

## ПЛАНАРНЫЕ ЧИП-ФОРМАТЫ С Ni МИКРОЭЛЕКТРОДАМИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МАНИПУЛЯЦИЙ КЛЕТКАМИ В УСЛОВИЯХ ГИБРИДНОЙ ЭЛЕКТРОКИНЕТИКИ

<sup>2</sup>Т.И.Ореховская, <sup>1</sup>А.И. Драпеза, <sup>2</sup>С.К. Лазарук, <sup>1</sup>В.А. Лобан,  
<sup>1</sup>А.И. Хмельницкий, <sup>1</sup>В.А. Сысов, <sup>3</sup>Г.А. Скороход, <sup>3</sup>Е.И. Гудкова

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники

<sup>3</sup>Белорусский государственный медицинский университет

г. Минск, Республика Беларусь

*Показано, что исследуемая конструкция чип-формата кругового типа с Ni микроэлектродами не позволила достоверно выявить наличие электрокинетического конвективно-диффузионного транспорта микроорганизма *S.albicans* в 5 %-ом растворе глюкозы и 0,9 % растворе NaCl от электрических режимов. Показано, что электрокинетическое перемещение *S.aureus* в 0,9 % растворе NaCl, как и в случае с *S.albicans*, также не имеет явно выраженных сил направленного действия и носит чисто броуновский характер на частотах 0,3 кГц и 3,0 кГц. Показано, что незначительное количество направленных сил в области центрального электрода больше всего проявляется для *S.aureus* в 5 % растворе глюкозы на частоте 300 Гц. Показано наличие различного типа электролиза Ni микроэлектродов в 5 % растворе глюкозы, содержащей *S.aureus*, при определенных параметрах электрического режима управления электрокинетическим транспортом. Отмечено, что наблюдаемые виды коррозии могут быть вызваны значительным влиянием состава электролита и температуры на состояние поверхности неоптимизированных элементов конструкции никелевых микроэлектродов.*

**Ключевые слова:** электрокинетика, Ni микроэлектроды, конвекционно-диффузионный транспорт, PIV-анализ, 5 % раствор глюкозы, 0,9 % раствор NaCl, круговой чип-формат, микроорганизмы *S.aureus* и *C.albicans*

## PLANARY CHIP-FORMATS WITH Ni MICROELECTRODES FOR STUDY OF CELL MANIPULATIONS UNDER CONDITIONS OF HYBRID ELECTROKINETICS

<sup>2</sup>T.I. Orekhovskaya, <sup>1</sup>A.I. Drapeza, <sup>2</sup>S.K. Lazaruk, <sup>1</sup>V.A. Loban,  
<sup>1</sup>A.I. Khmelnitsky, <sup>1</sup>V.A. Sysov, <sup>3</sup>G.A. Skorokhod, <sup>3</sup>E.I. Gudkova

<sup>1</sup>Belarusian State University

<sup>2</sup>Belarusian State University of Informatics and Radioelectronics

*It is shown that the investigated design of a chip format of the circular-type with Ni microelectrodes did not reliably reveal the presence of electrokinetic convective-diffusion transport of the C. albicans microorganism in a 5 % solution of glucose and 0.9% NaCl solution from electrical regimes. It is shown that the electrokinetic movement of S. aureus in a 0.9% NaCl solution, as in the case of C. albicans, also has no explicit directional forces and is purely Brownian in nature at frequencies of 0.3 kHz and 3.0 kHz. It is shown that a small amount of directional forces in the region of the central electrode is most pronounced for S. aureus in a 5 % glucose solution at a frequency of 300 Hz. The presence of a different type of electrolysis of Ni microelectrodes in a 5% solution of glucose containing S. aureus is shown, with certain parameters of the electric control regime of electrokinetic transport. It is noted that the observed types of corrosion can be caused by the significant influence of the electrolyte composition and temperature on the state of the surface of the non-optimized elements of the construction of nickel microelectrodes.*

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

**E-mail:** drapeza@bsu.by

### **Введение**

Создание биопроцессорных чип-форматов планарного типа для информационных технологий ускоренного обнаружения и дифференциации инфекционных микроорганизмов на основе электрокинетических принципов их сепарации и концентрирования является одной из актуальных проблем повышения быстродействия и эффективности микробиологического анализа [1,2].

В силу целого ряда причин (отмывка инфекционных агентов на поверхности чип-форматов после их использования, оценка изменения исходных характеристик чип-формата, оценка целесообразности его повторного использования и калибровки и т.п.) разрабатываемые биопроцессорные чип-форматы стараются поставлять для систем измерения, наряду с химреактивами одноразового использования, в качестве одноразового расходного материала – загрузочного модуля. Стоимость такого загрузочного модуля, во-многом, определяется технологической сложностью изготовления его конструкции и наличием в ней драгметаллов.

Применение в качестве электрических проводников тонких никелевых пленок, нанесенных на стекло и доведенных по структуре, хотя бы, до 70 % уровня прозрачности, несомненно, представляет интерес для конструирования на их основе недорогих биопроцессорных чип-форматов для ускоренного микробиологического анализа, обладающих адгезионной стойкостью и антикоррозионностью [3]. Прозрачность биопроцессорных чип-форматов такого типа исключает необходимость функционализации мембраны инфекционных микроорганизмов люминофорами для последующей визуализации наблюдения за их электрокинетическим транспортом, что позволяет использовать для изучения электрокинетического транспорта только нативные формы микроорганизмов.

**Целью настоящей работы** является создание планарных чип-форматов с Ni микроэлектродами для изучения манипуляций клетками в условиях гибридной электрокинетики.

## Материалы и методы исследований

Для проведения электрокинетических исследований использовали разведение  $10^6$  КОЕ/мл односуточных культур микроорганизмов *C.albicans* и *S.aureus* в 5 %-ом растворе глюкозы и 0,9 % физрастворе. Тонкие пленки никеля на стеклянной подложке, имеющие толщину приблизительно 60 нм, создавали с помощью вакуумной электронно-лучевой установки типа Орион (БГУИР).

Исследования проводили на основе планарных трехэлектродных чип-форматов кругового типа, представленных на рис. 1, а,б. Диаметр топологического рисунка чувствительной области кругового чип-формата в виде эквидистантной спирали Архимеда составляет 6 мм. Для реализации различных микрогидродинамических конвективно-диффузионных потоков, в зависимости от электрических режимов, используется конфигурация микроэлектродов, фотография которой показана на рис. 1, б. Ширина микроэлектродов равна 10 и 50 мкм. Ширина зазоров – 10 и 30 мкм.

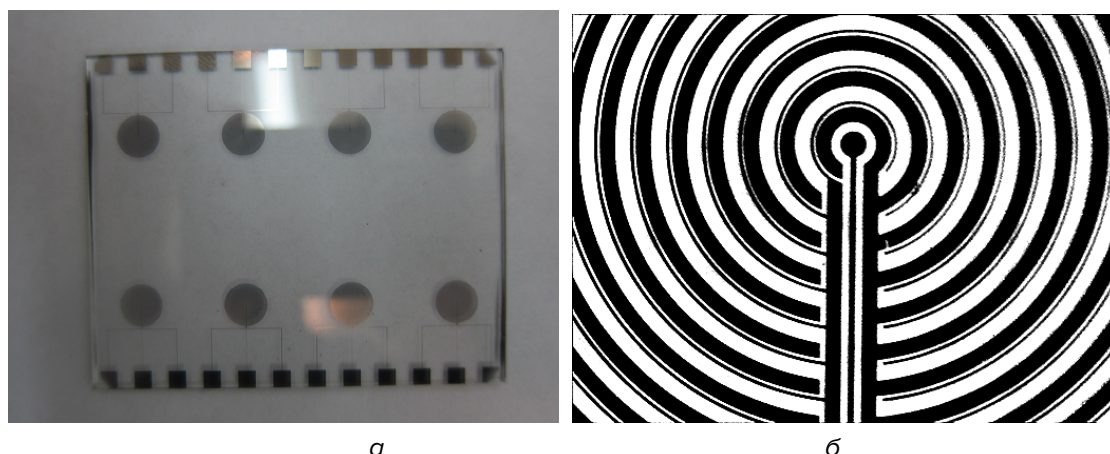


Рис. 1. Фотографии массива чип-формата с Ni микроэлектродами на стеклянной подложке (а) и топологического рисунка их чувствительной области (б)

Для проведения электрокинетических исследований использовали экспериментальную установку аппаратно-программного типа [4] и одноразовые измерительные ячейки (рис. 2). Объектив цифровой фотокамеры при исследованиях фокусировался вблизи исследуемой микроэлектродной поверхности. Функциональные возможности и характеристики экспериментальной установки приведены в указанной работе [4]. Одноразовые ячейки для кругового чип-формата имеют объем приблизительно 4,0 мкл. Для стенок камеры ячейки использовалось кольцо высотой  $h = 80$  мкм с внутренним и внешним диаметрами 8 мм и 10 мм соответственно. Верхняя часть камер ячеек, с исследуемыми растворами, закрывались покровным стеклом.

Для изучения направлений и скоростей микрожидкостных потоков клеток использовалось программное приложение PIV (Particle Image Velocimetry) к MATLAB (7.10.0, R2010a). В PIV-анализе форма линии со стрелкой показывает направление движения микроорганизмов, а длина линии со стрелкой отражает скорость  $V$  их перемещения, которую можно оценить с помощью соотношения, полученного нами в процессе калибровки,  $V = 102 \cdot 10^{-9} \text{ м}/(\text{pixel} \cdot t_{\text{зв}})$ , где м – метр,  $t_{\text{зв}}$  – время записи видеоматериалов.

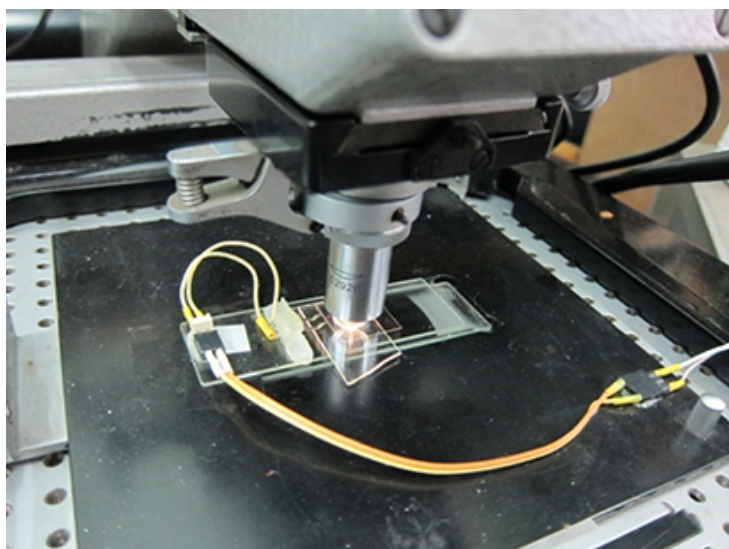


Рис. 2. Экспериментальная установка для одноразовой измерительной ячейки

### Результаты исследований и обсуждение

Исследования электрокинетики перемещения микроорганизмов *S.albicans* и *S.aureus* были проведены в 0,9 %-ом растворе NaCl и 5 %-ом растворе глюкозы. Значения проводимости 0,9 %-го раствора NaCl и 5 %-го раствора глюкозы на частоте 1 МГц были соответственно равны 6,0 мСм/см и 64,0 мкСм/см.

Электрические режимы задавались с помощью функционального генератора (ФГ), входящего в состав установки [4]. Для формирования гибридной электрокинетики конвективно-диффузионного типа использовали круговой трехэлектродный чип-формат с микроэлектродами из Ni. Два отдельных генератора переменного напряжения  $U_{пер1}$  и  $U_{пер2}$ , запускающиеся одновременно с нулевой фазы, подключались к крайним контактам чип-формата. Генератор для задания постоянного напряжения смещения подключался к центральному контакту используемого кругового чип-формата, как показано на рис. 3

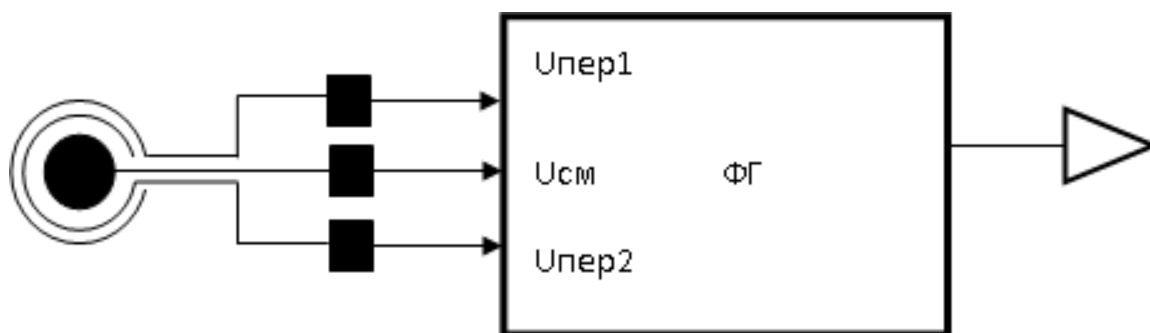


Рис. 3. Обобщенная структурная схема задания параметров электрического режима с помощью трехэлектродного чип-формата

В табл. 1 приведены параметры электрических режимов, используемых для манипуляции перемещения микроорганизмов *S.albicans* в 5 % растворе глюкозы и в 0,9 % физрастворе NaCl. Время записи видеоматериалов  $t_{зв}$  для каждой среды и каждого электрического режима составляло 10 минут. Для указанных случаев запись видеоматериалов проводилась в области центрального электрода.

**Параметры электрических режимов манипуляции  
электрокинетическим транспортом микроорганизмов *S.albicans*  
в 5 %-ом растворе глюкозы и 0,9 % физрастворе NaCl**

№режима	$U_{см}$ , В	$U_{неп1}$ , В	$U_{неп2}$ , В	$f$ , Гц
1	1,0	10,0	6,0	3000,0
2	-1,0	10,0	6,0	3000,0
3	-1,0	10,0	6,0	300,0
4	1,0	10,0	6,0	300,0

Полученные результаты PIV-обработки показывают, что для всех электрических режимов, представленных в табл. 1, и используемых сред, характер перемещения *S.albicans* практически один и тот же. Анализ графического материала (направлений и длины векторных линий) показывает, что данный тип перемещения является практически броуновским, поскольку нет явно выраженных сил направленного действия, при которых увеличивается длина и изменяются направления векторных линий.

Поскольку данные процессы были типичными для всех электрических режимов и сред (5 % раствор глюкозы и 0,9 % физраствор NaCl), то для наглядности на рис. 4 показана только PIV-обработка видеоматериалов в области центрального электрода для 4-го режима (табл. 1) в 5 % растворе глюкозы.

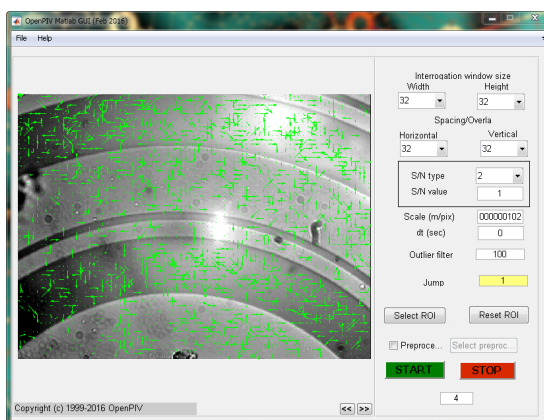


Рис. 4. Скан Windows-окна программы с результатами векторной PIV-обработки *S.albicans* в 5 % растворе глюкозы для 4-го режима

Анализ полученных видеоматериалов показал, что для всех электрических режимов табл. 1 каких-либо видимых повреждений поверхности микроэлектродов за счет электролиза не наблюдалось.

Для оценки функциональных возможностей исследуемой планарной конструкции трехэлектродного чип-формата, фотография топологического рисунка микроэлектродов которого приведена на рис. 1, б, были проведены аналогичные исследования на бактериях *S.aureus* в тех же средах. Параметры исследуемых электрических режимов приведены в табл. 2.

Анализ результатов PIV-обработки видеоматериалов, в области центрального электрода, для *S.aureus* в 0,9 % растворе NaCl показал (рис. 5, а, б), что их перемещение, как и в случае с *S.albicans*, также не имеет явно выраженных сил направленного действия и носит чисто броуновский характер на частотах 0,3 кГц и 3,0 кГц. Это связа-

но, скорее всего, с тем, что Ni в 0,9 % растворе NaCl обладает повышенной коррозионной устойчивостью за счет образования пассивирующей окисной пленки, поскольку уровень его стандартного электродного потенциала  $\varphi_{Ni^{2+}/Ni} = -0,25$  В остается отрицательным и близким к уровню значения  $\varphi_{Ni} = -0,007$  В, например, для аэрированного 3 % раствора NaCl, что говорит о заметном снижении поверхностной активности силы тока обмена на границе раздела металл – раствор [5].

При переходе к исследованиям конвективно-диффузионного транспорта *S.aureus* в 5 % растворе глюкозы исходные параметры электрического режима 1 были выбраны аналогичными режиму 4 для 0,9 % раствора NaCl (табл. 2).

**Табл. 2**

**Электрические режимы манипуляции электрокинетическим транспортом микроорганизмов *S.aureus* в 5 %-ом растворе глюкозы и 0,9 % растворе NaCl**

N режима	$U_{см}, В$	$U_{пер1}, В$	$U_{пер2}, В$	$f, Гц$
	0,9 % раствор NaCl			
1	1,0	10,0	6,0	3000,0
2	-1,0	10,0	6,0	3000,0
3	-1,0	10,0	6,0	300,0
4	1,0	10,0	6,0	300,0
5 % раствор глюкозы				
1	1,0	10,0	6,0	300,0
2	1,0	4,0	2,0	300,0
3	1,0	4,0	2,0	1000,0
4	1,0	4,0	2,0	10000,0
5	1,0	4,0	2,0	10,0

При просмотре видеоматериалов, полученных для электрического режима 1 (*S.aureus* в 5 % растворе глюкозы), было обнаружено наличие процесса электролиза на микроэлектроде шириной 50 мкм, к которому подключена сеть круговых микроэлектродов шириной 10 мкм (рис. 5, а).

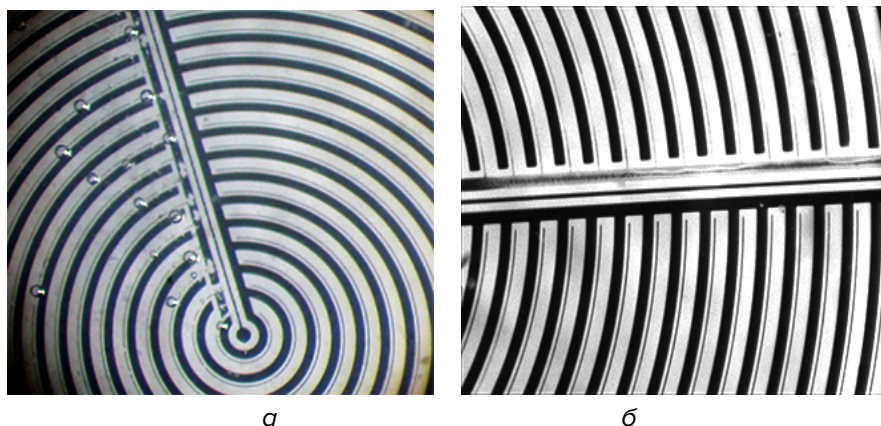


Рис. 5. Фотографии поверхности трехэлектродного чип-формата для *S.aureus* в 5 %-ом растворе глюкозы при электрических режимах 1 (а) и 5 (б) согласно табл. 2



Анализ схемного подключения данного электрода показывает, что он является анодом, на который подано переменное напряжение, имеющее амплитуду 10 В (от пика до пика) и частоту 300 Гц. К другому крайнему микроэлектроду, ширина которого по всей чувствительной области составляет 50 мкм, было подано переменное напряжение аналогичной частоты с амплитудой (от пика до пика) 6 В.

Возникновение в пределах поверхности электрода, имеющего ширину 50 мкм, точечной коррозии «язвенного» типа, или коррозии пятнами, показанной на рис. 5, а, может быть вызвано значительным влиянием состава электролита на состояние поверхности Ni. Это может происходить, например, когда одни из ионов 5 % раствора глюкозы будут оказывать активирующее действие, усиливая протекание анодного растворения Ni. В тоже время другие ионы могут затруднять прохождение анодной реакции, образуя в пределах поверхности данного электрода пассивные пленки. Одновременное присутствие данных процессов в результате конкурирующей адсорбции будут приводить к усилению анодного процесса разрушения Ni на одних и образованию пассивной плёнки на других участках поверхности микроэлектрода [5]. Кроме того, такому сценарию прохождения электрохимических реакций может способствовать заданный электрический режим, обеспечивающий высокую плотность тока на 10 мкм электродах, и отсутствие одновременности их отрыва от поверхности широкого микроэлектрода.

Для проведения дальнейших исследований поврежденный чип-формат был заменен новым, а также были изменены параметры электрических режимов  $U_{\text{пер}1} = 4 \text{ В}$  и  $U_{\text{пер}2} = 2 \text{ В}$ , для которых были получены видеоматериалы на различных частотах (0,3; 1,0; 10,0) кГц и проведена их PIV-обработка. Результаты PIV-обработки приведены на рис. 6.

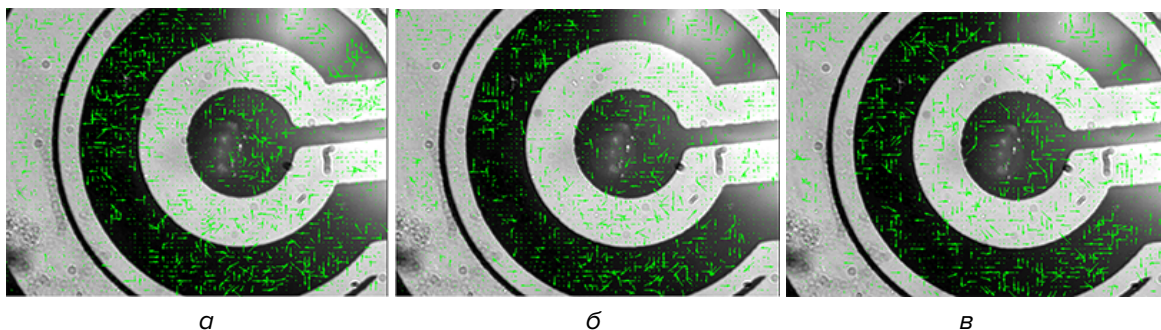


Рис. 6. Результаты PIV-обработки видеоматериалов для *S.aureus* в 5 % растворе глюкозы на частотах: а – 300Гц; б – 1000Гц; в – 10000 Гц

На рис. 6 видно, что незначительное количество направленных сил в области центрального электрода больше всего проявляется на частоте 300 Гц (рис. 6, а), хотя частичное проявление этих сил наблюдается и на других частотах. Практически отсутствуют перемещения в 10 мкм зазоре на всех частотах. Для более объективного PIV-анализа необходимо увеличивать прозрачность данного типа микроэлектродов. Кроме того, анализ полученных видеоматериалов на частотах (0,3; 1,0; 10,0) кГц показал отсутствие видимых изменений в различных областях поверхности пленочных микроэлектродов из никеля.

При переходе на частоту 10 Гц, при указанных в табл. 2 параметрах электрического режима 5, в 5 % растворе глюкозы наблюдался, согласно полученным видеоматериалам, электролиз, вид которого показан на рис. 5, б. Объяснение наблюдаемому явлению может быть следующим. Электрохимический электролиз происходит на аноде никелевого электрода при изменяющейся напряженности поля от 0 В/м до

$\pm 2 \cdot 10^5$  В/м за время приблизительно равное 100 мс (время периода на частоте 10 Гц), что значительно больше значений времен для частот (0,3; 1,0; 10,0) кГц. При такой длительности квазичастотного воздействия происходит постепенное локальное повышение температуры электролита в области анодного 50 мкм электрода за счет более длительного влияния на него повышенной плотности тока. Повышение температуры, в свою очередь, оказывает значительное влияние на увеличение скорости электрохимической коррозии никелевого анода в 5 % растворе глюкозы за счет возможных изменений скорости диффузии, перенапряжения электродных процессов, степени анодной пассивности, растворимости деполяризатора и вторичных продуктов коррозии [5].

Предполагаемый механизм электрохимической коррозии анодного никелевого электрода подтверждается приводимой на рис. 5, б фотографией. На фотографии видно, что в тех местах, где уже исчезли контакты 10 мкм проводящих дорожек с широким 50 мкм электродом, широкий электрод корродирует сильнее, скорее всего, за счет более высокой плотности тока в данных местах.

Таким образом, полученные результаты исследований показали, что для повышения эффективности управления гибридным электрокинетическим транспортом микроорганизмов *S.aureus* и *C.albicans* необходимо усовершенствование и оптимизация конструкции и технологии изготовления биопроточного чип-формата.

### Заключение

Показано, что исследуемая конструкция чип-формата кругового типа с Ni микроэлектродами не позволила достоверно выявить наличие электрокинетического конвективно-диффузионного транспорта микроорганизма *C.albicans* в 5 %-ом растворе глюкозы и 0,9 % растворе NaCl от различных электрических режимов.

Показано, что электрокинетическое перемещение *S.aureus* в 0,9 % растворе NaCl, как и в случае с *C.albicans*, также не имеет явно выраженных сил направленного действия и носит чисто броуновский характер на частотах 0,3 кГц и 3,0 кГц.

Показано, что незначительное количество направленных сил в области центрального электрода больше всего проявляется для *S.aureus* в 5 %-ом растворе глюкозы на частоте 300 Гц.

Показано наличие различного типа электролиза Ni микроэлектродов в 5 % растворе глюкозы, содержащей *S.aureus*, при определенных параметрах электрического режима управления электрокинетическим транспортом. Отмечено, что наблюдаемые виды коррозии могут быть вызваны значительным влиянием состава электролита и температуры на состояние поверхности неоптимизированных элементов конструкции никелевых микроэлектродов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Кухтевич, И.В. Микрофлюидные устройства для исследования клеток (Обзор) / И.В. Кухтевич, А.А.Евстратов, А.С. Букатин // Научное приборостроение, 2013, том23, №4. – с. 66–75.
2. Rapid (<5 min) identification of pathogen in human blood by electrokinetic concentration and surface-enhanced Raman spectroscopy / I-Fang Cheng [et al.] // Scientific Reports. 2013. 3:2365. DOI:10.1038/strep02365
3. Точицкий, Т.А. Влияние подложки на формирование структуры переходных слоёв в электролитических плёнках никеля / Т.А. Точицкий // Поверхность, 1998. №10. –С. 68–72.
4. Экспериментальная установка для электрокинетического управления разделением и концентрированием клеток на поверхности планарной конструкции микрочипа из микрокапли суспензий / Т. И. Ореховская [и др.] // Современные методы и технологии создания и обработки материалов: сб. научных трудов. В 3 кн. Кн. 2. Технологии и оборудование механической и физико-технической обработки/ редкол.: А.В.Белый (гл. ред.) [и др.]. — Минск: ФТИ НАН Беларуси, 2017. — С. 229–237.
5. Гурский, Л.И. Структура и кинетика взаимодействия металла с окисляющими средами / Л.И. Гурский, В.А. Зеленин. — Минск: Наука и техника. 1982, - 192 с.



## REFERENCES

1. Kukhtevich I.V., Yevstratov A.A., Bukatin A.S. Mikroflyuidnyye ustroystva dlya issledovaniya kletok (Obzor)[Microfluidic devices for cell studies: (Review)] // Nauchnoye priborostroyeniye[Scientific Instrumentation], 2013, V.23, iss.4, pp.66–75. (in Russ.)
2. I-Fang Cheng, Hsien-Chang Chang [et al.] Rapid (<5 min) identification of pathogen in human blood by electrokinetic concentration and surface-enhanced Raman spectroscopy // Scientific Reports, 2013, 3:2365. DOI:10.1038/strep02365
3. Tochitskiy T.A. Vliyaniye podlozhki na formirovaniye struktury perekhodnykh sloyov v elektroliticheskikh plonkakh nikelya [Effect of a substrate on the formation of the structure of transition layers in electrolytic nickel films] // Poverkhnost', 1998. N°10. pp. 68–72. (in Russ.)
4. Loban B. A., Drapeza A. I., Lazaruk C. K., Orekhovskaya T. I., Khmelnitsky A. I., Rudenko D. A., Skorokhod G. A., Gudkova E. I. Eksperimental'naya ustanovka dlya ehlektrokineticheskogo upravleniya razdeleniem i koncentrirovaniem kletok na poverkhnosti planarnoy konstrukcii mikrochipa iz mikrokapli suspensij [Laboratory made instrument for electrokinetic control separation and concentration of cells on surface of planar microchip structures out of a suspensions microdrop] / Sovremennyye metody i tekhnologii sozdaniya i obrabotki materialov [Advanced Methods and Technologies of Materials Development and Processing]. Collection of scientific papers, Minsk, FTI NAN Belarusi [PTI NAS Belarus], A.V. Byeli (ed.), 2017, vol. 2, pp. 229–237. (in Russ.)
5. Gurskiy L.I., Zelenin V.A. Struktura i kinetika vzaimodeystviya metalla s okislyayushchimi sredami [Structure and kinetics of metal interaction with oxidizing media]. Minsk: Nauka i tekhnika. 1982,- 192 p. (in Russ.)

*Статья поступила в редакцию в окончательном варианте 11.05.18*