

ИЗУЧЕНИЕ УСЛОВИЙ ПРИМЕНИМОСТИ РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ УСКОРЕННОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *E. COLI* И *S. AUREUS*, ВЫДЕЛЯЕМЫХ ИЗ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ БИОПРОЦЕССОРАМИ С ТОНКОПЛЕНОЧНЫМИ ИТО-МИКРОЭЛЕКТРОДАМИ

¹С. К. Лазарук, ²А. И. Драпеза, ³Г. А. Скороход,

²В. А. Лобан, ²А. И. Хмельницкий,

¹Т. И. Ореховская, ¹А. В. Долбик

¹Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники,
г. Минск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный университет,
г. Минск, Республика Беларусь

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

*Изучены условия применимости рамановской спектроскопии для ускоренной динамической идентификации бактерий *E.coli* и *S.aureus*, которые выделяют из цельной крови биопроцессорами с тонкопленочными ИТО-микроэлектродами. Показано, что при выделении бактерий *S.aureus* в цельной крови с антикоагулянтом ЭДТА, месячной выдержки в холодильнике, оптически прозрачный доступ к ним обеспечивается на площадях размером 6 358,5 и 314 μm^2 , представляющих центральный микроэлектрод и его контактную дорожку, через 500 и 800 с соответственно. Показано, что оптически прозрачный доступ к выделенным бактериям обеспечивается на площадях размером $\sim 6\ 358,5$ и $\sim 11\ 304\ \mu\text{m}^2$ через 820 и 899 с соответственно, для цельной крови, суточной выдержки в холодильнике, с бактериями *S.aureus* в отсутствие антикоагулянта. Показано, что оптически прозрачный доступ к выделенным бактериям *E.coli* в цельной крови суточной выдержки, в отсутствие антикоагулянта, обеспечивается на площадях размером $\sim 6\ 358,5$ и $\sim 1\ 962\ \mu\text{m}^2$, представляющих центральный микроэлектрод и его контактную дорожку, через 500 и 600 с соответственно. Показано, что при лазерной идентификации бактерий *S.aureus* и *E.coli*, выделяемых с помощью трехэлектродных биосенсорных чип-форматов с ИТО-микроэлектродами, на длине волны 532 нм погрешность точности накопления сигнала в диапазоне волновых чисел (400–2000) cm^{-1} лежит в диапазоне от 0,17 до 6,2 %, в зависимости от области выделения, при размере площади лазерного «пятна» диаметром 5 μm .*

Ключевые слова: биопроцессорный чип-формат, ИТО-микроэлектроды, бактерии *S.aureus* и *E.coli*, сепарация и концентрирование, ускоренная динамическая идентификация, рамановская спектроскопия

STUDYING THE CONDITIONS OF APPLICABILITY OF THE RAMAN SPECTROMETRY FOR ACCELERATE IDENTIFICATION OF BACTERIA *E.COLI* AND *S.AUREUS* ALLOCATED FROM WHOLE BLOOD BIOPROCESSORS WITH THIN-FILM ITO-MICROELECTRODES

¹S. K. Lazaruk, ²A. I. Drapeza, ³G. A. Skorokhod,
²V. A. Loban, ²A. I. Khmel'nitsky,
¹T. I. Orekhovskaya, ¹A. V. Dolbik

¹Belarusian State University of Informatics and Radioelectronics,
Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian State University,
Minsk, Republic of Belarus

³Belarusian State Medical University,
Minsk, Republic of Belarus

The conditions for the applicability of raman spectrometry for accelerated dynamic identification of E.coli and S.aureus bacteria allocated from whole blood by bioprocessors with thin-film ITO microelectrodes were studied. It has been shown that when S.aureus bacteria are allocated in whole blood with EDTA anticoagulant, kept in a refrigerator for a month, optically transparent access is provided on areas of 6 358.5 and 314 μm^2 , representing the central microelectrode and its contact path, after 500 and 800 seconds, respectively. It has been shown that optically transparent access to allocated bacteria is provided on areas of $\sim 6\ 358.5$ and $\sim 11\ 304\ \mu\text{m}^2$ in 820 and 899 seconds, respectively, for whole blood, daily refrigeration, with S. aureus bacteria in the absence of an anticoagulant. It has been shown that optically transparent access to allocated E. coli bacteria in whole blood of daily exposure, in the absence of an anticoagulant, is provided on areas of $\sim 6\ 358.5$ and $\sim 1\ 962,5\ \mu\text{m}^2$ in size, representing the central microelectrode and its contact path, after 500 and 600 seconds, respectively. It is shown that at a laser beam wavelength of 532 nm, the error in the accuracy of signal accumulation in the wave number range (400–2000) cm^{-1} , depending on the place of the measurements, when identifying allocated S.aureus and E.coli bacteria using three-electrode bioprocessors with ITO-microelectrodes, lies in the range from 0.17 to 6.2 %.

Keywords: bioprocessor chip format, ITO microelectrodes, bacteria *S.aureus* and *E.coli*, separation and concentration, accelerated dynamic identification, raman spectrometry

e-mail: serg@nano.bsuir.edu.by

Результаты исследований, полученные нами ранее на биопленках бактерий *E.coli* и *S.aureus*, показывают, что исходные зарядовые состояния, в условиях структурно-функциональной целостности их мембран, имеют значительные различия между собой по вольт-амперным зависимостям и характеристикам рамановского спектра. Эти различия могут выступать в качестве отдельных маркеров для их быстрой идентификации [1].

Однако, создание технических конструкций для практического использования тонкопленочных биопроцессорных чип-форматов, обеспечивающих в реальном времени совместимость процессов выделения из гетерогенной фазы цельной крови бактерий *E.coli* и *S.aureus* и высокую точность измерений значений их макроскопической электропроводимости, представляет собой достаточно сложную задачу.

В то же время, идентификацию бактерий *E.coli* и *S.aureus* в гетерогенной фазе цельной крови, выделяемых технологиями электрокинетической сепарации и концен-

трирования с использованием биопроцессоров, имеющих тонкопленочные микроэлектроды, предпочтительнее проводить на основе оптических методов диагностики неизвестного заранее состава молекулярной среды. Таким методом является спектроскопия комбинационного рассеяния света (рамановская спектрометрия), не требующая, к тому же, и сложной подготовки образцов для проведения исследований. Использование оптических систем известных марок для регистрации рамановских спектров, обладающих широкими функциональными возможностями, но и высокой исходной стоимостью, требует дополнительных интеллектуальных, денежных и временных затрат для обеспечения условий ускоренной идентификации, связанных с совмещением электрокинетических методов выделения и оптических методов идентификации бактерий в пределах металлизированной области биопроцессора [2].

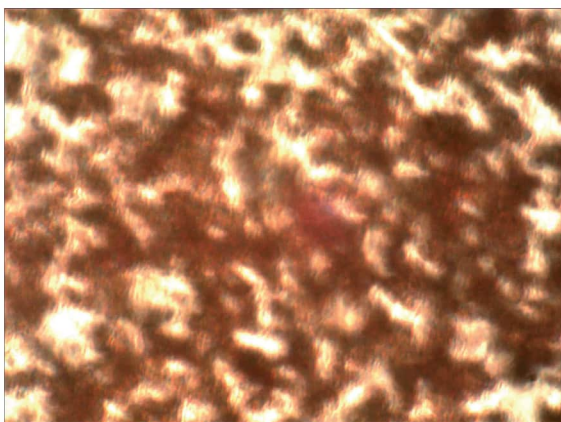
Разработку методов ускоренной идентификации бактерий на основе измерения параметров рамановского спектра целесообразно проводить путем встраивания в оптический микроскоп портативных узлов рамановского спектрометра и использовать динамический режим идентификации в реальном времени. Данный подход требует предварительных исследований по выяснению условий измерения параметров идентификации, при которых обеспечивается более высокая достоверность различия бактерий. Например, размер площади выделенных с помощью биопроцессора бактерий должен быть значительно больше размера площади лазерного «пятна». Кроме этого, должны обеспечиваться условия краткосрочного сохранения перед измерением топологического рисунка распределения бактерий и соответствующий уровень оптической прозрачности измерительной ячейки, а также подбор мощности лазерного луча, чтобы избежать повреждения клеток во время измерений, выбор времени экспозиции и времени накопления сигнала в заданном диапазоне волновых чисел, отсутствия фоновых изменений сигнала [3].

Сила внешней поляризация гетерогенной фазы исследуемой среды определяется типом металла микроэлектродов биопроцессора и условиями ее выделения. Различные металлы для микроэлектродов и методы их изготовления могут приводить к значительным различиям в силе воздействия при выделении и концентрировании фазы исследуемой среды, например, за счет различий в гидрофильности металлических поверхностей и/или их развитости. Это требует изучения условий их применимости для вышеназванных методов идентификации, например, при оценке размера площади лазерного «пятна», связанной с повышением точности измерения в заданном диапазоне волновых чисел для выделяемых бактерий [4].

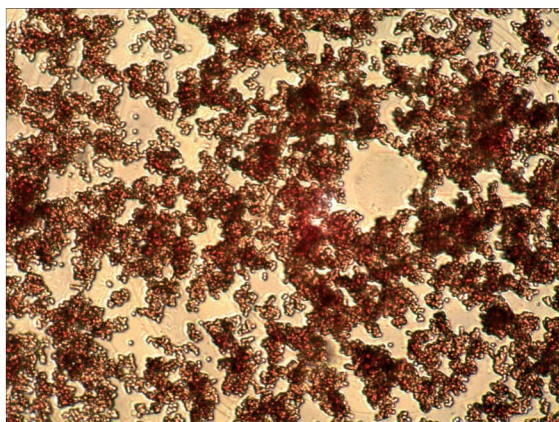
Целью данной работы является изучение условий применимости рамановской спектрометрии для ускоренной идентификации бактерий *E.coli* и *S.aureus*, которые выделяют из цельной крови биопроцессорами, имеющими тонкопленочные ИТО-микроэлектроды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

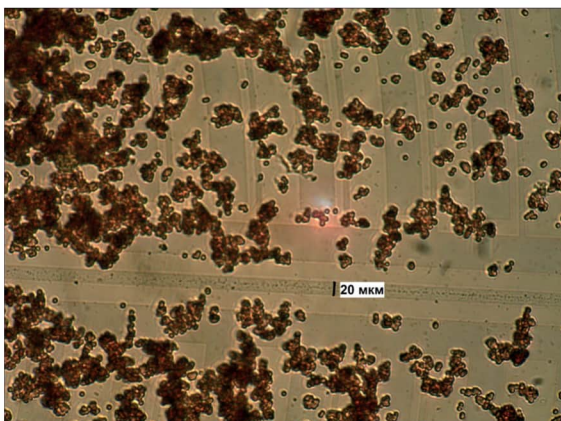
Для проведения исследований использовали трехэлектродные биопроцессорные чип-форматы с ИТО-микроэлектродами на стеклянной подложке, изготовленные с помощью технологии высокочастотного (ВЧ) магнетронного распыления [4]. Микроэлектроды имеют толщину 100 нм и поверхностное сопротивление ~ 50 Ом/мм. Топологический рисунок центральной части и размеры микроэлектродов показаны на рис. 1.



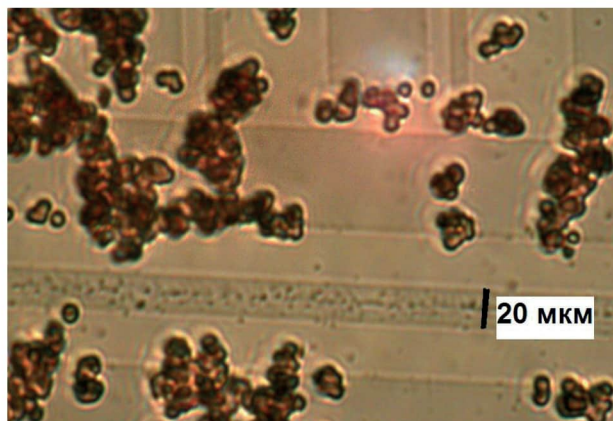
а



б



в



г

Рис. 2. Фотоматериалы процесса сепарации и концентрирования цельной крови с бактериями *S.aureus* и антикоагулянтом ЭДТА в моменты времени, с:
а – 100, б – 500, в – 800; г – фрагмент рис. 2в

Для оценки результатов исследований, согласно решаемым задачам, на рис. 2а, б, в приведены фотоматериалы процесса сепарации и концентрирования цельной крови с антикоагулянтом ЭДТА в моменты времени 100, 500 и 800 с. Из полученных фотоматериалов, представленных на рис. 2а, можно видеть, что через 100 с после заполнения закрытой измерительной ячейки происходят электрокинетические процессы сепарации эритроцитов и концентрирования бактерий. При этом только к 500 с происходит полное удаление с поверхности центрального круглого электрода эритроцитов и концентрирование на данной поверхности бактерий *S.aureus*, имеющих значительно меньший размер (рис. 2б). К 800 с полностью очищается от эритроцитов и поверхность контактной дорожки шириной 20 μм, исходящая от центрального круглого микроэлектрода, диаметром 90 μм. Из выделенного с рис. 2в фрагмента видно, что середина контактной дорожки центрального токопроводника на протяжении всей ее длины заполнена цепочечным расположением бактерий *S.aureus*. Механизм электрокинетических процессов такой сепарации эритроцитов и концентрирования бактерий на контактной дорожке центрального микроэлектрода отрабатывается трехэлектродным биопроцессором всякий раз, когда более высокое переменное напряжение U_1 подается на контактную дорожку, от которой исходят более широкие концентрические микроэлектроды, в нашем случае – 50 μм.

Полученные результаты исследования показывают, что подобранный состав среды экспериментального раствора и параметры электрокинетического режима раздвигают достаточно большие по размерам кластеры эритроцитов при выделении бактерий *S.aureus*, обеспечивая оптически прозрачный доступ к ним на занимаемых ими площадях ($\sim 6\ 358,5$ и $\sim 314\ \mu\text{m}^2$), которые могут быть использованы для идентификации.

Цельная кровь с бактериями *S.aureus* в отсутствие антикоагулянта ЭДТА. На рис. 3а–г приведены результаты предварительных исследований цельной крови бактерий *S.aureus* без антикоагулянта ЭДТА, имеющей почасовую или односуточную выдержку в холодильнике, представляющие собой фотоматериалы процесса сепарации и концентрирования цельной крови без антикоагулянта ЭДТА в моменты времени 300, 500, 820 и 899 с. При измерениях были использованы следующие подобранные параметры электрокинетического режима управления $U_1 = 12\ \text{В}$ (от пика до пика), $U_2 = 8\ \text{В}$ (от пика до пика), $U_{\text{см}} = 0,50\ \text{В}$, частота 801,0 Гц. Соотношение состава экспериментального раствора относительно цельной крови без антикоагулянта ЭДТА и бактерий *S.aureus* выбрано 1:1.

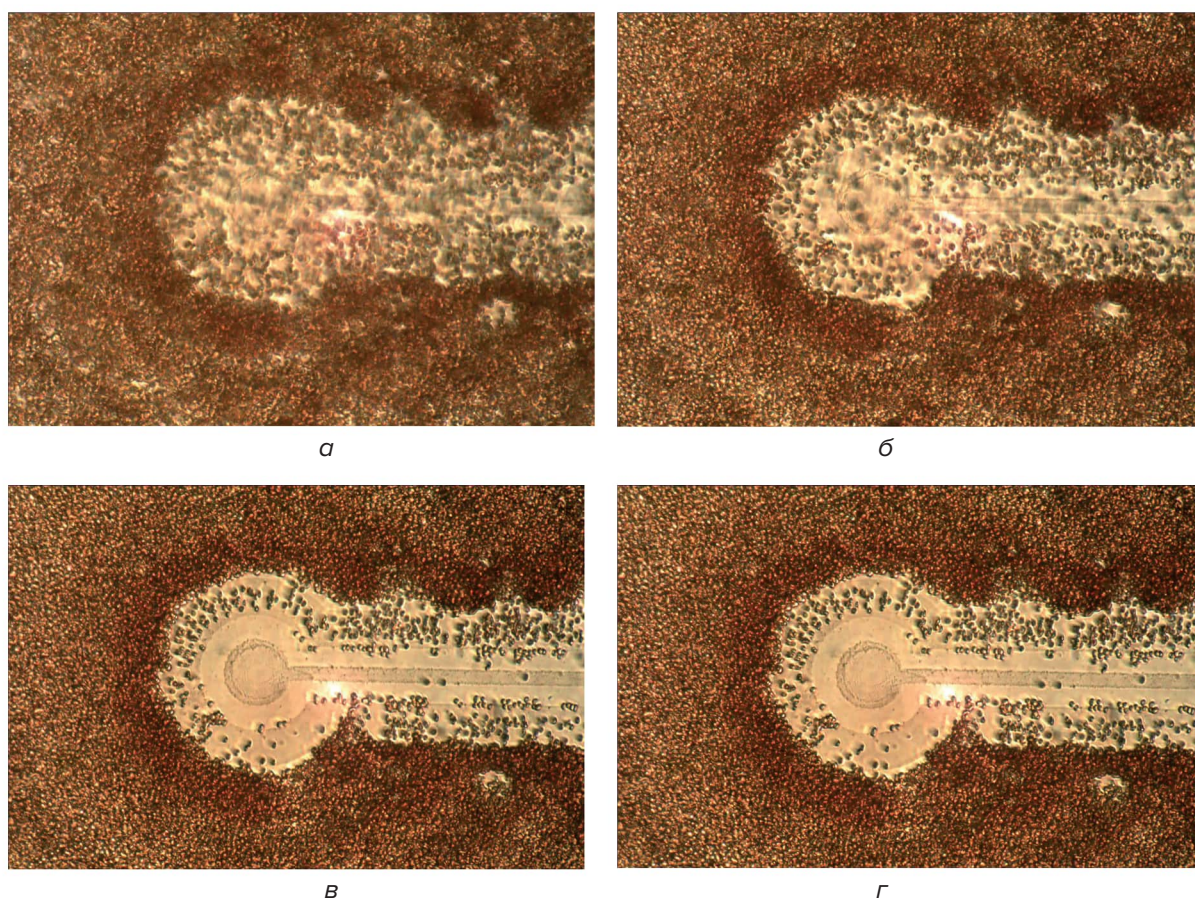


Рис. 3. Фотоматериалы процесса сепарации и концентрирования цельной крови с *S.aureus* в отсутствие антикоагулянта ЭДТА в моменты времени, с:
а – 300, б – 500, в – 820, г – 899

Из фотоматериалов рис. 3а видно, что объектив микроскопа сфокусирован на поверхность микроэлектродов. Поверхности центрального круглого электрода и контактного токопроводника практически полностью очищены от эритроцитов, поскольку не видно сфокусированных эритроцитов на их поверхностях. Однако над их поверхностями в момент времени 300 с наблюдаются темные размытые пятна, представляющие собой несфокусированные эритроциты, которых через 300 с еще достаточно

много, чтобы применить оптические методы для ускоренной идентификации бактерий *S.aureus*. Их становится значительно меньше к моменту времени 500 с, но еще достаточно, чтобы воздержаться от применения оптических методов (рис. 3б). К моменту времени 820 с (рис. 3в) по краям круглого кольца видны отдельные эритроциты, еще не прикрепленные к поверхности круглого электрода, но достаточно близко к ней. Хорошо просматриваются бактериальные клетки, которые плотным широким кольцом расположились на поверхности круглого центрального микроэлектрода. Внутри данного кольца имеется практически пустая от бактерий круглая область небольших размеров. На внешней окружности кольца наблюдается значительное количество бактерий в виде прямоугольного треугольника, выступающего в сторону контактного токопроводника, по центру которого в виде линии также расположились бактериальные клетки *S.aureus*.

Из микрофотографий рис. 3в и рис. 3г, согласно рис. 1, следует, что оптически прозрачный доступ к выделенным бактериям обеспечивается на площадях размером $\sim 6\,358,5$ и $\sim 11\,304\ \mu\text{m}^2$ через 820 и 899 с соответственно, которые могут быть использованы для идентификации.

Цельная кровь с бактериями *E.coli* в отсутствии антикоагулянта ЭДТА. На рис. 4а–г представлены результаты исследований для бактерий *E.coli*, проведенных с помощью аналогичных трехэлектродных биопроцессорных чип-форматов с ИТО-микроэлектродами. Использованы аналогичные соотношения состава среды и параметров электрического режима, а также аналогичные объемы суспензии для заполнения измерительной ячейки закрытого типа.

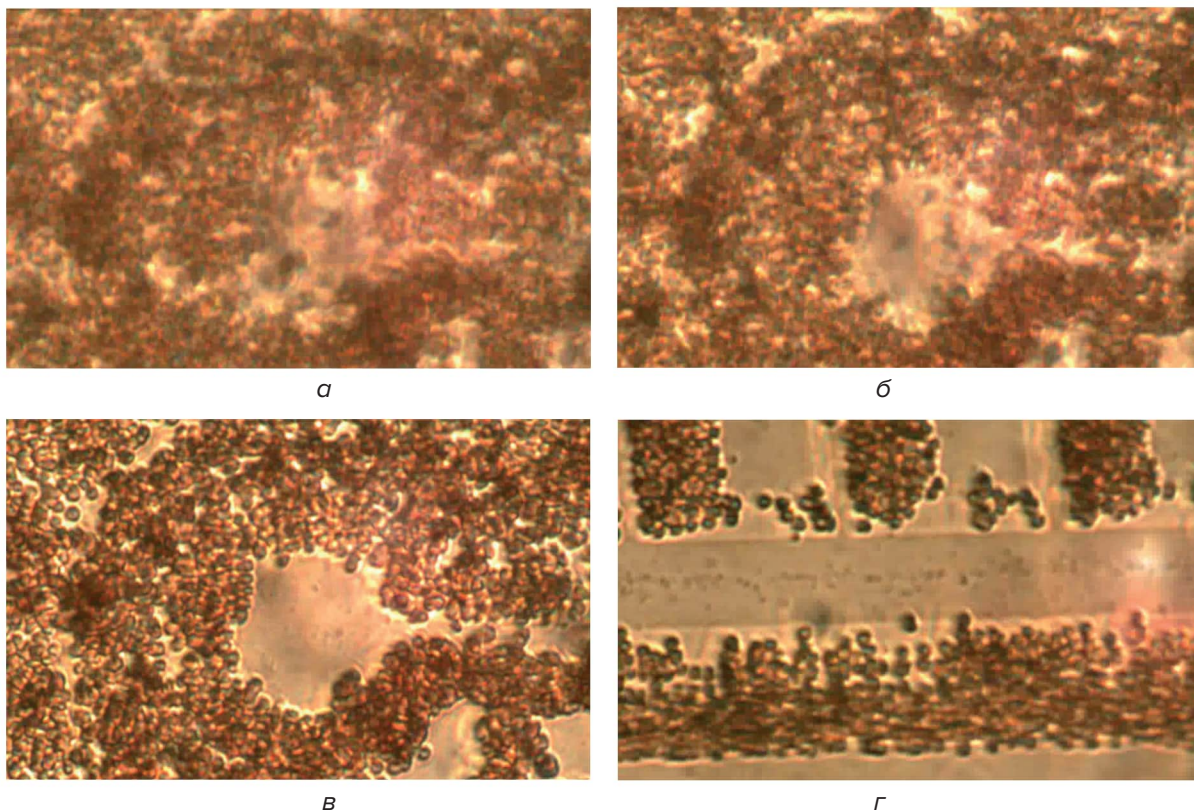


Рис. 4. Фотоматериалы процесса сепарации и концентрирования цельной крови с бактериями *E.coli* в отсутствии антикоагулянта ЭДТА в моменты времени, с:

а – 200, б – 300, в – 500; г – микрофотография процесса сепарации и концентрирования бактерий *E.coli* через 600 с с помощью аналогичного чип-формата при подаче на контактную дорожку напряжения U_1 , от которой исходят концентрические микроэлектроды шириной 10 μm

Полученные при этом микрофотоматериалы показывают, что к 200 с при бактериях *E.coli* в составе суспензии наблюдается просветление в области круглого центрального микроэлектрода. Аналогичная активность происходит и во внешнем окружении центрального микроэлектрода, в отличие от предыдущего типа бактерий *S.aureus*. Однако, к этой секунде площадь центрального микроэлектрода еще довольно плотно закрыта несфокусированными эритроцитами крови. К 300 с происходит значительное просветление в области центрального микроэлектрода и его окружения. К 500 с вся поверхность круглого микроэлектрода оказывается оптически прозрачной, на которой видны осевшие бактерии. Площадь поверхности составляет $\sim 6\,358,5\ \mu\text{m}^2$.

На микрофотографии рис. 4г приведен процесс сепарации и концентрирования бактерий *E.coli* через 600 с с помощью аналогичного чип-формата при подаче на контактную боковую дорожку напряжения U_1 , от которой концентрические микроэлектроды шириной 10 μm . В результате механизмов электрокинетических процессов, присущих такому режиму сепарации и концентрирования, трехэлектродный биопроцессор производит концентрирование бактерий *E.coli* ближе к центру боковой контактной дорожки шириной 50 μm , связанной с концентрическими микроэлектродами шириной 10 μm . Для целей идентификации на длине 50 μm боковой контактной может выбрана площадь приблизительно $1\,962,5\ \mu\text{m}^2$.

По полученным результатам размеров площадей, на которых выделены и сконцентрированы бактерии *S.aureus* и *E.coli*, оценены условия применимости рамановской спектроскопии для их ускоренной идентификации относительно размера площади лазерного «пятна» диаметром 5 μm [3]. Оценочные расчеты показывают, что при идентификации выделяемых бактерий *S.aureus* и *E.coli* с помощью трехэлектродных биопроцессоров с ИТО-микроэлектродами на длине волны лазерного луча 532 нм, погрешность точности накопления сигнала в диапазоне волновых чисел (400–2000) cm^{-1} в зависимости от места проводимых измерений, лежит в диапазоне от 0,17 до 6,2 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучены условия применимости рамановской спектроскопии для ускоренной динамической идентификации бактерий *E.coli* и *S.aureus*, которые выделяют из цельной крови биопроцессорами с тонкопленочными ИТО-микроэлектродами.

2. Показано, что при выделении бактерий *S.aureus* в цельной крови с антикоагулянтом ЭДТА, месячной выдержки в холодильнике, оптически прозрачный доступ обеспечивается на площадях размером $6\,358,5$ и $314\ \mu\text{m}^2$, представляющих центральный микроэлектрод и его контактную дорожку, через 500 и 800 с соответственно.

3. Показано, что оптически прозрачный доступ к выделенным бактериям обеспечивается на площадях размером $\sim 6\,358,5$ и $\sim 11304\ \mu\text{m}^2$ через 820 и 899 с соответственно, для цельной крови, суточной выдержки в холодильнике, с бактериями *S.aureus* в отсутствии антикоагулянта.

4. Показано, что оптически прозрачный доступ к выделенным бактериям *E.coli* в цельной крови суточной выдержки, в отсутствие антикоагулянта, обеспечивается на площадях размером $\sim 6\,358,5$ и $\sim 1\,962\ \mu\text{m}^2$, представляющих центральный микроэлектрод и его контактную дорожку, через 500 и 600 с соответственно.

5. Показано, что при длине волны лазерного луча 532 нм погрешность точности накопления сигнала в диапазоне волновых чисел (400–2000) cm^{-1} в зависимости от места проводимых измерений, при идентификации выделяемых бактерий *S.aureus* и *E.coli* с помощью трехэлектродных биопроцессоров с ИТО-микроэлектродами, лежит в диапазоне от 0,17 до 6,2 %.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биочипы для информационных технологий быстрого обнаружения и идентификации вида возбудителей инфекций / А. И. Драпеза [и др.] // Современные методы и технологии создания и обработки материалов : сб. науч. тр. : в 3 кн. / редкол.: А. В. Белый (гл. ред.) [и др.]. – Минск : ФТИ НАН Беларуси, 2015. – Кн. 1. Материаловедение. – С. 145–151.
2. Оптимизация состава среды и конструкционных элементов биопроцессорного чип-формата с Ni микроэлектродами для разделения и концентрации S.aureus в модельных условиях и в цельной крови / А. И. Драпеза [и др.] // Медэлектроника–2020. Средства медицинской электроники и новые медицинские технологии : сб. науч. ст. XII Междунар. науч.-техн. конф., Минск, 10 декабря 2020 года. – Минск : БГУИР, 2020 – 224 с.–С. 163–169.
3. 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. – V. 3. – P. 2365–2379.
4. Сравнительные исследования легированных оловом тонкопленочных структур оксида индия различной толщины на стеклянной подложке для биомедицинских приложений сепарации и концентрирования клеток / А.И.Драпеза [и др.] // Современные методы и технологии создания и обработки материалов : сб. науч. тр. : в 2 кн. / редкол.: В.Г.Залесский (гл. ред.) [и др.].–Минск : ФТИ НАН Беларуси, 2022. – Кн. 1.Материаловедение. – 330 с. : ил. ISBN 978-985-6441-68-7. – С. 91–101.

REFERENCES

1. Biochipy dlya informatsionnykh tekhnologiy bystrogo obnaruzheniya i identifikatsii vida vozbuditeley infektsiy [Biochips for information technologies for rapid detection and identification of the type of infectious agents] / A. I. Drapeza [i dr.] // Sovremennyye metody i tekhnologii sozdaniya i obrabotki materialov : sb. nauch. tr. : v 3 kn. / redkol.: A. V. Belyy (gl. red.) [i dr.]. – Minsk : FTI NAN Belarusi, 2015. – Kn. 1. Materialovedeniye. – S. 145–151. (in Russian)
2. Optimizatsiya sostava sredy i konstruksionnykh elementov bioprotsessornogo chip-formata s Ni mikroelektrodami dlya razdeleniya i kontsentratsii S.aureus v model'nykh usloviyakh i v tsel'noy krovi [Optimization of the composition of the medium and structural elements of the bioprocessor chip format with Ni microelectrodes for the separation and concentration of S.aureus under model conditions and in whole blood] / A. I. Drapeza [i dr.] // Medelektronika–2020. Sredstva meditsinskoy elektroniki i novyye meditsinskiye tekhnologii : sb. nauch. st. XII Mezhdunar. nauch.-tekhn. konf., Minsk, 10 dekabrya 2020 goda. – Minsk : BGUIR, 2020 – 224 s.–S. 163–169. (in Russian)
- 3 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. – V. 3. – P. 2365–2379.
4. Sravnitel'nyye issledovaniya legirovannykh olovom tonkoplenochnykh struktur oksida indiya razlichnoy tolshchiny na steklyannoy podlozhke dlya biomeditsinskikh prilozheniy separatsii i kontsentrirvaniya kletok [Comparative studies of tin-doped thin-film indium oxide structures of various thicknesses on a glass substrate for biomedical applications of cell separation and concentration] / A. I. Drapeza [i dr.] // Sovremennyye metody i tekhnologii sozdaniya i obrabotki materialov : sb. nauch. trudov. : v 2 kn. / redkol.: V. G. Zaleskiy (gl. red.) [i dr.]. – Minsk : FTI NAN Belarusi, 2022 – Kn. 1. Materialovedeniye 330 s. – S. 91–101. : il. ISBN 978-985-6441-68-7. (in Russian)

Статья поступила в редакцию 11.05.2023 г.