

07.3;14.1

## Оптоволоконный датчик pH для микробиореакторов

© С.Е. Ангарита Лорес, Е.В. Богатиков<sup>✉</sup>, Е.Н. Бормонтов

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

<sup>✉</sup> E-mail: evbogatikov@yandex.ru

Поступило в Редакцию 10 июня 2019 г.

В окончательной редакции 1 ноября 2019 г.

Принято к публикации 5 ноября 2019 г.

Разработан и изготовлен оптоволоконный датчик для микробиореакторов, регистрирующий изменение pH в диапазоне от 6.5 до 9 с точностью  $\pm 0.2$  для малых объемов жидкости. Принцип детектирования основан на измерении степени поглощения излучения светодиода при его прохождении через контролируемую среду с индикатором. В качестве биосовместимого индикатора используется феноловый красный.

**Ключевые слова:** датчик pH, микробиореактор, феноловый красный, фотодетектор с подавлением фоновой засветки.

DOI: 10.21883/PJTF.2020.03.48992.17917

Разработка микробиореакторов — перспективное направление в области биотехнологии. Быстрый и дешевый способ культивирования различных биоматериалов позволяет существенно ускорить научные исследования, повысить эффективность оптимизации условий культивирования биоматериалов в промышленных условиях [1].

Важным компонентом микробиореакторов являются сенсоры, регистрирующие изменение жизненно важных для культивируемых микроорганизмов параметров [2]. Один из важнейших типов сенсоров — сенсор pH. Именно pH среды, с одной стороны, может изменяться под действием метаболизма микроорганизмов, а с другой — сильно влияет на эффективность их роста. Поскольку различные микроорганизмы предпочитают индивидуальный уровень pH среды (от кислотного до основного), сенсор pH должен работать в достаточно широком диапазоне значений pH.

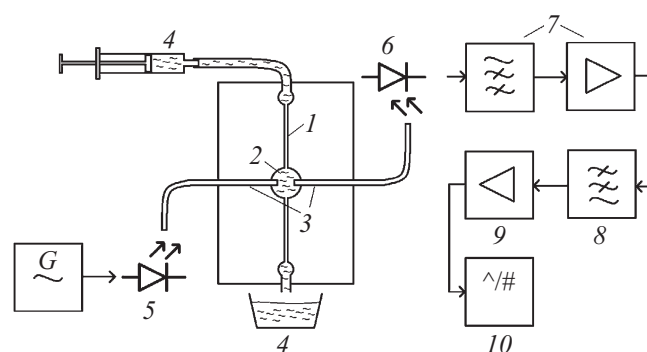
В настоящее время известны различные реализации датчиков pH для микробиореакторов. В некоторых используется явление флуоресценции специально разработанных материалов [3], в некоторых измеряется коэффициент поглощения света при прохождении через среду микробиореактора с добавленным индикатором [4]. Поскольку микробиореакторы являются в большинстве случаев одноразовым расходным материалом, при их изготовлении нужно использовать максимально доступные материалы и дешевые технологии. В связи с этим целью настоящей работы состоит в разработке сенсора pH без использования специальных материалов и компонентов, а также сложных технологических операций.

За основу был взят метод измерения поглощения света при прохождении через среду с феноловым красным — распространенным биосовместимым индикатором. Феноловый красный имеет две полосы поглощения в синей и зеленой областях спектра (положение максимумов  $\sim 440$  и  $560$  nm соответственно). При изменении pH в диапазоне от 4 до 6 происходит изменение коэффи-

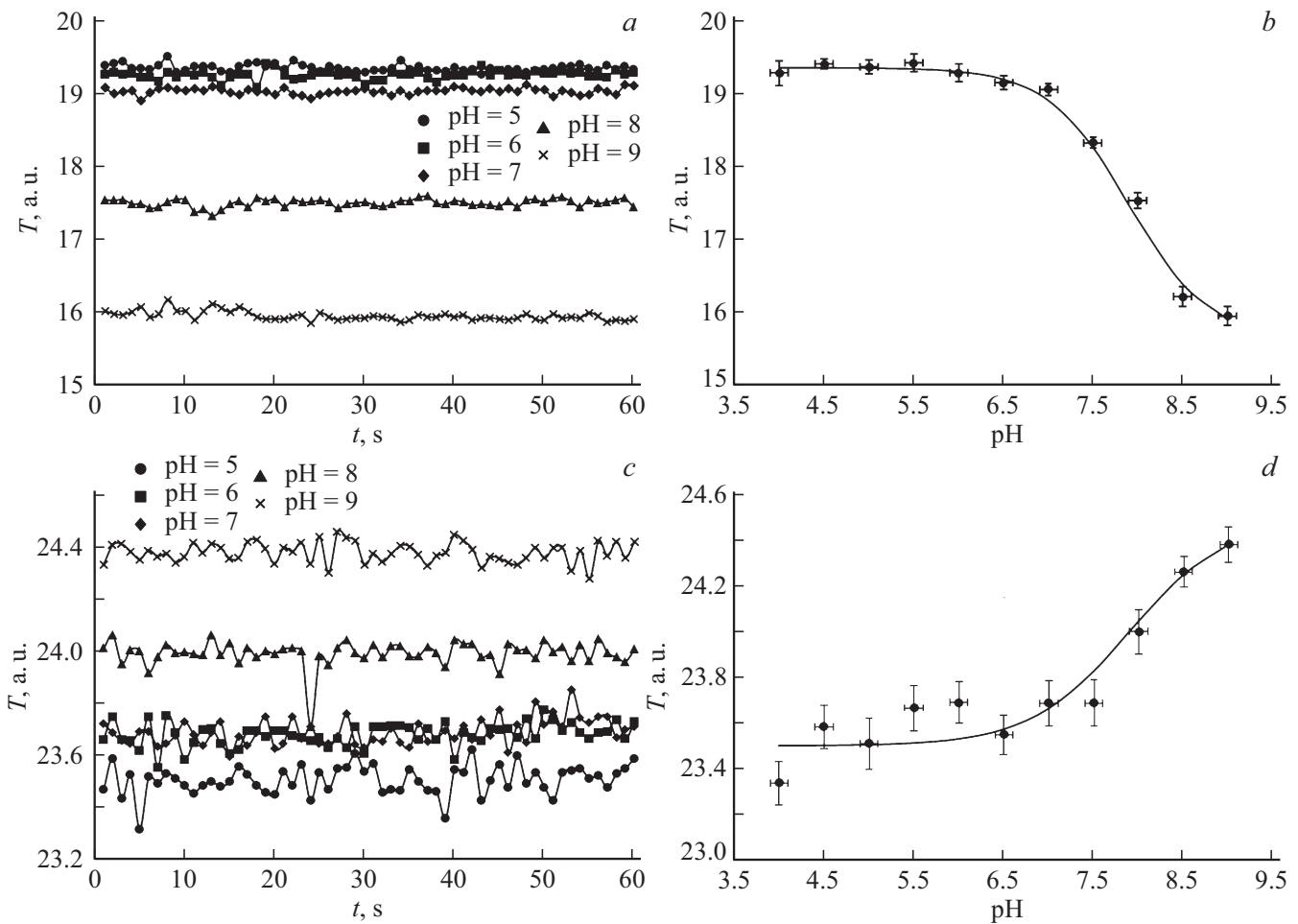
циента поглощения в синей области спектра, тогда как изменение коэффициента поглощения в зеленой области спектра соответствует изменению pH в диапазоне от 6 до 10. Оба эти диапазона изменения pH важны для применения в микробиореакторах, что необходимо учитывать при разработке датчика pH.

В большинстве существующих конструкций для проведения измерений отдельно для синей и зеленой областей спектра используются светофильтры, а также фоточувствительные CCD- или CMOS-матрицы. Для упрощения конструкции и одновременно повышения чувствительности в настоящей работе были использованы серийные синие и зеленые светодиоды, а также кремниевый  $p-i-n$ -фотодиод в качестве фотоприемника. Для повышения чувствительности используется переменный оптический сигнал, что позволяет провести подавление фоновой засветки.

Предварительно отклик датчика  $T_c$  (pH) был рассчитан теоретически на основе спектров оптической плотности фенолового красного  $\tau(\lambda, \text{pH})$  [5], спектральной плотности излучения различных серийно выпускаемых светодиодов  $S(\lambda)$ , а также относительной спектральной чувствительности  $D(\lambda)$  используемого фотодиода



**Рис. 1.** Общий вид установки для испытания датчика pH. Обозначения приведены в тексте.



**Рис. 2.** Экспериментальный отклик и калибровочные кривые датчика pH при использовании зеленого светодиода (a, b) и синего светодиода (c, d).

по следующей формуле:

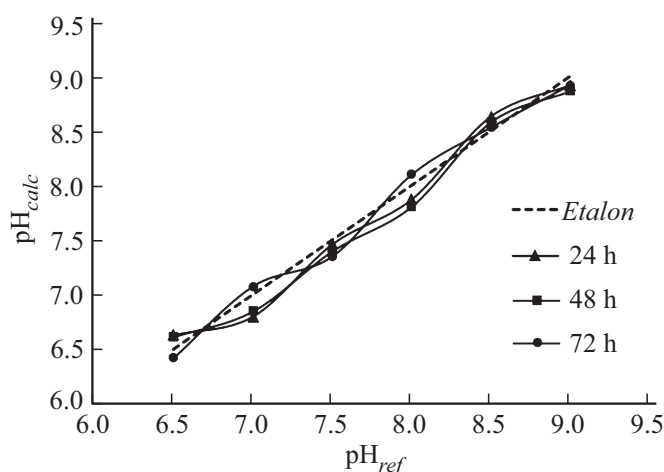
$$T_c(\text{pH}) = \sum_{\lambda=350 \text{ nm}}^{650 \text{ nm}} S(\lambda) \cdot D(\lambda) / \exp(\tau(\lambda, \text{pH})). \quad (1)$$

При выборе светодиодов с оптимальными спектральными характеристиками рассматривались два варианта. Первый — использование двух отдельных светодиодов: синего GaN/SiC с максимумом спектральной характеристики  $\sim 465 \text{ nm}$  и ультразеленого AlGaInP с максимумом спектральной характеристики  $\sim 575 \text{ nm}$ . Данные светодиоды максимально соответствуют спектру поглощения фенолового красного и способны обеспечить максимальный отклик сенсора. Второй вариант — использование трехцветного RGB-светодиода, который для синей и зеленой областей спектра имеет максимумы при  $\sim 465$  и  $\sim 525 \text{ nm}$  соответственно. Согласно расчету по формуле (1), характер зависимости отклика сенсора от величины pH в данном случае остается тем же, что и в случае использования двух отдельных светодиодов. Некоторое уменьшение отклика сенсора ( $\sim 10\%$ ) в дан-

ном случае компенсируется удобством использования одного светодиода вместо двух.

Общая схема проведения эксперимента приведена на рис. 1. Она включает упрощенный вариант микробиореактора, состоящий из транспортного канала (1) диаметром  $\sim 0.1 \text{ mm}$ , реакционной камеры (2) диаметром  $\sim 1 \text{ mm}$  и каналов с полимерным оптоволоконном (3) диаметром  $\sim 0.9 \text{ mm}$  (все каналы были изготовлены методом лазерной микрообработки полиметилметакрилата (ПММА), сращивание пластин ПММА производилось методом термического связывания); систему подачи жидкой среды с индикатором, включающую шприцевой насос и дренаж (4); RGB-светодиод и генератор переменного сигнала для питания светодиода (5); кремниевый *p-i-n*-фотодиод (6); блок подавления фоновой засветки и предварительного усиления сигнала фотодиода (7) [6]; фильтр нижних частот четвертого порядка (8); инструментальный усилитель (9); систему оцифровки, обработки и передачи данных (10).

Испытание установки проводилось с использованием буферных растворов, имеющих pH от 4.0 до 9.0 (с шагом 0.5). Значение pH контролировалось pH-метром



**Рис. 3.** Отклонение рассчитанных по калибровочной кривой значений pH (измерения проведены спустя 24, 48 и 72 h после построения калибровочной кривой) от значений, полученных эталонным pH-метром.

Ohaus ST10 с точностью  $\pm 0.1$ . Водный раствор фенолового красного был приготовлен в соответствии с ГОСТ 4919.1–2016. Концентрация индикатора в буферных растворах составляла 0.004 г/л и определялась оптимальной амплитудой отклика фотодетектора при используемом размере реакционной камеры. Измерения выполнялись при температуре 25°C, контроль температуры микробиореактора осуществлялся с помощью пирометра SEM DT-811. Перед использованием каждого буферного раствора проводилась промывка транспортной системы микробиореактора дистиллированной водой. Оцифровка данных производилась 24-битным аналого-цифровым преобразователем ADS1220, управляемым микроконтроллером Atmel SAM3X8E. После накопления 1024 отсчетов с частотой дискретизации 1024 Hz выполнялось быстрое преобразование Фурье, определялась амплитуда доминирующей частоты на спектре Фурье и полученные результаты передавались на ПК. По результатам 60 измерений вычислялись точка калибровочной кривой и ее погрешность. Для выявления влияния температуры на результаты измерений проводился контрольный эксперимент с pH = 7.5 при изменении температуры от 10 до 40°C. В данном диапазоне температур в пределах погрешности эксперимента влияния температуры выявлено не было. Спустя 24, 48 и 72 h после построения калибровочной кривой проводились контрольные эксперименты, которые не выявили дрейфа параметров во времени.

На рис. 2, *a, c* показан характер изменения отклика сенсора во времени при различных значениях pH буферного раствора для зеленого (*a*) и синего (*c*) светодиодов. Видно отсутствие дрейфа в отклике сенсора, поэтому полученные данные были использованы для построения калибровочных кривых, которые аппроксимировались

сигмоидальной функцией следующего вида:

$$T(\text{pH}) = T_0 + \frac{A}{1 + \exp\left(\frac{\text{pH} - \text{pKa}}{B}\right)}, \quad (2)$$

где величина  $\text{pKa}$  для фенолового красного принималась равной 7.9. На рис. 2, *b, d* приведены экспериментальные точки калибровочных кривых и аппроксимирующие сигмоидальные функции. С помощью выражения (2) были вычислены значения pH для контрольных экспериментов и получена оценка точности датчика  $\pm 0.2$  при  $\text{pH} > 6.5$  (рис. 3). Полученный результат не уступает точности оптоволоконных датчиков pH, работающих с большими объемами вещества [7]. При  $\text{pH} < 6.5$  точности проведенных экспериментов с использованием как зеленого, так и синего светодиодов не хватает для достоверной оценки pH.

Для испытания технологической воспроизводимости предложенной конструкции было изготовлено пять идентичных сенсоров. Калибровочные кривые (2) сенсоров имеют достаточно большой разброс параметров  $T_0$ ,  $A$ ,  $B$  из-за сложности совмещения оптической оси двух сегментов оптоволоконна и воспроизведения величины зазора между ними. Поэтому каждый сенсор требует построения собственной калибровочной кривой. Однако после калибровки все изготовленные сенсоры обеспечивают указанную выше точность определения pH.

Полученные результаты показывают, что разработанная конструкция датчика pH для микробиореакторов сочетает в себе простоту реализации и высокую чувствительность даже при малых размерах реакционной камеры, не превышающих 1 mm. Тем не менее высокая чувствительность достигнута только для  $\text{pH} > 6.5$ . Это связано с тем, что полезное изменение сигнала при  $\text{pH} < 6.5$  становится меньше нестабильности отклика сенсора. Причиной нестабильности отклика, по-видимому, являются колебания оптической плотности буферных растворов. Поэтому для расширения диапазона измеряемого pH без изменения используемого индикатора можно предложить одновременное измерение pH с использованием зеленого и синего светодиодов. При этом необходимо использование корреляционного анализа для детектирования зависимости отклика сенсора от уровня pH на фоне колебаний уровня оптической плотности буферного раствора.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### Список литературы

- [1] Cagnin S., Cimetta E., Guiducci C., Martini P., Lanfranchi G. // *Sensors*. 2012. V. 12. N 11. P. 15947–15982. DOI: 10.3390/s121115947
- [2] Schapper D., Stocks S.M., Szita N., Gernaey K.V. // *Chem. Eng. J.* 2010. V. 160. N 3. P. 891–898. DOI: 10.1016/j.cej.2010.02.038

- [3] Zhang Z., Boccazzi P., Choi H.G., Perozziello G., Sinsky A.J., Jensen K.F. // *Lab Chip*. 2006. V. 6. N 7. P. 906–913. DOI: 10.1039/B518396K
- [4] Magnusson E.B., Halldorsson S., Fleming R.M.T., Leosson K. // *Biomed. Opt. Express*. 2013. V. 4. N 9. P. 1749–1758. DOI: 10.1364/BOE.4.001749
- [5] Wang H., Liu B., Li Z., Yang L. // *Spectr. Lett.* 2017. V. 50. N 6. P. 307–315. DOI: 10.1080/00387010.2017.1321019
- [6] Мамонов А.С., Богатиков Е.В., Туровский Я.А., Шебанов А.Н. Устройство регистрации пульсового сигнала // Радиолокация, навигация, связь. Сб. трудов XXIV Междунар. науч.-техн. конф. Воронеж: Вэлборн, 2018. Т. 5. С. 289–294.
- [7] Higashino N., Takayama T., Ito H., Horade M., Yamaguchi Y., Dylan Tsai C.-H., Kaneko M. // *Sensors*. 2018. V. 18. N 1. P. 191. DOI: 10.3390/s18010191