# Z49 BIOSENSORY

Ćwiczenie 1: Wyznaczenie częstotliwości rezonansowej drgań beleczek o różnych długościach oraz dobroci krzywych rezonansowych w środowisku ciekłym i gazowym.

Ćwiczenie 2: Wyznaczenie średniej masy pojedynczej komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae.* 

Ćwiczenie 3 (opcjonalne): Detekcja jonów wapnia oraz badanie efektu bimetalicznego.

# Zagadnienia do przygotowania

- pojęcie sensora,
- budowa i zasada działania sensora mikrobeleczkowego (tryb statyczny, dynamiczny)
- zastosowania oraz czułość sensora mikrobeleczkowego

pojęcia: częstotliwość rezonansowa, drgania własne i mody drgań, dobroć krzywej rezonansowej, naprężenie powierzchniowe, efekt bimetaliczny

# Zakres teoretyczny

(fragmenty pracy magisterskiej "Badanie dynamiki prostych układów biologicznych za pomocą mikrobiosensora beleczkowego" A.Dejko oraz "Sensory mikrobeleczkowe w analizie podstawowych parametrów biofizycznych modelowych układów biologicznych" B.Łabędź)

#### Mikrobiosensor beleczkowy

Biosensory są urządzeniami pozwalającymi na przekształcenie sygnału pochodzącego z interakcji biologicznej w sygnał elektroniczny (Lazzarino, 2012). Mikrosystemy MEMS (ang. *Micro-Electro-Mechanical System<sup>1</sup>*), do których należą mikrobiosensory beleczkowe (ang. *cantilever-based microbiosensors*), to technologia definiowana jako zminiaturyzowane mechaniczne i elektromechaniczne elementy (Lazzarino, 2012). MEMS składają się zwykle z jednego lub wielu komponentów oddziałujących z otoczeniem oraz jednostki centralnej przetwarzającej dane.

Mikrobiosensory beleczkowe są więc zminiaturyzowanymi urządzeniami pozwalającymi na detekcję sygnału biologicznego za pomocą elastycznej beleczki (ang. *cantilever*). W urządzeniach tego typu dostępne są dwa tryby wykonywania pomiaru: tryb statyczny, który pozwala na pomiar różnicy naprężenia powierzchniowego na powierzchni beleczki oraz tryb dynamiczny, pozwalający na określenie zmian częstotliwości rezonansowej drgań beleczki.

#### Zasada działania mikrobiosensora beleczkowego.

W budowie biosensorów należy wyróżnić trzy podstawowe elementy (Grattarola et al., 2001):

- 1) detektor, który rejestruje badany sygnał biologiczny,
- 2) transduktor, który przekształca sygnał w formę elektroniczną,
- 3) system odczytu, który filtruje, wzmacnia, zapisuje i wyświetla przekazywany sygnał.

W wykorzystywanym do tego ćwiczenia mikrobiosensorze beleczkowym tymi elementami są kolejno (Rysunek 1):

- beleczka odpowiadająca w sposób mechaniczny na bodziec biologiczny lub chemiczny,
- 2) fotodetektor pozycyjny (ang. *Position Sensitive Detector*) przekształcający sygnał mechaniczny w sygnał elektroniczny,
- 3) oprogramowanie przetwarzające sygnał elektroniczny w dane komputerowe zawierające informacje o ugięciu i częstotliwości rezonansowej drgań beleczki.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> W niniejszej pracy obok polskich tłumaczeń podano także angielskie nazwy niektórych pojęć, aby ułatwić czytelnikowi śledzenie fachowej literatury anglojęzycznej.



Rysunek 1. Schemat mikrobiosensora beleczkowego: beleczka (A), światło lasera (B), fotodetektor pozycyjny PSD (C), komputer z oprogramowaniem przetwarzającym dane (D) (źródło: opracowanie własne na podstawie M.K.Ghathesar, V.Barwich, T.Braun, 2004 oraz http://shutterstock.com).

Działanie mikrobiosensorów beleczkowych opiera się na wykorzystaniu efektu wygięcia cienkiej, prostopadłościennej beleczki bądź na zmianie częstotliwości jej drgań w odpowiedzi na zewnętrzny bodziec.

Działanie systemu optycznej detekcji ugięcia beleczki polega na odbiciu od lustrzanej powierzchni beleczki światła laserowego o niskiej mocy (około kilka mW). Odbita wiązka światła pada na fotodetektor pozycyjny PSD (Rysunek 1).

Program komputerowy, przetwarzając dane z fotodetektora pozycyjnego, pozwala na otrzymanie informacji o wychyleniu końca beleczki oraz częstotliwości rezonansowej drgań beleczki. Wychylenie jest wyznaczane na podstawie lokalizacji na fotodetektorze pozycyjnym wiązki światła laserowego odbitej od beleczki. Częstotliwość rezonansowa drgań zaś wyznaczana jest na podstawie wielkości amplitudy drgań beleczki w funkcji częstotliwości. Zakres częstotliwości drgań skanowany jest dzięki pętli sprzężenia zwrotnego (ang. *Phase Locked Loop*), w której za pomocą detektora fazy porównuje się sygnał drgań beleczki z sygnałem wzbudzenia elementem piezoelektrycznym. Sprzężenie zwrotne informacji o drganiach beleczki pozwala na odpowiednie dostrojenie sygnału wzbudzającego.

Schemat beleczki pokazany jest na Rys. 2. W doświadczeniach z wykorzystaniem mikrobiosensora beleczkowego nie używa się pojedynczych beleczek lecz całych zestawów..

Beleczki są zazwyczaj wykonane z krzemu, dwutlenku krzemu lub związków krzemu z azotem, a czasem także z polimerów. Ponadto część beleczek pokryta jest cienką warstwą złota, wzmacniającą stopień odbicia światła oraz umożliwiającą funkcjonalizację ich powierzchni za pomocą wiązań tiolowych.



Rysunek 2. Schemat beleczki wraz z oznaczeniami wymiarów: długość L, szerokość w, grubość h (źródło: Boisen et al., 2011).

#### **Tryby pomiarowe**

#### Tryb statyczny

Detekcja za pomocą trybu statycznego opiera się na powstawaniu naprężenia powierzchniowego  $\sigma$  (ang. *surface stress*) na "górnej" lub "dolnej" powierzchni beleczki w wyniku odpowiedzi na dany bodziec (Rysunek 4). Naprężenie powierzchniowe definiowane jest jako zmiany wielkości pracy *dw* na jednostkę powierzchni *dA* potrzebnej do elastycznego rozciągnięcia tej powierzchni (1) (Calleja et al.,2013).

$$dw = \sigma \, dA \tag{1}$$



Rysunek 3. Naprężenie powierzchniowe  $\sigma$  powstające na "górnej" i "dolnej" powierzchni beleczki. (źródło: Calleja et al., 2013).

W wyniku nierównomiernego działania bodźca jak np. adsorpcji molekuł jedynie do jednej ze "stron" beleczki, pojawia się różnica naprężenia powierzchniowego  $\Delta \sigma$  między dwoma powierzchniami beleczki ("górna" i "dolna"). Pojawienie się różnicy naprężeń powierzchniowych skutkuje wygięciem końca beleczki.



Rysunek 4. Asymetryczna adsorpcja molekuł (tu: jedynie na górnej powierzchni) wywołuje: naprężenie powierzchniowe rozciągające, zginające beleczkę "do góry" (A) lub naprężenie powierzchniowe ściskające, zginające belkę "do dołu"(B) (źródło: Fritz, 2008).

Wyróżnia się naprężenia rozciągające i ściskające. Dla spontanicznego procesu, gdzie dw < 0 i przyłożone jest dodatnie naprężenie  $\sigma > 0$ , zgodnie z wzorem (1) dA jest mniejsze od zera i powierzchnia kontaktu zmniejsza się. W takiej sytuacji naprężenie  $\Delta \sigma$  określane jest jako rozciągające. Dla ujemnej wartości naprężenia powierzchniowego  $\Delta \sigma < 0$ , dA musi być dodatnie- powierzchnia powiększa się. Wtedy naprężenie określane jest jako ściskające (Rysunek 5) (Fritz, 2008).

Opis wychylenia końca beleczki  $\Delta z$  pod wpływem różnicy naprężeń  $\Delta \sigma$ , bazuje na równaniu Stoney'a (2). Formuła ta została opublikowana w 1909 roku do opisu naprężenia

powierzchniowego materiałów szklanych powstającego po nałożeniu cienkiej warstwy metalu (Calleja et al., 2013).

$$R = \frac{E h^2}{6\sigma(1-v)} \tag{2}$$

gdzie: R jest promieniem krzywizny beleczki, E, v to odpowiednio moduł Younga, współczynnik Poissona materiału beleczki, h to grubość beleczki, a  $\sigma$  jest wywołanym naprężeniem powierzchniowym

W celu zastosowania równania Stoney'a dla mikrobiosensorów, skorzystano z zależności geometrycznej łączącej promień krzywizny R z wychyleniem  $\Delta z$  oraz długością L beleczki, stosowanej w przybliżeniu do małych wygięć beleczki (3) (Boisen et al., 2011).

(3)

Połączenie równań (2) i (3), pozwala na sformułowanie wzoru opisującego zależność wychylenia końca beleczki  $\Delta z$  pod wpływem różnicy naprężeń  $\Delta \sigma$  (4).

$$\Delta z = \frac{3(1-v)L^2}{Eh^2} \Delta \sigma \tag{4}$$

Ze wzoru (4) wynika, że im dłuższa i cieńsza jest beleczka, tym dla danej różnicy naprężeń uzyskuje się większe wygięcie. Jednocześnie jednak powoduje to zwiększenie drgań termicznych oraz szumu (Fritz, 2008).

#### Tryb dynamiczny

Za pomocą trybu dynamicznego wyznacza się częstotliwość rezonansową drgającej beleczki. Najczęściej tryb dynamiczny wykorzystuje się do wyznaczenia masy osadzonej na beleczce.

Częstotliwość rezonansową beleczki można obliczyć ze wzoru na częstotliwość drgań poprzecznych wyrażaną przez stałą sprężystości k, masę beleczki m oraz współczynnik  $\lambda_n$  (5) (Johnson, Mutharasan, 2012).

$$f = \frac{\lambda_n^2}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}}$$
(5)

gdzie:  $\lambda_n$  jest współczynnikiem charakterystycznym dla n-tego modu drgań, a jego wartość wynika z warunków brzegowych związanych z jednostronnego unieruchomienia beleczki. Wynosi on (6):

$$\lambda_{\mathbf{n}} = (\mathbf{n} - \mathbf{0}, \mathbf{5})\boldsymbol{\pi} \tag{6}$$

gdzie: n- kolejne liczby naturalne powyżej 4. Dla n =1 przyjmuje wartość 1,875.

Wykorzystując zależności między parametrami geometrycznymi i materiałowymi beleczek (7,8) wzór na częstotliwość rezonansową drgań beleczek wyraża się jako (9) (Johnson, Mutharasan, 2012).

$$k = \frac{Ewh^3}{12L^3} \tag{7}$$

$$m = \rho w \mathbf{h} L \tag{8}$$

$$f = \frac{\lambda_n^2}{4\pi} \frac{h}{L^2} \sqrt{\frac{E}{3\rho}}$$
(9)

gdzie: E jest modułem Younga materiału, p gęstością materiału beleczki, w, h i L to odpowiednio szerokość, grubość i długość beleczki, k to stała sprężystości beleczki, m to jej masa,  $\lambda_n$  to współczynnik opisany w równaniu (6)

Przekształcenie zależności (5) pozwala na wyznaczenie wzoru na zmianę masy drgającej beleczki:

$$\Delta m = \frac{\lambda_n^4 k}{(4\pi^2) \left(\frac{1}{f_1^2} - \frac{1}{f_0^2}\right)}$$
(10)

W ten sposób oblicza się zmianę masy beleczki w wyniku równomiernego pokrycia całej powierzchni. Do opisu zmiany masy w wyniku punktowej adsorpcji obciążenia korzysta się z zależności uwzględniającej położenie masy na beleczce (11) (Boisen et al., 2011).

Dla  $\Delta m \ll m$  kształt beleczki podczas drgań nie ulega zmianie. W związku z tym dodatkowa masa na beleczce podczas drgań zwieksza energie układu o energie kinetyczna ładunku zależną od położenia na beleczce. Pomijając tłumienie drgań energia kinetyczna beleczki i ładunku równa się energii potencjalnej sprężystości. Z powyższej zależności można wyliczyć masę ładunku w zależności od zmiany częstotliwości rezonansowej:

$$\Delta m = \frac{m_0}{U_n(z)^2} * \left(\frac{f_n^2}{f_{n,m}^2} - 1\right)$$
(11)

gdzie:  $m_0$  jest masą belki drgającej z częstotliwością rezonansową  $f_n$  dla n-tego modu drgań,  $\Delta m$  to zaadsorbowana masa powodująca zmianę częstotliwości rezonansowej beleczki na wartość  $f_{n,m}$ , a  $U_n(z)$  jest funkcją opisującą kształt beleczki w największym wygięciu (Rysunek 6) w kolejnych modach wyrażaną jako (12):

$$U_n(z) = A_n(\cos\kappa_n z - \cos\hbar\kappa_n z) + B_n(\sin\kappa_n z - \sin\hbar\kappa_n z)$$
(12)

gdzie:  $A_n$ ,  $B_n$ ,  $\kappa_n$  to stałe dla danego modu drgań i wymiarów beleczki



Rysunek 6. Kształt beleczki dla pierwszego i kolejnych modów drgań w największym wychyleniu. Wykresy znormalizowano do maksymalnego wychylenia 1. Beleczka jest osadzona w pozycji (0,0). Oś pozioma znormalizowana jest do długości beleczki L

Kształt beleczki w największym wychyleniu podczas drgań w kolejnych modach przedstawiony został na Rys. 6.

Krzywa rezonansowa charakteryzowana jest przez dwa parametry: pozycję wierzchołka f (częstotliwość rezonansowa) oraz szerokość krzywej rezonansowej w połowie wysokości w (Lazzarino, 2012). Często podawanym parametrem jest również dobroć Q (ang. *quality factor*). Parametr ten definiowany jest jako stosunek zachowanej energii wibracyjnej do energii straconej w jednym cyklu (Calleja et al., 2013). Dobroć liczy się jako stosunek częstotliwości rezonansowej f do szerokości krzywej rezonansowej w połowie wysokości w (13).

$$Q = \frac{f}{w} \tag{13}$$

Dobroć zależy od geometrii beleczki oraz ośrodka, w którym się ona znajduje (Goeders et al., 2007). Dla próżni wartości Q mogą osiągnąć wartość do 10 000, w powietrzu  $Q \approx$  kilkaset, a dla wody  $Q \approx$  kilkadziesiąt. Przykładowe krzywe rezonansowe dla czynników Q równych 10 i 100 przedstawione są na Rys. 7. Zastosowanie mikrobiosensorów w próżni pozwala na detekcję substancji w małych koncentracjach dzięki wysokiej dobroci. Niskie wartości dobroci w wodzie wynikają z tłumienia drgań przez lepkość płynu oraz wpływu fluktuacji. Wartość dobroci zależy także od długości beleczki.



Rysunek 5. Dobroć krzywej rezonansowej (źródło: opracowanie własne na podstawie Goeders et al., 2007).

W trybie dynamicznym wzbudzenie beleczki może być wywołane przez energię termiczną. Niemniej jednak dla uzyskania lepszej czułości niezbędne jest zastosowanie

zewnętrznego wzbudzania drgań gwarantującego zwiększenie stosunku sygnału do szumu. W mikrobiosensorze używanym w niniejszej pracy, funkcję tę spełnia dedykowany układ piezoelektryczny.

#### Funkcjonalizacja powierzchni beleczki.

Funkcjonalizacja powierzchni beleczki polega na pokryciu jej warstwą materiału pozwalającego na adsorpcję substancji. Funkcjonalizację powinny cechować (Grattarola et al., 2001):

- specyficzność gwarantująca adsorpcję jedynie określonej substancji,
- powtarzalność umożliwiająca wielokrotne zastosowanie sfunkcjonalizowanej beleczki,
- wydajność adsorpcji danej substancji,
- depozycja cienkiej warstwy substancji pokrywającej, tak aby parametry charakteryzujące beleczkę nie uległy znacznej zmianie,
- warstwa wiążąca powinna być jednorodna w celu zapewnienia równomiernej adsorpcji substancji.

Podczas pracy w trybie statycznym ważna jest funkcjonalizacja jedynie jednej powierzchni beleczki bądź sfunkcjonalizowanie obu powierzchni w różny sposób (Rysunek 8B). Zapewnia to różnicę w adsorpcji molekuł między powierzchnią "górną" i "dolną" belki, a w rezultacie powstanie różnicy naprężeń. Wykorzystuje się często adsorpcję grup tiolowych (-SH) do powierzchni złota oraz grup silanowych (-SiOX) do powierzchni dwutlenku krzemu. Powierzchnię funkcjonalizuje się również charakterystycznymi wiązaniami typu antygen-przeciwciało.

Proces funkcjonalizacji beleczek może ułatwić użycie kapilary (Rysunek 8A). Jeden z końców cienkiej rurki umieszcza się w danej substancji, a w drugi koniec rurki wsuwa się beleczkę. Dzięki efektowi kapilarnemu, ciecz przemieszcza się po wewnętrznych ściankach rurki aż do beleczki. Kapilara musi mieć odpowiednie wymiary tak, aby jednocześnie mieszcząc w niej jedną beleczkę, nie uszkodzić sąsiednich.



Rysunek 6. Funkcjonalizacja beleczki za pomocą kapilary(A). Belka złoto-krzemowa sfunkcjonalizowana za pomocą blokującej wiązania warstwy białek (złota strona) oraz za pomocą receptorów (warstwa krzemowa)(B) (źródło: Fritz, 2008).

# Aparatura i obsługa oprogramowania

#### Zasady działania sensora mikrobeleczkowego Cantisens® CSR-801

Sensor mikrobeleczkowy Cantisens® CSR-801 jest zazwyczaj używany do pomiarów w środowisku ciekłym. Składa się z modułu badawczego (Rys. 10 A) oraz jednostki centralnej (Rys. 10 B) połączonej z komputerem. Jednym z głównych elementów modułu badawczego jest podstawka (Rys. 11), w której umieszczony zostaje zestaw ośmiu beleczek. Znajduje się w niej materiał piezoelektryczny, który może wzbudzać drgania beleczki w zakresie



Rysunek 10. Układ badawczy Cantisens® CSR-801. A – główny moduł badawczy, czerwonym owalem zaznaczono miejsce na włożenie podstawki z zestawem beleczek. Widoczne są dwa szklane pojemniki z czerwonymi nakrętkami należącymi do systemu wymiany płynu w komorze. Płyn przepływa z pojemnika po lewej stronie przez komorę do pojemnika po prawej stronie. Płyn jest tłoczony przez pompkę umocowaną w czarnej podstawie. B – jednostka sterująca.

częstotliwości 10 kHz-2000 kHz. Na Rys. 12 widoczne są złote styki doprowadzającego do niego sygnał wzbudzający. Na Rys. 10 zaznaczono miejsce, w którym ulokowana zostaje podstawka w celu umieszczenia zestawu beleczek w komorze pomiarowej.



Rysunek 12. Przód podstawki. Widoczne jest miejsce na zestaw beleczek pod nakrywającą płytką. Po prawej stronie podstawki znajdują się dwa złote styki (B) zapewniające przesyłanie sygnału wzbudzającego materiał piezoelektryczny w podstawce

#### Procedura osadzania zestawu beleczek

Przed rozpoczęciem pomiarów zestaw beleczek należy osadzić w uchwycie podstawki. W tym celu należy wysunąć uchwyt z podstawki za pomocą klucza (Rys. 11) dopasowanego do śruby D w podstawce (Rys. 13), aż będzie możliwy dostęp do śruby A w uchwycie (Rys. 14). Następnie śrubę A należy poluzować tak, aby było możliwe niewielkie podniesienie nakrywającej płytki. W powstałym miejscu C (Rys. 12) umieszcza się zestaw beleczek i dokręca śrubę A, przez co nakrywająca płytka dociska zestaw beleczek do uchwytu. Następnie należy wsunąć uchwyt w podstawkę (śruba D) i układ jest gotowy do umieszczenia w komorze pomiarowej.



Rysunek 11 Od lewej: klucz do śrub D i L w podstawce, podstawka, śrubokręt do śruby A w uchwycie, pęseta, pudełko z zestawami beleczek



Rysunek 13. Tył podstawki z miejscami dla klucza. Śruba D zapewnia ruch uchwytu wzdłuż podstawki, L zapewnia ruch uchwytu wszerz podstawki.



Rysunek 14. Zestaw beleczek umieszczony w uchwycie podstawki. Widoczna jest śruba mocują płytkę nakrywającą zaznaczona jako A. kierunki D i L odpowiadają przesunięciu uchwytu w podstawce po obrocie śruby D lub L.



Rysunek 14. Zestaw beleczek umieszczony w uchwycie podstawki. Widoczna jest śruba mocują płytkę nakrywającą zaznaczona jako A. kierunki D i L odpowiadają przesunięciu uchwytu w podstawce po obrocie śruby D lub L.

Sprzęt wykorzystuje firmowe oprogramowanie Concentris. W głównym oknie programu (Rys. 9) znajduje się informacja o statusie połączenia z jednostką sterującą i systemem wymianu płynów komory (zielone/czerwone kwadraty świadczą o nawiązaniu/zerwaniu połączenia pomiędzy jednostkami). Program ma budowę okienkową (modułową). Funkcje programowe zostały podzielone na 5 modułów:

- ustawienie parametrów lasera,
- sterowanie temperaturą,
- pomiar sygnału od beleczek,
- praca w modzie dynamicznym,
- system wymiany płynów komory.

Każdy z nich jest otwierany przez kliknięcie w zakładkę "Measurement". Moduły składają się z paneli zawierających pogrupowane funkcje systemu, wyróżniające się szarą ramką w danym module. Panel służący do graficznego przedstawienia mierzonych wyników



Rysunek 9. Główne okno programu Concentris do obsługi sensora beleczkowego.

w czasie rzeczywistym w dalszej części pracy nazwano wyświetlaczem.

#### Ustawianie oświetlenia beleczki przez wiązkę laserową

Przed włożeniem podstawki do komory pomiarowej należy właczyć kamere CCD. Proces wkładania należy wykonywać powoli, uważając by nie dotknąć beleczkami obudowy (może to skutkować złamaniem beleczek w zestawie). Po włożeniu podstawki do komory pomiarowej zestaw beleczek jest widoczny w obrazie komory (Rys. 15A). Następnie należy włączyć laser odpowiadający beleczce 1 (nr 1 w oknie pomiarowym odpowiada pierwszej trybie beleczce od lewej strony w obrazie kamery CCD) ustawiony W emisyjnym i zwiększyć natężenie wiązki, aż do pojawienia się jasnego punktu w komorze (do ok. 1,5%) jak na Rys. 15B. Za pomocą śruby L (Rys. 13) w podstawce można zmienić poziome położenie uchwytu, aż do momentu oświetlenia beleczki 1 (Rys. 15C). Za pomocą śruby D należy ustawić miejsce oświetlenia najbliżej końca beleczki tak. aby pełny obraz wiązki laserowej był widoczny (Rys. 15D). Po ustawieniu pozycji wiązki



Rysunek 15. Zdjęcia z kamery CCD w komorze pomiarowej. A – laser wyłączony, B – włączony laser, oświetlony punkt znajduje się między 1 i 2 beleczką, C – poziome ustawienie położenia zestawu, by była oświetlona 1 beleczka, D – pionowe przesunięcie beleczki w celu oświetlenia jej końca.

laserowej trzeba wyłączyć kamerę i ustawić laser w trybie odbicia. W ostatnim kroku należy ustawić natężenie światła odbitego ok. 40%.

#### Ustawienie parametrów lasera – moduł "Laser Controller"

Okno to pozwala na konfigurację laserów oświetlających beleczki (Rys. 10). Wyboru laserów używanych w pomiarze dokonuje się po prawej stronie okna (Rys. 10 p. 1). Świecące/zgaszone znaczniki oznaczają aktywne/nieaktywne lasery. Zmiana ich statusu odbywa się poprzez kliknięcie na znacznik. Po lewej stronie od nich (zaznaczone jako p. 2) znajduje się wartość mierzonego natężenia światła w % maksymalnej mocy źródła światła. Suwak do ustalenia natężenia światła laserowego oznaczono jako p. 3. Do pomiarów zalecana jest wartość mniejsza od 50%. Poniżej znajduje się przełącznik (Rys. 10 p. 4) pomiędzy trybami sterowania mocą lasera. W trybie emisyjnym ("*Emission"*) ustawia się pożądane natężenia światła emitowanego przez lasery. W trybie odbicia ("*Reflection"*) system utrzymuje stałą, ustawioną przez eksperymentatora, wartość natężenia światła odbitego przez beleczki. W panelu p. 5 znajduje się włącznik kamery CCD. Po jego przełączeniu otwiera się dodatkowe okno z podglądem komory pomiarowej. W dolnej części okna (Rys. 10 p. 6) wyświetlana jest wartość natężenia światła emitowanego przez laser lub odbitego od beleczki w funkcji czasu.



Rysunek 10. Okno sterowania laserami. Zaznaczono 1-znaczniki umożliwiające wybór laserów, 2-aktualne natężenie światła laserów, 3-suwak do zmiany natężenia światła, 4-przełącznik trybu pomiaru mocy, 5-włącznik kamery CCD, 6-wyświetlacz mierzonego natężenia światła laserów.

#### Sterowanie temperaturą

Moduł "Temperature Controller" pozwala na ustawienie oraz pomiar temperatury w czasie rzeczywistym w komorze pomiarowej (Rys. 12). Zapewnia on stabilizację temperatury z dokładnością do 0,01°C w zakresie od 20°C do 70°C. Możliwe jest także podgrzewanie płynu dostarczanego do komory z pętli próbki, co zapobiega nagłym zmianom temperatury podczas wymiany płynów.

#### System wymiany płynów komory

Sensor beleczkowy Cantisens® CSR-801 posiada system płukania komory, który pracuje w dwóch trybach: A oraz B (Rys. 13 – na żółto zaznaczono komorę pomiarową). W pozycji B płyn ze zbiornika po lewej stronie płynie bezpośrednio przez komorę i pompkę do zbiornika z odpadami po prawej stronie. Wyjście z pętli próbki także jest skierowane do zbiornika z odpadami. W tym ułożeniu pętla próbki może zostać napełniona, gdyż nie grozi jej przepełnienie. W pozycji A pętla jest włączana w obieg płynu pomiędzy pojemnikiem po lewej stronie, a komorą pomiarową, przez co jej zawartość może być wprowadzona do tejże komory. Dla pompki o pojemności 500 µl parametry wymiany płynów komory przedstawiono w tabeli 1.

	Temperature Controller	X	
	🔶 Temperatu	3	
	Pre-Heating Stage	Measurement Chamber Setpoint () 35,00 Cdeg	K
→	Controller On Off Pre-heatin Measurem	ig stage 24,60 Cdeg ent chamber 25,08 Cdeg	$\leftarrow$
	25,1- 25,05- 24,95- 24,95- 24,95- 24,85- 24,85- 24,75- 24,65- 24,55-	Time 09:05:40,5 2014-06-24	←_5
	Time a 12 8.88		

Rysunek 12. Okno sterujące temperaturą w komorze. 1-włącznik stabilizacji temperatury, 2-docelowa temperatura wprowadzanej cieczy, 3-docelowa temperatura w komorze, 4-aktualne temperatury doprowadzanego płynu oraz komory, 5-wyświetlacz temperatury.



Rysunek 13. System wymiany płynów komory w pozycji A (po lewej) oraz B (po prawej). (13)

Tabela 1.	Parametry	wymiany	płynów	komory (14).
-----------	-----------	---------	--------	--------------

Parametr	Wartość
Objętość pompki	500 μl
Minimalna pojemność	0,021 µl
Minimalny przepływ	0,42 µl/s
Maksymalny przepływ	50 µl/s

# Pomiar sygnału od beleczek

Sensor mikrobeleczkowy Cantisens® posiada układ 8 równoległych laserów o długości linii światła 850 nm. Światło laserowe po odbiciu od beleczek pada na diodę pozycyjną. Jako sygnał od beleczek traktowano mierzoną odpowiedź diody pozycyjnej na położenie wiązki światła na niej. Sposób przeliczenia tego sygnału oraz jego prezentacja na ekranie zależy od wybranego trybu pomiarowego. Modułem, który steruje pomiarem sygnału jest "Cantilever Signals". Dodatkowo podczas pomiarów w trybie dynamicznym korzysta się z modułu "Dynamic Mode Setup" w celu ustawienia parametrów pomiaru częstotliwości rezonansowej beleczki.

#### Tryb statyczny.

Do prezentacji wartości tego sygnału w oknie "Cantilever Signals" (Rys. 15) służy pierwszy wyświetlacz oznaczony jako p. 1. Podobnie jak przy wyborze laserów (rozdział 4.2.1) tutaj także klikając na odpowiedni znacznik wybiera się sygnały od beleczek, które mają być wyświetlone w formie wykresu (Rys.15 p. 2). Sygnał od beleczek jest przeliczany w zależności od parametrów ustawianych po prawej stronie okna (Rys. 15 p. 3) takich jak wzmocnienie sygnału (DC-Amplification), długość beleczki (Cantilever Lenght), czy też miejsce oświetlenia beleczki (Spot Offset). W dolnej części okna znajduje się włącznik pomiaru oznaczony jako p. 5 oraz włącznik zapisu danych wraz z wyborem ścieżki zapisu oznaczony jako p. 6. Po kliknięciu na przełącznik (Rys. 15 p. 7) możliwy jest pomiar



Rysunek 15. Okno sygnału od beleczek. 1-wyświetlacz dla trybu statycznego, 2-wybór wyświetlanych sygnałów, 3- parametry konwersji danych, 4-wyświetlacz dla trybu dynamicznego, 5- włącznik pomiaru, 6włącznik zapisu danych i wybór ścieżki zapisu, 7-wybór oświetlenia/pomiaru jednej beleczki, 8-ustawianie i odczyt częstotliwości próbkowania sygnału.

w trybie jednobeleczkowym ("Single mode"), w którym włączony zostaje wybrany laser

i są mierzone tylko parametry oświetlonej beleczki. Gdy przełącznik znajduje się w pozycji "*Off*" lasery są włączane tylko na czas pomiaru z częstotliwością ustaloną w panelu oznaczonym jako p. 8

#### Tryb dynamiczny

#### Metoda pomiaru całego widma

Metoda ta opiera się na cyklicznym pomiarze amplitudy drgań beleczek w określonym zakresie częstotliwości wzbudzającej. Dla każdej beleczki w zestawie pomiar wykonuje się oddzielnie, a do otrzymanej zależności dopasowywany jest model Lorentza (Rys. 16). Położenie wierzchołka tej krzywej odpowiada aktualnej częstotliwości rezonansowej beleczki. Ostatecznie otrzymujemy zbiór częstotliwości rezonansowych w czasie.

Do pomiarów w tym trybie służy moduł "Dynamic Mode Setup" (Rys. 17). Dla każdej beleczki konieczny jest oddzielny pomiar (miejsce wyboru beleczki oznaczono na rysunku jako p. 1). Możliwe jest ustawienie parametrów (Rys. 17 p. 2) takich jak: siła wzbudzenia beleczki do drgań przez materiał piezoelektryczny (Excitation), zakres częstotliwości w jakiej będzie beleczka wzbudzana (Start/Stop Frequency), krok próbkowania



Rysunek 16. Przykładowa zmierzona zależność amplitudy drgań od częstotliwości wzbudzającej Dopasowany model Lorentza (czerwona linia) do punktów pomiarowych (czarne punkty). W lewym górnym rogu przedstawiono parametry dopasowania.



Rysunek 17. Okno służące do pomiaru w trybie dynamicznym. 1-wybór beleczki, 2-parametry pomiaru, 3wyświetlacz amplitudy, 4-Wyświetlacz fazy, 5-zapis danych eksperymentalnych.

(Frequency Step) oraz częstotliwość próbkowania (Sweeping Frequency). Należy tu zauważyć, że wybrany krok próbkowania nie jest absolutny – po pomiarze całego zakresu z zadanym krokiem próbkowania, system automatycznie wraca do częstotliwości w jakiej zmierzył największą amplitudę drgań i w otoczeniu tego punktu próbkuje z dużo mniejszym krokiem. Dla największej amplitudy drgań wyznaczana jest automatycznie częstotliwość wzbudzająca (rezonansowa). Na wyświetlaczach w oknie prezentowany jest zebrany sygnał (Rys. 17 p. 3).

#### Metoda pętli synchronizacji fazy PLL (ang. Phase Locked Loop)

Pętla synchronizacji fazy wykorzystuje zasadę sprzężenia zwrotnego służącą do automatycznej regulacji częstotliwości. Opiera się na utrzymaniu tej samej różnicy fazy pomiędzy sygnałem wzbudzającym beleczkę do drgań, a sygnałem od drgającej beleczki. Pierwszym krokiem jest pomiar wartości efektywnej sygnału oraz fazy drgań beleczki w zależności od wzbudzającej częstotliwości (tak jak w rozdziale 0). Faza drgań przedstawiana jest na wyświetlaczu na Rys.17 p. 3. Dla największej amplitudy drgań jest ona zapisywana wraz z częstotliwością rezonansową. Obie wartości będą parametrami startowymi w pętli sprzężenia zwrotnego. Na Rys. 18 przedstawiono zasadę budowy pętli sprzężenia



Rysunek 18. Schemat działania pętli sprzężenia fazowego.

zwrotnego w celu wyliczenia i utrzymania stałej wartości zapisanej fazy. Jednostka centralna (oznaczona jako C) wysyła sygnał do generatora przestrajalnego napięcia VCO (ang. *Voltage Controlled Oscillator*), który wzbudza beleczkę sinusoidalnym sygnałem d(t) poprzez materiał piezoelektryczny. Beleczka odpowiada sygnałem s(t) przesuniętym w fazie o  $\varphi$ . Oba sygnały docierają do detektora fazy PD (ang. *Phase Detector*) gdzie są wymnażane przez siebie. Następnie wymnożony sygnał [1] trafia do filtra LP (ang. *Low-pass filter*) gdzie część sygnału zależna od czasu zostaje usunięta.

$$d(t) * s(t) = A\cos(\omega t) * B\cos(\omega t + \varphi) = AB * \frac{\cos(\omega t - \omega t - \varphi) + \cos(\omega t + \omega t + \varphi)}{2}$$
$$= \frac{AB}{2}\cos(\varphi) + \frac{AB}{2}\cos(2\omega t + \varphi)$$

Pozostały człon  $\frac{A * B}{2} \cos(\varphi)$  wraca do jednostki centralnej gdzie wyliczona zostaje faza  $\varphi$ . Następnie sygnał wysyłany do VCO jest tak dobrany, aby wartość częstotliwości rezonansowej dla wcześniej zmierzonej fazy była w środku wysyłanego zakresu częstotliwości. Ostatecznie otrzymuje się wykres częstotliwości rezonansowej beleczki w czasie. Do prezentacji tego sygnału służy drugi wyświetlacz w module "Cantilever Signals" (Rys. 15 p. 4).

# **Opis ćwiczeń**

Przed rozpoczęciem ćwiczeń należy zapoznać się z działaniem programu, korzystając z rozdziału "Aparatura i obsługa oprogramowania" umieszczonego powyżej.

# <u>Ówiczenie 1:</u> Wyznaczenie częstotliwości rezonansowej drgań beleczek o różnych długościach oraz dobroci krzywych rezonansowych w środowisku ciekłym i gazowym.

<u>Cel ćwiczenia:</u> Porównanie wartości częstotliwości rezonansowej drgań beleczek wyznaczonej doświadczalnie z wartościami przewidywanymi z teorii; Określenie wpływu środowiska pomiarowego na jakość sygnału.

#### Przebieg ćwiczenia:

1. Włączyć program Concentris (pasek Startu->Concentris) i czekać aż "romby" w programie zmienią kolor na zielony, świadczący o połączeniu sensora z oprogramowaniem. W razie braku połączenia wyłączyć program i spróbować ponownie. Zapoznać się z działaniem programu.

2. Umieścić uchwyt z zestawem beleczek w suchej komorze pomiarowej (UWAGA! Przenosząc zestawy beleczek w uchwycie należy zachować maksymalną ostrożność, tak aby nie uszkodzić zestawów.)

3. Ustawić światło lasera na końcu pierwszej beleczki (intensywność około 40 V). Sprawdzić czy ustawienie to jest prawidłowe dla pozostałych beleczek (Jeżeli zestaw ustawiony jest krzywo w uchwycie należy zgłosić to do prowadzącego). Zmienić w "Cantilever signals" przycisk "Single Mode" na "OFF" i sprawdzić w oknie "Laser Controler" czy dla wszystkich beleczek intensywność zbliżona jest do 40 V. 4. W programie w oknie "Dynamic Mode Setup" dla beleczki 1 (Cantilever) ustawić odpowiednio: *Excitation*= 5V, *Start Frequency*= 10 kHz, *Stop Frequency*= 1000 kHz, *Frequency Step*= 500 Hz, *Sweeping Frequency ok.* 8 Hz i uruchomić pomiar widma rezonansowego klikając "*Start*". Zapisać widmo rezonansowe klikając "*Save Graphs*" zapisując dane w folderze ze swoim nazwiskiem. Wykonać identyczny pomiar dla pozostałych beleczek, za każdym razem zapisując dane przez wybranie przycisku "*Save Graphs*". Po wykonaniu widma rezonansowego dla każdej beleczki warto zapisać ustawienia pomiaru przez wybranie przycisku "*Save Status*".

5. Wybrać dwie krzywe rezonansowe z widm rezonansowych dla każdej z beleczek i w danym zakresie (np. dla krzywej rezonansowej o maksimum dla 470 kHz ustawić *Start Frequency*= 390 kHz i *Stop Frequency*= 600kHz tak, aby widoczna była cała krzywa rezonansowa) wykonać dziesięciokrotny pomiar krzywej rezonansowej z krokiem *Frequency Step*= 50 kHz. Po każdym pomiarze zapisać krzywą rezonansową z inną nazwą. Po pomiarze należy wyłączyć laser w module Laser Controller.

6. Po wprowadzeniu do komory pomiarowej wody destylowanej (UWAGA! przez prowadzącego) wykonać pomiar (podpunkty 4 i 5) dla środowiska ciekłego. Po pomiarze należy wyłączyć laser w module Laser Controller.

# <u>Ćwiczenie 2:</u> Wyznaczenie średniej masy pojedynczej komórki drożdży *Saccharomyces cereviaise*.

Cel ćwiczenia: Wyznaczenie średniej masy komórki drożdży.

### Przebieg ćwiczenia:

- Włączyć program Concentris (pasek Start->Concentris) i czekać aż "romby" w programie zmienią kolor na zielony, świadczący o podłączeniu sensora z oprogramowaniem. W razie braku połączenia wyłączyć program i spróbować ponownie.
- 2. Poprzez zakładkę "*Measurement"* otworzyć potrzebne moduły: Laser Controller, Cantilever Signals, Dynamic Mode Setup.

- 3. Zmierzyć częstotliwość rezonansową pierwszego modu drgań wybranych beleczek. Czas pomiaru dla całego zestawu powinien wynosić 8 minut. Krok próbkowania powinien wynosić 50 Hz. Czas eksperymentu należy modyfikować poprzez zmianę zakresu pomiaru częstotliwości dla każdej beleczki (*Start/Stop frequency*), by była widoczna cała krzywa rezonansowa oraz częstotliwości próbkowania (*Sweeping frequency*).
- 4. Zapisać ustawione parametry (*Save status*)
- 5. Wykonać 10 serii pomiarowych dla czystego zestawu. W przypadku, gdy nie jest możliwe zebranie sygnału lub gdy położenie piku zmienia się więcej niż szerokość połówkowa pomiędzy kolejnymi pomiarami należy poprawić umieszczenie zestawu w uchwycie i powtórzyć procedurę.
- 6. Po pomiarze należy wyłączyć laser w module Laser Controller. Następnie wyjąć podstawkę z komory i nanieść zawiesinę drożdży na końce beleczek. Po nałożeniu drożdży wg instrukcji prowadzącego należy umieścić podstawkę w komorze pomiarowej oraz ponownie ustalić położenie wiązki na końcu beleczek.
- 7. Należy ustalić taką samą intensywność światła laserowego jak podczas pomiaru czystego zestawu oraz załadować ustawienia parametrów w module Dynamic Mode Setup (*Load Status*). Następnie wykonać punkt 5 aż do stabilizacji sygnału (Kolejne położenia wierzchołka sygnału rezonansowego powstają dla stałej częstotliwości wzbudzającej nie ma tendencji rosnącej w jej zmianie). Po ustabilizowaniu należy wykonać 10 serii w celu uzyskania odpowiedniej statystyki.
- 8. Po pomiarze należy wyłączyć laser w module Laser Controller. Podstawkę należy wyjąć delikatnie i przenieść zestaw beleczek do szalki Petriego ze szklanym dnem. Następnie uważnie przenieść w celu wykonania zdjęć mikroskopowych. W komorze pomiarowej umieścić podstawkę bez uchwytu.

#### <u>Ćwiczenie 3 (opcjonalne):</u> Detekcja jonów wapnia oraz badanie efektu bimetalicznego.

<u>Cel ćwiczenia:</u> zapoznanie się z działaniem trybu statycznego mikrobiosensora beleczkowego

#### Przebieg ćwiczenia:

Część 1

- Beleczki sfunkcjonalizowane glutationem umieścić w komorze pomiarowej (UWAGA! Zachowując wciąż środki ostrożności, tak aby nie uszkodzić zestawów). Ustawić światło lasera na beleczkach zgodnie z wykonywaną wcześniej procedurą.
- 2. Komorę napełnić wodą (Okno "Liquid handling", tryb A)
- Otworzyć okno "Cantilever signals", włączyć pomiar klikając "*Measuring*", a następnie wybrać przycisk "*Adjust*" w celu wyjustowania sygnału z beleczek.
- 4. Włączyć zapisywanie danych klikając na ikonę podpisaną "Record data"
- 5. Po kilku minutach napełnić komórkę 180 μl roztworu CaCl<sub>2</sub> 1.5 nM (dbając o to, by w oknie "Liquid Handling" wciąż ustawiony był tryb A)
- Ustawić wpompowywanie roztworu do komory: w oknie "Liquid Handling" zmienić tryb na B, objętość płynu: 60 μl w tempie 10 μl/s.
- 7. Po 10 minutach napełnić komórkę 180 μl roztworu EDTA (UWAGA! dbać o to, by w oknie "Liquid Handling" ustawiony był tryb A)
- 8. Ustawić wpompowywanie roztworu do komory: w oknie "Liquid Handling" zmienić tryb na B, objętość płynu: 60 μl w tempie 10 μl/s.

Część 2: Pomiar efektu bimetalicznego dla zestawu beleczek krzemowych pokrytych warstwą złota.

- Włączyć program Concetris (pasek Startu->Concentris) i czekać aż "romby" w programie zmienią kolor na zielony, świadczący o podłączeniu sensora z oprogramowaniem. W razie braku połączenia wyłączyć program i spróbować ponownie.
- Poprzez zakładkę "Measurement" otworzyć potrzebne moduły: Laser Controller, Cantilever Signals, Temperature Controller. Zestaw beleczek umieścić w komorze pomiarowej. Ustawić światło lasera na beleczkach zgodnie z wykonywaną wcześniej procedurą.
- W module *Temperature Controller* włączyć stabilizację temperatury w komorze na wartość 25°C.
- 4. W oknie *Cantilever Signals* włączyć pomiar przyciskiem *Measure* Następnie przyciskiem *Adjust* wyzerować wartość bieżącego pomiaru. Po stabilizacji sygnału

(zielona kontrolka pod przyciskiem Adjust) właczyć zapisywanie pomiaru klikając Record Data. Ustalić z prowadzącym miejsce zapisania danych.

- 5. Następnie co 3 minuty zwiększać temperaturę o 10 stopni do wartości 55°C i po osiągnięciu tej wartości wrócić do temperatury początkowej w takich samych krokach. Wykonać pomiar 3 razy.
- 6. Wyłączyć pomiar (klikając Measure), wyłączyć światło lasera i wyjąć podstawkę. Umieścić zestaw beleczek krzemowych. Umieścić w komorze i wykonać analogicznie pomiar zmiany odgięcia w zależności od zmiany temperatury.

# **Opracowanie danych**

#### **Ćwiczenie** 1

Część 1 (dotyczy jedynie wyników otrzymanych w pomiarze w środowisku gazowym)

Otrzymane pliki tekstowe otworzyć za pomocą programu Origin, wygenerować krzywą A(f) i dopasować krzywą Lorentza. Z parametrów krzywej odczytać wartość maksimum krzywej oraz szerokości połówkowej krzywej. Obliczyć średnią wartości maksimum krzywej z dziesięciu pomiarów. Obliczyć niepewność statystyczną.

Następnie wyznaczyć częstotliwość rezonansową drgań czterech pierwszych modów beleczek zgodnie z (17) oraz obliczyć niepewność systematyczną.

$$f = \frac{\lambda_n^2}{4\pi} \frac{h}{L^2} \sqrt{\frac{E}{3\rho}}$$
(1)

gdzie: E jest modułem Younga materiału (Esi= 169 GPa), p gęstością materiału beleczki  $(\rho_{Si}=2300 \text{ kg/m}^3)$ , w, h i L to odpowiednio szerokość, grubość i długość beleczki,  $\lambda_n$  to współczynnik opisany w równaniu (6)

Porównać wartości otrzymane ze wzoru (17) z wartościami uzyskanymi w doświadczeniu.

Część 2 (dotyczy wyników otrzymanych w środowisku cieczy i gazu)

Z dopasowania do krzywych rezonansowych otrzymanych w pierwszej części doświadczenia obliczyć dobroć pików rezonansowych zgodnie z ( ). Obliczyć średnią dobroć dla danej częstotliwości rezonansowej.

W ten sam sposób wyznaczyć dobroć krzywych rezonansowych wykonanych w środowisku ciekłym.

Porównać wartości dobroci krzywych rezonansowych w wodzie i powietrzu.

#### **Ćwiczenie 2**

Ostatecznym celem opracowania danych jest wyliczenie masy pojedynczej komórki drożdży opisanej wzorem:

$$\Delta m = \frac{m_0}{\Sigma U^2(z)} \left( \frac{f_n^2}{f_{n,\Delta m}^2} - 1 \right)$$

gdzie  $m_0$  – masa beleczki,  $f_n$  – częstotliwość rezonansowa przed nałożeniem dodatkowej masy,  $f_{n,\Delta m}$  – częstotliwość rezonansowa n-tego modu drgań po nałożeniu ładunku o masie  $\Delta m$  w odległości z od początku beleczki, U(z) – funkcja zależna od położenia masy na beleczce.

- Częstotliwość rezonansową przed jak i po nałożeniu masy należy wyliczyć jako średnią arytmetyczną zmierzonych 10 częstości rezonansowych po ustabilizowaniu sygnału. W pracy należy załączyć wykres częstotliwości rezonansowej od czasu dla każdej beleczki.
- Masę beleczki należy wyliczyć z jej wymiarów oraz tablicowej gęstości jej materiału. Wymiary należy wyliczyć poprzez analizę obrazów mikroskopowych beleczek. W programie graficznym (polecany ImageJ) należy zrobić profil linii prostopadłej i równoległej do beleczki przechodzących przez jej środek. Następnie otrzymaną linię należy zróżniczkować. Do otrzymanych krzywych dopasować profil Gaussa – położenie jego wierzchołka wskazuje położenie krawędzi beleczki.
- Funkcja U(z) opisują kształt beleczki ma postać :
  U(z) = A<sub>n</sub>(cos k<sub>n</sub>z cosh k<sub>n</sub>z) + B<sub>n</sub>(sin k<sub>n</sub>z sinh k<sub>n</sub>z)

Gdzie,  $B_n = 0.734346226$   $A_n = -1.00017956$  oraz  $k_n L = 1.875$ . W celu jej wyznaczenia należy zmierzyć odległość środka każdej komórki od końca beleczki. Należy mierzyć odległość w linie równoległej do dłuższej krawędzi beleczki. W pracy należy

umieścić także przykładowy obraz komórek. Dla każdej zmierzonej odległości należy wyliczyć wartość funkcji U(z).

- Korzystając z wzoru na masę  $\Delta m$  należy wyliczyć masę pojedynczej komórki drożdży.
- Wyliczoną masę porównać z wielkościami literaturowymi.

## **Ćwiczenie 3**

- Z otrzymanych danych należy wyliczyć zmianę wygięcia beleczki podczas zmian temperatury dla każdej beleczki.
- Należy wykonać wykres zależności zmiany średniego wygięcia beleczki od wielkości zmiany temperatury dla każdej beleczki.
- Porównać wyniki dla beleczek pokrytych warstwą złota z beleczkami tylko krzemowymi.

# Obowiązująca literatura

M.Grattarola, R.Raiteri, H.J.Butt, P.Skladal, Micromechanical cantilever-based biosensors, "Sensors and Actuators", 2001, nr 79 s.115-126

H. P. Lang, C. Gerber .Microcantilever sensors. Top Curr Chem. 2008;285:1-27. doi: 10.1007/128\_2007\_28. s.1-12

### Bibliografia przytoczona w części teoretycznej

E.Barrio, F.N.Arroyo-Lopez, S.Orlic, A.Querol, Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid, "International Journal of Food Microbiology", 2009, nr 131, s. 120-17

A.Boisen, S.Dohn, S.S.Keller, S.Schmid, M.Tenje, Cantilever-like micromechanical sensors, "Reports on Progress in Physics", 2011, nr 74, M.Calleja, J.Tamayo, P.M.Kosaka, J.J.Ruz, A.San Paulo, Biosensors based on nanomechanical systems, "Chem. Sov. Rev", 2013, nr 42, s.1287-1311

S.L.Forsburg, The yeast Saccharomyces cerevisiae and Schizosaccharomyces pombe: Modles for cell biology research, "Gravitational and Space Biology", 2005, nr 18, s. 3-9

J. Fritz, Cantilever biosensors, "The Analyst", 2008, nr 133, s. 855-863

M.K.Ghatkesar, V.Barwich, T.Braun, A.H.Bredekamp, U.Drechsler, M.Despont, H.P. Lang, M.Hegner, Ch.Gerber, Real-Time Mass Sensing by Nanomechanical Resonators in Fluid, "Sensors", 2004, vol. 2, s.1060-1063

K.M.Goeders, J.S.Colton, L.A.Bottomley, Microcantilevers: Sensing Chemical Interactions via Mechanical Motion, "Chem. Rev.", 2008, nr 101, s.522-542

M.Grattarola, R.Raiteri, H.J.Butt, P.Skladal, Micromechanical cantilever-based biosensors, "Sensors and Actuators", 2001, nr 79 s.115-126

A.Gupta, D.Akin, R.Bashir, Single virus particle mass detection using microresonators with nanoscale thickness, "Applied Physics Letters", 2004, nr 11, s. 1976-1978

B.Ilic, D.Czaplewski, M.Zalalutdinov, H.G.Craighead, P.Neuzil, C.Campagnolo, C.Batt, Single cell detection with micromechanical oscillators, "Journal of Vacuum Science & Technology", 2001, nr 19, s.2825-2828

B.Ilic, Y.Yang, K.Aubin, R.Reichenbach, S.Krylov, H.G.Craighead, Enumeration of DNA Molecules Bound to a Nanomechanical Oscillator, "Nano Letters", 2005, nr 5, s.925-929

H.P.Lang, M.Hegner, C.Gerber, Cantilever array sensors, "Materials today", 2005, nr 8(4), s. 30-36

B.N.Johnson, R.Mutharasan, Biosensing using dynamic-mode cantilever sensors: A review, "Biosensors and Bioelectronics, 2012, nr 32, s. 1-18

F. Rodrigues, P. Ludovico, C.Leao, An Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism, "Biodiversity and Ecophysiology oh Yeasts, Sugar Metabolism in yeast", 2006, s.101-121

J.M.Standard, Introduction do Molecular Vibrations and Infrared Spectroscopy, "Chemistry", 2013, nr 362

C.Verduyn, T.P.L.Zomerdijk, J.P.van Dijken, W.A.Scheffers, Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode, "Applied Microbiology and Biotechnology", 1984, nr 19, s.181-185

H.Ji, K.Hansen, T.Thundat, R.Datar, R.Cote, M.F.Hagan, A.K.Chakraborty, G.Wu, A.Majumdar, Origin of nanomechanical cantilever motion generated from biomolecular interactions, "Proceedings of the National Academy of Sciences", 2000, nr 98(4), s.1560-1564

http://concentris.ch (strona producenta)

CONCENTRIS. Functionalization Unit Operating Instruction. Vol 4.

CONCENTRIS. Cantisens Research Operating intrunctions. Vol 1.

CONCENTRIS. Dynamic mode operating instruction. Vol 2.

Potrzebne materiały:

- szalka Petriego ze szklanym dnem
- Probówka Eppendorfa x2
- pipeta Pasteura
- -woda destylowana

Do czyszczenia beleczek:

- -kwas siarkowy oraz nadtlenek wodoru
- (szklana pipeta na 10 ml) x2
- szklana szalka Petriego x2 (x3)
- kolba stożkowa
- krystalizator