie(III) potasu 0,5 mM na 1 ml w wodzie.



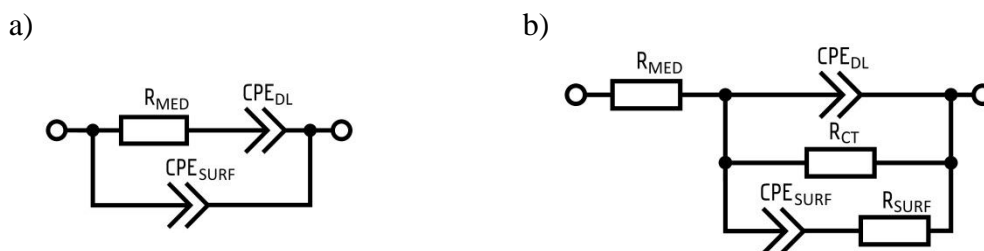
**Rysunek 3.6.** Widma impedancji czujników w heksacyjanożelazianie(II) potasu 0,5 mM + heksacyjanożelazianie(III) potasu 0,5 mM na 1 ml w 0,09% wodnym roztworze chlorku sodu.



**Rysunek 3.7.** Widma impedancji czujników w heksacyjanożelazianie(II) potasu 5 mM + heksacyjanożelazianie(III) potasu 5 mM na 1 ml w wodzie.

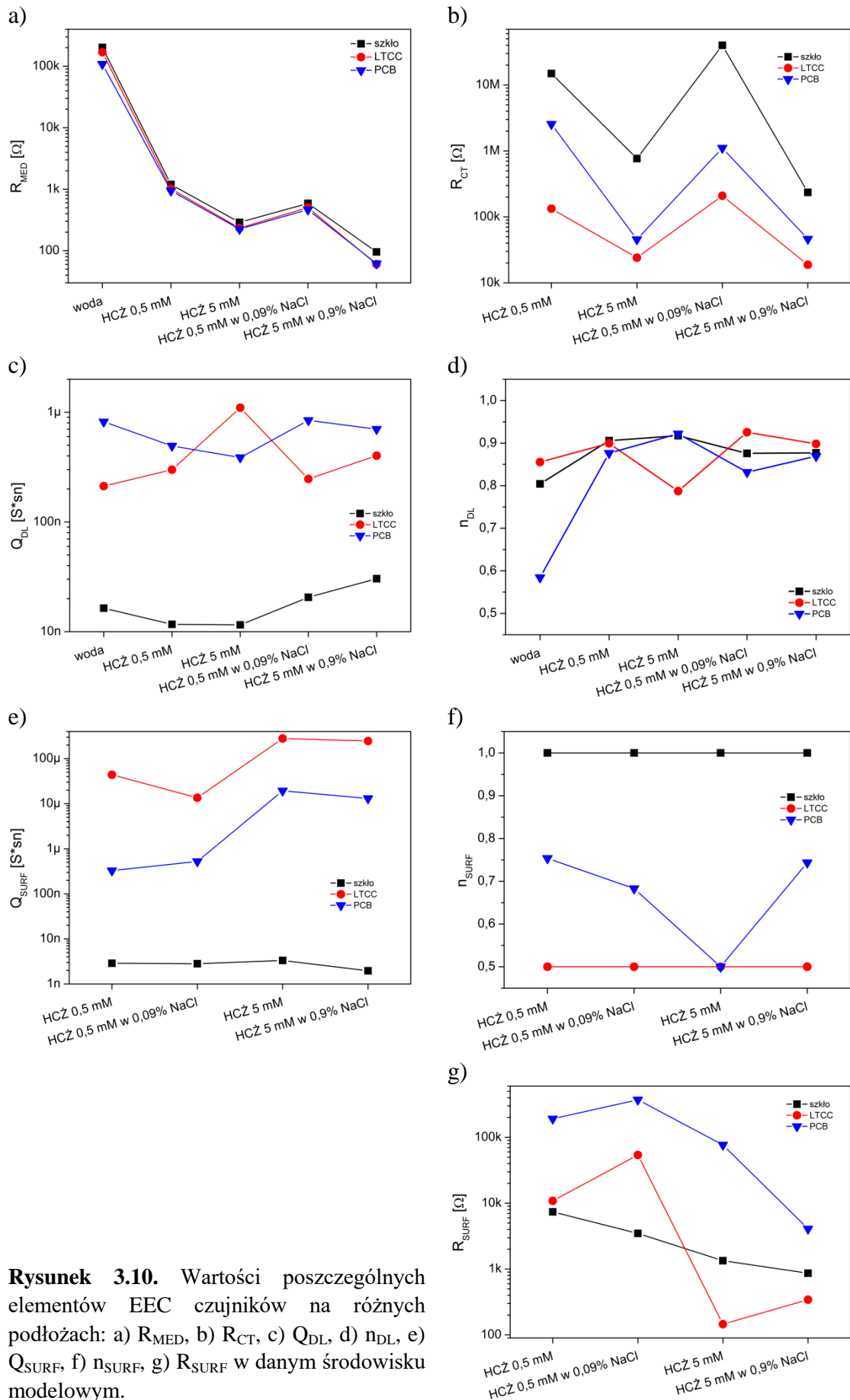


**Rysunek 3.8.** Widma impedancji czujników w heksacyjanożelazianie(II) potasu 5 mM + heksacyjanożelazianie(III) potasu 5 mM na 1 ml w 0,9% wodnym roztworze chlorku sodu.



**Rysunek 3.9.** EEC czujnika impedancyjnego w: a) wodzie destylowanej, b) roztworze zawierającym jony.

Uzyskane wyniki zamodelowano za pomocą EEC zaprezentowanych na rysunku 3.9. Ze względu na bardzo niską koncentrację nośników ładunku EEC czujnika w wodzie destylowanej jest prostszy aniżeli EEC czujnika w pozostałych cieczach. Wartości poszczególnych elementów EEC w zależności od środowiska modelowego przedstawiono na rysunku 3.10. Rezystancja medium  $R_{MED}$  maleje wraz ze wzrostem koncentracji nośników ładunku w cieczy modelowej, a jej wartości są niemalże identyczne i niezależne od typu czujnika. Podobnie do  $R_{MED}$  zachowuje się rezystancja transferu ładunku  $R_{CT}$  – również zmniejsza się wraz ze wzrostem koncentracji nośników, jednakże jej wartości są już uzależnione od typu czujnika. Wartości parametrów CPE modelującego warstwę podwójną mają się następująco:  $Q_{DL}$  wahają się w zakresie od 200 n do 1  $\mu S*s^n$  dla czujników wykonanych w technologiach LTCC i PCB oraz 10 n do 30 n  $S*s^n$  dla czujników na podłożu szklanym co związane jest z powierzchnią elektrod, zaś  $n_{DL}$  waha się w zakresie od 0,6 do 0,95. Parametry CPE modelującego powierzchnię elektrod to odpowiednio  $Q_{SURF}$  i  $n_{SURF}$ . Wartości pierwszego z nich ( $Q_{SURF}$ ) wahają się w zakresie od 10  $\mu$  do 300  $\mu S*s^n$  dla czujników wykonanych w technologii LTCC, 300 n do 20  $\mu S*s^n$  dla PCB i od 2 n do 4 n  $S*s^n$  dla czujnika na podłożu szklanym. Drugi z nich ( $n_{SURF}$ ) wykazuje wahania wartości w zakresie od 0,5 do 0,75 tylko dla czujnika wykonanego w technologii PCB. Dla czujnika na szklanym podłożu wartość  $n_{SURF}$  wynosi 1 niezależnie od środowiska modelowego, co świadczy o czysto pojemnościowym charakterze tego elementu EEC. Zupełnie odmienna sytuacja występuje zaś w wypadku czujnika LTCC, gdzie  $n_{SURF}$  niezależnie od środowiska modelowego wynosi 0,5 a co za tym idzie wykazuje właściwości elementu Warburga, charakterystycznego dla procesów dyfuzyjnych. Ostatni element  $R_{SURF}$  i zmiany jego wartości w zależności od środowiska łatwo jest interpretować w wypadku czujnika na szklanym podłożu. Podobnie jak w wypadku  $R_{MED}$  wraz ze wzrostem koncentracji nośników ładunku spada wartość  $R_{SURF}$ . Jednakże w wypadku czujników wykonanych w technologiach LTCC i PCB interpretacja  $R_{MED}$  nie jest jednoznaczna gdyż jej wartość waha się w zakresie dwóch dekad bez wyraźnej zależności. Otrzymane wartości parametrów EEC wskazują na największą stabilność czujników na podłożu szklanym.



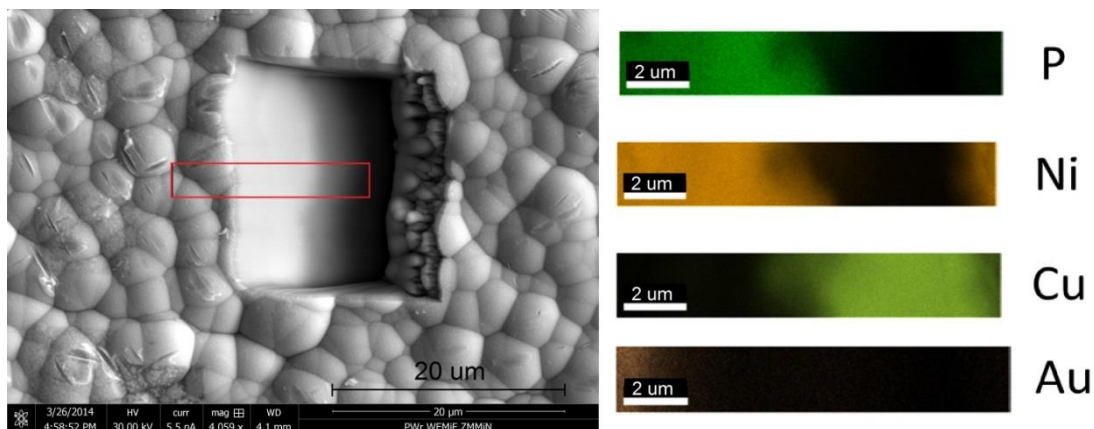
**Rysunek 3.10.** Wartości poszczególnych elementów EEC czujników na różnych podłożach: a)  $R_{MED}$ , b)  $R_{CT}$ , c)  $Q_{DL}$ , d)  $n_{DL}$ , e)  $Q_{SURF}$ , f)  $n_{SURF}$ , g)  $R_{SURF}$  w danym środowisku modelowym.

### 3.1.3. Struktura elektrody czujnika wykonanego w technologii PCB

Typowa metalowa powierzchnia płytki PCB galwanicznie pokryta złotem składa się z trzech warstw w strukturze przekładkowej: miedzi, stopu niklowo-fosforowego oraz złota [132]. Procentowa zawartość wymienionych składników w elektrodzie czujnika została sprawdzona za pomocą analizy EDS. W pierwszej kolejności badany czujnik został przygotowany poprzez splukanie wodą destylowaną, etanolem oraz acetonem, następnie wytrawiony za pomocą zogniskowanej wiązki jonów (FIB) jak pokazano na rysunku 3.11. Kolejnym krokiem było przeprowadzenie analizy EDS. Uzyskane wyniki potwierdziły strukturę przekładkową warstw metalicznych elektrody – miedź znajdowała się na spodzie, następną warstwę stanowił stop niklu z fosforem pokryty na powierzchni cienką warstwą złota. Jak zauważyć można w tabeli 3.4. oraz na rysunku 3.11. procentowa zawartość złota jest bardzo niewielka. Dodatkowo wyspowa struktura galwanicznie nanoszonej złotej warstwy świadczyć może o jej niskiej jakości.

Tabela 3.4. Skład chemiczny elektrody czujnika PCB.

Pierwiastek	Orbital	Masa [%]	Atomy [%]	Błąd [%]
węgiel	K	2.66	11.91	9.56
fosfor	K	5.54	9.61	7.43
nikiel	K	36.27	33.17	0.96
miedź	K	52.70	44.54	1.02
złoto	L	2.82	0.77	3.17



Rysunek 3.11. Obraz SEM elektrody czujnika wytrawionej za pomocą FIB- miejsce analizy EDS zaznaczono na czerwono (lewy). Wynik analizy składu pierwiastkowego EDS (prawy).

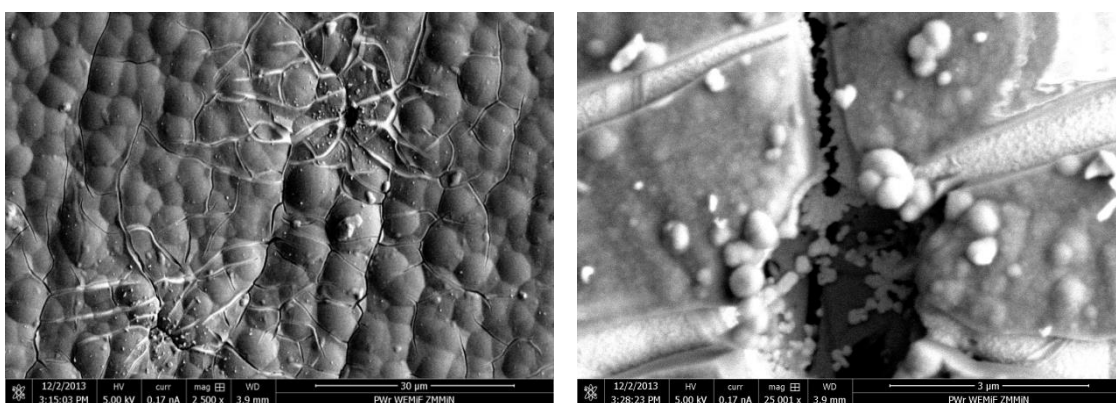
Opisana przekładkowa struktura elektrody czujnika wykonanego w technologii PCB wraz z wątpliwą jakością złotą powłoką może sugerować podatność elektrody na degradację w środowiskach korozyjnych. Zagadnienie jest o tyle istotne, że częstym składnikiem pożywek bakteryjnych, w których to czujniki mają pracować, jest chlorek sodu – substancja powodująca korozję.

Aby sprawdzić stabilność zachowania się elektrody w agresywnym środowisku przeprowadzono następujący eksperyment: oczyszczony przez splukanie wodą destylowaną, etanolem oraz acetonem czujnik inkubowano przez 48 godzin w wodnym

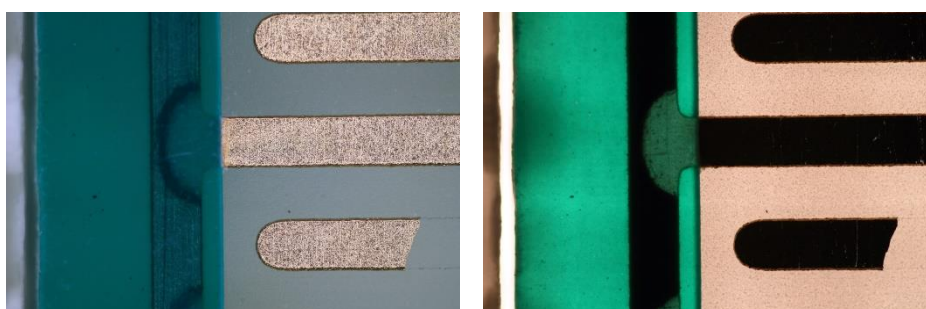
roztworze 0,9% NaCl. Stan powierzchni elektrody po inkubacji oceniono za pomocą SEM a wyniki zaprezentowano na rysunku 3.12. W kilku miejscach na powierzchni elektrody widoczna jest korozja wżerowa. Wskazuje to na nieciągłość warstwy złota na powierzchni elektrody a co za tym idzie brak zabezpieczenia przed korozją [133].

Innym potwierdzeniem nieciągłości warstwy złota był eksperyment polegający na umieszczeniu czujnika w roztworze nadsiarczanu sodowego, który to typowo wykorzystywany jest do trawienia warstw miedzi z laminatu PCB. Po kilkunastogodzinnej ekspozycji na nadsiarczan sodowy wytrawieniu uległ fragment elektrody czujnika oraz podtrawiona została miedź znajdująca się pod soldermaską (rysunek 3.13).

W tej sytuacji należy mieć na uwadze fakt, że przy badaniach aplikacyjnych czujników PCB ich miejscami korodujące elektrody mogą mieć wpływ na wartości parametrów EEC, za pomocą którego to czujniki będą analizowane.



**Rysunek 3.12.** Obraz SEM elektrody pokrytej złotem po 48-godzinnej inkubacji w wodnym roztworze 0,9% NaCl. Uwidoczniona jest korozja warstwy metalu pod złotym pokryciem. Powiększenie 2500x (lewy) i 25000x (praw).



**Rysunek 3.13.** Zdjęcie przedstawiające fragment czujnika poddanego działaniu roztworu nadsiarczanu sodowego. W lewej dolnej części zdjęcia widoczny jest ubytek elektrody oraz podtrawienie pod soldermaską w środkowej części zdjęcia.

### 3.2. Pomiary adhezji białek do powierzchni elektrod

Zaprezentowany w tym podrozdziale sposób osadzania biologicznie aktywnych cząstek (awidyna, IgG) jest jedną z metod wytwarzania warstw receptorowych w czujnikach biologicznych, polegającej na fizycznej adsorpcji cząstek do powierzchni

czujnika [134] [135]. Biosensory są wrażliwe na obecność analitu w próbce. Związanie się analitu do warstwy receptorowej znajduje odzwierciedlenie w sygnale wyjściowym czujnika, którym w zależności od rodzaju sensora może być: impedancja [136], pojemność elektryczna [51] [38], wychylenie [137], częstotliwość rezonansowa [137] [138] itp. Podrozdział ten przedstawia badanie osadzania warstw receptorowych na powierzchni miniaturowego czujnika impedancyjnego na podłożu krzemowym ze złotymi elektrodami o strukturze palczastej opisanego w podrozdziale 2.1.1.

Weryfikacja metod osadzania warstw białek przebiegała dwuetapowo: za pomocą mikroskopii sił atomowych a następnie pomiarów impedancyjnych, co zaprezentowane jest w kolejnych podrozdziałach.

Badania prowadzone były w ścisłej współpracy z Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej mieszczącym się w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej (IITD) we Wrocławiu.

### **3.2.1. Materiały i metody**

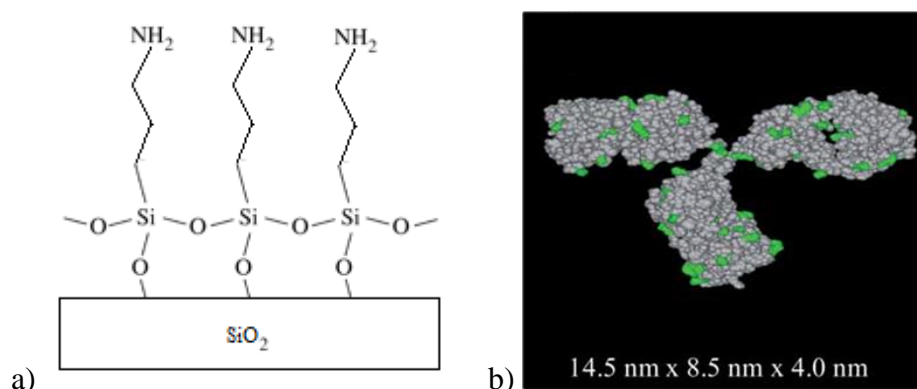
Badania polegały osadzania warstw białkowych, mogących służyć jako pokrycia receptorowe na powierzchni mikroczujników impedancyjnych [3]. Wybór rodzajów powierzchni nie jest przypadkowy. Złoto często stanowi materiał konstrukcyjny elektrod w czujnikach impedancyjnych i mikrowagach kwarcowych. Dwutlenek krzemu spotykany jest na powierzchni czujników półprzewodnikowych FET oraz czujników masowych – mikroźwigni krzemowych. Obydwie powierzchnie dają się łatwo funkcjonalizować chemicznie [139]. Warstwy białkowe stanowiły: awidyna, awidyna z biotynylowanym króliczym przeciwciałem IgG oraz królicze przeciwciało IgG osadzone na warstwie samoorganizującej 3-aminopropylotoksylsilanu (APTES) w wypadku podłoża z SiO<sub>2</sub> lub cysteaminie w wypadku podłoża złotego.

W zależności od pokrycia powierzchni badane próbki dwutlenku krzemu i złota przygotowywane były do pomiaru na różne sposoby:

1. Czujniki wyczyszczono poprzez inkubację w roztworze piranii (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w proporcji 7:3) przez 20 min. i obfite spłukanie wodą, następnie inkubację przez 1 godzinę w czystej wodzie dla ustabilizowania powierzchni.
2. Powierzchnię dwutlenku krzemu z IgG na warstwie samoorganizującej przygotowano zaczynając od czyszczenia jak w pkt. 1. a następnie inkubowano 2 godz. w 0,2 % roztworze APTES (rysunek 3.14a) w etanolu po czym spłukano wodą, następnie inkubowano w 3 % roztworze wodnym aldehydu glutarowego przez 1 godz., znowu spłukano wodą, inkubowano w roztworze wodnym IgG (rysunek 3.14b) o stężeniu 10 µg/ml przez 1 godzinę i spłukano wodą.
3. Powierzchnię złota z IgG na warstwie samoorganizującej przygotowano zaczynając od wyczyszczenia powierzchni jak w pkt. 1. a następnie inkubowano przez 12 godzin w 10 mM roztworze cysteaminy w wodzie po czym spłukano wodą, następnie inkubowano w 3 % roztworze wodnym aldehydu glutarowego przez 1 godz., znowu spłukano wodą, i dalej inkubowano w roztworze wodnym IgG (rysunek 3.14b) o stężeniu 10 µg/ml przez 1 godzinę i spłukano wodą.
4. Próbki pokryte awidyną przygotowano przez wyczyszczenie powierzchni jak w pkt. 1., inkubację w wodnym roztworze awidyny (rysunek 3.15) o stężeniu 50 ng/ml przez 1 godzinę i spłukanie wodą.



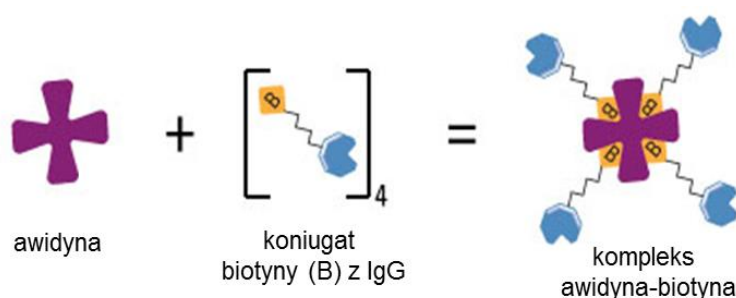
5. Próbkę pokrytą kompleksem awidyna-biotyny IgG przygotowano jak w pkt. 4., a następnie inkubowano w wodnym roztworze biotynylowanych IgG (rysunek 3.16) o stężeniu 10  $\mu\text{g/ml}$  przez 1 godzinę i spłukano wodą.



**Rysunek 3.14.** Wizualizacja a) osadzonej warstwy samoorganizującej APTES na  $\text{SiO}_2$  oraz b) przeciwciała klasy IgG [140].



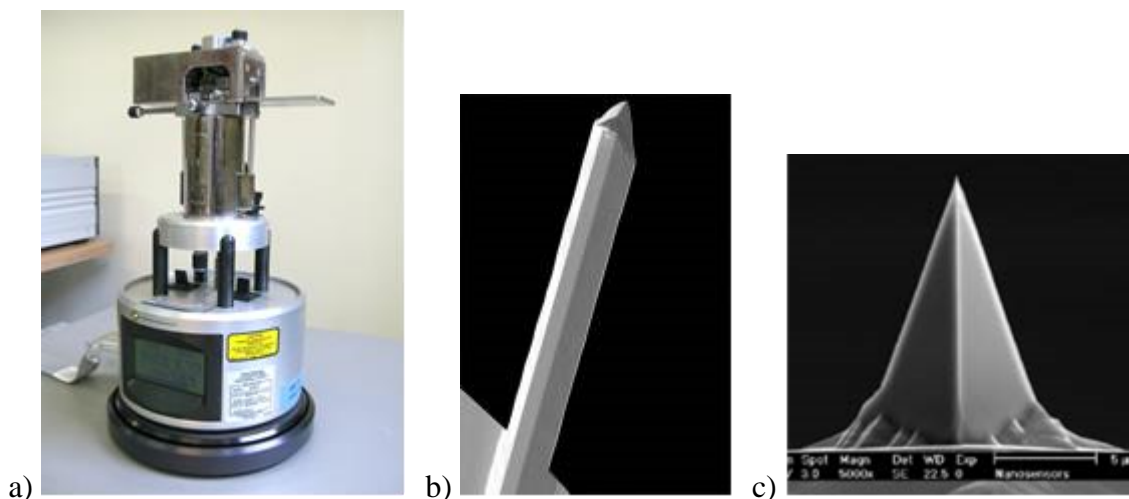
**Rysunek 3.15.** Tetramer awidyny wraz z wymiarami geometrycznymi [141]



**Rysunek 3.16.** Schemat interakcji awidyny z biotynylowanym przeciwciałem tworzącej kompleks awidyna-biotyna [142].

### 3.2.2. Pomiary za pomocą AFM

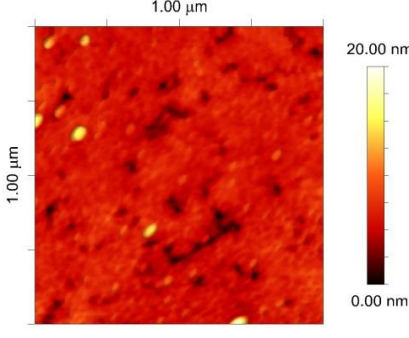
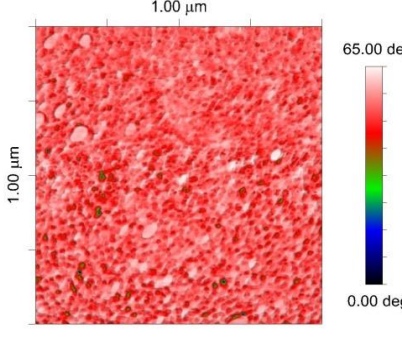
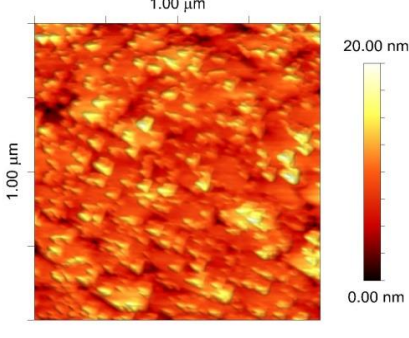
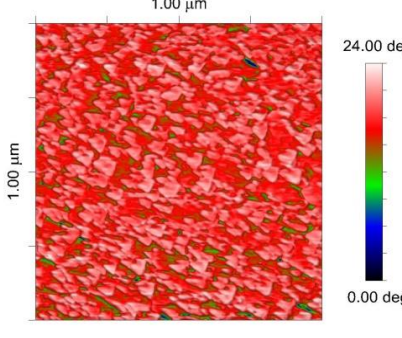
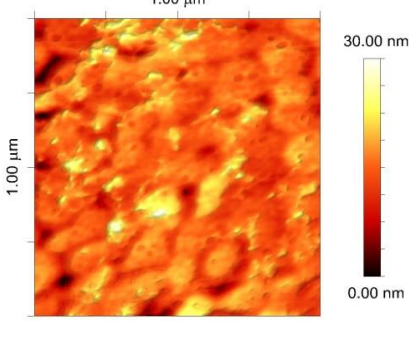
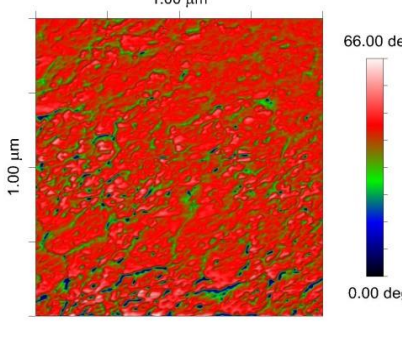
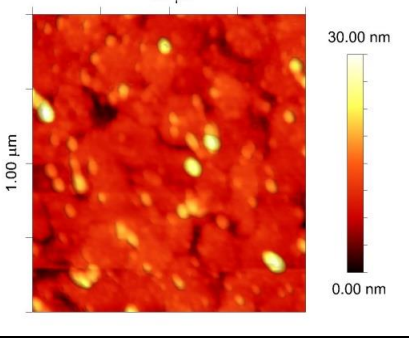
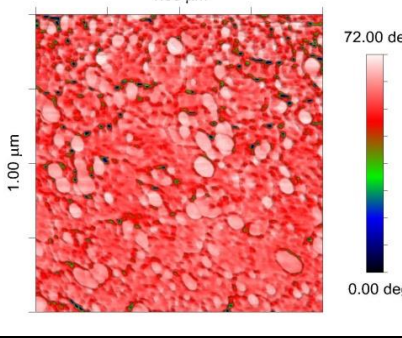
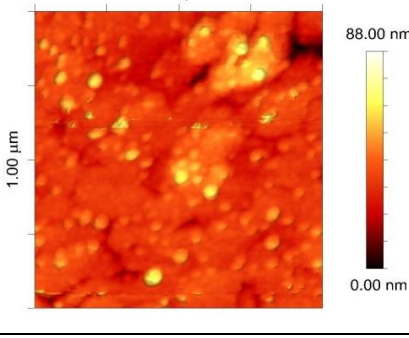
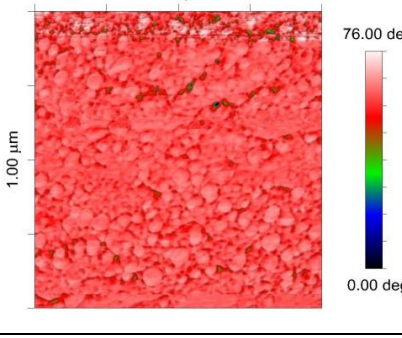
Podstawowym narzędziem pomiarowym w przedstawionych badaniach był mikroskop sił atomowych (AFM) Veeco MultiMode ze sterownikiem NanoScope V (rysunek 3.17a). Pomiary wykonywano w trybie kontaktu przerywanego (TM – *tapping mode*) za pomocą sondy typu PPP-NCLR (rysunek 3.17b oraz c). Mierzone próbki przygotowano wg algorytmu opisanego w 3.2.1. Wyniki pomiarów pokryć powierzchni warstwą białek przedstawiono w tabeli 3.5.



**Rysunek 3.17.** Przyrządy pomiarowe: a) głowica mikroskopu, b) sonda i c) ostrze sondy [143].

**Tabela 3.5.** Topografia i kontrast fazowy funkcjonalizowanych powierzchni złota i SiO<sub>2</sub>

Powierzchnia i pokrycie	Topografia	Kontrast fazowy
Dwutlenek krzemu bez pokrycia		
Dwutlenek krzemu pokryty króliczymi przeciwciałami IgG na warstwie samoorganizującej z APTES		
Dwutlenek krzemu pokryty awidyną zaadsorbowana fizycznie z zawiesiny		

<p>Dwutlenek krzemu pokryty awidyną z biotynylowanymi króliczymi przeciwciałami IgG</p>		
<p>Złoto bez pokrycia</p>		
<p>Złoto pokryte króliczymi przeciwciałami IgG na warstwie samoorganizującej z cysteaminy</p>		
<p>Złoto pokryte awidyną zaadsorbowana fizycznie z zawiesiny</p>		
<p>Złoto pokryte awidyną z biotynylowanymi króliczymi przeciwciałami IgG</p>		

Pomiary AFM wykazały różnice zarówno w kształtach topografii różnych powierzchni jak i w ich kontrastach fazowych.

W wypadku czystego dwutlenku krzemu jego powierzchnia jest gładka, zawierająca nieliczne pory, w kontraście fazowym dominuje kąt ok.  $60^\circ$ . Nałożenie warstwy przeciwciał IgG na warstwie samoorganizującej APTES zmienia obraz topografii na mniej gładki, na którym widoczne są struktury wyspowe podobnie jak na kontraście fazowym. Jego kąt zmienia się i dominuje wartość ok  $35^\circ$ . Obecność zaadsorbowanej fizycznie awidyny na powierzchni  $\text{SiO}_2$  również zmienia topografię powierzchni i kontrast fazowy jak obecność IgG, jednak powstałe wyspy są większe i nieco rzadziej rozlokowane – widać to szczególnie dobrze na kontraście fazowym. Dodanie warstwy biotynylowanych przeciwciał na powierzchnię z awidyny powoduje kolejne zmiany topologii i kontrastu fazowego. Topografia wygładza się, a obraz kontrastu fazowego staje się czymś pośrednim między obrazem warstwy awidyny a czystego  $\text{SiO}_2$ .

Powierzchnia czystego złota jest chropowata, w kontraście fazowym dominuje kąt ok.  $20^\circ$ . Nałożenie warstwy przeciwciał IgG na warstwie samoorganizującej cysteaminy zmienia obraz topografii na bardziej gładki. Wydaje się, że powierzchnia staje się mniej chropowata. Podobnie rzecz ma się z kontrastem fazowym. Jego kąt wyraźnie zmienia się i dominuje wartość ok  $55^\circ$ . Obecność zaadsorbowanej fizycznie awidyny na powierzchni złota również zmienia topografię powierzchni na wydaje się jeszcze bardziej gładką. Kontrast fazowy ukazuje jednak miejsca o prawdopodobnie zwiększonej agregacji awidyny, niemniej cały obraz kontrastu jest zmieniony, tak jakby warstwa białka była obecna – tym bardziej, że dominująca wartość przesunięcia fazowego wynosi ok  $60^\circ$ . Dodanie warstwy biotynylowanych przeciwciał na powierzchnię z awidyny powoduje kolejne zmiany topologii i kontrastu fazowego. Obraz topografia i kontrastu fazowego wygładza się, a jego dominująca wartość wynosi ok.  $65^\circ$ .

### **3.2.3. Monitoring adsorpcji białek za pomocą pomiarów impedancji**

W eksperymencie wykorzystano stanowisko pomiarowe rozlokowane w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej IITD. Składało się ono z multipleksera 8-kanalowy opisanego w rozdziale 2.6.1 oraz urządzenia pomiarowego tj. analizatora impedancji GW InstekLCR-8101G opisanego w 2.3.3. Stanowisko pomiarowe zaprezentowano na rysunku 3.18. System ten pozwolił na wykonywanie quasi-jednoczesnych pomiarów wszystkich czujników znajdujących się w dołkach płytki titracyjnej. System sterowany jest z poziomu komputera PC za pomocą oprogramowania ImpeDancer opisanego w rozdziale 2.5.3.

Tak jak w poprzednim eksperymencie wykorzystano mikroczujniki impedancyjne na podłożu krzemowym opisane w podrozdziale 2.1.1.



**Rysunek 3.18.** Stanowisko pomiarowe do monitorowania adsorpcji białek (lewy). Zbliżenie na multipleksjer przykryty parafilmem dla odizolowania od wpływu otoczenia (prawy).

### 3.2.3.1. Zastosowanie spektroskopii impedancyjnej

Przed rozpoczęciem pomiaru czujniki były wyczyszczone jak opisano w pkt. 1. zawartym w 3.2.1. Elektrycznie zbadano procedury opisane w punktach 4. i 5. wspomnianego podrozdziału.

Eksperyment angażował trzy czujniki i nie licząc przygotowania składał się z pięciu kroków w tym trzech etapów pomiarowych:

- a) pomiaru wszystkich czujników w roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS - *phosphate-buffered saline*) przez ok. 40 min.
- b) przełożenia czujników do innych dołków płytki titracyjnej, jeden czujnik referencyjny pozostał w PBS, dwa kolejne umieszczono w roztworze awidyny o stężeniu 50 ng/ml
- c) pomiar wszystkich czujników przez ok. 1 godzinę
- d) kilkukrotne spłukanie drugiego i trzeciego czujnika wodą dla usunięcia niezaadsorbowanych cząstek awidyny, następnie przełożenia czujników do innych dołków płytki titracyjnej, jeden czujnik referencyjny pozostał w PBS, drugi czujnik z powrotem umieszczono w PBS, trzeci czujnik umieszczono w wodnym roztworze biotynylowanych IgG o stężeniu 10  $\mu\text{g/ml}$
- e) pomiar wszystkich czujników przez ok. 40 minut.

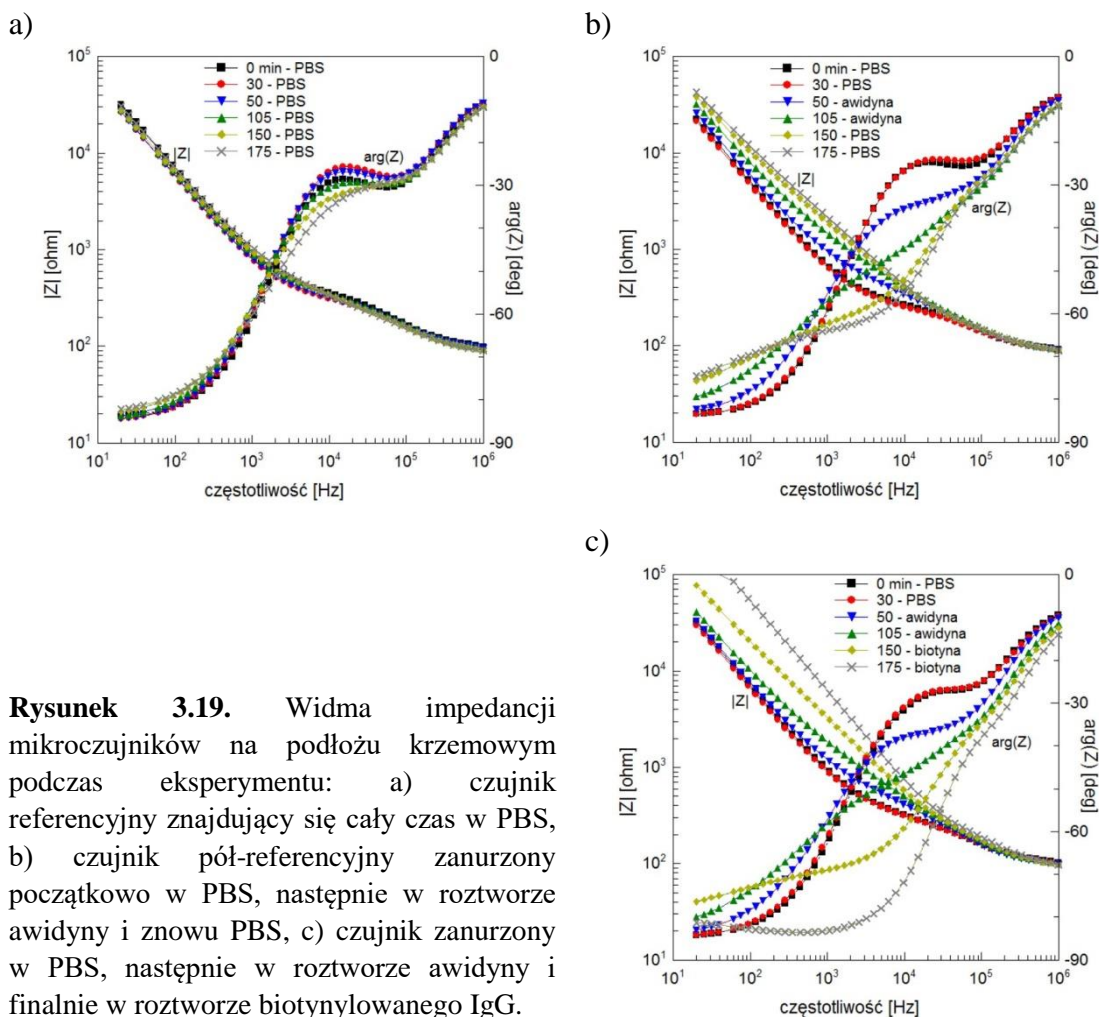
Uzyskane w ramach eksperymentu widma impedancji zaprezentowano na rysunku 3.19. Widoczne jest wyraźne zróżnicowanie między charakterystykami przedstawiającymi sensory poddane działaniom różnych środowisk.

W wypadku czujnika referencyjnego (3.19.a) moduł impedancji zostaje praktycznie niezmienny natomiast argument maleje o ok.  $10^\circ$  a największa jego zmiana występuje ok 10 kHz – wynikać to może z oddziaływania roztworu buforującego na powierzchnię elektrody jak i samego starzenia się PBS-u.

Charakterystyki czujnika pół-referencyjnego (3.19.b) początkowo przyjmują taki sam przebieg jak referencja. Po poddaniu go działaniu awidyny moduł impedancji widocznie zaczyna rosnać w zakresie do ok. 30 kHz a jej argument znacznie zmienia się w zakresie do 100 kHz. Zmiana otoczenia czujnika ponownie na PBS dalej wpływa

na wzrost wartości modułu impedancji i zmiany jej argumentu, aczkolwiek między kolejnymi pomiarami w PBS wspomniane różnice są nieduże.

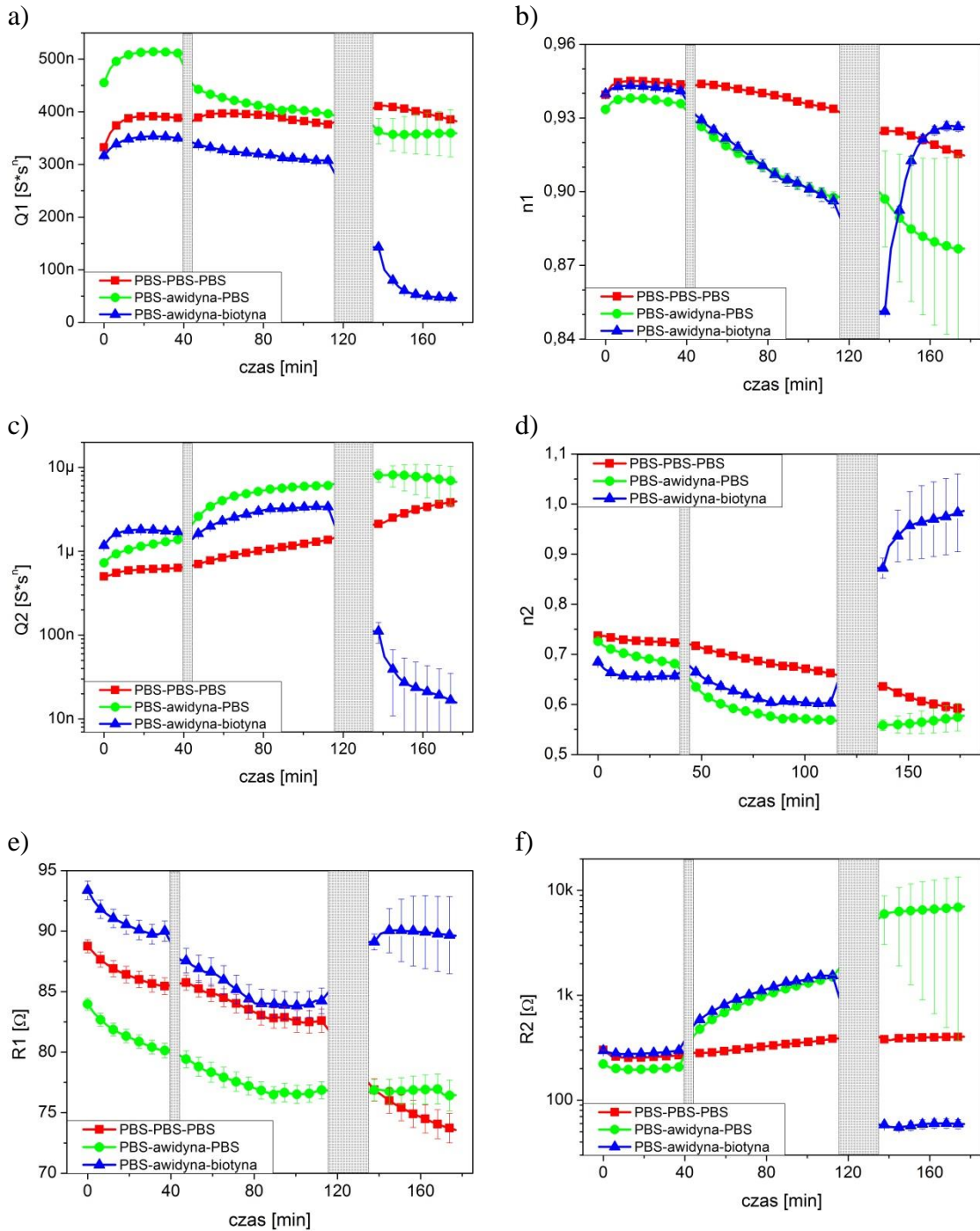
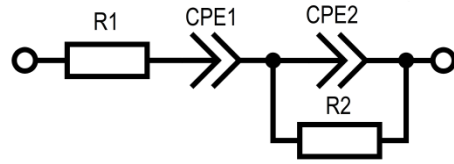
Widma impedancji czujnika poddanego działaniu PBS-u, awidyny i biotynyłowanych przeciwciał (3.19.c) zmieniają się najbardziej. W początkowej fazie pomiaru charakterystyki mają niemalże identyczny przebieg jak pozostałych sensorów i jest to spodziewane. Po umieszczeniu czujnika w roztworze awidyny widma zmieniają się w taki sam sposób jak równoległe mierzonego opisanego wcześniej sensora. Umieszczenie czujnika w roztworze biotynyłowanego IgG powoduje dalsze, bardzo wyraźne zmiany wzrostu wartości modułu impedancji i w szerokim zakresie częstotliwości bardzo wyraźny spadek wartości argumentu – różnice widoczne są nawet między kolejnymi pomiarami w roztworze biotynyłowanych IgG.



**Rysunek 3.19.** Widma impedancji mikroczujników na podłożu krzemowym podczas eksperymentu: a) czujnik referencyjny znajdujący się cały czas w PBS, b) czujnik pół-referencyjny zanurzony początkowo w PBS, następnie w roztworze awidyny i znowu PBS, c) czujnik zanurzony w PBS, następnie w roztworze awidyny i finalnie w roztworze biotynyłowanego IgG.

Dla lepszego zrozumienia zjawisk fizykochemicznych zachodzących na powierzchni czujników stworzono model równoważny mierzonej struktury (rysunek 3.20). Poszczególne elementy modelu odzwierciedlają kanały przewodnictwa i polaryzacji mierzonego układu: R1 – rezystancja medium, CPE1 – pojemność elektrycznej warstwy podwójnej, CPE2 – pojemność elektryczna związana z właściwościami PBS-u i białek, R2 - rezystancja związana z właściwościami PBS-u i białek.

**Rysunek 3.20.** EEC mikroczujnika impedancyjnego na podłożu krzemowym zanurzonego w medium.



**Rysunek 3.21.** Wartości parametrów EEC w czasie trwania eksperymentu: a) Q1, b) n1, c) Q2, d) n2, e) R1, f) R2. Wykresy przedstawiają wszystkie etapy eksperymentu – białe pola odpowiadają momentom zanurzenia czujników w danym roztworze (PBS, awidyna, biotynylowane IgG) natomiast wyszarzenia oznaczają momenty przekładanie czujników do innych roztworów z dodatkowym spłukaniem wodą (szersze wyszarzenie).

Otrzymane w eksperymencie widma impedancji analizowano za pomocą oprogramowania ZView opisanego w podrozdziale 2.5.1 z wykorzystaniem struktury EEC z rysunku 3.20. Wyniki dopasowania wartości elementów przedstawiono na rysunku 3.21. Praktycznie wszystkie elementy EEC wykazywały wrażliwość na zmiany otoczenia czujnika jak i adsorpcję białek. CPE1 wykazuje wrażliwość zarówno na adsorpcję awidyny jak i biotynyłowanego IgG – widoczne jest to szczególnie na parametrze  $n1$  (rysunek 3.21b), którego wartości w początkowej fazie eksperymentu są niemalże identyczne i stałe dla wszystkich czujników, po czym dla czujnika referencyjnego wartość  $n1$  delikatnie maleje a dla czujników w roztworze awidyny maleje z dużym nachyleniem, natomiast w ostatniej fazie eksperymentu dla czujnika w roztworze biotynyłowanym IgG wartość  $n1$  gwałtownie rośnie, w przeciwieństwie do wartości  $n1$  dwóch pozostałych sensorów znajdujących się w PBS. Podobna reakcja obserwowana jest też dla  $Q1$  (rysunek 3.21a), którego wartość z początkowo stałej delikatnie maleje po ekspozycji czujnika na awidynę, a następnie gwałtownie maleje dla czujnika w roztworze biotynyłowanego IgG i delikatnie maleje dla sensora w PBS po awidynie. Co ciekawe wartość  $Q1$  delikatnie rośnie wraz z kolejnymi etapami pomiaru czujnika referencyjnego w PBS. CPE2 podobnie jak CPE1 wykazuje wrażliwość zarówno na adsorpcję awidyny jak i biotynyłowanego IgG z tą różnicą, że nachylenie zmian  $n2$  (rysunek 3.21d), jest mniejsze dla czujników poddanych działaniu awidyny natomiast parametr  $Q2$  (rysunek 3.21c), reaguje delikatnym wzrostem a nie maleniem wartości w wypadku ekspozycji sensora na awidynę. Czułość elementu  $R2$  (rysunek 3.21f) jest analogiczna do  $Q2$ , z tym, że poszczególne różnice zmian wartości są jeszcze bardziej zaakcentowane. Wartość elementu  $R1$  (rysunek 3.21e), ustawicznie delikatnie maleje aż do ostatniego etapu eksperymentu, w którym to następuje jej nagły wzrost dla czujnika w roztworze biotynyłowanego IgG oraz ustabilizowanie się dla sensora w PBS, na którym wcześniej osadzono awidynę.

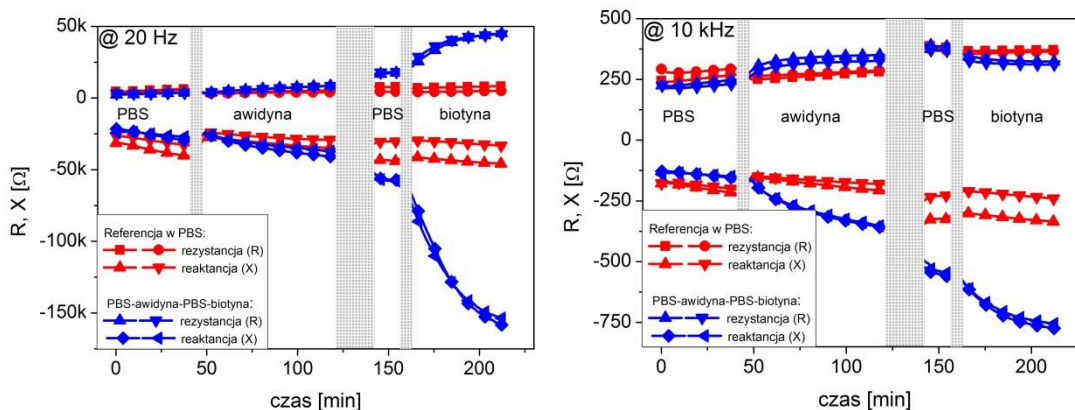
### **3.2.3.2. Pomiar impedancji przy dwóch częstotliwościach**

Bazując na widmach impedancji zaprezentowanych na rysunku 3.19, na których to widoczne były największe zmiany modułu impedancji przy 20 Hz i największe zmiany jej argumentu przy 10 kHz wykonano jeszcze jeden eksperyment, wykorzystujący opisane wcześniej procedury, materiały i metody. Polegał on na szybkim pomiarze impedancji czujników tylko przy dwóch wymienionych częstotliwościach. Wykorzystano łącznie cztery mikroczujniki na podłożu krzemowym: dwa referencyjne (na każdym etapie eksperymentu znajdujące się w PBS) i dwa robocze (umieszczane kolejno w PBS, roztworze awidyny, PBS, roztworze biotynyłowanego IgG).

Wyniki pomiarów zaprezentowano na rysunku 3.22. Przy obydwu częstotliwościach pomiarowych możliwe jest monitorowanie osadzania awidyny i biotynyłowanego IgG na powierzchni sensorów. Przy niższej częstotliwości pomiarowej różnice w wartościach impedancji nie są relatywnie zbyt duże dla osadzania awidyny, natomiast w wypadku monitorowania osadzania biotynyłowanego IgG wyraźnie zmienia się rezystancja jak i reaktancja – wynika z tego, że częstotliwość 20 Hz bardziej



odpowiednia jest do monitorowania tego ostatniego etapu eksperymentu. Przy wyższej częstotliwości pomiarowej osadzanie awidyny zaakcentowane jest zarówno na składowej rezystancyjnej (mniej) jak i reaktancyjnej (bardziej), natomiast przy monitorowaniu osadzania biotynyłowanego IgG jedynie składowa reaktancyjna wykazuje bardzo wyraźne zmiany. Wyższa częstotliwość pomiarowa jest bardziej odpowiednia do monitorowania adsorpcji awidyny.



**Rysunek 3.22.** Impedancja mikroczytników przy 20 Hz (lewy) i 10 kHz (prawy) w trakcie trwania eksperymentu. Adnotacje na wykresach (PBS, awidyna, PBS, biotyna) odnoszą się do etapu eksperymentu, w którym to czujniki robocze były eksponowane na dane otoczenie, a wyszarzenia oznaczają momenty przekładania czujników do innych roztworów z dodatkowym spłukaniem wodą (szersze wyszarzenie).

### 3.2.4. Wyniki i wnioski

Przedstawione wyniki eksperymentów potwierdzają doniesienia na temat możliwości osadzania warstw białkowych na powierzchni złota i dwutlenku krzemu [144] [145] [146]. Zmierzona topografia próbek jak i przesunięcie fazowe sondy pomiarowej wskazują na zmiany w morfologii powierzchni. Mikroskopia sił atomowych dobrze sprawdza się jako metoda pomiarowa warstw białek na zadanych podłożach pozwalając na lepsze zrozumienie interakcji białko-powierzchnia. W przypadku osadzania awidyny konieczne jest jedynie wyczyszczenie powierzchni a białko osiada na niej spontanicznie dzięki adsorpcji fizycznej. Awidyna osadzona na złocie i dwutlenku krzemu zachowuje zdolność wiązania biotyny [147], a co za tym idzie biotynyłowanych przeciwciał, bez dezaktywacji fragmentów wiążących antygen. Wytwarzana jest w ten sposób warstwa receptorowa. Inaczej sprawa ma się z immunoglobulinami IgG, które słabiej ulegają adsorpcji fizycznej, w szczególności do złota [144]. Wydajność wiązania poprawia zastosowanie linkerów w postaci warstw samoorganizujących, które zmieniają właściwości fizykochemiczne powierzchni. Pozwala to na jej chemiczną aktywację i łatwe dołączenie cząstek biologicznych jak w przedstawionym przykładzie APTES + IgG oraz cysteamina + IgG. Podobnie jak w przypadku immobilizowanej kowalencyjnie awidyny związanej z biotynyłowaną IgG wytwarzana jest warstwa receptorowa: powierzchnia-warstwa samoorganizująca-IgG. Wiązania kowalencyjne mają tę przewagę nad adsorpcją fizyczną, że umożliwia osadzanie cząstek biologicznych na selektywnie wybranej powierzchni.

Pomiary elektryczne mikrosensorów umieszczanych w roztworach awidyny i biotynylowanych króliczych przeciwciał IgG potwierdzają wrażliwość sensorów na osadzanie warstw wymienionych białek. Analiza zmierzonych widm impedancji za pomocą modelu EEC wykazała wrażliwość wszystkich elementów modelu na adsorpcję awidyny i wiązanie się do niej biotynylowanych IgG, z czego najbardziej wymowny wydaje się być parametr R2. Szybkie pomiary impedancji czujników przy dwóch częstotliwościach pomiarowych (20 Hz i 10 kHz) dały dowód na możliwość monitorowania osadzania cząstek biologicznych (awidyna – biotynylowane IgG) na powierzchni czujnika przy uproszczonej formie pomiaru, z czego wyższa częstotliwość pomiarowa nadaje się bardziej do monitorowania adsorpcji awidyny a niższa do monitorowania wiązania się biotynylowanego IgG do wcześniej wytworzonej warstwy awidyny.

Wydaje się, że uzupełnienie przedstawionych pomiarów o badanie odpowiedzi elektrycznej czujnika impedancyjnego z warstwą receptorową inną niż układ awidyna-biotyna może zaowocować stworzeniem użytecznego narzędzie do badania wiązania pomiędzy cząsteczkami biologicznymi o wzajemnym powinowactwie jak i detekcji mikroorganizmów.

### **3.3. Pomiary wzrostu i degradacji biofilmu**

Rozdział ten jest najważniejszy w całej rozprawie gdyż stanowi jej kwintesencję. Prezentuje on wyniki zebrane w trakcie badań aplikacyjnych czujników impedancyjnych do pomiaru wzrostu i degradacji biofilmu *Pseudomonas aeruginosa*.

Wszystkie badania prowadzone były w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu we ścisłej współpracy z mikrobiologami z Zakładu.

Pierwszy podrozdział przedstawia sposób prowadzenia oraz interpretacji eksperymentów z wykorzystaniem czujników na podłożu szklanym do monitorowania wzrostu biofilmu *P. aeruginosa*. Chronologicznie były to pierwsze badania, więc nie skupiano się w nich na długości trwania eksperymentu w taki sposób, aby obejmował on fazę degradacji biofilmu. Prowadzenie eksperymentu dodatkowo ułatwiała wysoka jakość czujników na podłożu szklanym, co mocno ograniczało wpływ materiałów konstrukcyjnych na wyniki badań.

Drugi podrozdział prezentuje bardziej szczegółowe w odniesieniu do poprzednich wyniki badań nad zastosowaniem czujników impedancyjnych na podłożu PCB już nie tylko do monitorowania wzrostu ale również i degradacji biofilmu *P. aeruginosa*, a więc trwające odpowiednio długo, aby można było dostrzec wszystkie pięć faz wzrostu i degradacji biofilmu. Czujniki na podłożu PCB były trudniejsze do analizy ze względu na niską jakość technologii ich wykonania co przekładało się na zakłócenia wyników pomiaru przez czynniki wynikające z natury samych czujników. Z drugiej strony stosunkowo bardzo niska cena czujników na podłożu PCB oraz łatwa dostępność ich wykonania pozwoliła na ich masową produkcję i przeprowadzenie wielu powtórzeń eksperymentu, na co nie można było sobie pozwolić przy trudno dostępnych i drogich czujnikach na podłożu szklanym.

Trzeci podrozdział opisuje kontynuację poprzedniego eksperymentu, w którym to czujniki PCB zastąpiono sensorami wykonanymi w technologii LTCC. Posiadały one większą dokładność wykonania oraz lepsze jakościowo materiały dzięki czemu nie były podatne na korozję. Koszt procesu wytwarzania tego rodzaju sensorów jest większy aniżeli PCB choć mieści się w akceptowalnych granicach i mimo wszystko, jest o wiele niższy od kosztu produkcji czujników technikami mikroelektronicznymi.

W czwartym podrozdziale zaprezentowane zostały wyniki pomiaru wzrostu i degradacji biofilmu *P. aeruginosa* za pomocą czujników na podłożu PCB oraz miernika IMP-AD5933 opisanego w rozdziale 2.4.1.

Piąty podrozdział przedstawia wykorzystanie czujników LTCC i IMP-AD5933 do monitorowania biofilmu drożdżaka *Candida albicans*. Proces formowania biofilmu drożdżaka jest o wiele dłuższy od formowania biofilmu *P. aeruginosa*, co przekłada się na ciekawe wyniki porównawcze, jednakże jednoznaczność otrzymanych wyników była mniejsza, aniżeli w poprzednich wypadkach.

### **3.3.1. Zastosowanie mikrocujników impedancyjnych na podłożu szklanym do monitorowania wzrostu biofilmu *P. aeruginosa***

Ze względu na nieodpowiednie właściwości elektryczne (duże sprzężenie pojemnościowe przez podłoże) i trudności w zastosowaniu elektrody ochronnej po wstępnych testach *in situ* zdecydowano się nie stosować mikrocujników na podłożu krzemowym. W ten sposób pierwsze poważne eksperymenty związane z monitorowaniem biofilmu wykonano z wykorzystaniem mikrocujników na podłożu szklanym [37]. Wysoka jakość materiałów i bardzo duża dokładność wykonania sensorów zapewniała minimalizację wpływu czujnika na eksperyment, co było niezwykle ważne w ich pierwszej serii, która niejako stanowiła dowód koncepcji – *proof of concept*.

#### **3.3.1.1. Przygotowanie eksperymentu**

W eksperymencie wykorzystano mikrocujniki impedancyjne na podłożu szklanym opisane w rozdziale 2.1.1 oraz multiplexer 8-kanałowy opisany w rozdziale 2.6.1. Urządzenie pomiarowe stanowił analizator impedancji GW InstekLCR-8101G zaprezentowany w 2.3.2. Stanowisko pomiarowe zaprezentowano na rysunku 3.23. Stanowisko takie pozwala na wykonywanie quasi-jednoczesnych pomiarów wszystkich czujników znajdujących się w dołkach płytki titracyjnej. System sterowany jest z poziomu komputera PC za pomocą oprogramowania ImpeDancer opisanego w rozdziale 2.5.3.

W eksperymencie wykorzystano szczep bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. Zdolność wspomnianego szczepu do tworzenia biofilmu na powierzchniach abiotycznych została już wcześniej potwierdzona przez zespół z Zakładu Mikrobiologii [148].

Jednodobowa hodowla badanego szczepu została rozcieńczona do 1 McFarlanda za pomocą densytometru (Biomerieux, Poland) i następnie do koncentracji  $10^3$  cfu/ml w pożywce TSB (Tryptic Soya Broth, BioMerck, Poland) wykorzystując metodę rozcieńczania. Po dwa mililitry otrzymanego roztworu trafiło do dołków płytki titracyjnej. Następnie czujniki zostały zamontowane aseptycznie w uchwytach

multipleksera i umieszczone w dołkach płytki titracyjnej. Dla przygotowania powierzchni elektrod czujniki przed zamontowaniem zostały spłukane wodą destylowaną, acetonem i izopropanolem.

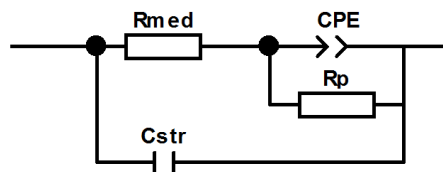


**Rysunek 3.23.** Stanowisko pomiarowe. Widoczny jest analizator impedancji, komputer z oprogramowaniem ImpeDancer oraz cieplarka.

Widma impedancji każdego z czujników były mierzone co 4 minuty przez jedną dobę. Eksperyment prowadzony był w cieplarni w temperaturze 37 °C przy 100% wilgotności. Czysta pożywka TSB została wykorzystana jako referencja.

Uzyskane widma impedancji zostały zanalizowane za pomocą metody EEC. Model równoważny czujnika w pożywce TSB zaprezentowano na rysunku 3.24. Pozwala on na modelowanie procesów przewodnictwa i polaryzacji zachodzących w obszarze czujnika (medium i biofilm). Poszczególne elementy modelu reprezentują następujące właściwości mierzonego obiektu:  $R_{med}$  – rezystancja medium,  $C_{str}$  – pojemność pasożytnicza struktury czujnika, CPE – element stałofazowy reprezentujący pojemność interfejsu elektroda-otoczenie,  $R_p$  – rezystancja równoległa do CPE. Dwa z elementów EEC opisuje zjawiska zachodzące na elektrodach czujnika - są nimi CPE i  $R_p$ . Admitancja CPE dana jest wzorem  $Y_{CPE} = Q(j\omega)^n$ , gdzie  $Q$  oraz  $n$  są parametrami,  $\omega$  pulsacją,  $j$  jednostką urojoną [110]. Wartości wspomnianych parametrów zostały wyliczone dla każdego punktu pomiarowego w czasie za pomocą oprogramowania ZView (Scribner). Wyliczone wartości  $R_p$ ,  $Q$  oraz  $n$  zostały przeanalizowane pod kątem monitorowania wzrostu biofilmu *P. aeruginosa*.

**Rysunek 3.24.** Elektryczny model równoważny mikroczujnika impedancyjnego w czystym i zawierającym bakterie medium.



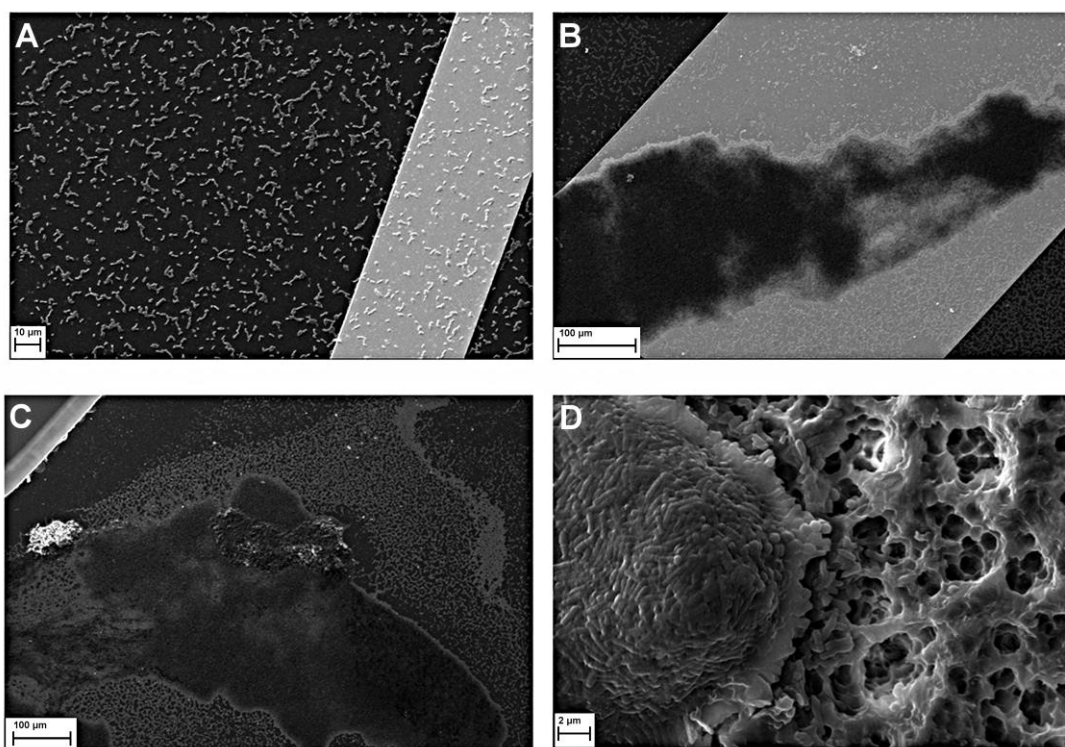
Poza pomiarami elektrycznymi przeprowadzono równoległy eksperyment w którym wykonano posiewy ilościowe celem skorelowania wyników. Szczep *P. aeruginosa* jak i czujniki przygotowano w ten sam sposób jak do pomiarów elektrycznych. Czujniki były inkubowane w pożywce zawierającej bakterie odpowiednio przez 2, 6, 12, i 24 godziny. Następnie sensory zostały aseptycznie usunięte z uchwytów, spłukane solanką i przeniesione do pojemnika z łagodnym detergentem – 0,5% saponiną (Sigma Aldrich). Czujniki odwirowano przez 1 minutę celem usunięcia biofilmu z ich powierzchni, po czym otrzymaną zawiesinę rozcieńczono  $10 - 10^7$  razy. 100  $\mu\text{l}$  z każdego rozcieńczenia zostało posiane na agarze MacConkeya (Merck) i inkubowane w temperaturze 37 °C przez jedną dobę. Po wszystkim policzono kolonie bakteryjne i określono liczbę komórek tworzących biofilm.

Dodatkowym sposobem weryfikacji wzrostu biofilmu na powierzchni czujnika była mikroskopia elektronowa. Szczep bakterii został wyhodowany na powierzchni czujników jak opisano wyżej. Następnie sensory zostały aseptycznie wyjęte z uchwytów, spłukane trzykrotnie solanką i suszone w temperaturze 37 °C przez 4 godziny. Wysuszone próbki zostały pokryte warstwą Au/Pd w proporcji 6:4 poprzez napylenie za pomocą urządzenia QUORUM (Quorum International Forth Worth, USA) i zbadane za pomocą mikroskopu SEM Zeiss EVO MA25.

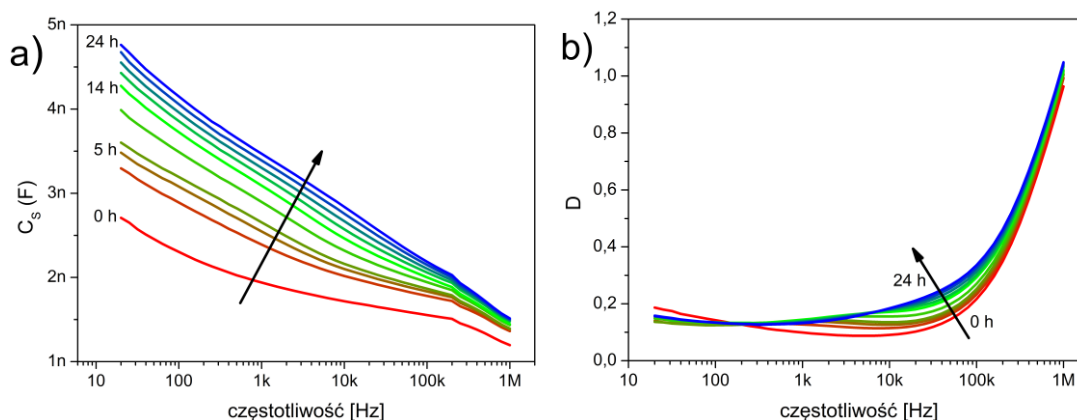
### **3.3.1.2. Rezultaty**

W zdjęciach z SEM po dwóch godzinach inkubacji stają się widoczne skupiska komórek bakteryjnych na powierzchni czujnika (rysunek 3.25a). Posiewy ilościowe wykazały obecność ok.  $10^4$  cfu bakterii na powierzchni czujnika. W ciągu następnych czterech godzin liczba bakterii wzrosła do  $10^8$  cfu. Okres ten może być zidentyfikowany jako faza intensywnego wzrostu biofilmu, w efekcie powierzchnia czujnika została częściowo pokryta gęstą, wielowarstwową powłoką biofilmu (rysunek 3.25b). Chociaż wolniej niż poprzednio, po 12 godzinach od początku eksperymentu liczba komórek nadal wzrastała – na powierzchni czujnika powstał dojrzały biofilm (rysunek 3.25c). Po 24 godzinach cała powierzchnia czujnika została pokryta biofilmem w różnym stadium rozwoju zależnym od miejsca (rysunek 3.25d).

Zmiany właściwości fizykochemicznych pożywki z biofilmem wykrywane przez czujniki zaprezentowano na rysunku 3.26 jako zbiór widm impedancji w postaci pojemności szeregowej i współczynnika rozproszenia. Zgromadzone dane pomiarowe przeanalizowano za pomocą modelowania równoważnego modelu elektrycznego, co pozwoliło na uzyskanie ilościowych informacji na temat mierzonego obiektu.



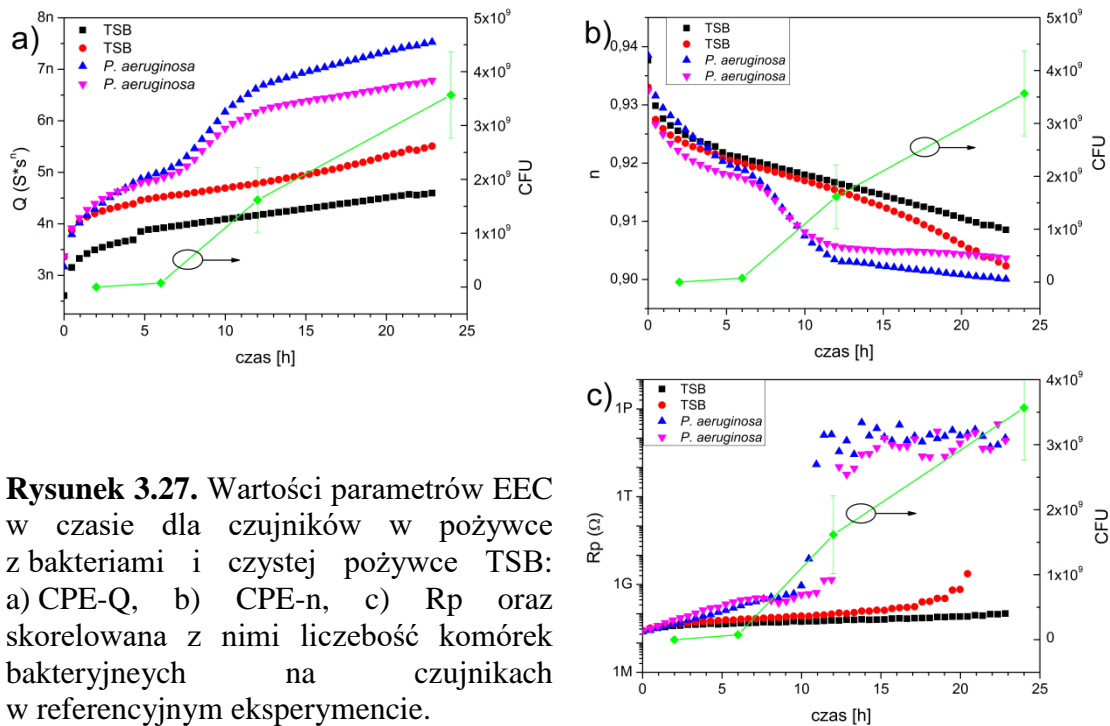
**Rysunek 3.25.** Komórki *P. aeruginosa* na powierzchni czujnika impedancyjnego po: a) 2, b) 6, c) 12, d) 24 godzinach inkubacji.



**Rysunek 3.26.** Typowe widma pojemności szeregowej  $C_s$  i współczynnika rozproszenia  $D$  w czasie dla czujnika w pożywce z bakteriami.

Jak można zauważyć na rysunku 3.27 wszystkie trzy analizowane parametry:  $R_p$ ,  $Q$  oraz  $n$  niosły użyteczne informacje dla analizy wzrostu biofilmu *P. aeruginosa*. Parametr  $Q$  okazał się pozytywnie skorelowany z narastającą liczebnością komórek bakteryjnych na powierzchni czujnika, podczas gdy wartość  $n$  maleje wraz ze wzrostem biofilmu (rysunek 3.27a oraz b). Od szóstej godziny eksperymentu zaczyna być widoczna różnica w wartości parametru  $Q$  dla czujników w dołkach zawierających bakterie a  $Q$  referencji, dalszy wzrost różnicy notowany jest przez kolejne pięć godzin. Po jedenastej godzinie eksperymentu tempo narostu parametru  $Q$  dla eksperymentu i kontroli przybiera podobną wartość. Odmiennie wyniki otrzymano dla parametru  $R_p$ . Jego wartość delikatnie wzrastała w czasie aż do ok. jedenastej godziny eksperymentu,

po czym nagle wzrosła osiągając wartość około  $10^{14} \Omega$ , co w praktyce oznacza niemierzalnie dużą wartość rezystancji (rysunek 3.27c).



**Rysunek 3.27.** Wartości parametrów EEC w czasie dla czujników w pożywce z bakteriami i czystej pożywce TSB: a) CPE-Q, b) CPE-n, c) Rp oraz skorelowana z nimi liczebność komórek bakteryjnych na czujnikach w referencyjnym eksperymencie.

### 3.3.1.3. Podsumowanie

W przedstawionych badaniach *in vitro* biofilm *P. aeruginosa* przeszedł przez wszystkie specyficzne fazy swego rozwoju: adhezję, wytworzenie macierzy i dojrzewanie (rysunek 3.25). Wykazano, że zastosowane czujniki impedancyjne umożliwiają rozróżnienie medium czystego i zawierającego bakterie. Możliwość ta daje pewien potencjał aplikacyjny, szczególnie biorąc po uwagę jeden z analizowanych parametrów modelu równoważnego tj. Q – zaczyna ono rosnać po dwóch godzinach od początku eksperymentu wraz ze wzrastającą liczbą komórek bakteryjnych. Ponadto wydaje się, że wartości Q pozytywnie korelują z poszczególnymi fazami wzrostu biofilmu na powierzchni czujnika (rysunek 3.27a). Z drugiej strony w ciągu pierwszych sześciu godzin eksperymentu wartości parametru n modelu równoważnego nie różniły się specjalnie między kontrolą a medium zawierającym bakterie, jak miało to miejsce w wypadku parametru Q. Jest to pewnym ograniczeniem w wykorzystaniu parametru n do detekcji biofilmu. Jeśli dalsze badania były by prowadzone powinny one skupić się na wyjaśnieniu znaczenia parametru n i zjawisk przez niego reprezentowanych zachodzących między 6 a 11 godziną pomiaru. Ciekawe wyniki uzyskano dla trzeciego z analizowanych parametrów tj. Rp. Po 11 godzinach inkubacji wartość wspomnianego parametru wzrosła znacząco i gwałtownie. Wg przyjętego modelu elektrycznego zjawisko to wiąże się z nagłą utratą przewodnictwa stałoprądowego obiektu. Może ono wynikać z pokrycia całej powierzchni elektrod biofilmem bakteryjnym. Z drugiej strony omawiany nagły wzrost wartości Rp występuje w dalszym etapie eksperymentu. Za

to już we wcześniejszej fazie badania na powierzchni czujnika zauważyć można było rozległe klastry biofilmu nie tylko za pomocą mikroskopii elektronowej ale również gołym okiem. Wynika z tego, że parametr  $R_p$  może być przydatny głównie w systemach, gdzie detekcja optyczna nie jest możliwa.

Podsumowując ten podrozdział można stwierdzić, że zastosowane czujniki impedancyjne na podłożu szklanym są w stanie wykrywać tworzenie się biofilmu *P. aeruginosa*, a zastosowany model elektryczny jest przydatny do analizowania odpowiedzi czujnika. Wartość parametru modelu  $Q$  zmienia się wraz z fazą wzrostu biofilmu, a co za tym idzie przydatność tego parametru do wykrywania biofilmu jest obiecująca. Stosowalność parametrów  $R_p$  i  $n$  do wykrywania obecności biofilmu wydaje się ograniczona. Odkrycia te zostały potwierdzone mikroskopią elektronową i technikami mikrobiologicznymi.

### **3.3.2. Zastosowanie czujników impedancyjnych wykonanych w technologii PCB do monitorowania wzrostu biofilmu *P. aeruginosa***

Przedstawione w tym podrozdziale badania stanowią rozwinięcie eksperymentów zaprezentowanych w poprzednim podrozdziale. Doświadczenie nabyte w trakcie poprzednich eksperymentów pozwoliło na rozbudowanie metod badawczych i prowadzenie badań na bardziej wymagających typach czujników. Zmienione zostało stanowisko pomiarowe jak i zakres mierzonych częstotliwości oraz rodzaj wykorzystywanego multipleksera [133].

Przeprowadzono wiele serii badań nt. zastosowania czujników wykonanych w technologii PCB do pomiaru wzrostu i degradacji biofilmu *P. aeruginosa*. Charakteryzowały się one dużą powtarzalnością, stąd niniejszy podrozdział przedstawia wyniki najbardziej reprezentatywne, przypisane do jednej serii pomiarowej.

#### **3.3.2.1. Przygotowanie eksperymentu**

W eksperymencie wykorzystano czujniki impedancyjne wykonane w technologii PCB opisane w rozdziale 2.1.2 oraz multiplekser 24-kanalowy opisany w rozdziale 2.6.2. Urządzenie pomiarowe stanowił analizator impedancji IMP-STM32 zaprezentowany w 2.4. Stanowisko pomiarowe zaprezentowano na rysunku 3.28. Stanowisko takie pozwala na wykonywanie quasi-jednoczesnych pomiarów wszystkich czujników znajdujących się w dołkach płytki titracyjnej. System sterowany jest z poziomu komputera PC za pomocą oprogramowania ImpeDancer opisanego w rozdziale 2.5.3.

Widma impedancji mierzone były w zakresie częstotliwości od 0,1 Hz do 100 kHz sygnałem pobudzającym o amplitudzie 25 mV<sub>RMS</sub>.

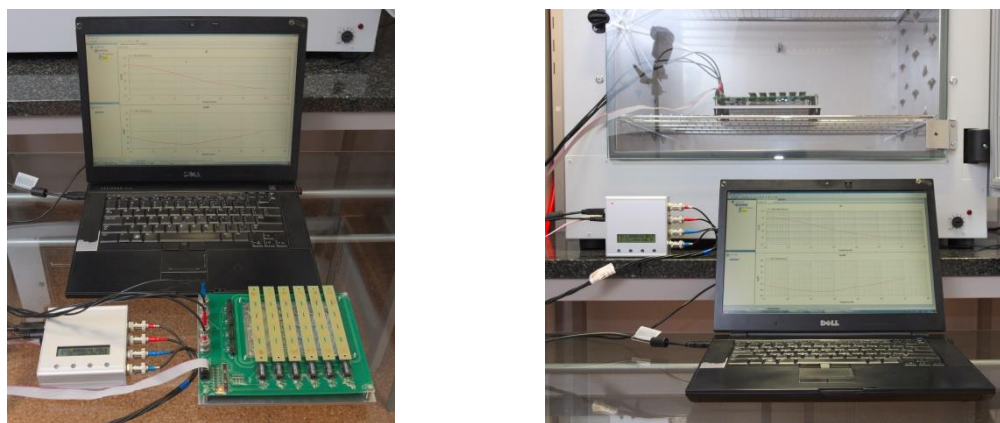
Przed eksperymentem czujniki zostały wyczyszczone poprzez spłukanie wodą destylowaną i acetonem celem usunięcia pozostałości procesu technologicznego oraz wysterylizowane spłukaniem izopropanolem, po czym aseptycznie umieszczone w uchwytach multipleksera i naświetlone promieniami UVC przez 20 minut celem dalszej sterylizacji.



Tak jak poprzednio w badaniu wykorzystano referencyjny szczep *Pseudomonas aeruginosa* ATCC14454. Jednodobowa hodowla badanego szczepu została rozcieńczona do koncentracji 1 McFarlanda za pomocą densytometru (Biomerieux, Polska) i kolejno rozcieńczana do koncentracji  $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^2$  cfu/ml w pożywce TSB (Tryptic Soy Broth - TSB, Becton Dickinson).

W eksperymencie mierzone były pożywki TSB zawierające bakterie w odpowiednich stężeniach ( $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^2$  cfu/ml) oraz czyste TSB jako referencja. Cztery rzędky płytki titracyjnej, każdy składający się z 6 dołeków, zostały napełnione 2 ml medium na dołek, po czym umieszczono płytkę w multiplekserze. Otrzymany układ inkubowano przez 168 godzin w cieplarni przy  $37\text{ }^\circ\text{C}$  i 95 % wilgotności względnej. Pojedynczy pomiar impedancji trwał ok. 60 s co pozwoliło na pomiar każdego sensora w przybliżeniu co 24 minuty.

Dodatkowo oprócz pomiarów impedancji wykonano badanie polegające na wybarwieniu fioletem krystalicznym czujników inkubowanych w medium z biofilmem odpowiednią ilość czasu. Konieczne było to dla optycznego zobrazowania przylegania biofilmu do powierzchni czujnika. Eksperyment przygotowany był bardzo podobnie jak w wypadku pomiarów impedancji z tą różnicą, że wykorzystano jedynie roztwór *P. aeruginosa* w TSB o koncentracji  $10^6$  cfu/ml. Sensory były inkubowane w medium (każdy oddzielnie) poprzez 1, 4, 16 oraz 24 godziny w temperaturze  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Po inkubacji czujniki zostały aseptycznie wyjęte z multipleksera, spłukane wodą destylowaną i pozostawione do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Następnie sensory zanurzono w 1 ml wodnego roztworu 0,1 % fioletu krystalicznego na 5 minut, spłukano wodą i pozostawiono do wyschnięcia.

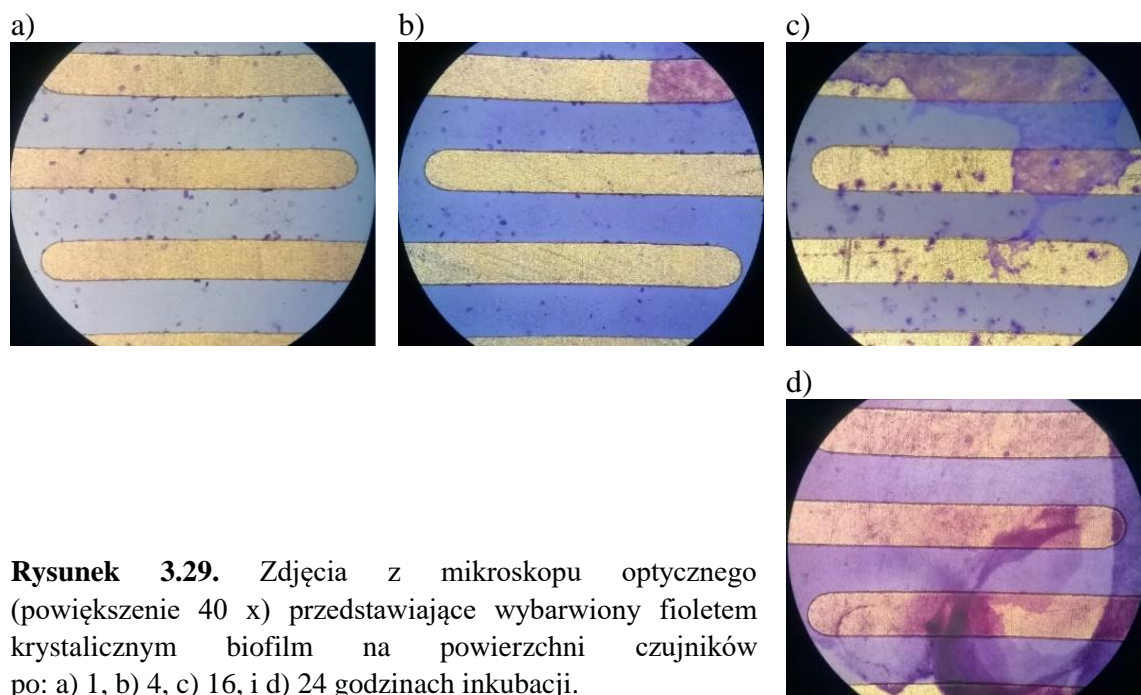


**Rysunek 3.28.** Stanowisko pomiarowe: a) składowe stanowiska: komputer PC, analizator impedancji (po lewej), multiplekser z czujnikami i płytką titracyjną (po prawej), b) multiplekser umieszczony w cieplarni.

### 3.3.2.2. **Rezultaty**

Efekty wybarwienia czujników z biofilmem fioletem krystalicznym przedstawiono na rysunku 3.29. Proces adhezji bakterii i początek wzrostu struktury biofilmowej widoczny jest po 4 godzinach inkubacji. Po 16 godzinach około jednej czwartej powierzchni czujnika pokryte jest warstwą biofilmu, zaś po jednym dniu inkubacji cała

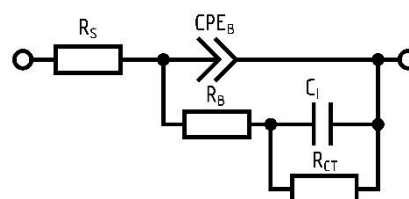
powierzchnia czujnika pokryta jest dojrzałym, trójwymiarowym biofilmem bakteryjnym.



**Rysunek 3.29.** Zdjęcia z mikroskopu optycznego (powiększenie 40 x) przedstawiające wybarwiony fioletem krystalicznym biofilm na powierzchni czujników po: a) 1, b) 4, c) 16, i d) 24 godzinach inkubacji.

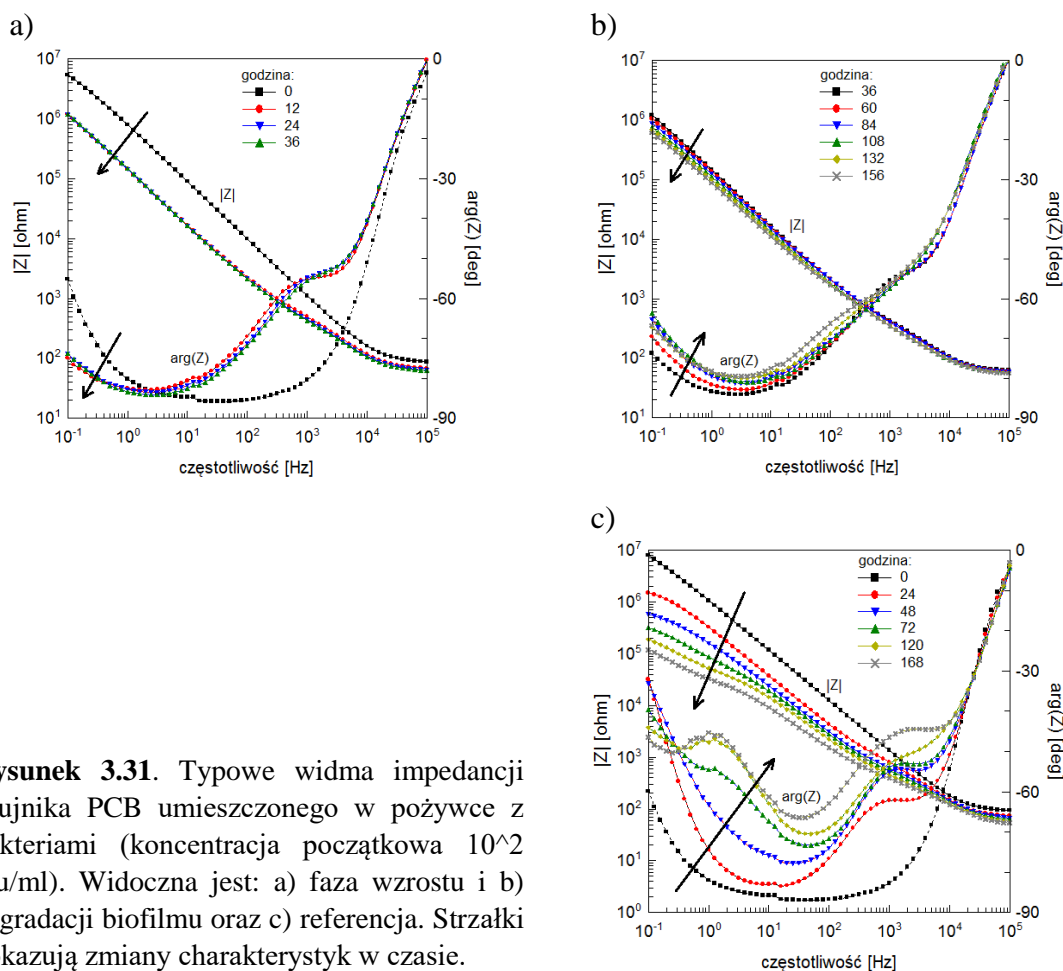
Przykładowe widma impedancji czujnika zanurzonego w pożywce z bakteriami o koncentracji początkowej  $10^2$  cfu/ml w ciągu pierwszych 36 (wzrost biofilmu) i ostatnich 132 (degradacja biofilmu) godzin inkubacji zaprezentowano na rysunku 3.31. Zaobserwować można znaczące zmiany właściwości elektrycznych zarówno czujników w hodowli bakteryjnej jak i czystej pożywce (referencji).

Bazując na literaturze [23] [31] [35] [113] [132], zmierzonych widmach impedancji oraz wiedzy nt. fizykochemicznych właściwości biofilmu [15] [22] [30] [36] zbudowano elektryczny model równoważny EEC i zaprezentowano go na rysunku 3.30.



**Rysunek 3.30.** EEC czujnika wykonanego w technologii PCB zanurzonego w pożywce z bakteriami.

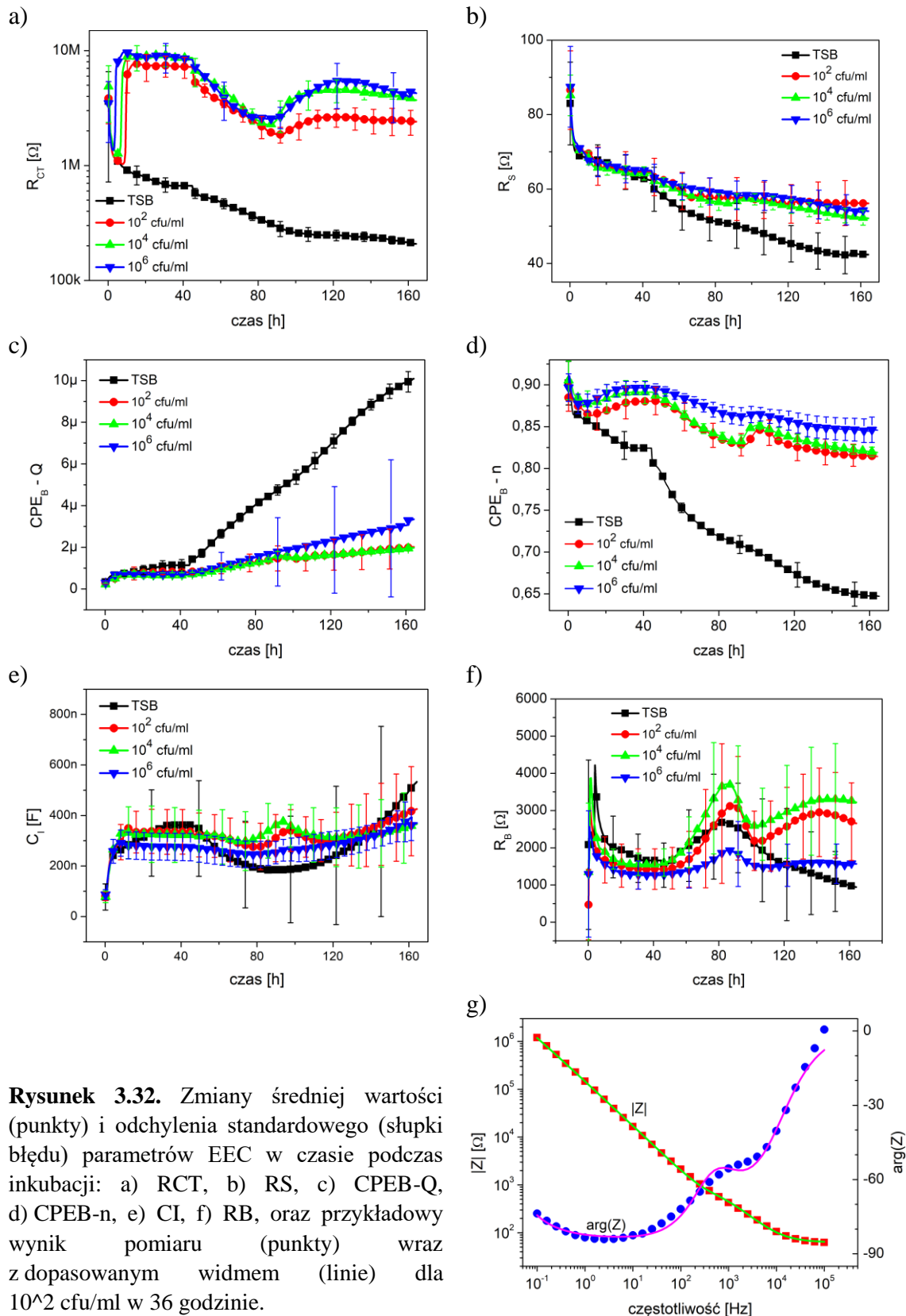
Każdy element modelu reprezentuje inne zjawisko przewodnictwa prądu lub polaryzacji elektrycznej tj.  $R_S$  – rezystancja medium,  $CPE_B$  – element stałofazowy modelujący niejednorodną powierzchnię elektrod oraz jej pokrycie biofilmem,  $R_B$  – rezystancja powierzchni elektrod oraz porów biofilmu,  $C_1$  – pojemność elektrycznej warstwy podwójnej,  $R_{CT}$  – rezystancja transferu ładunku.



**Rysunek 3.31.** Typowe widma impedancji czujnika PCB umieszczonego w pożywce z bakteriami (koncentracja początkowa  $10^2$  cfu/ml). Widoczna jest: a) faza wzrostu i b) degradacji biofilmu oraz c) referencja. Strzałki pokazują zmiany charakterystyk w czasie.

Otrzymane w eksperymencie widma impedancji zostały zanalizowane za pomocą oprogramowania ZFitter Turbo opisanego w podrozdziale 2.5.2 z wykorzystaniem struktury EEC z rysunku 3.30. Jako, że płytka titracyjną zawierała 4 rzędkie po 6 dołków, każdy eksperyment zawierał się w 6 powtórzeniach (tj. 6 serii pomiarowych dla koncentracji początkowej  $10^6$  cfu/ml, 6 serii dla koncentracji początkowej  $10^4$  cfu/ml itd.). Zmiany wartości elementów EEC w czasie trwania 168-godzinnej inkubacji czujników w badanych mediach zaprezentowano na rysunkach 3.32a - 3.32f natomiast przykładowy wynik dopasowania krzywej do widma przedstawiono na rysunku 3.32g.

Najbardziej przykuwającym uwagę parametrem jest element  $R_{CT}$ . Da się zaobserwować skokowy wzrost jego wartości odpowiednio w trzeciej, piątej i siódmej godzinie eksperymentu dla koncentracji początkowej  $10^6$ ,  $10^4$  oraz  $10^2$  cfu/ml. Wartość  $R_{CT}$  dla czujnika w bakteriach w pierwszych dwóch dobach pomiaru osiąga fazę quasi-plateau podczas gdy dla referencji delikatnie maleje. Parametr ten jest czułym wskaźnikiem momentu, w którym to cała powierzchnia elektrod czujnika pokryta jest biofilmem bakteryjnym, ponieważ lipopeptydy wchodzące w skład bakterii gram ujemnych [114] (a takimi jest *P. aeruginosa*) jak i sam biofilm może być uznawany za elektryczny izolator [113].



**Rysunek 3.32.** Zmiany średniej wartości (punkty) i odchylenia standardowego (słupki błęd) parametrów EEC w czasie podczas inkubacji: a)  $R_{CT}$ , b)  $R_S$ , c)  $CPE_B - Q$ , d)  $CPE_B - n$ , e)  $CI$ , f)  $R_B$ , oraz przykładowy wynik pomiaru (punkty) wraz z dopasowanym widmem (linie) dla  $10^2$  cfu/ml w 36 godzinie.

Wartość rezystancji medium  $R_S$  niemalże ciągle maleje w miarę upływu czasu dla czujników w medium z bakteriami podczas gdy dla referencji osiąga fazę plateau między czwartą a szesnastą godziną eksperymentu – po czym znów maleje, najprawdopodobniej na skutek zwiększonej koncentracji jonów wynikającej z korozji

elektrod. Do tego zachowanie  $CPE_B$  wydaje się być bardzo interesujące. Wartości parametrów  $CPE_B$  tj.  $Q$  oraz  $n$  fluktuują w pierwszej fazie eksperymentu dla każdej serii danych. Sytuacja staje się ustabilizowana w ósmej godzinie pomiaru, kiedy to  $CPE_B-Q$  zaczyna powoli maleć dla czujnika w pożywce z bakteriami, po czym znowu zaczyna rosnąć po trzydziestej drugiej godzinie pomiaru podczas gdy dla referencji wartość ta nieustannie wzrasta. Podobna sytuacja w odwrotny sposób występuje dla wartości  $CPE_B-n$ . Wydaje się, że parametry  $C_I$  oraz  $R_B$  nie niosą żadnych istotnych informacji, jako że zmiany ich wartości jak i odchylenia standardowe zarówno dla eksperymentu jak i referencji są stosunkowo duże.

### 3.3.2.3. Podsumowanie

Badania zaprezentowane w tym podrozdziale skupione były na zastosowaniu czujników impedancyjnych wykonanych w technologii PCB do detekcji i monitorowania biofilmu *P. aeruginosa*. W trakcie eksperymentu mierzono widma impedancji czujników zanurzonych w medium stanowiącym pożywkę TSB z bakteriami i bez, pomiar każdego czujnika odbywał się co ok. pół godziny. Otrzymane dane zanalizowano za pomocą modelowania EEC.

Najciekawszym elementem EEC okazał się  $R_{CT}$ , który reprezentował rezystancję transferu ładunku. Jak można zobaczyć na rysunku 3.32a jego wartość rośnie gwałtownie po kilku godzinach inkubacji czujnika w pożywce z bakteriami, podczas gdy  $R_{CT}$  referencji (czysta pożywka) powoli maleje. Moment nagłego wzrostu wartości  $R_{CT}$  związany jest ściśle z pokryciem całej dostępnej powierzchni elektrod biofilmem, co spowodowało zmniejszenie transferu ładunku. Wynik ten zbieżny jest z wynikiem wybarwiania powierzchni czujnika fioletem krystalicznym (rysunek 3.29). Ze względu na niedoskonałość i ograniczenia ogólnodostępnej technologii PCB pozostałe elementy EEC zakłócone były poprzez dodatkowe zjawiska zachodzące podczas eksperymentu. Najbardziej dającym się odczuć efektem ubocznym była korozja elektrod tj. warstw niklu i miedzi umieszczonych pod nieszczelną powłoką galwanicznie nanoszonego złota. Jakość warstwy złota na PCB nie jest tak dobra jak uzyskiwana poprzez napylenie [149]. Efekty korozji elektrod ocenione zostały za pomocą mikroskopii elektronowej i opisane w rozdziale 3.1.3. Pomimo wymienionych wad badania zaprezentowane w tym podrozdziale pokazują, że czujniki impedancyjne wykonane przy pomocy prostej i niskokosztowej technologii PCB wciąż stanowią użyteczne narzędzie do bezmarkerowej detekcji formującego się biofilmu *in situ*.

Interesujące okazały się również zmiany wartości pojemnościowych elementów EEC:  $CPE_B-Q$ ,  $CPE_B-n$  oraz  $C_I$  (rysunki 3.32c, d oraz e). Wspomniane wartości stają się quasi-ustabilizowane po około ośmiu godzinach dla czujników w pożywce z bakteriami podczas gdy dla referencji zmieniają się przez cały czas trwania eksperymentu.  $CPE_B$  oraz  $C_I$  zależą najmocniej nie od stanu biofilmu lecz od stanu korozji elektrod – w tym wypadku biofilm stanowi warstwę zapobiegającą korozji.

Otrzymane wyniki są zbieżne z opisanymi w podrozdziale 3.3.1. Wspólną cechą obydwu eksperymentów był charakterystyczny skok wartości rezystancji równoległej EEC.

### **3.3.3. Zastosowanie czujników impedancyjnych wykonanych w technologii LTCC do monitorowania wzrostu biofilmu *P. aeruginosa***

Zaprezentowane badania są kolejnym rozwinięciem eksperymentów z poprzednich podrozdziałów. Tym razem głównym zadaniem było zweryfikowanie przydatności czujników wykonanych technologią niskotemperaturowej ceramiki współwypalanej LTCC [133]. Jest to rozwiązanie pośrednie pomiędzy technologią mikroelektroniczną a technologią PCB. Technologia LTCC obejmująca laserowe wycinanie ceramiki, sitodruk do nanoszenia wzorów na podłoże i wypalanie otrzymanej struktury oferuje dokładność wykonania podobną do PCB, jednakże ze względu na zastosowanie innych materiałów otrzymane struktury są bardziej stabilne fizykochemicznie i w wypadku zastosowania tylko ceramiki oraz złotej pasty niepodatne na korozję.

Podobnie jak w 3.3.2 przeprowadzono wiele serii badań nt. zastosowania czujników wykonanych w technologii LTCC do pomiaru wzrostu i degradacji biofilmu *P. aeruginosa*. Wykazywały one dużą powtarzalnością, więc niniejszy podrozdział przedstawia wyniki najbardziej reprezentatywne, przypisane do jednej serii pomiarowej.

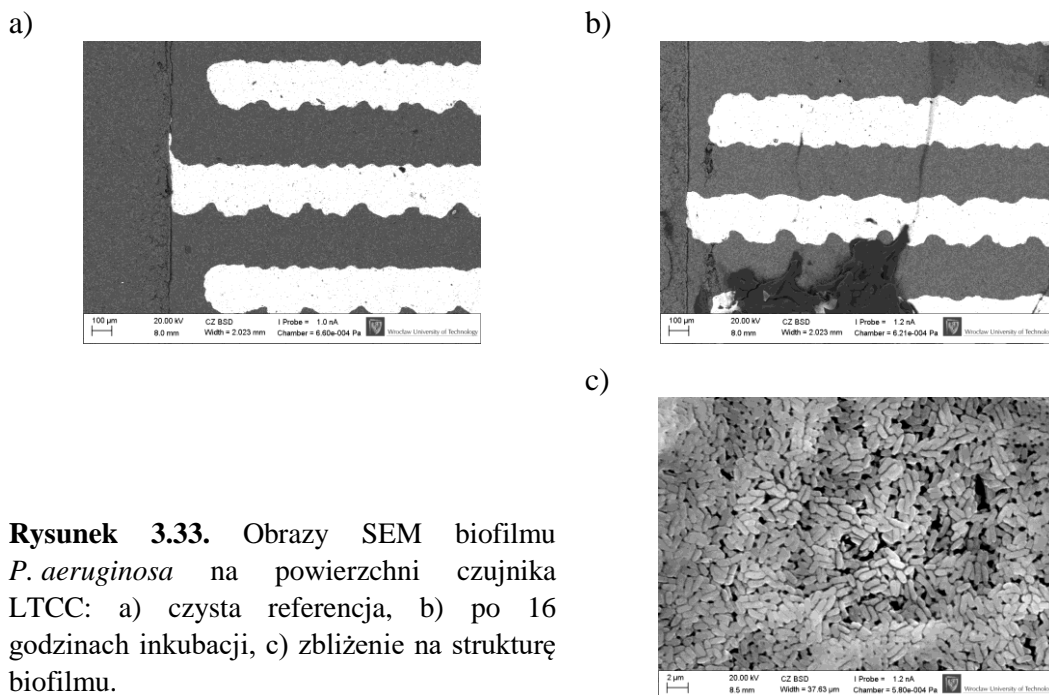
#### **3.3.3.1. Przygotowanie eksperymentu**

W eksperymencie wykorzystano czujniki impedancyjne wykonane w technologii LTCC opisane w rozdziale 2.1.3. Sposób przygotowania czujników, stanowisko pomiarowe (rysunek 3.28) jak i sam przebieg eksperymentu był taki sam jak opisany w 3.3.2.1. Wykorzystano ten sam analizator impedancji (IMP-STM32), zakres częstotliwości (0,1 Hz – 100 kHz), multiplexer 24-kanałowy, szczep bakterii (ATCC14454), cztery stężenia początkowe ( $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^2$  cfu/ml) oraz czyste TSB) po 6 dołków w rzędzie płytki titracyjnej, pomiar trwający 168 godzin oraz wszystkie procedury.

Dla potwierdzenia możliwości osadzania się biofilmu na powierzchni sensorów zobrazowano powierzchnię czujnika inkubowanego w pożywce z bakteriami za pomocą mikroskopii elektronowej SEM. Eksperyment przygotowany był bardzo podobnie jak w wypadku pomiarów impedancji z tą różnicą, że wykorzystano jedynie roztwór *P. aeruginosa* w TSB o koncentracji  $10^6$  cfu/ml. Czujnik był inkubowany w medium przez 16 godzin w temperaturze 37 °C. Po inkubacji czujnik zostały aseptycznie wyjęte z multiplexera, spłukane wodą destylowaną i pozostawione do wyschnięcia w temperaturze pokojowej a następnie zobrazowano SEM.

#### **3.3.3.2. Rezultaty**

Wyniki obrazowania powierzchni czujnika zaprezentowano na rysunku 3.33 zaś całą, widoczną gołym okiem strukturę biofilmu wytworzoną na powierzchni czujnika przedstawiono na rysunku 3.34. Podobnie do sensorów wykonanych w technologii PCB po 16 godzinach inkubacji powierzchnia czujnika była częściowo pokryta trójwymiarową strukturą biofilmu, jednakże obecność monowarstwy biofilmu nie może być w ten sposób udowodniona.



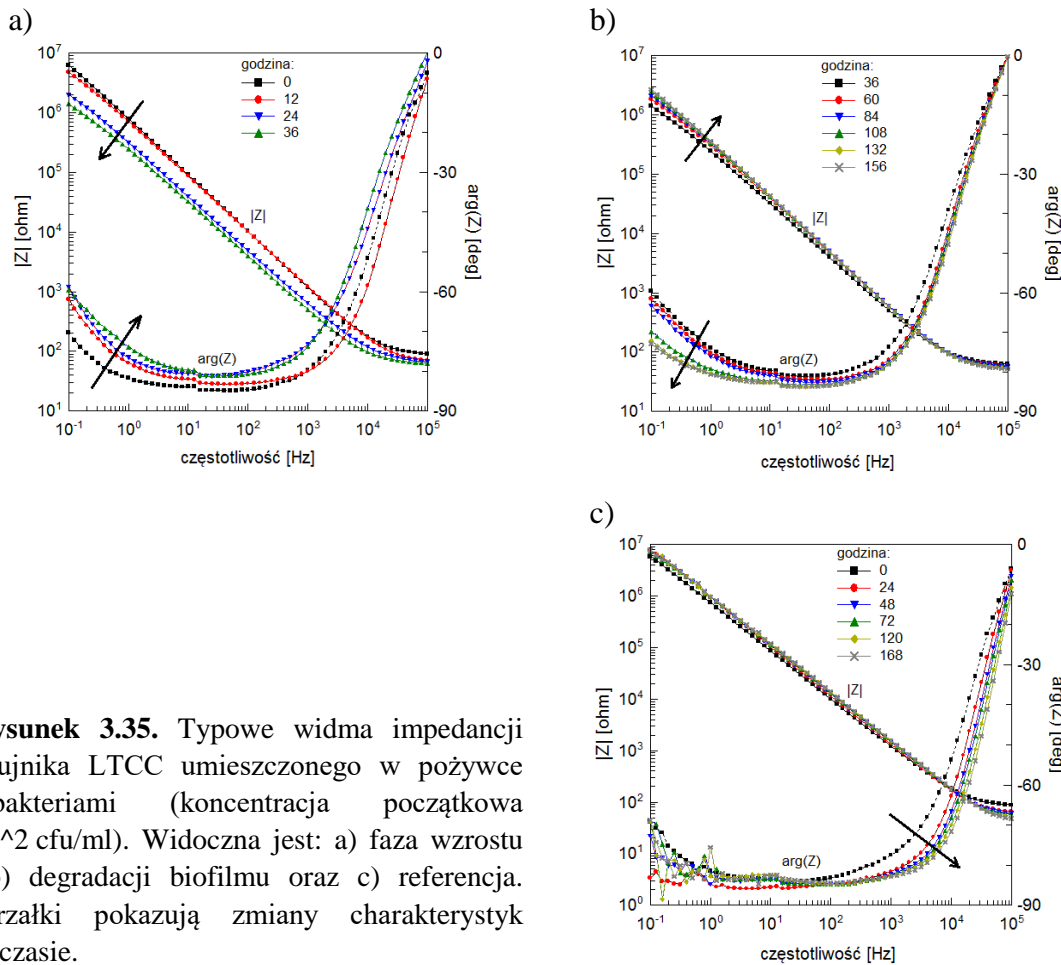
**Rysunek 3.33.** Obrazy SEM biofilmu *P. aeruginosa* na powierzchni czujnika LTCC: a) czysta referencja, b) po 16 godzinach inkubacji, c) zbliżenie na strukturę biofilmu.



**Rysunek 3.34.** Biofilm *P. aeruginosa* na powierzchni czujników LTCC po 168 godzinach inkubacji.

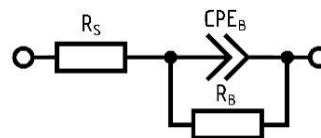
Przykładowe widma impedancji czujnika zanurzonego w pożywce z bakteriami o koncentracji początkowej  $10^2$  cfu/ml w ciągu pierwszych 36 (wzrost biofilmu) i ostatnich 132 (degradacja biofilmu) godzin inkubacji zaprezentowano na rysunku 3.35. Widoczne są zmiany właściwości elektrycznych zarówno czujników w hodowli bakteryjnej jak i czystej pożywce (referencji).

Aby możliwa była analiza otrzymanych danych skonstruowano model EEC zaprezentowany na rysunku 3.36. Przy konstrukcji modelu kierowano się tymi samymi przesłankami co w podrozdziale 3.3.2.2. Sensory wykonane w technologiach PCB i LTCC różniły się materiałem elektrod oraz morfologią ich powierzchni co wymusiło również różnice w sposobie analizy danych pomiarowych. W wypadku czujników LTCC niemożliwe okazało się rozróżnienie pojemności elektrycznych interfejsu oraz biofilmu stąd wykorzystano prostszy model aniżeli ten zastosowany do analizy czujników PCB z rysunku 3.36.



**Rysunek 3.35.** Typowe widma impedancji czujnika LTCC umieszczonego w pożywce z bakteriami (koncentracja początkowa  $10^2$  cfu/ml). Widoczna jest: a) faza wzrostu i b) degradacji biofilmu oraz c) referencja. Strzałki pokazują zmiany charakterystyk w czasie.

**Rysunek 3.36.** EEC czujnika wykonanego w technologii LTCC zanurzonego w pożywce z bakteriami.



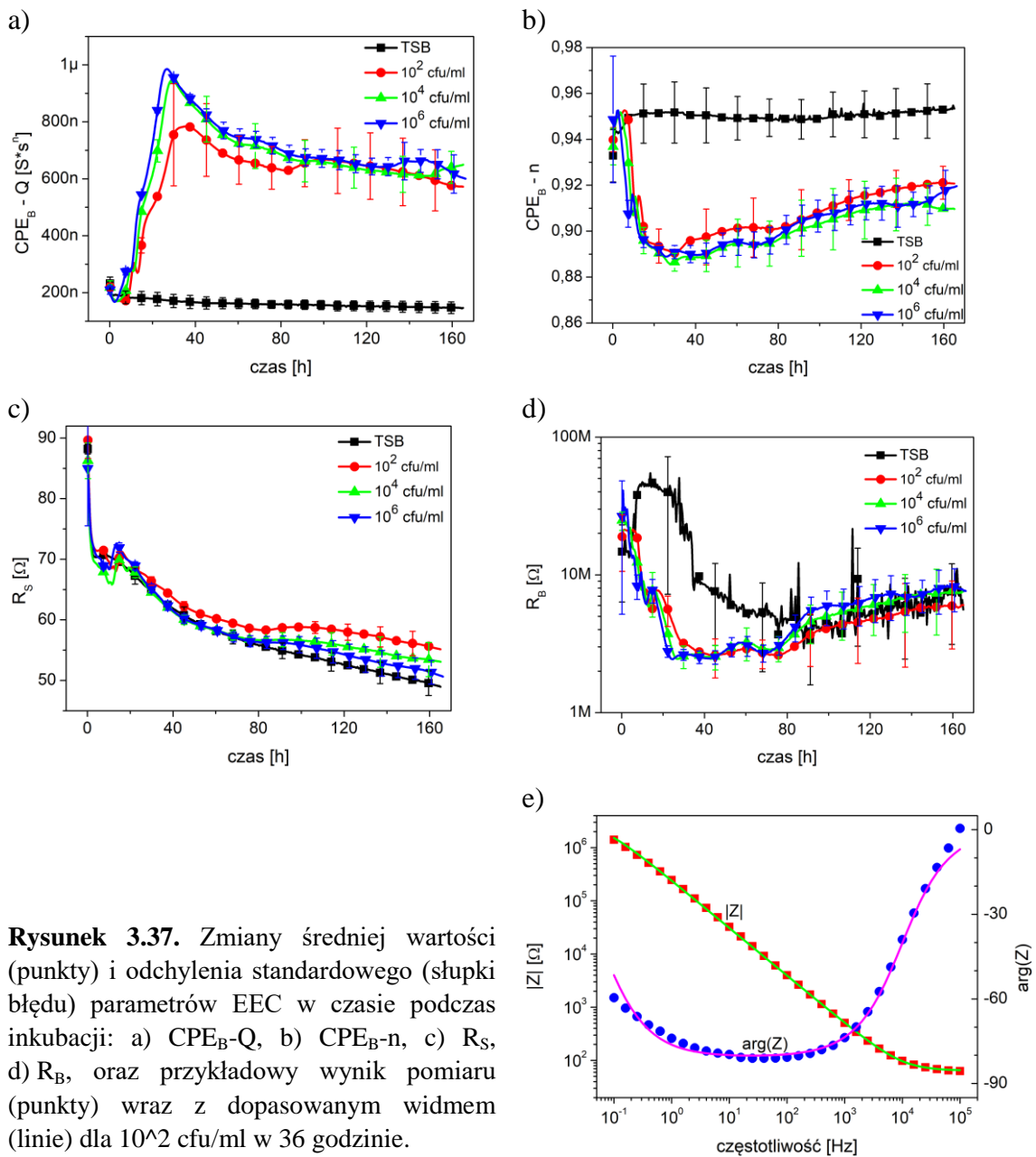
Tak samo jak w poprzednim podrozdziale widma impedancji uzyskane w eksperymencie zebrane w liczbie 6 powtórzeń dla każdej próby (koncentracji początkowej bakterii) zostały zanalizowane za pomocą ZFitter Turbo opisanego w podrozdziale 2.5.2 i metody modelowania EEC wykorzystując model z rysunku 3.36. Zmiany wartości parametrów EEC w ciągu 168 godzin trwania eksperymentu pokazano na rysunkach 3.37a - 3.37d zaś przykładowy wynik dopasowania krzywej do widma przedstawiono na rysunku 3.37e.

Da się zauważyć, że najważniejszym elementem EEC jest  $CPE_B$ , który jasno odzwierciedla obecny stan biofilmu. Faza adhezji kończy się w pierwszych godzinach eksperymentu i zależnie od koncentracji początkowej komórek bakteryjnych zaczyna się faza wzrostu biofilmu, co reprezentowane jest poprzez stały wzrost wartości elementu  $CPE_B-Q$  i współtowarzyszący spadek wartości  $CPE_B-n$ . Około 36 godziny (znow zależnie od koncentracji początkowej) biofilm zaczyna wkraczać w fazę



degradacji, co skutkuje powolnym spadkiem wartości  $CPE_B-Q$  oraz powolnym wzrostem  $CPE_B-n$ . Dla porównania wartości  $CPE_B$  referencji utrzymują się na quasi-stałym poziomie przez cały czas trwania eksperymentu.

Wykres wartości  $R_S$  nie wykazuje żadnych znaczących różnic pomiędzy biofilmem a referencją. Podobnie  $R_B$ , z jednym dodatkowym zjawiskiem – w ciągu pierwszych 30 godzin eksperymentu referencja  $R_B$  przekracza  $10\text{ M}\Omega$  po czym maleje, aby po około 80 godzinach osiągnąć podobną wartość jak pozostałe próby. Spowodowane jest to brakiem biofilmu w referencji i prawdopodobną adhezją składników odżywczych pożywki do powierzchni sensora, która mogła wytworzyć kanał przewodzący między elektrodami czujnika.



**Rysunek 3.37.** Zmiany średniej wartości (punkty) i odchylenia standardowego (słupki błęd) parametrów EEC w czasie podczas inkubacji: a)  $CPE_B-Q$ , b)  $CPE_B-n$ , c)  $R_S$ , d)  $R_B$ , oraz przykładowy wynik pomiaru (punkty) wraz z dopasowanym widmem (linie) dla  $10^2$  cfu/ml w 36 godzinie.

### **3.3.3.3. Podsumowanie**

W podrozdziale przedstawiono badania skupione na zastosowaniu czujników impedancyjnych wykonanych w technologii LTCC do detekcji i monitorowania biofilmu *P. aeruginosa*. W trakcie eksperymentu mierzono widma impedancji czujników zanurzonych w medium stanowiącym pożywkę TSB z bakteriami i bez, pomiar każdego czujnika odbywał się co ok. pół godziny. Otrzymane dane zanalizowano za pomocą modelowania EEC.

Najbardziej przydatnym elementem EEC okazał się  $CPE_B$ , którego wartości dobrze odzwierciedlały stan biofilmu – fazy adhezji, wzrostu i degradacji (rysunki 3.37a i b). Nie wystąpiła korozja elektrod, jak w wypadku czujników PCB. Wynika stąd, że czujniki LTCC mogą być z powodzeniem stosowane do monitorowania wzrostu i degradacji biofilmu *P. aeruginosa*.

Otrzymane wyniki są spójne z otrzymanymi w poprzednich podrozdziałach.. W wypadku mikroczujników na podłożu szklanym i czujników w technologii PCB wspólną cechą eksperymentów był charakterystyczny skok wartości rezystancji równoległej EEC. W wypadku czujników LTCC sytuacja ma się nieco inaczej, mianowicie dosyć duża zmiana wartości elementu CPE modelującego powierzchnię elektrod (w tym wypadku  $CPE_B$ ).

### **3.3.4. Wykorzystanie IMP-AD5933 oraz czujników wykonanych w technologiach PCB i LTCC do monitorowania wzrostu biofilmu *P. aeruginosa***

Podrozdział przedstawia eksperymenty walidujące przydatność miernika impedancji IMP-AD5933 opisanego w rozdziale 2.4.1 do monitorowania wzrostu biofilmu *P. aeruginosa*. Konstrukcja oparta na układzie scalonym AD5933 wyraźnie różniła się od zastosowanej we wcześniejszych eksperymentach IMP-STM32 (2.4.2). W podrozdziale 2.4.1.7 wykazano, że IMP-AD5933 nadaje się do pomiaru elektronicznych elementów biernych w szerokim zakresie częstotliwości, natomiast ze względu na swoją specyfikę impedancja obiektu biologicznego może być technicznie trudniejsza do zmierzenia.

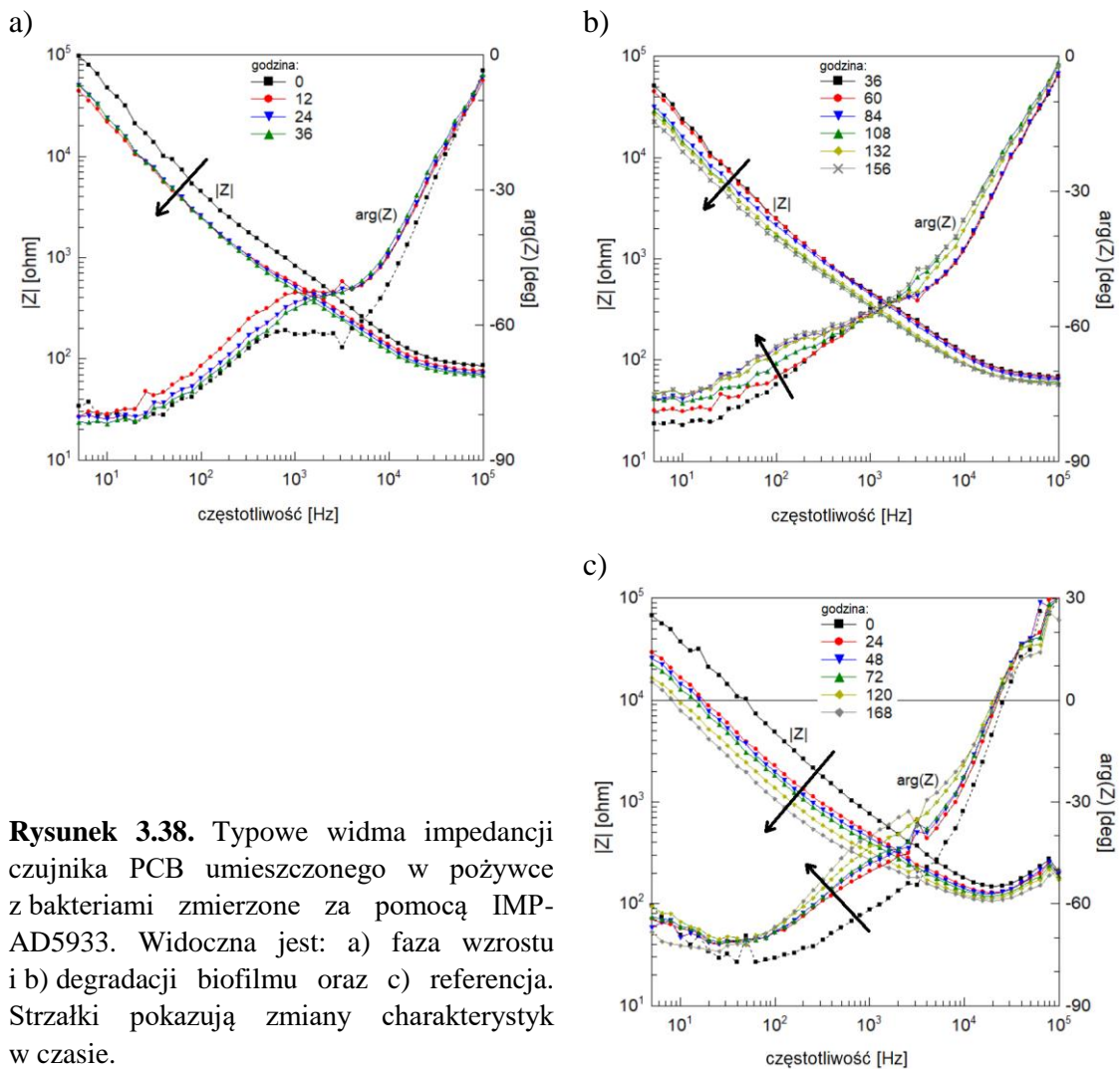
#### **3.3.4.1. Przygotowanie eksperymentu**

W eksperymencie wykorzystano dwa rodzaje czujników impedancyjnych - wykonane w technologiach PCB oraz LTCC opisane odpowiednio w rozdziałach 2.1.2 i 2.1.3. Sposób przygotowania czujników, stanowisko pomiarowe (rysunek 3.28) jak i sam przebieg eksperymentu było zbliżone do opisanego w 3.3.2.1 z zachowaniem wszystkich procedur. Jak wspomniano w wcześniej wykorzystano inny analizator impedancji tj. IMP-AD5933 i pomiar w zakresie częstotliwości od 5 Hz do 100 kHz. Do tego ten sam multiplexer 24-kanałowy, szczep bakterii (ATCC14454), lecz tylko jedno stężenie początkowe  $10^2$  cfu/ml oraz czyste TSB. Płytkę titracyjną wypełniano naprzemiennie po 6 dołków medium z bakteriami oraz czystym TSB (referencją) i w takim samym układzie zamocowano w uchwytach po 6 sztuk w 2 rzędach czujników PCB i LTCC.

Zdolność adhezji bakterii do czujników wykonanych w technologiach PCB i LTCC wykazano w podrozdziałach 3.3.2.2 i 3.3.3.2 więc w zaprezentowanym badaniu nie zastosowano innych metod pomiarowych.

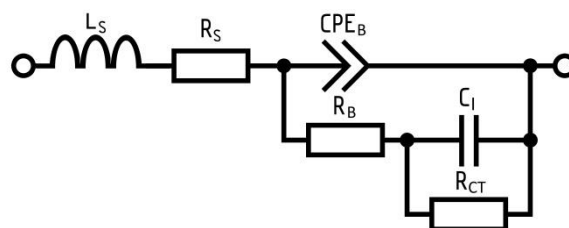
### 3.3.4.2. *Rezultaty przy zastosowaniu czujników wykonanych w technologii PCB*

Przykładowe widma impedancji czujnika PCB zanurzonego w pożywce z bakteriami o koncentracji początkowej  $10^2$  cfu/ml w ciągu pierwszych 36 (wzrost biofilmu) i ostatnich 132 (degradacja biofilmu) godzin inkubacji zaprezentowano na rysunku 3.38. Tak samo jak w poprzednich badaniach widoczne są zmiany właściwości elektrycznych zarówno czujników w hodowli bakteryjnej jak i czystej pożywce (referencji). Interesujące są otrzymane widma impedancji referencji (rysunek 3.38c). Powyżej częstotliwości 20 kHz wzrasta wartość modułu impedancji a jej argument przyjmuje dodatnie wartości. Są to wyniki niezgodne z oczekiwanymi i pewnym stopniu zafałszowane. Miałyby one fizyczny sens jedynie w momencie, gdy w układzie pomiarowym znajdowałaby się szeregowa indukcyjność, a w mierzonym obiekcie biologicznym takowej nie było.



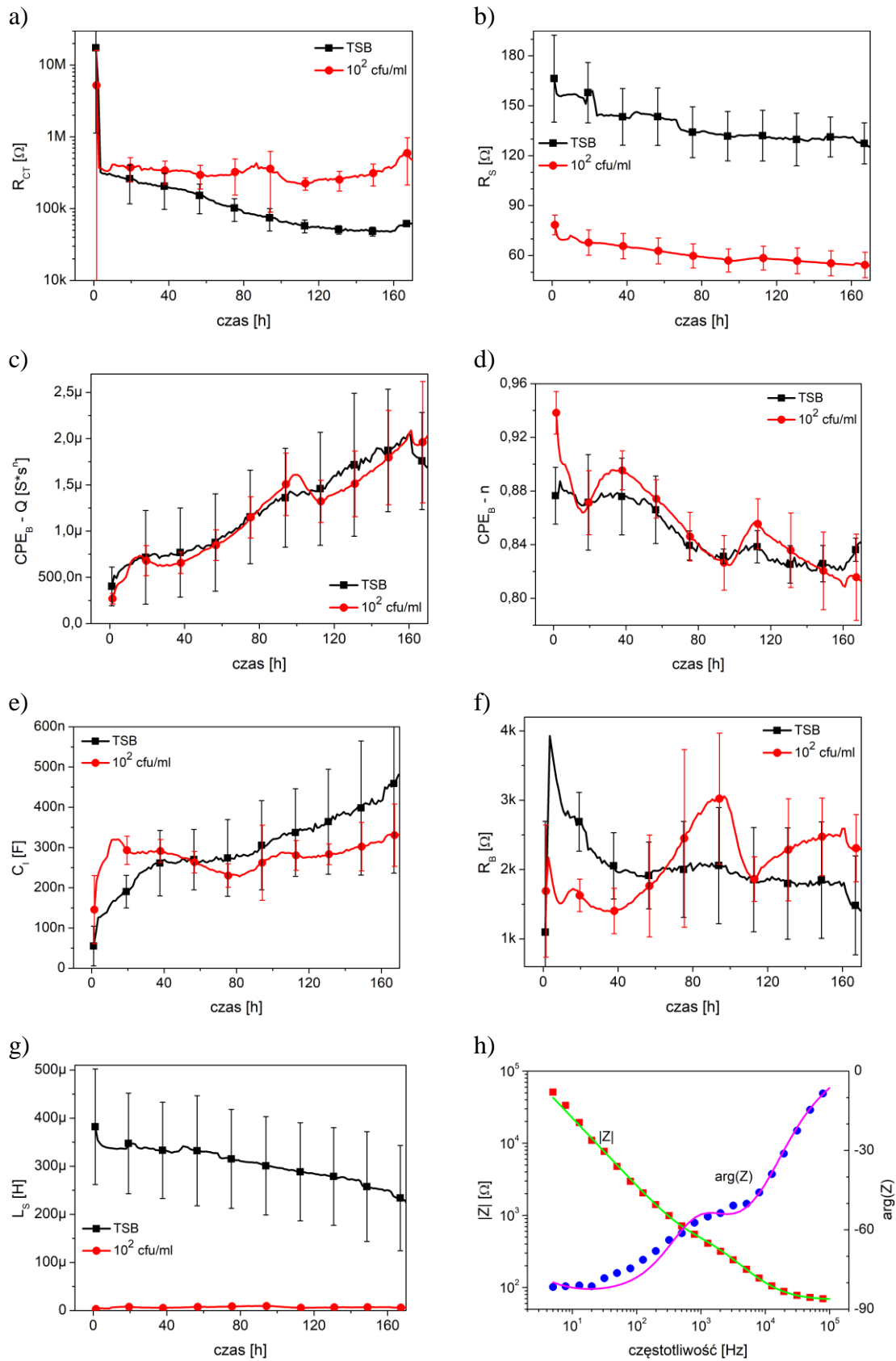
**Rysunek 3.38.** Typowe widma impedancji czujnika PCB umieszczonego w pożywce z bakteriami zmierzone za pomocą IMP-AD5933. Widoczna jest: a) faza wzrostu i b) degradacji biofilmu oraz c) referencja. Strzałki pokazują zmiany charakterystyk w czasie.

Jedyna indukcyjność występująca w układzie wynikała z indukcyjności doprowadzeń elektrycznych i w wykorzystywanym zakresie częstotliwości jest pomijalnie mała. Układ pomiarowy IMP-AD5933 nie radzi sobie z pomiarem czystego TSB powyżej 20 kHz. Zamierzone widma impedancji analizowano programem ZFitter Turbo opisanym w podrozdziale 2.5.2 przy użyciu EEC zaprezentowanym na rysunku 3.39. Układ modelu jest niemalże taki sam, co użyty w podrozdziale 3.3.2.2 z tą różnicą, że dodano element  $L_S$ . Dodatkowy element modeluje indukcyjność szeregową sztucznie pojawiającą się w wypadku pomiaru referencji, dzięki czemu możliwe jest odseparowanie jej wpływu na inne elementy modelu. Dla zachowania spójności widma impedancji czujnika w roztworze z bakteriami zamodelowano tym samym EEC. Pozostałe elementy EEC odpowiadają jak poprzednio:  $R_S$  – rezystancja medium,  $CPE_B$  – element stałofazowy modelujący niejednorodną powierzchnię elektrod oraz jej pokrycie biofilmem,  $R_B$  – rezystancja powierzchni elektrod oraz porów biofilmu,  $C_1$  – pojemność elektrycznej warstwy podwójnej,  $R_{CT}$  – rezystancja transferu ładunku. Zmiany wartości elementów EEC w czasie trwania 168-godzinnej inkubacji czujników w badanych mediach zaprezentowano na rysunkach 3.40a - 3.40g natomiast przykładowy wynik dopasowania krzywej do widma przedstawiono na rysunku 3.40h.



**Rysunek 3.39.** EEC czujnika wykonanego w technologii PCB zanurzonego w pożywce z bakteriami. Widoczny jest dodatkowy element  $L_S$ .

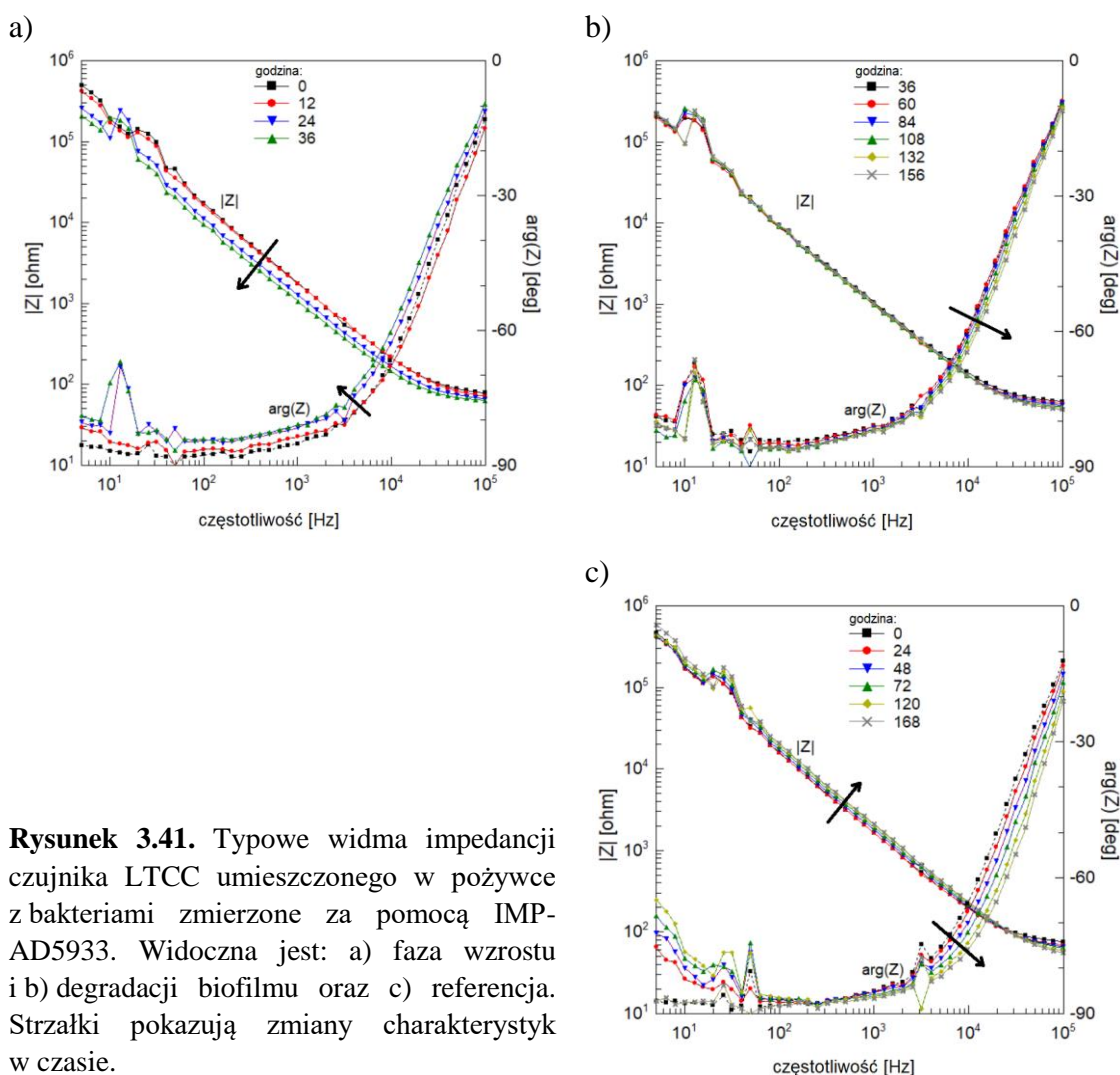
Podobnie jak w podrozdziale 3.3.2.2 najbardziej przykuwającym uwagę parametrem jest  $R_{CT}$ . Da się zaobserwować skokowy wzrost jego wartości około dziewiątej godziny eksperymentu, jednakże wzrost tej wartości nie jest tak znaczący jak w poprzednim badaniu. Po skokowym wzroście  $R_{CT}$  dla czujnika w bakteriach osiąga fazę quasi-plateau podczas gdy dla referencji delikatnie maleje. Jak można było się spodziewać parametr ten jest wskaźnikiem momentu, w którym cała powierzchnia elektrod czujnika pokryta jest biofilmem bakteryjnym, aczkolwiek biorąc pod uwagę odchylenia standardowe badania i referencji (rysunek 3.40a) jednoznacznym staje się dopiero po ok. 100 godzinach pomiaru. Wartość rezystancji medium  $R_S$  niemalże ciągle maleje w miarę upływu czasu zarówno dla czujników w medium z bakteriami jak i dla referencji. W przeciwieństwie do poprzedniego eksperymentu z czujnikami PCB i biofilmem *P. aeruginosa* (3.3.2.2) element modelu  $CPE_B$  podobnie jak  $C_1$  oraz  $R_B$  nie niesie użytecznej informacji. Wartości tych parametrów są zbieżne ze sobą i charakteryzują się stosunkowo dużymi odchyleniami standardowymi. Wartości dodatkowego elementu EEC tj.  $L_S$  mocno różnią się dla referencji i właściwego eksperymentu.  $L_S$  referencji przybiera duże, niemożliwe do fizycznego uzyskania w mierzonym układzie wartości – jest to związane z opisanymi wcześniej kształtami widm impedancji referencji (rysunek 3.38a) i niedoskonałością użytego sprzętu pomiarowego. Wartości  $L_S$  dla czujnika w medium z bakteriami jest znacznie niższe i nie przekracza kilku  $\mu H$ .



**Rysunek 3.40.** Zmiany średniej wartości (punkty) i odchylenia standardowego (słupki błędów) parametrów EEC w czasie podczas inkubacji: a)  $R_{CT}$ , b)  $R_S$ , c)  $CPE_B-Q$ , d)  $CPE_B-n$ , e)  $C_L$ , f)  $R_B$ , g)  $L_S$  oraz h) przykładowy wynik pomiaru (punkty) wraz z dopasowanym widmem (linie) dla  $10^2$  cfu/ml w 36 godzinie.

### 3.3.4.3. Rezultaty przy zastosowaniu czujników wykonanych w technologii LTCC

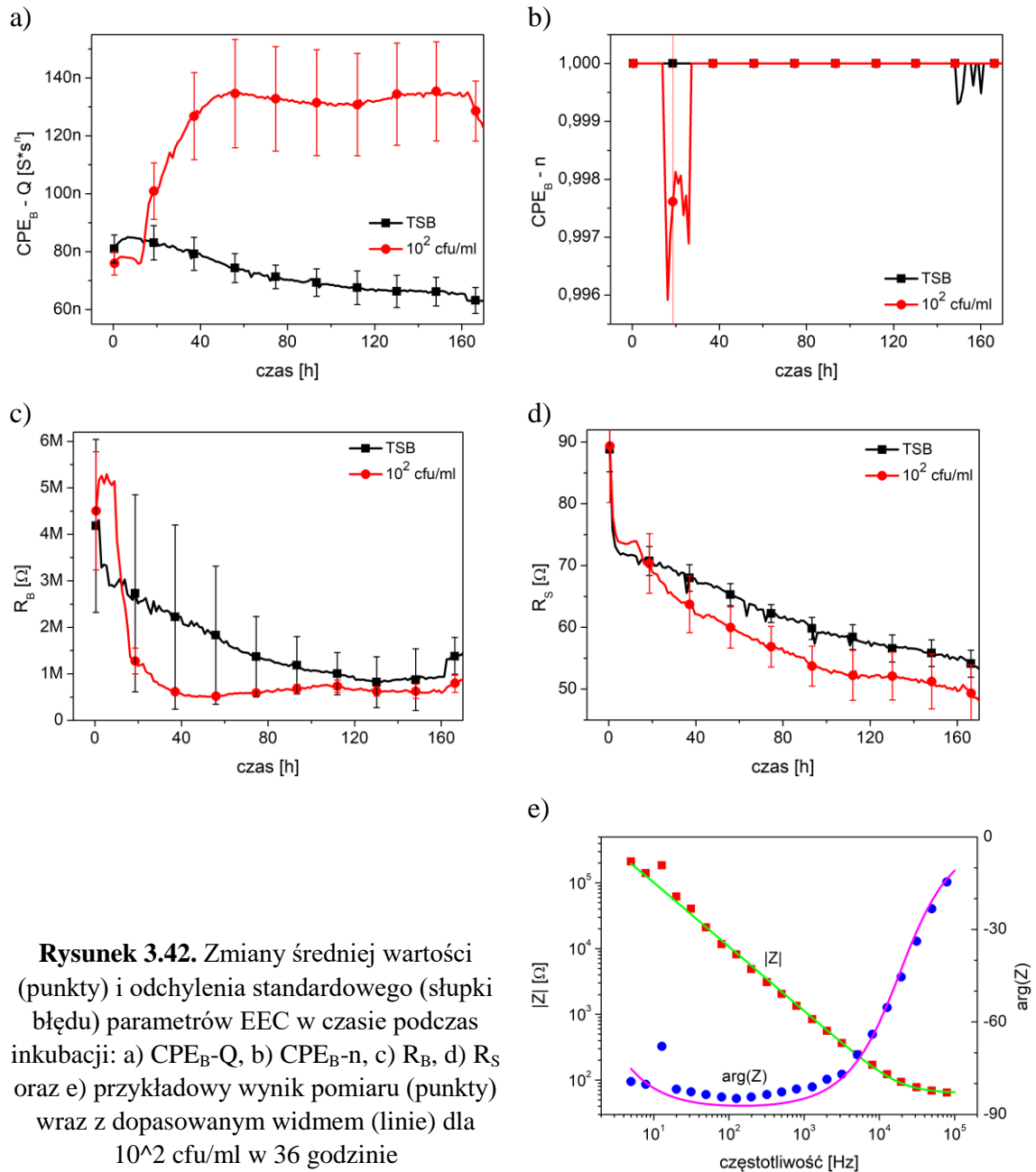
Wybrane widma impedancji czujnika LTCC zanurzonego w pożywce z bakteriami o koncentracji początkowej  $10^2$  cfu/ml w ciągu pierwszych 36 (wzrost biofilmu) i ostatnich 132 (degradacja biofilmu) godzin inkubacji zaprezentowano na rysunku 3.41. Widoczne są pewne zmiany właściwości elektrycznych zarówno czujników w hodowli bakteryjnej jak i czystej pożywce (referencji). W pomiarze widoczne są pewne zaburzenia widm, głównie w zakresie częstotliwości od 10 do 50 Hz, wynikające z niedoskonałości sprzętu pomiarowego. Nie występuje natomiast problem z przyjmowaniem dodatnich wartości argumentu impedancji przy pomiarze referencji, jak opisano to w 3.3.4.2.



**Rysunek 3.41.** Typowe widma impedancji czujnika LTCC umieszczonego w pożywce z bakteriami zmierzone za pomocą IMP-AD5933. Widoczna jest: a) faza wzrostu i b) degradacji biofilmu oraz c) referencja. Strzałki pokazują zmiany charakterystyk w czasie.

Ze względu na ten sam typ czujnika i mierzonego obiektu oraz brak specjalnych różnic w widmach impedancji do analizy otrzymanych w eksperymencie danych pomiarowych wykorzystano ten sam EEC co w 3.3.3.2 zaprezentowany na rysunku 3.36. W trójelementowym modelu poszczególne komponenty reprezentują następujące zjawiska przewodnictwa i polaryzacji:  $R_S$  – rezystancja medium,  $CPE_B$  – pojemność elektryczna interfejsu elektroda-medium oraz pojemność biofilmu,  $R_B$  rezystancja

przeniesienia ładunku oraz rezystancja biofilmu. Zmiany wartości parametrów EEC w ciągu 168 godzin trwania eksperymentu pokazano na rysunkach 3.42a - 3.42d natomiast przykładowy wynik dopasowania krzywej do widma przedstawiono na rysunku 3.42e.



**Rysunek 3.42.** Zmiany średniej wartości (punkty) i odchylenia standardowego (słupki błędów) parametrów EEC w czasie podczas inkubacji: a)  $CPE_B - Q$ , b)  $CPE_B - n$ , c)  $R_B$ , d)  $R_S$  oraz e) przykładowy wynik pomiaru (punkty) wraz z dopasowanym widmem (linie) dla  $10^2$  cfu/ml w 36 godzinie

Podobnie jak w podrozdziale 3.3.3.2 najważniejszym elementem EEC jest  $CPE_B$ , który jasno odzwierciedla obecny stan biofilmu. Faza adhezji kończy się ok. 15 godziny eksperymentu po czym przekształca się w fazę wzrostu biofilmu, co reprezentowane jest poprzez stały wzrost wartości elementu  $CPE_B - Q$ . Jednak w tym wypadku wartość  $CPE_B - n$  jest praktycznie stała przez cały okres trwania eksperymentu i wynosi 1. Około 55 godziny biofilm zaczyna wkraczać w fazę degradacji, co skutkuje powolnymi fluktuacjami wartości  $CPE_B - Q$ , lecz nie uzyskuje się jej wyraźnego spadku. Dla

porównania wartości  $CPE_B$  referencji delikatnie maleje przez cały czas trwania eksperymentu.

Ze względu na duże odchylenia standardowe i przebiegi charakterystyk wykresy wartości  $R_S$  i  $R_B$  nie wykazuje żadnych znaczących różnic pomiędzy biofilmem a referencją w dalszych godzinach eksperymentu. Jedynie w ciągu pierwszych 15 godzin eksperymentu czyli w fazie adhezji biofilmu  $R_B$  i  $R_S$  dla czujnika w bakteriach posiadają quasi-stałe wartości na poziomie  $5\text{ M}\Omega$  dla  $R_B$  i  $74\ \Omega$  dla  $R_S$  po czym maleją. Po niecałych 40 godzinach wartość  $R_B$  zaczyna oscylować wokół wartości  $600\text{ k}\Omega$  natomiast  $R_S$  konsekwentnie maleje do wartości ok.  $50\ \Omega$  na koniec badania.

#### **3.3.4.4. Podsumowanie**

Przedstawione badania dotyczyły możliwości zastosowania miernika impedancji IMP-AD5933 do monitorowania wzrostu biofilmu *P. aeruginosa* przy wykorzystaniu czujników wykonanych w technologiach PCB i LTCC. Pomiary wykonywane były w zakresie częstotliwości od 5 Hz do 100 kHz a otrzymane dane analizowane za pomocą modelowania EEC.

W wypadku czujników PCB uzyskano wyniki podobne do otrzymanych w poprzednim eksperymencie z wykorzystaniem innego urządzenia pomiarowego opisanym w podrozdziale 3.3.2. Najbardziej interesującym elementem EEC (rysunek 3.39) okazał się  $R_{CT}$  modelujący rezystancję transferu ładunku. Charakteryzuje się on skokowym wzrostem wartości w momencie pokrycia całej dostępnej powierzchni elektrod warstwą biofilmu z tym, że amplituda jego wzrostu była znacznie większa a różnica w stosunku do referencji bardziej jednoznaczna w wypadku pomiaru za pomocą dokładniejszego IMP-STM32. Tak samo element  $CPE_B$  niósł pewne użyteczne informacje w wypadku pomiaru IMP-STEM32 co nie miało miejsca przy pomiarze IMP-AD5933, w którym to kształty przebiegu charakterystyk jak i duże odchylenia standardowe nie pozwoliły na jednoznaczną interpretację przedstawionych wartości. W wypadku obydwu wymienionych mierników dwa elementy EEC tj.  $C_1$  oraz  $R_B$  nie niosły użytecznych informacji. Odnosnie elementu  $R_S$  z punktu widzenia monitorowania biofilmu może być traktowany jako element pomocniczy. Jego wartość maleje zarówno dla czujnika w medium z bakteriami jak i dla referencji z tym, że dla referencji tępo spadku wartości jest szybsze. Zjawisko to wytłumaczone może być zwiększoną koncentracją jonów wynikającą z korozji elektrod. Należy nadmienić, że wykorzystany w tym badaniu EEC zawierał jeden dodatkowy element  $L_S$ , potrzebny do zamodelowania widma impedancji referencji, w którym to argument impedancji nienaturalnie przyjmował dodatnie wartości powyżej częstotliwości 20 kHz.

Pomiary z wykorzystaniem czujników LTCC również przyniosły oczekiwane rezultaty, podobne do opisanych w podrozdziale 3.3.3. Tu przy zastosowaniu prostszego EEC (rysunek 3.36) do analizy czujników LTCC również najbardziej interesującym elementem modelu był  $CPE_B$ . Wartość  $CPE_B$ -Q zaczyna gwałtownie wzrastać w momencie pokrycia całej dostępnej powierzchni elektrod warstwą biofilmu natomiast zależnie od urządzenia pomiarowego  $CPE_B$ -n przyjmuje wartość jeden przy pomiarze IMP-AD5933 lub zachowuje się odwrotnie proporcjonalnie do  $CPE_B$ -Q przy



pomiarze IMP-STM32. Pozostałe elementy modelu tj.  $R_S$  i  $R_B$  w wypadku obydwu wymienionych typów mierników nie niosą użytecznych informacji z punktu widzenia monitorowania biofilmu.

### **3.3.5. Wykorzystanie IMP-AD5933 i czujników na podłożu PCB do monitorowania wzrostu biofilmu *C. albicans***

Niniejszy podrozdział przedstawia dalsze poszukiwania zastosowań analizatora IMP-AD5933 i czujników impedancyjnych wykonanych w technologii PCB (rozdział 2.1.2) w mikrobiologii. Przy zachowaniu poprzednich procedur eksperymentu, stanowiska i sprzętu badawczego zbadano możliwość monitorowania wzrostu biofilmu drożdżaków. *Candida albicans* jest grzybem bezotoczkowym potrafiącym formować biofilm, niemniej rozwój jego struktury następuje o wiele wolniej aniżeli ma to miejsce w wypadku *P. aeruginosa*.

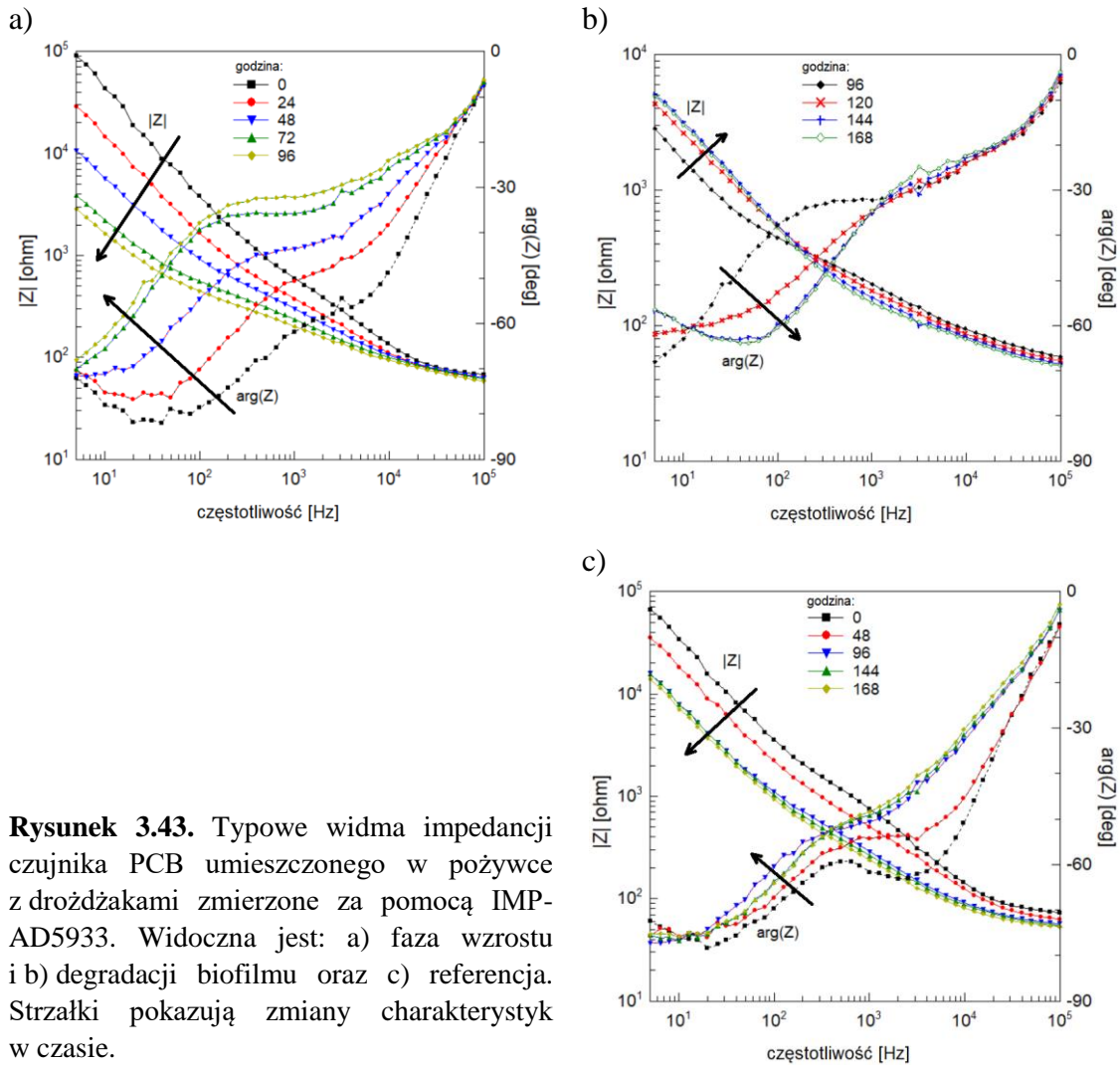
#### **3.3.5.1. Przygotowanie eksperymentu**

W eksperymencie wykorzystano czujniki impedancyjne wykonane w technologii PCB opisane w rozdziale 2.1.2. Sposób przygotowania czujników, stanowisko pomiarowe (rysunek 3.28) jak i sam przebieg eksperymentu było zbliżone do opisanego w 3.3.2.1. z zachowaniem wszystkich procedur. Wykorzystano inny analizator impedancji IMP-AD5933 i pomiar w zakresie częstotliwości od 5 Hz do 100 kHz i ten sam multiplexer 24-kanalowy. Dotychczas badany szczep bakterii zamieniono na drożdżaka *C. albicans*. Wykorzystano jedno stężenie początkowe  $10^2$  cfu/ml oraz czyste TSB jako referencję. Płytkę titracyjną wypełniono w 2 rzędkach po 6 dołków medium z drożdżakiem oraz 6 dołków czystym TSB (referencją) i w takim samym układzie zamocowano w uchwytach po 6 sztuk w 2 rzędkach czujników.

#### **3.3.5.2. Rezultaty**

Wybrane widma impedancji czujnika PCB zanurzonego w pożywce z drożdżakami o koncentracji początkowej  $10^2$  cfu/ml w ciągu pierwszych 96 (wzrost biofilmu) i ostatnich 72 (degradacja biofilmu) godzin inkubacji zaprezentowano na rysunku 3.43. Widoczne są pewne zmiany właściwości elektrycznych zarówno czujników w hodowli drożdżaków jak i referencji. W przeciwieństwie do 3.3.4.3 w pomiarze nie występują zaburzenia widm około 30 Hz i nie występuje problem z przyjmowaniem dodatnich wartości argumentu impedancji przy pomiarze referencji, jak opisano to w 3.3.4.2. Biorąc pod uwagę typ czujnika i podobieństwo widm impedancji do analizy otrzymanych w eksperymencie danych pomiarowych wykorzystano ten sam EEC co w 3.3.2.2 zaprezentowany na rysunku 3.30. Do aproksymacji wartości elementów EEC wykorzystano program ZFitter Turbo opisanym w podrozdziale 2.5.2. Elementy EEC odpowiadają jak poprzednio:  $R_S$  – rezystancja medium,  $CPE_B$  – element stałofazowy modelujący niejednorodną powierzchnię elektrod oraz jej pokrycie biofilmem,  $R_B$  – rezystancja powierzchni elektrod oraz porów biofilmu,  $C_1$  – pojemność elektrycznej warstwy podwójnej,  $R_{CT}$  – rezystancja transferu ładunku. Zmiany wartości elementów EEC w czasie trwania 168-godzinnej inkubacji czujników w badanych

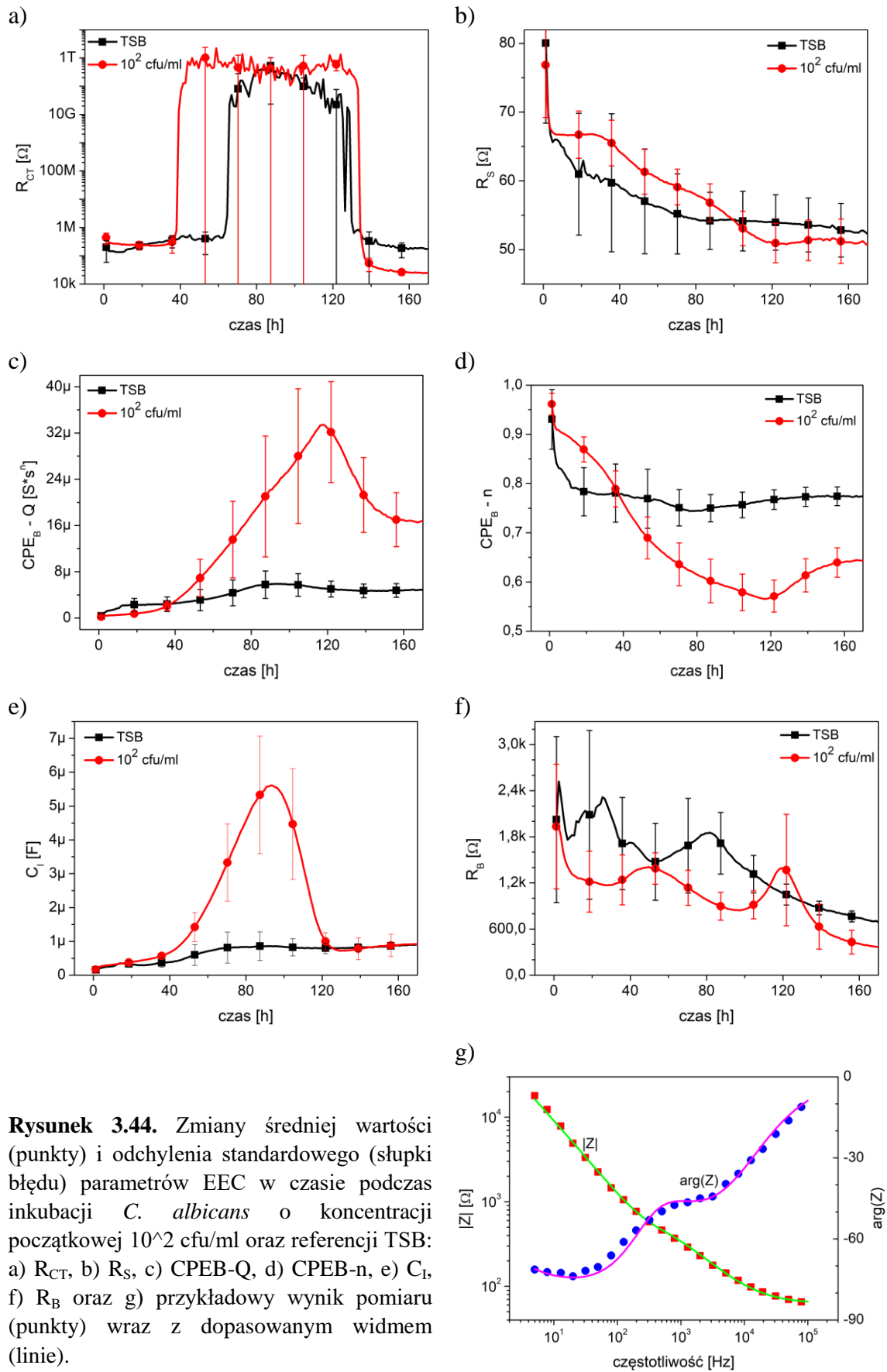
mediach zaprezentowano na rysunkach 3.44a - 3.44f, natomiast przykładowy wynik dopasowania krzywej do widma przedstawiono na rysunku 3.44g.



**Rysunek 3.43.** Typowe widma impedancji czujnika PCB umieszczonego w pożywce z drożdżakami zmierzone za pomocą IMP-AD5933. Widoczna jest: a) faza wzrostu i b) degradacji biofilmu oraz c) referencja. Strzałki pokazują zmiany charakterystyk w czasie.

W odniesieniu do podrozdziału 3.3.2.2, w którym to czujniki PCB wykorzystywane były do badania biofilmu *P. aeruginosa*, wyniki uzyskane badaniem biofilmu *C. albicans* wskazują na odmienny wpływ drożdżaków aniżeli bakterii na impedancję czujnika.

Najważniejszym elementem EEC jest  $CPE_B$  oraz drugi element pojemnościowy czyli  $C_I$ . Składowa  $CPE_B$ -Q modelu czujnika w medium z drożdżakiem zaczyna wyraźnie rosnąć w stosunku do referencji ok. 40 godziny eksperymentu, osiąga maksimum ok. 120 godziny eksperymentu po czym zaczyna maleć. Podobnie, lecz w odwrotny sposób zachowuje się składowa  $CPE_B$ -n. Tym samym zidentyfikować rozkład faz biofilmu drożdżaka w czasie tj. adhezję przypadającą do czterdziestej godziny, dojrzewanie między czterdziestą a sto dwudziestą godziną i rozproszenie po sto dwudziestej godzinie. Co ciekawe wartość  $C_I$  zmienia się znacznie w stosunku do referencji jedynie w domniemanej fazie dojrzewania biofilmu między czterdziestą a sto dwudziestą godziną.



**Rysunek 3.44.** Zmiany średniej wartości (punkty) i odchylenia standardowego (słupki błęd) parametrów EEC w czasie podczas inkubacji *C. albicans* o koncentracji początkowej  $10^2$  cfu/ml oraz referencji TSB: a)  $R_{CT}$ , b)  $R_S$ , c)  $CPEB-Q$ , d)  $CPEB-n$ , e)  $C_I$ , f)  $R_B$  oraz g) przykładowy wynik pomiaru (punkty) wraz z dopasowanym widmem (linie).

Z elementów rezystancyjnych  $R_{CT}$  przedstawia charakterystyczny dla siebie skok wartości, aczkolwiek bardzo wyraźnie maleje ok. 130 godziny eksperymentu, jakieś 10 godzin po wkroczeniu biofilmu w domniemaną fazę degradacji. Użyteczności elementu  $R_{CT}$  odbiera tu zachowanie referencji TSB, dla której to wartość  $R_{CT}$  gwałtownie rośnie ok. 55 godziny eksperymentu po czym gwałtownie maleje ok. 125 godziny. Dwa pozostałe elementy  $R_S$  i  $R_B$  nie wykazują większej użyteczności ze względu na zbieżność charakterystyk eksperymentu i referencji oraz zachodzące na siebie odchylenia standardowe.

### **3.3.5.3. Podsumowanie**

Zaprezentowano badania dotyczące możliwości zastosowania miernika impedancji IMP-AD5933 do monitorowania wzrostu biofilmu drożdżaka *C. albicans* przy wykorzystaniu czujników wykonanych w technologii PCB. Pomiar wykonywane były w zakresie częstotliwości od 5 Hz do 100 kHz a otrzymane dane analizowane za pomocą modelowania EEC.

Najbardziej interesującym elementem modelu EEC, akurat podobnie jak dla czujników LTCC, okazał się  $CPE_B$ , którego wartości wyraźnie różniły się od referencji i korelowały z fazami wzrostu biofilmu drożdżaka. Innym wartościowym elementem był również pojemnościowy  $C_I$  gdyż wyraźne zmiany jego wartości pokrywały się z fazą dojrzewania biofilmu.  $R_{CT}$  wykazuje charakterystyczny skok wartości jak poprzednich badaniach na tego typu czujnikach lecz w dalszym etapie jego wartość również gwałtownie maleje. Ponadto zachowanie  $R_{CT}$  dla referencji TSB wpływa na niewiarygodność tego parametru. Elementy  $R_S$  i  $R_B$  nie wykazują większej użyteczności ze względu na zbieżność charakterystyk eksperymentu i referencji oraz zachodzące na siebie odchylenia standardowe.

Biorąc pod uwagę, że badanym obiektem był biofilmujący drożdżak *C. albicans* posiadający inne właściwości fizykochemiczne i inną dynamikę wzrostu niż dobrze w tej pracy zbadany biofilm *P. aeruginosa* trudno jest odnosić uzyskane w tym eksperymencie wyniki do poprzednich badań. Nie zastosowano też innej metody referencyjnej niż równoległy pomiar dołków wypełnionych czystym TSB. Niemniej zaprezentowane badania wstępnie wskazują na pozytywną możliwość zastosowania IMP-AD5933 do monitorowania wzrostu i degradacji biofilmu *C. albicans*.

## 4. Podsumowanie i wnioski

W rozprawie przedstawiono badania nad zastosowaniem czujników impedancyjnych w pomiarach warstw mikrobiologicznych, począwszy od wyznaczenia podstawowych parametrów czujników, poprzez pomiary adhezji białek do powierzchni czujników, a na pomiarach wzrostu i degradacji biofilmów kończąc.

Podjęto się zagadnienia opracowania własnych czujników impedancyjnych wytwarzanych technologią mikroelektroniczną oraz stosunkowo tanimi technologiami PCB i LTCC. Opisano własne konstrukcje analizatorów impedancji – które były następnie wykorzystywane w badaniach - i problemy napotykanne przy ich budowaniu. Określono podstawowe właściwości opracowanych czujników. Zbadano wpływ adhezji białek (awidyna) oraz tworzenia się koniugatów (awidyna – biotynylowane IgG) na impedancję czujnika. Zbadano również wpływ faz rozwoju biofilmu bakteryjnego *P. aeruginosa* na impedancję czujników na podłożu szklanym, PCB i LTCC oraz wpływ wzrostu i degradacji biofilmu drożdżakowego *C. albicans* na impedancję czujników PCB.

Wszystkie zmierzone widma impedancji analizowane były za pomocą modelownia elektrycznym obwodem równoważnym EEC. Zwielenokrotnienie pomiaru dzięki zastosowaniu wielu czujników jednocześnie pozwoliło na uzyskanie prostego statystycznie opisu wyznaczonych wartości elementów EEC poprzez wyliczenie i zaznaczenie na wykresach odchylenia standardowego.

Wykorzystane w badaniach czujniki impedancyjne są niespecyficzne, gdyż nie posiadają warstwy receptorowej (wyjątek stanowi część badań opisanych w 3.2.3, gdyż zaadsorbowaną na elektrodach awidynę można uznać za warstwę receptorową). Niespecyficzność nie daje selektywności pomiaru zadanego obiektu, lecz dzięki swej prostocie posiada inne zalety, których to nie mają biosensory. Głównymi wadami impedancyjnych biosensorów są: zwykle skomplikowana procedura immobilizacji warstwy receptorowej; konsystencja warstwy receptorowej jest zależna od stanu powierzchni elektrod, na której została osadzona oraz od niespecyficznej adsorpcji innych niż analit biologicznych składników próbki; ogromna trudność w regeneracji elektrody i warstwy receptorowej [64]. Warto tu jeszcze nadmienić, że dla celów detekcji narastającego biofilmu, jak pokazały przeprowadzone badania, specyficzność detekcji nie jest konieczna.

Progi czasowej detekcji biofilmu *P. aeruginosa*, zarówno na czujnikach na podłożu szklanym jak i PCB i LTCC, da się oszacować dla poszczególnych koncentracji początkowych bakterii:  $10^6$  cfu/ml – 4 godziny,  $10^4$  cfu/ml – 6 godzin,  $10^3$  cfu/ml – 7 godzin,  $10^2$  cfu/ml – 8 godzin. Należy mieć tu na uwadze, że bakterie nie namnażają się liniowo i progi detekcji czasowej dla innych koncentracji początkowych należałoby wyznaczyć eksperymentalnie. Ponadto należy pamiętać, że progi detekcji czasowej zawsze będą szacunkowe, gdyż bakterie jako organizmy żywe nie zawsze namnażają się w tym samym tempie. Uzyskane wyniki progów detekcji czasowej biofilmu *P. aeruginosa* są porównywalne z wynikami innych autorów [15]. Takie czasy detekcji są typowe dla niespecyficznych czujników impedancyjnych [24]. Podobne wyniki

uzyskiwano dla detekcji *Salmonella Typhimurium* [31] [36], *Staphylococcus aureus* [24] i *Staphylococcus epidermis* [24] [33].

Próg ilościowej detekcji bakterii *P. aeruginosa*, zarówno na czujnikach na podłożu szklanym jak i PCB i LTCC, da się oszacować na  $10^8$  cfu/ml. Podobny próg ilościowej detekcji *P. aeruginosa* uzyskano w [29]. Wydaje się być on dość wysoki, lecz pod uwagę należy wziąć, że jest to wciąż detekcja niespecyficzna. Próg detekcji na poziomie  $9 \times 10^2$  cfu/ml udało się uzyskać autorom w [58] przy zastosowaniu biosensora z makroskopowych elektrod z warstwą receptorową. Uzyskiwane przez innych autorów niskie progi detekcji w relatywnie krótkim czasie przy użyciu specjalnych (niekiedy grafenowych), najnowszych typu biosensorów wynoszą: 75 komórek/ml [57] i 4 cfu/ml [62] dla detekcji *Escherichia coli*, 25 cfu/ml [60] i 3 cfu/ml [66] dla detekcji *Salmonella Typhimurium*, oraz 1 cfu/ml [59] dla detekcji *Bacillus cereus*.

Wykorzystywane przez autora w badaniach czujnikach na podłożu szklanym jak i PCB i LTCC *de facto* mogą posiadać niezmiernie niski próg detekcji na poziomie jednej komórki w badanej próbce, ponieważ wykrywają namnażające się bakterie. Uwzględnić tylko należy kwestię jak szybki musi być pomiar i czy dopuszczalne jest, aby bakterie mogły się namnożyć – np. przy impedancyjnym badaniu natury biofilmów namnożenie się bakterii jest wręcz wskazane. Należałoby tu jeszcze zwrócić uwagę na czujniki wykonane w technologii PCB. Czujnik taki co prawda jest podatny na korozję, lecz pozostaje zdolny do detekcji przez kilka dni, zanim skoroduje w stopniu uniemożliwiającym dalszą pracę. Czujniki LTCC są lepsze pod tym względem, nie korodują i mają prostszy model równoważny, niemniej są wciąż droższe w produkcji od czujników PCB. Koszt kupna jednej sztuki czujnika PCB od zleceniobiorcy-producenta przy zamówieniu kilkuset sztuk jest bardzo niski i wynosi ok. 2 zł.

Przeprowadzone rozważania, opracowane konstrukcje czujników i systemów pomiarowych oraz wyniki pomiarów pozwalają stwierdzić, iż postawione problemy badawcze zostały rozwiązane, a cele pracy zrealizowane. W szczególności:

1. Opracowano miniaturowy czujnik impedancyjny wysokiej jakości, zdolny do monitorowania adhezji białek (awidyna, biotynylowane IgG) i wzrostu biofilmu *P. aeruginosa*.
2. Opracowano tanie w produkcji miniaturowe czujniki impedancyjne wykonane w technologiach PCB i LTCC, zdolne są one do monitorowania wzrost i degradacji biofilmu *P. aeruginosa*, a czujniki PCB dodatkowo zbadano pod kątem monitorowania wzrostu i degradacji biofilmu *C. albicans*.
3. Opracowano system pomiarowy, umożliwiający pomiar impedancji w szerokim zakresie częstotliwości i zdolny obsłużyć jednocześnie wiele czujników. Autor współtworzył konstrukcje mierników impedancji IMP-STM32 i IMP-AD5933, a także oprogramowanie nimi sterujące i urządzenia pomocnicze tj. multipleksery.
4. Uzyskane w badaniach widma impedancji modelowano za pomocą EEC i identyfikowano zjawiska przewodnictwa i polaryzacji.. Zbudowano elektryczne modele równoważne EEC dla każdego typu czujnika i wskazano istotne dla badania warstw mikrobiologicznych elementy modeli.

Zgodnie z wiedzą autora, elementami nowości w prezentowanej rozprawie są:

- porównanie wykonanych w tym samym czasie wyników pomiarów czujników o tej samej geometrii, w tym samym układzie pomiarowym, ale wykonanych z różnych materiałów (technologie PCB i LTCC)
- zaobserwowanie i zbadanie wpływu efektów korozji pokrywanych galwanicznie złotem miedzianych elektrod czujnika PCB w kontekście pomiarów obiektów mikrobiologicznych
- szerokopasmowy interfejs analogowy kondycjonujący sygnał pobudzenia i odpowiedzi jako rozszerzenie funkcjonalności AD5933, eliminujący stałą sygnału pobudzenia w sposób nie wpływający na pomiary nawet przy bardzo małych częstotliwościach
- analiza wpływu *P. aeruginosa* i *C. albicans* na mierzone widma impedancji czujników na podłożu szklanym, PCB, LTCC, i określenie najważniejszych elementów modelu EEC.

Przedstawione w rozprawie badania skupiają się na badaniu biofilmu *P. aeruginosa* i jedynie zahaczają o kwestię impedancyjnych pomiarów biofilmu *C. albicans* oraz monitorowania adsorpcji awidyny i wytwarzania kompleksu awidyna – biotynylowane IgG. Kontynuacją przedstawionych prac powinno być zbadanie możliwości monitorowania adhezji i faz wzrostu biofilmów innych drobnoustrojów i cząstek biologicznych za pomocą opracowanych i opisanych w rozprawie narzędzi i metod.

## Streszczenie

### Czujniki impedancyjne w pomiarach warstw mikrobiologicznych

Konrad Andrzej Chabowski

W rozprawie doktorskiej opisano wyniki prac badawczych dotyczących zastosowania planarnych czujników impedancyjnych z elektrodami o strukturze palczastej w układzie dwuelektrodowym do pomiaru warstw mikrobiologicznych w postaci białek i biofilmów. Oprócz aspektu pomiarowego prace obejmowały również zagadnienia budowania sensorów i konstrukcję własnego sprzętu pomiarowego wraz ze sprzętem pomocniczym.

Obecnie popularne jest rozwijanie alternatywnych metod detekcji i monitorowania mikroorganizmów: optycznych, kalorymetrycznych, grawimetrycznych i elektrycznych. W rozprawie autor skupia się na jednej z metod elektrycznych - spektroskopii impedancyjnej i czujnikach impedancyjnych. Sensory te wykazują obiecujące właściwości w zakresie monitorowania warstw mikrobiologicznych, takich jak białka i biofilmy bakteryjne. W tym wypadku impedancja czujnika odzwierciedla zdolność badanego obiektu biologicznego do przewodzenia prądu elektrycznego a także magazynowania energii w postaci pola elektrycznego. Wszystkie fizykochemiczne zmiany zachodzące w obiekcie biologicznym wiążą się ze zmianami ich właściwości elektrycznych, a co za tym idzie ich impedancji. Istotne mikrobiologicznie zjawiska, takie jak fluktuacja stężenia jonów w medium, podziały komórkowe oraz adhezja do powierzchni elektrod, mogą być potencjalnie wykryte za pomocą czujników impedancyjnych. Największą zaletą metod impedancyjnych jest możliwość monitorowania wspomnianych zjawisk w czasie rzeczywistym. Kolejną zaletą jest nieinwazyjność, brak konieczności stosowania markerów (*label-free detection*) i uzyskiwanie dodatkowych informacji nt. elektrycznych właściwości otoczenia czujnika.

Rozprawa podzielona jest na cztery rozdziały. Pierwszy rozdział szeroko definiuje warstwy mikrobiologiczne, będące zainteresowaniem autora. Zawiera wprowadzenie do zagadnienia czujników impedancyjnych, przegląd ich zastosowań oraz ich rozwinięcia w postaci biosensorów, eksperymentalnych i komercyjnych systemów pomiarowych. Na podstawie przedstawionego przeglądu sformułowane zostają cele pracy.

Drugi rozdział dysertacji skupia się na zastosowanych w badaniach materiałach i metodach: opisuje czujniki impedancyjne własnego projektu, metodę spektroskopii impedancyjnej, komercyjne analizatory impedancji, własne projekty analizatorów i sprzętu pomocniczego –



w tym obszerny opis ich konstrukcji, oraz oprogramowanie sterujące zestawianymi stanowiskami pomiarowymi.

Trzeci rozdział poświęcony jest charakteryzacji podstawowych właściwości i zastosowaniu zaprojektowanych czujników impedancyjnych oraz sprzętu pomiarowego do monitorowania adhezji białek oraz faz wzrostu biofilmu bakteryjnego bakterii *Pseudomonas aeruginosa* i grzybów *Candida albicans*. Każdy podrozdział kończy się podsumowaniem uzyskanych wyników.

Ostatni, czwarty rozdział podsumowuje całą rozprawę, odnosząc się do osiągnięcia wyznaczonych celów. Przedstawia wyciągnięte wnioski i sugerowane kierunki rozwinięcia opracowanych metod badawczych.

## **Abstract (ENG)**

### **Impedance sensors in measurements of microbiological layers**

Konrad Andrzej Chabowski

The dissertation concerns the research on the use of planar impedance sensors with interdigitated electrodes in two-electrode system for measurement of microbiological layers in form of proteins and biofilms. Apart from the measurement results it contains the sensors development issues as well as the design and construction of custom built measuring and supplementing equipment.

Currently it is popular to develop the alternative methods of detection and monitoring of microorganisms: optical, calorimetric, gravimetric and electrical. In the thesis the author focuses on one of the electrical methods which is the use of the impedance spectroscopy and impedance sensors. These sensors exhibit promising properties for purposes of microbiological layers monitoring in the form of proteins and bacterial biofilms. In this case, the impedance of the sensor reflects the ability of the tested biological object to conduct electric current and also store energy in the form of an electric field. All physicochemical changes occurring in the biological object are associated with changes in their electrical properties and hence their impedance. In addition, microbiologically significant phenomena such as fluctuations in ion concentration in the growth medium, cell divisions and adhesion to the surface of the electrodes can potentially be detected by means of impedance sensors. The greatest advantage of impedance methods is the ability to monitor these phenomena in real time. Another advantage is non-invasive, label-free detection, and obtaining additional information about the electrical characteristics of the sensor environment.

The dissertation is divided into four chapters. The first chapter broadly defines the microbiological layers which were the point of interest of the author. It also includes an introduction to impedance sensors, a review of their applications and their development in the form of biosensors, as well as experimental and commercial measurement systems. Subsequently, the objectives of the work are formulated on the basis of the review.

The second part of the thesis focuses on the materials and methods used in the research: it describes the developed impedance sensors, the impedance spectroscopy method, the commercial impedance analyzers, analyzers constructed by own as well as supplementary

equipment - including a comprehensive description of their design and finally controlling software.

The third chapter deals with the characterization and application of designed impedance sensors and measuring equipment for monitoring the protein adhesion and biofilm growth phases of *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* strains. Each section ends with a summary of the results.

The last, fourth chapter summarizes the entire dissertation, referring to the achievement of the goals, and outlines the conclusions and suggested directions for the further development of described research methods.

# Bibliografia

- [1] M Wroński, "Badanie zawiesin mikroorganizmów metoda spektroskopii impedancyjnej," *Rozprawa doktorska*, 2011.
- [2] T Gotszalk et al., "IV.3. Raport 16: BioczuJNIKI impedancyjne i masowe," *Monografia projektu POIG.01.03.01-02-002/08. Czujniki i sensory do pomiarów czynników stanowiących zagrożenie w środowisku*, vol. Część I, pp. 273-289, 2011.
- [3] **K Chabowski** et al., "IV.5. Raport 17: Matryce czujników impedancyjnych i zmian masy w detekcji zagrożeń biologicznych," *Monografia projektu POIG.01.03.01-02-002/08 Czujniki i sensory do pomiarów czynników stanowiących zagrożenia w środowisku*, vol. Część II, pp. 289-305, 2013.
- [4] "[http://en.wikipedia.org/wiki/File:Biological\\_and\\_technological\\_scales\\_compared-en.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Biological_and_technological_scales_compared-en.svg)," dostęp: 7.06.2017.
- [5] J M Berg, J L Tymoczko, L Stryer, and N D Clarke, "Białka," *Biochemia*, 2007.
- [6] "<https://encyklopedia.pwn.pl/haslo/bialka;3877011.html#prettyPhoto>," dostęp 16.07.2017.
- [7] K Chou, "Some remarks on protein attribute prediction and pseudo amino acid composition," *Journal of Theoretical Biology*, vol. 273, no. 1, pp. 236-247, 2011.
- [8] "<https://encyklopedia.pwn.pl/haslo/immunoglobuliny;3914331.html>," dostęp 16.07.2017.
- [9] R S Kane, S Takayama, E Ostuni, D E Ingber, and G M Whitesides, "Patterning proteins and cells using soft lithography," *Biomaterials*, vol. 20, no. 23-24, pp. 2363-2376, 1999.
- [10] G A O'Toole, "A resistance switch," *Nature*, vol. 416, p. 695-696, 2002.
- [11] H-C Flemming and J Wingender, "The biofilm matrix," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 8, no. 9, pp. 623-633, 2010.
- [12] J W Costerton, P S Stewart, and E P Greenberg, "Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infection," *Science*, vol. 284, no. 5418, pp. 1318-1322, 2011.
- [13] G A James et al., "Biofilms in chronic wounds," *Wound Repair and Regeneration*, vol. 16, pp. 37-44, 2008.
- [14] X Shi and X Zhu, "Biofilm formation and food safety in food industries," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 20, no. 9, pp. 407-413, 2009.
- [15] T Kim, J Kang, J H Lee, and J Yoon, "Influence of attached bacteria and biofilm on double-layer capacitance during biofilm monitoring by electrochemical impedance spectroscopy," *Water Research*, vol. 45, no. 15, pp. 4615-4622, 2011.
- [16] G Guła, "Wykorzystanie nowych metod badawczych do oznaczania wzrostu biofilmu bakteryjnego," *Rozprawa doktorska*, 2012.
- [17] R Monds and G O'Toole, "The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review," *Trends in Microbiology*, vol. 17, no. 2, pp. 73-87, 2009.
- [18] D Monroe, "Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms," *PLoS biology*, vol. 5, no. 11, pp. 2458-2461, 2007.
- [19] D G Davies, "Regulation of matrix polymer in biofilm formation and dispersion," in

*Microbial extrapolymeric substances, characterization, structure and function.* Berlin: Springer, 1999, pp. 93-112.

- [20] M Varshney and Y Li, "Interdigitated array microelectrodes based impedance biosensors for detection of bacterial cells," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 24, no. 10, pp. 2951-2960, 2009.
- [21] Q Xie et al., "In situ monitoring of gold-surface adsorption and acidic denaturation of human serum albumin by an isolation-capacitance-adopted electrochemical quartz crystal impedance system," *Analytica Chimica Acta*, vol. 464, no. 1, pp. 65-77, 2002.
- [22] H Ben-Yoav, A Freeman, M Sternheim, and Y Shacham-Diamand, "An electrochemical impedance model for integrated bacterial biofilms," *Electrochimica Acta*, vol. 56, pp. 7780-7786, 2011.
- [23] L Y Zheng et al., "Electrochemical measurements of biofilm development using polypyrrole enhanced flexible sensors," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 182, pp. 725-732, 2013.
- [24] J Paredes et al., "Interdigitated microelectrode biosensor for bacterial biofilm growth monitoring by impedance spectroscopy technique in 96-well microtiter plates," *Sensors and Actuators B*, pp. 663-670, 178 2013.
- [25] D Gutierrez, C Hidalgo-Cantabrana, A Rodriguez, P Garcia, and P Ruas-Madiedo, "Monitoring in real time the formation and removal of biofilms from clinical related pathogens using an impedance-based technology," *PLoS ONE*, vol. 11, no. 10, pp. 1-17, 2016.
- [26] Y Ge, T Deng, and X Zheng, "Dynamic monitoring of changes in endothelial cell-substrate adhesiveness during leukocyte adhesion by microelectrical impedance assay," *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, vol. 41, no. 3, pp. 256-262, 2009.
- [27] S S Hakki and S B Bozkurt, "Effects of different setting of diode laser on the mRNA expression of growth factors and type I collagen of human gingival fibroblasts," *Lasers in medical science*, vol. 27, no. 3, pp. 325-331, 2012.
- [28] X Munoz-Berbel, F J Munoz, N Vignes, and J Mas, "On-chip impedance measurements to monitor biofilm formation in the drinking water distribution network," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 118, pp. 129-134, 2006.
- [29] P Cady, S W Dufour, P Lawless, B Nunke, and S J Kraeger, "Impedimetric screening for bacteriuria," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 7, no. 3, pp. 273-278, 1978.
- [30] X Munoz-Berbel, N Vignes, A T A Jenkins, J Mas, and F J Munoz, "Impedimetric approach for quantifying low bacteria concentrations based on the changes produced in the electrode-solution interface during the pre-attachment stage," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 23, pp. 1540-1546, 2008.
- [31] L Yang, Y Li, C L Griffis, and M G Johnson, "Interdigitated microelectrode (IME) impedance sensor for the detection of viable *Salmonella typhimurium*," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 19, pp. 1139-1147, 2004.
- [32] M Farrow, I Hunter, and P Connolly, "Developing a Real Time Sensing System to Monitor Bacteria in Wound Dressings," *Biosensors*, vol. 2, no. 4, pp. 171-188, 2012.
- [33] J Paredes et al., "Real time monitoring of the impedance characteristics of Staphylococcal bacterial biofilm cultures with a modified CDC reactor system," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 38, no. 1, pp. 226-232, 2012.

- [34] A Dheilly et al., "Monitoring of microbial adhesion and biofilm growth using electrochemical impedancemetry," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 79, no. 1, pp. 157-164, 2008.
- [35] T Piasecki et al., "Evaluation of Pseudomonas aeruginosa biofilm formation using Quartz Tuning Forks as impedance sensors," *Sensors and Actuators B*, vol. 189, pp. 60-65, 2013.
- [36] L Yang, C Ruan, and Y Li, "Detection of viable Salmonella typhimurium by impedance measurement of electrode capacitance and medium resistance," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 19, no. 5, pp. 495-502, 2003.
- [37] **K Chabowski** et al., "The Application of Impedance Microsensors for Real-Time Analysis of Pseudomonas aeruginosa Biofilm Formation," *Polish Journal of Microbiology*, vol. 64, no. 2, pp. 115-120, 2015.
- [38] V Tsouti, C Boutopoulos, I Zergioti, and S Chatzandroulis, "Capacitive microsystems for biological sensing," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 27, no. 1, pp. 1-11, 2011.
- [39] K Bhavsar et al., "A cytokine immunosensor for Multiple Sclerosis detection based upon label-free electrochemical impedance spectroscopy using electroplated printed circuit board electrodes," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 25, no. 2, pp. 506-509, 2009.
- [40] A N Nordin, A U Tarmizi, M Ariff, A Ghani, and M Mel, "Printed Circuit Board Cultureware for Analysis of Colorectal Carcinoma Cells using Impedance Spectroscopy," in *2012 IEEE EMBS International Conference on Biomedical Engineering and Sciences*, 2012, pp. 574-578.
- [41] J T La Belle, A Fairchild, U K Demirok, and A Verma, "Method for fabrication and verification of conjugated nanoparticle-antibody tuning elements for multiplexed electrochemical biosensors," *Methods*, vol. 61, no. 1, pp. 39-51, 2013.
- [42] P Bogaerts, S Yunus, M Massart, T D Huang, and Y Glupczynski, "Evaluation of the BYG carba test, a new electrochemical assay for rapid laboratory detection of carbapenemase-producing enterobacteriaceae," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 54, no. 2, pp. 349-358, 2016.
- [43] P Ciosek et al., "Monitoring of cell cultures with LTCC microelectrode array," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 393, no. 8, pp. 2029-2038, 2009.
- [44] A Jędrychowska, K Malecha, J Cabaj, and J Sołoducho, "Laccase biosensor based on low temperature co-fired ceramics for the permanent monitoring of water solutions," *Electrochimica Acta*, vol. 165, pp. 372-382, 2015.
- [45] K Malecha, D G Pijanowska, L J Golonka, and P Kurek, "Low temperature co-fired ceramic (LTCC)-based biosensor for continuous glucose monitoring," *Sensors and Actuators B*, vol. 155, no. 2, pp. 923-929, 2011.
- [46] P Ciosek et al., "Microelectrode array fabricated in low temperature cofired ceramic (LTCC) technology," *Journal of Solid State Electrochemistry*, vol. 13, no. 1, pp. 129-135, 2009.
- [47] A Vasudev, A Kaushik, Y Tomizawa, N Norena, and S Bhansali, "An LTCC-based microfluidic system for label-free, electrochemical detection of cortisol," *Sensors and Actuators B*, vol. 182, pp. 139-146, 2013.
- [48] A.P.F. Turner., "<https://www.journals.elsevier.com/biosensors-and-bioelectronics>," *Biosensors and Bioelectronics - Aims & Scope*, dostęp: 7.07.2017 r.

- [49] C-K Joung, H-N Kim, H-C Im, M-H Oh, and Y-R Kim, "Ultra-sensitive detection of pathogenic microorganism using surface-engineered impedimetric immunosensor," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 161, no. 1, pp. 824-831, 2012.
- [50] S M Radke and E C Alocilja, "Design and Fabrication of a Microimpedance Biosensor for Bacterial Detection," *IEEE SENSORS JOURNAL*, vol. 4, no. 4, pp. 434-440, 2004.
- [51] X Tang et al., "A new interdigitated array microelectrode-oxide-silicon sensor with label-free, high sensitivity and specificity for fast bacteria detection," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 156, no. 2, pp. 578-587, 2011.
- [52] P Kao, D Allara, and S Tadigadapa, "Characterization of viscoelastic properties of adsorbed biomolecules and biomolecular assemblies with high frequency micromachined quartz resonators," *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 142, no. 2, pp. 406-411, 2009.
- [53] K Nieradka et al., "Microcantilever array biosensors for detection and recognition of Gram-negative bacterial endotoxins," *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 198, no. 31, pp. 114-124, 2014.
- [54] A K Wanekaya, W Chen, N V Myung, and A Mulchandani, "Nanowire-based electrochemical biosensors," *Electroanalysis*, vol. 18, no. 6, pp. 533-550, 2006.
- [55] K Maehashi et al., "Label-Free Protein Biosensor Based on Aptamer-Modified Carbon Nanotube Field-Effect Transistors," *Analytical Chemistry*, vol. 79, no. 2, pp. 782-787, 2007.
- [56] T Yoetz-Kopelman, Y Ram, A Freeman, and Y Shacham-Diamand, "Faradaic impedance spectroscopy for detection of small molecules binding using the avidin-biotin model," *Electrochimica Acta*, vol. 173, pp. 630-635, 2015.
- [57] H Yang, H Zhou, H Hao, Q Gong, and K Nie, "Detection of Escherichia coli with a label-free impedimetric biosensor based on lectin functionalized mixed self-assembled monolayer," *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 229, pp. 297-304, 2016.
- [58] N Krithiga, K Viswanath, V S Vasantha, and A Jayachitra, "Specific and selective electrochemical immunoassay for Pseudomonas aeruginosa based on pectin-gold nano composite," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 79, pp. 121-129, 2016.
- [59] Z Izadi, M Sheikh-Zeinoddin, A A Ensafi, and S Soleimani-Zad, "Fabrication of an electrochemical DNA-based biosensor for Bacillus cereus detection in milk and infant formula," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 80, pp. 582-589, 2016.
- [60] F Jia et al., "Impedimetric Salmonella aptasensor using a glassy carbon electrode modified with an electrodeposited composite consisting of reduced graphene oxide and carbon nanotubes," *Microchimica Acta*, vol. 183, no. 1, pp. 337-344, 2016.
- [61] Z Bagheryan, J B Raoof, M Golabi, A P F Turner, and V Beni, "Diazonium-based impedimetric aptasensor for the rapid label-free detection of Salmonella typhimurium in food sample," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 80, pp. 566-573, 2016.
- [62] S Burrs et al., "A paper based graphene-nanocauliflower hybrid composite for point of care biosensing," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 85, pp. 479-487, 2016.
- [63] D Grieshaber, R MacKenzie, J Vörös, and E Reimhult, "Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures," *Sensors*, vol. 8, no. 3, pp. 1400-1458, 2008.
- [64] M Xu, R Wang, and Y Li, "Rapid detection of Escherichia coli O157:H7 and

- Salmonella Typhimurium in foods using an electrochemical immunosensor based on screen-printed interdigitated microelectrode and immunomagnetic separation," *Talanta*, vol. 148, pp. 200-208, 2016.
- [65] C Zhang et al., "Binder-free graphene and manganese oxide coated carbon felt anode for high-performance microbial fuel cell," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 81, pp. 32-38, 2016.
- [66] E Sheikhzadeh, M Chamsaz, A P F Turner, E W H Jager, and V Beni, "Label-free impedimetric biosensor for Salmonella Typhimurium detection based on poly [pyrrole-co-3-carboxyl-pyrrole] copolymer supported aptamer," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 80, pp. 194-200, 2016.
- [67] M Grossi et al., "An embedded portable biosensor system for bacterial concentration detection," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, no. 3, pp. 983-990, 2010.
- [68] M Grossi et al., "A Portable Sensor With Disposable Electrodes for Water Bacterial Quality Assessment," *IEEE Sensors Journal*, vol. 13, no. 5, pp. 1775-1782, 2013.
- [69] L Pires et al., "Online monitoring of biofilm growth and activity using a combined multi-channel impedimetric and amperometric sensor," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 47, pp. 157-163, 2013.
- [70] Analog Devices, "AD5933 1MPS, 12-Bit Impedance Converter, Network Analyser. Datasheet for Analog Devices. Rev. E.," 2013.
- [71] C J Chen, J T Liu, S-J Chang, M-W Lee, and J-Z Tsai, "Development of a portable impedance detection system for monitoring the growth of mouse L929 cells," *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, vol. 43, no. 5, pp. 678-684, 2012.
- [72] T Schwarzenberger et al., "Impedance sensor technology for cell-based assays in the framework of a high-content screening system," *Physiological Measurement*, vol. 32, no. 7, pp. 977-993, 2011.
- [73] M-H Wang, M-F Kao, and L-S Jang, "Single HeLa and MCF-7 cell measurement using minimized impedance spectroscopy and microfluidic device," *Review of Scientific Instruments*, vol. 82, 2011.
- [74] H Berney and J J O'Riordan, "Impedance Measurement Monitors Blood Coagulation," *Analog Dialogue*, vol. 42, no. 8, pp. 1-3, 2008.
- [75] J Broeders et al., "Miniaturised eight-channel impedance spectroscopy unit as sensor platform for biosensor applications," *Physica Status Solidi A*, vol. 208, no. 6, pp. 1357-1363, 2011.
- [76] F Seoane, J Ferreira, J J Sánchez, and R Bragós, "An analog front-end enables electrical impedance spectroscopy system on-chip for biomedical applications," *Physiological Measurement*, vol. 29, no. 6, 2008.
- [77] P Bogónez-Franco, A Bayés-Genís, J Rosell, and R Bragós, "Performance of an implantable impedance spectroscopy monitor using ZigBee," *Journal of Physics: Conference Series*, vol. 224, 2010.
- [78] J Ferreira, F Seoane, and K Lindecrantz, "AD5933-based electrical bioimpedance spectrometer. Towards textile-enabled applications," *Conference proceedings: 33rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society.*, pp. 3282-3285, 2011.
- [79] C Margo, J Katrib, M Nadi, and A Rouane, "A four-electrode low frequency impedance



- spectroscopy measurement system using the AD5933 measurement chip," *Physiological measurement*, vol. 34, no. 4, pp. 391-405, 2013.
- [80] A Melwin and K Rajasekaran, "Implementation of Bioimpedance Instrument Kit in ARM7," *International Journal of Advanced Research in Computer Science and Software Engineering*, vol. 3, no. 5, pp. 1271-1273, 2013.
- [81] J Hoja and G Lentka, "Interface circuit for impedance sensors using two specialized single-chip microsystems," *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 163, no. 1, pp. 191-197, 2010.
- [82] J Hoja and G Lentka, "A Family of New Generation Miniaturized Impedance Analyzers for Technical Object Diagnostics," *Metrology and Measurement Systems*, vol. XX, no. 1, pp. 43-52, 2013.
- [83] S Grimnes and O G Martinsen, *Bioimpedance and bioelectricity basics*. London: Academic Press, 2000.
- [84] "<https://www.aceabio.com/product/rtca-dp/>," dostęp 25.05.2017.
- [85] A F Junka et al., "Use of the Real Time xCelligence System for Purposes of Medical Microbiology," *Polish Journal of Microbiology*, vol. 61, no. 3, pp. 191-197, 2012.
- [86] Z Canturk, E Kocabıyık, N Ozturk, and S İlhan, "Evaluation of Antioxidant and Antiproliferative Metabolites of *Penicillium flavigenum* Isolated from Hypersaline Environment : Tuz ( Salt ) Lake by Xcelligence Technology 1," *Microbiology*, vol. 86, no. 3, pp. 346-354, 2017.
- [87] "<http://www.bionas-discovery.com/prodservices/instruments/system2500/index.html>," dostęp 25.06.2017.
- [88] E Thedinga et al., "Online monitoring of cell metabolism for studying pharmacodynamic effects," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 220, no. 1, pp. 33-44, 2007.
- [89] K Koutsoumanis, C C Tassou, P S Taoukis, and G J E Nychas, "Modelling the effectiveness of a natural antimicrobial on *Salmonella enteritidis* as a function of concentration, temperature and pH, using conductance measurements," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 84, no. 6, pp. 981-987, 1998.
- [90] "<http://www.dwsscientific.co.uk/rabit/>," dostęp 25.06.2017.
- [91] S Zhu, S Schnell, and M Fischer, "Rapid detection of *Cronobacter* spp. with a method combining impedance technology and rRNA based lateral flow assay," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 159, no. 1, pp. 54-58, 2012.
- [92] "<https://microbiology.sylab.com/products.html>," dostęp 26.06.2017.
- [93] "<http://www.aberinstruments.com/biotechproducts/>," dostęp 28.06.2017.
- [94] "<http://www.fogalebiotech.com/images/PDF/PDF/IB465.pdf>," dostęp 28.06.2017.
- [95] D F Brown, M Warner, C E Taylor, and R E Warren, "Automated screening of blood cultures with the Malthus microbiological growth analyser," *Journal of Clinical Pathology*, vol. 41, no. 6, pp. 671-675, 1988.
- [96] G M Jawad, T Marrow, and J A Odumeru, "Assessment of impedance microbiological method for the detection of *Escherichia coli* in foods," *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, vol. 6, pp. 297-305, 1998.
- [97] T Takahashi, M Imai, I Suzuki, and J Sawai, "Growth inhibitory effect on bacteria of chitosan membranes regulated," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 40, pp. 485-

491, 2008.

- [98] R Priego, L M Medina, and R Jordano, "Bactometer System versus Traditional Methods for Monitoring Bacteria Populations in Salchichon during Its Ripening Process," *Journal of Food Protection*, vol. 74, no. 1, pp. 145-148, 2011.
- [99] M Wroński, T Piasecki, and K Nitsch, "Symulacja widm impedancyjnych struktur biologicznych na elektrodach palczastych," *Przegląd Elektrotechniczny*, vol. 86, no. 10, pp. 150-153, 2010.
- [100] B B Narakathu, M Z Atashbar, and B E Bejcek, "Improved detection limits of toxic biochemical species based on impedance measurements in electrochemical biosensors," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, no. 2, pp. 923-928, 2010.
- [101] **K Chabowski** et al., "Porównanie elektrycznych właściwości mikroczujników impedancyjnych wykonanych na podłożach krzemowych i szklanych," *Elektronika*, no. 4, pp. 51-55, 2014.
- [102] G Gruca et al., "Mikrodźwignia sprężysta jako bioczujnik," in *Materiały supramolekularne*, Grzegorz Schroeder, Ed. Poznań: Betagraf P.U.H., 2008, pp. 381-414.
- [103] K Kapczyńska, A Gamian, K Nieradka, T Gotszalk, and J Rybka, "Targeted Protein Immobilization on Si/Au Surfaces for Selective Functionalization of Si/SiO<sub>2</sub> Microcantilevers with Au Layer," *Procedia Engineering*, vol. 47, pp. 1378-1381, 2012.
- [104] K Nieradka, K Kapczyńska, J Rybka, P Grabiec, and T Gotszalk, "Dual-mode Stress and Mass Measurements with Chemical and Biochemical Microcantilever Sensor Arrays," *Procedia Engineering*, vol. 47, pp. 1346-1349, 2012.
- [105] K Nieradka, T Gotszalk, and G Schroeder, "A novel method for simultaneous readout of static bending and multimode resonance-frequency of microcantilever-based biochemical sensors," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 170, pp. 172-175, 2012.
- [106] K Nieradka et al., "Fabrication and characterization of electromagnetically actuated microcantilevers for biochemical sensing, parallel AFM and nanomanipulation," *Microelectronic Engineering*, vol. 98, pp. 676-679, 2012.
- [107] **K Chabowski**, "Czujniki impedancyjne na mikrobelkach," w *Interdyscyplinarność badań naukowych 2011 - praca zbiorowa pod redakcją Jarosława Szreka*. Wrocław: Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, 2011, pp. 123-126.
- [108] K Nitsch, "Zastosowanie spektroskopii impedancyjnej w badaniach materiałów elektronicznych," 1999.
- [109] J R Macdonald, "Impedance spectroscopy," *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 20, no. 3, pp. 289-305, 1992.
- [110] E Barsoukov and J R Macdonald, "Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment and Applications," 2005.
- [111] T Piasecki and K Nitsch, "Study of sprayed coatings and compound materials by impedance spectroscopy," *Surface & Coatings Technology*, vol. 205, pp. 1009-1014, 2010.
- [112] K Nitsch, "Microelectronic materials and structures characterization," *Microelectronics Reliability*, vol. 51, no. 7, pp. 1213-1218, 2011.

- [113] X Munoz-Berbel, C García-Aljaro, and F J Munoz, "Impedimetric approach for monitoring the formation of biofilms on metallic surfaces and the subsequent application to the detection of bacteriophages," *Electrochimica Acta*, vol. 53, no. 19, pp. 5739-5744, 2008.
- [114] V Shubina, L Gaillet, T Chaussadent, T Meylheuc, and J Creus, "Biomolecules as a sustainable protection against corrosion of reinforced carbon steel in concrete," *Journal of Cleaner Production*, vol. 112, pp. 666-671, 2016.
- [115] Agilent Technologies, "Agilent 4294A Precision Impedance Analyzer," *Data Sheet*.
- [116] Solartron, "1260 Impedance/Gain-Phase Analyzer. Operating manual," 1996.
- [117] Z Bober, "Automatyzacja pomiarów odpowiedzi materiałów dielektrycznych na pobudzenie," *Praca doktorska*, 1989.
- [118] M W Dudek, "Algorytmy szybkiego pomiaru impedancji w zakresie małych i bardzo małych częstotliwości w badaniach materiałów i struktur elektronicznych," *Rozprawa doktorska*, 2011.
- [119] M Dudek and K Nitsch, "System pomiarowy do analizy właściwości dielektryków w zakresie bardzo małych częstotliwości," *Pomiary, Automatyka, Kontrola*, vol. 53, pp. 676-679, 2007.
- [120] T Piasecki, "Fast impedance measurements at very low frequencies using curve fitting algorithms," *Measurement Science and Technology*, vol. 26, no. 6, p. 065002, 2015.
- [121] T Piasecki, M Wroński, M Dudek, and K Nitsch, "System setup and software for impedance spectroscopy measurements," *Elektronika*, vol. 52, no. 3, pp. 74-76, 2011.
- [122] M Rudek et al., "Uniwersalny mikroprocesorowy miernik impedancji elektrycznej.," *Przegląd Elektrotechniczny*, vol. 85, no. 11, pp. 175-177, 2009.
- [123] Ł Serwata, "Analizator bioimpedancji," *Praca magisterska*, 2007.
- [124] **K Chabowski**, T Piasecki, A Dzierka, and K Nitsch, "Simple wide frequency range impedance meter based on AD5933 integrated circuit," *Metrology and Measurement Systems*, vol. XXII, no. 1, pp. 13-24, 2015.
- [125] H Schwan, "Electrical properties of tissues and cell suspensions: mechanisms and models," *Engineering in Medicine and Biology Society, 1994. Engineering Advances: New Opportunities for Biomedical Engineers. Proceedings of the 16th Annual International Conference of the IEEE*, 1994.
- [126] Analog Devices, "Evaluation Board for the 250 kSPS 12-bit Impedance Converter Network Analyzer, Preliminary Technical Data EVAL-AD5934EB," 2007.
- [127] T Piasecki, **K Chabowski**, and K Nitsch, "Design, calibration and tests of versatile low frequency impedance analyser based on ARM microcontroller," *Measurement*, vol. 91, pp. 155-161, 2016.
- [128] Waveform Measurement and Analysis Technical Committee of the IEEE Instrumentation and Measurement Society, "IEEE Standard for Terminology and Test Methods for Analog-to-Digital Converters," 2001.
- [129] USB Impementers Forum, "Universal serial bus class definitions for communication devices," 2010.
- [130] W Olthuis, W Streekstra, and P Bergveld, "Theoretical and experimental determination of cell constants of planar-interdigitated electrolyte conductivity sensors," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 24-25, pp. 252-256, 1995.

- [131] L Rusiniak, "Electric properties of water. New experimental data in the 5 Hz – 13 MHz frequency range," *Acta Geophysica Polonica*, vol. 52, pp. 63-76, 2004.
- [132] J T Babauta and H Beyenal, "Mass transfer studies of *Geobacter sulfurreducens* biofilms on rotating disk electrodes," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 111, no. 2, pp. 285-294, 2014.
- [133] **K Chabowski** et al., "Impedancje sensors made in PCB and LTCC technologies for monitoring growth and degradation of pseudomonal biofilm," *Metrology and Measurement systems*, vol. 24, no. 2, pp. 369-380, 2017.
- [134] M Rabe, D Verdes, and S Seeger, "Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 162, no. 1-2, pp. 87-106, 2011.
- [135] Q Xie et al., "In situ monitoring of gold-surface adsorption and acidic denaturation of human serum albumin by an isolation-capacitance-adopted electrochemical quartz crystal impedance system," *Analytica Chimica Acta*, vol. 464, no. 1, pp. 65-77, 2002.
- [136] Xiulan Sun, Li Yan, and Yinzhi Zhang, "A rapid and specific immunosensor for the detection of aflatoxigenic *Aspergilli*," *European Food Research and Technology*, vol. 234, no. 6, pp. 1013-1021, 2012.
- [137] K Nieradka, T Gotszalk, and G Marek Schroeder, "A novel method for simultaneous readout of static bending and multimode resonance-frequency of microcantilever-based biochemical sensors," *Procedia Engineering*, vol. 5, pp. 910-913, 2010.
- [138] W Pang et al., "Piezoelectric microelectromechanical resonant sensors for chemical and biological detection," *Lab on a Chip*, vol. 12, no. 1, pp. 29-44, 2012.
- [139] Daniel Mandler and Shlomit Kraus-Ophir, "Self-assembled monolayers (SAMs) for electrochemical sensing," *Journal of Solid State Electrochemistry*, vol. 15, pp. 1535-1558, 2011.
- [140] Y H Tan et al., "Characterization of protein immobilization on nanoporous gold using atomic force microscopy and scanning electron microscopy," *Nanoscale*, vol. 3, no. 8, pp. 3395-3407, 2011.
- [141] J Leppiniemi et al., "Bifunctional avidin with covalently modifiable ligand binding site," *PLOS ONE*, vol. 6, no. 1, 2011.
- [142] "<https://www.thermofisher.com/pl/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/avidin-biotin-interaction.html>," dostęp 2.05.2017.
- [143] "<http://www.nanosensors.com/PPP-NCLR.htm>," dostęp 1.05.2017.
- [144] M Veiseh, M H Zareie, and M Zhang, "Highly Selective Protein Patterning on Gold–Silicon Substrates for Biosensor Applications," *Langmuir*, vol. 18, no. 17, pp. 6671-6678, 2002.
- [145] H Kim et al., "Selective immobilization of proteins on gold dot arrays and haracterization using chemical force microscopy," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 334, no. 2, pp. 161-166, 2009.
- [146] C Chai, J Lee, and P Takhistov, "Direct Detection of the Biological Toxin in Acidic Environment by Electrochemical Impedimetric Immunosensor," *Sensors*, vol. 10, no. 12, pp. 11414-11427, 2010.
- [147] S Sun et al., "Systematic evaluation of avidin–biotin interaction by fluorescence

spectrophotometry," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 89, pp. 99-104, 2012.

- [148] A F Junka, M Bartoszewicz, D Smutnicka, A Secewicz, and P Szymczyk, "Efficacy of antiseptics containing povidone-iodine, octenidine dihydrochloride and ethacridine lactate against biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* measured with the novel biofilm-oriented antiseptics test," *International Wound Journal*, vol. 11, no. 6, pp. 730-734, 2014.
- [149] A Bozkurt and A Lal, "Low-cost flexible printed circuit technology based microelectrode array for extracellular stimulation of the invertebrate locomotory system," *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 169, no. 1, pp. 89-97, 2011.