

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA
SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA
Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

SVILUPPO DI UN SISTEMA PER IL
MONITORAGGIO DELLA CONCENTRAZIONE
BATTERICA TRAMITE IMPEDENZIOMETRIA

Elaborata nel corso di: Sensori e Nanotecnologie LM

Tesi di Laurea di:
FABBRI MARCO

Relatore:
Prof. TARTAGNI MARCO

Co-relatori:
Prof CRESCENTINI MARCO
Prof GIORDANO EMANUELE
Ing LUCIANI GIULIA

ANNO ACCADEMICO 2016–2017
SESSIONE III

PAROLE CHIAVE

Concentrazione batterica

Impedance microbiology

Microcontrollore

Conducibilità

Sensore impedenziometrico

Alla mia famiglia

Indice

Introduzione	ix
1 Materiali e metodi	1
1.1 Rilevamento dell'impedenza elettrica (Electric Impedance Sensing "EIS")	1
1.2 Sensore di conducibilità	2
1.2.1 Modello di Randles	4
1.2.2 Effetto di prossimità	6
1.2.3 Il sensore di temperatura	8
1.3 Sviluppo batterico degli E.Coli ed Impedance Microbiology	9
1.4 Spettrofotoscopia	13
2 Sviluppo del dispositivo	17
2.1 Descrizione del dispositivo	17
2.2 Il chip integrato	19
2.3 Gestione multi-core del chip integrato	21
2.4 Sleep-Mode e Watchdog-timer	22
2.5 Acquisizione dei dati in real-time	25
2.6 Interfaccia grafica	28
3 Risultati	31
3.1 Calibrazione del dispositivo	31
3.2 Prove di Impedance Microbiology ad incubatore statico	34
3.3 Prove di Impedance Microbiology ad incubatore in movimento	36
3.4 Prove di Impedance Microbiology con la compensazione della temperatura	38

Introduzione

Conoscere la concentrazione batterica di un campione biologico è di primaria importanza per molti segmenti di mercato come l'industria biomedicale, militare [10] [2], ma anche l'industria alimentare [8] e per il controllo ambientale [14]. In questi ultimi due casi, la necessità è quella di monitorare la concentrazione batterica sia sotto una certa soglia per garantire la prevenzione da infezioni batteriche [16]. L'identificazione e la quantizzazione dei microrganismi risulta essere un punto fondamentale nella biodifesa, nella sicurezza alimentare, nell'ambito diagnostico e nelle ricerche in campo farmaceutico [5]. L'obiettivo della tesi è lo sviluppo di un dispositivo per il monitoraggio della concentrazione batterica basato sulla variazione di conducibilità della soluzione nel tempo, dovuto all'accumulo di ioni nella soluzione in cui sono presenti i batteri. Questa tecnica prende il nome di *Impedance Microbiology* e presenta una serie di vantaggi rispetto alle tecniche tradizionali in termini di tempo e di denaro. La tecnica standard utilizzata per l'analisi della concentrazione batterica è la "Standard Plate Count", che risulta essere lenta e necessita di un laboratorio apposito con personale qualificato. Al contrario, la tecnica di *Impedance Microbiology* promette di essere più veloce della SPC, portando il tempo di analisi da 24-72 ore ad approssimativamente 12 ore. Questa tecnica inoltre ha il vantaggio di poter essere automatizzata e di non necessitare di personale qualificato, riducendo sensibilmente i costi di analisi.

Il punto di partenza di questa tesi è un chip, sviluppato nei laboratori dell'Università di Bologna, sede di Cesena, che permette di ricavare l'impedenza del dispositivo da testare (Device Under Test, DUT). Partendo quindi dalla possibilità di misurare l'impedenza di una soluzione, si è scelto di applicare questo dispositivo nell'ambito biologico, aggiungendo funzioni al microcontrollore che interfaccia il chip in modo da sfruttare i quattro core di cui il dispositivo è composto e utilizzando le funzioni di power-saving in modo da

ridurre il consumo energetico (in ottica di realizzare un dispositivo portatile) e il numero di dati ottenuti. I dati provenienti dal microcontrollore vengono quindi acquisiti tramite Matlab sfruttando la comunicazione seriale e il protocollo UART-USB. I dati vengono poi elaborati e visualizzati su un grafico in real-time, in modo da controllare il funzionamento del dispositivo. Nel primo capitolo verranno descritte in dettaglio i metodi biologici ed elettronici utilizzati: verrà descritto il metabolismo batterico che è alla base dell'impedance microbiology, la spettroscopia d'impedenza e il sensore di conducibilità.

Il secondo capitolo riguarderà lo sviluppo del dispositivo: verrà descritto il chip impedenziometrico alla base della misura, verranno descritte le nuove funzioni implementate nel microcontrollore, programma di acquisizione realizzato in Matlab e la sua interfaccia grafica.

Nel terzo capitolo verranno illustrati i risultati degli esperimenti svolti in laboratorio: partendo dalla calibrazione del dispositivo, sono stati testati vari set-up sperimentali per la crescita batterica e valutati i tempi di durata dell'analisi.

Infine, nell'ultimo capitolo, verranno tratte le conclusioni riguardo la realizzazione del dispositivo e gli sviluppi futuri.

Capitolo 1

Materiali e metodi

In questo capitolo sono presentati il background e le tecniche utilizzate per lo sviluppo della tesi.

1.1 Rilevamento dell'impedenza elettrica (Electric Impedance Sensing "EIS")

La spettroscopia d'impedenza è una tecnica utilizzata per indagare sulle caratteristiche elettriche di un materiale attraverso la caratterizzazione dell'impedenza, a seguito di una stimolazione in tensione a diverse frequenze e l'acquisizione della corrente in risposta o viceversa. Una generica impedenza Z può essere rappresentata da una parte reale e una parte immaginaria oppure da modulo e fase in questo modo:

$$Z = Z_0 e^{j\varphi} = Z_0(\cos \varphi + j \sin \varphi);$$

indicando con Z_0 il modulo e φ la fase oppure con $Z_0 \cos \varphi$ la parte reale e $Z_0 \sin \varphi$ la parte immaginaria dell'impedenza. In base al tipo di eccitazione ed alle esigenze, la spettroscopia può essere valutata nel dominio del tempo o della frequenza e i risultati vengono adattati ad un modello circuitale equivalente. Le tecniche impiegate per misurare l'impedenza si classificano in base alla tipologia di eccitazione utilizzata in ingresso al sistema e in base all'elaborazione dei segnali impiegata per ottenere l'impedenza equivalente. In letteratura sono riportati quattro diversi segnali che possono essere

impiegati indifferentemente in corrente o in tensione: gradino, impulso, segnale sinusoidale e rumore bianco o pseudo-random. La tecnica più diffusa nella misura dell'impedenza è l'applicazione di un segnale sinusoidale. In un sistema lineare e stazionario l'applicazione di un segnale sinusoidale in ingresso garantisce un segnale anch'esso sinusoidale in uscita con differenti modulo e fase seguendo la relazione:

$$\begin{aligned} \text{ingresso: } x(t) &= A \sin(\omega t) = A \sin(2\pi f t) \\ \text{uscita: } y(t) &= |G(j\omega)| A \sin(2\pi f t + \angle G(j\omega)). \end{aligned}$$

Modulo e fase dell'impedenza sono ricavabili dal seguente rapporto:

$$\begin{aligned} \frac{Y(f)}{X(f)} &= \frac{Y_0 \cos(\omega t)}{X_0 \cos(\omega t + \varphi)} = G_0 \frac{\cos \omega t}{\cos(\omega t + \varphi)} \\ &= G_0 \frac{2(e^{j\omega t} + e^{-j\omega t})}{2(e^{j(\omega t + \varphi)} + e^{-j(\omega t + \varphi)})} = G_0 \frac{(e^{j\omega t} + e^{-j\omega t})}{(e^{j(\omega t + \varphi)} + e^{-j(\omega t + \varphi)})} \\ &= G_0 e_{-j\varphi} = G_0(\cos \varphi - j \sin \varphi) = Z_0(\cos \varphi - j \sin \varphi). \end{aligned}$$

Poichè la frequenza è una costante della sinusoide, non vi sono i problemi delle tecniche transitorie, affetti da fenomeni di distorsione non essendo periodici; tuttavia nella pratica la scelta di una frequenza bassa implica un intervallo di attesa lungo per la risposta del sistema. Tale situazione può compromettere la misura se il sistema non è perfettamente stazionario, compromettendo il risultato finale. La tecnica invece presenta elevati vantaggi per misure ad alte frequenze, dove i tempi di attesa sono minimi, e per la quantità dei dati poichè viene considerata una sola frequenza. Per ottenere dunque l'andamento dell'impedenza a diverse frequenze sono richieste più misure.

1.2 Sensore di conducibilità

Il sensore di conducibilità è il dispositivo che permette di interfacciare il chip integrato con la soluzione contenente batteri per monitorarne la crescita attraverso misure elettriche. Il sensore utilizza quattro elettrodi per generare la misura di resistenza della soluzione; i due elettrodi più esterni vengono utilizzati per applicare una corrente sinusoidale mentre i due elettrodi vicini misurano la caduta di tensione dovuta alla resistenza offerta dal liquido al passaggio della corrente. Conoscendo quindi la caduta di tensione, è possibile ottenere la misura della resistenza offerta dal terreno

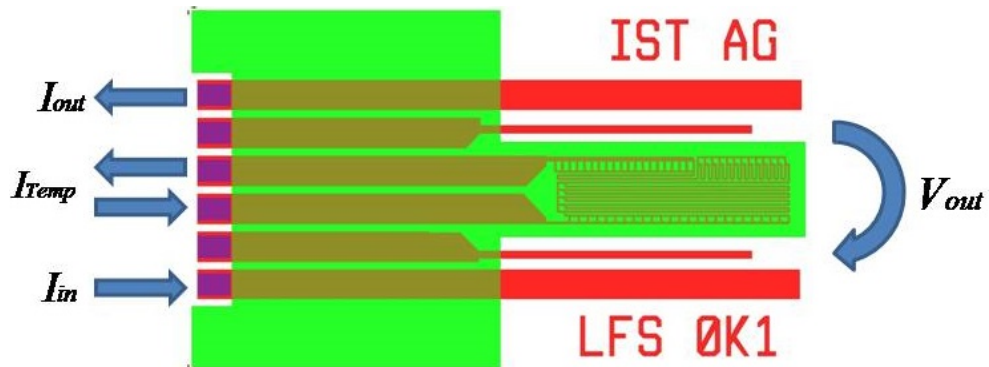


Figura 1.1: Schema del conducimetro: i due elettrodi esterni impongono una corrente in uscita, i due elettrodi adiacenti misurano l'output, la parte centrale è adibita alla misurazione della temperatura.[1]

di coltura e di conseguenza la sua conducibilità ($C = 1/R$). Viene poi ricavata la conduttività ionica (espressa come S/m o suoi sottomultipli, nella nostra applicazione mS/cm) come rapporto tra la conduttanza e la costante di cella del sensore, quest'ultima ottenuta come rapporto tra lo spessore della cella conduttometrica (misurata in cm) e la superficie affacciata degli elettrodi (misurata in cm^2). Questa operazione viene svolta per evitare la dipendenza dalla geometria del conducimetro. Il sensore utilizzato, per come è costruito, permette di svolgere le misure a quattro punti, perdendo di conseguenza la resistenza dovuta ai cavi che collegano il sensore al dispositivo.

Il dispositivo integra un sensore di temperatura Pt1000 per la misura della temperatura della soluzione; in questo caso viene effettuata una misura a due punti imponendo una corrente sinusoidale in uscita dal chip.

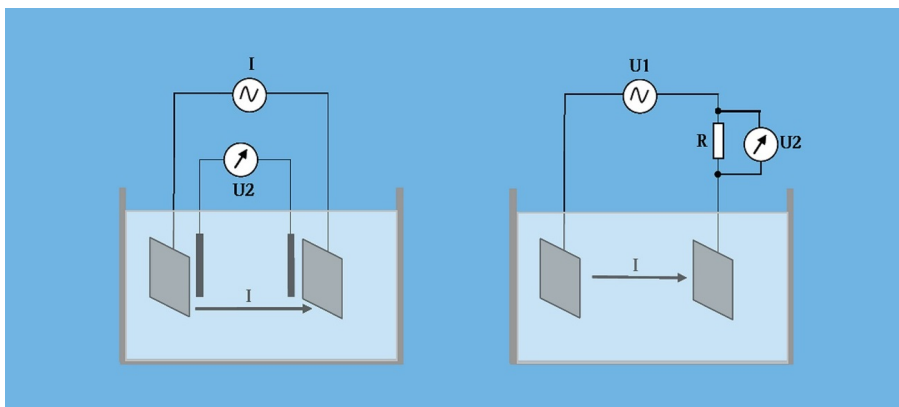


Figura 1.2: A sinistra, schema rappresentante una misura a 4 punti; a destra, schema rappresentante una misura a 2 punti[1]

1.2.1 Modello di Randles

Il modello di Randles è il circuito equivalente utilizzato nella spettroscopia d'impedenza elettrochimica per l'interpretazione dello spettro. L'impedenza di una cella elettrochimica è composta dalla resistenza del liquido e dall'impedenza dall'elettrodo. Partendo dal caso generale, l'impedenza dell'elettrodo a contatto con il liquido viene rappresentata come una connessione in parallelo di una capacità di double-layer C_{dl} e l'impedenza faradaica, a sua volta composta da una resistenza di charge transfer (R_{ct}) in serie a un'impedenza di Warburg (Z_w) [9]. L'equazione per calcolare l'impedenza di Warburg è:

$$Z_w = \sigma(\omega)^{0.5}(1 - j),$$

dove σ è il coefficiente di Warburg, ω la pulsazione e j l'unità immaginaria. In base al modello di Randles, il circuito equivalente di due sensori immersi in una soluzione può essere rappresentato come mostrato in figura: dove C_{dl} , R_{ct} e Z_w rappresentano l'impedenza all'interfaccia dell'elettrodo e R_s la resistenza offerta dalla soluzione. La combinazione di C_{dl} , R_{ct} e Z_w viene anche rappresentata con l'impedenza *constant phase angle* Z_{CP} con equazione:

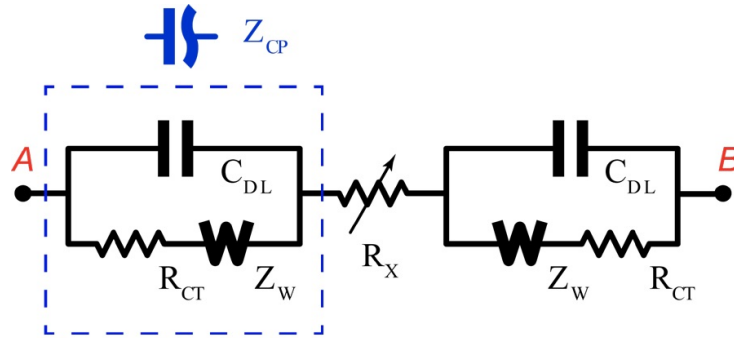


Figura 1.3: Equivalente elettrico di due sensori immersi in una soluzione[6]

$$Z_{CP} = \frac{A}{(j\omega)^\beta};$$

con A e β costanti e β inferiore a uno[6]. I working electrode sono realizzati in oro o platino; questi metalli permettono di ottenere elettrodi polarizzabili per piccoli segnali di eccitazione. Per gli elettrodi polarizzabili, sia la capacità di double-layer sia l'impedenza di Warburg possono essere considerati "infiniti" per segnali in continua. Tuttavia, applicando un segnale sinusoidale, all'aumentare della frequenza, l'impedenza dovuta alla capacità di double-layer C_{dl} diminuisce più velocemente rispetto all'impedenza faradaica. L'impedenza di Warburg può essere rappresentata nel diagramma di Cole-Cole: in ascissa viene rappresentata la parte reale dell'impedenza mentre sull'asse delle ordinate l'andamento della parte immaginaria, al variare della frequenza. La figura mostra come per le frequenze di interesse per il caso di studio, l'impedenza faradaica dovuta a R_{CT} e Z_W sia trascurabile, risultando cortocircuitata dalla capacità di double layer ad essa parallela per eccitazioni in AC. Il circuito equivalente può essere semplificato da una resistenza, rappresentante la conducibilità della soluzione, e da due capacità C_{dl} associate all'interfaccia elettrodo-liquido. Per frequenze tra 1KHz e 1MHz l'impedenza di C_{dl} può essere trascurata e quindi l'impedenza totale coincide con la resistenza; utilizzando frequenze più basse, la misura sarà invece influenzata dalla caduta di tensione dovuta all'effetto di double-layer ottenendo quindi un'impedenza totale più alta. Attraverso una misura con quattro elettrodi, i due elettrodi più esterni sono adibiti ad iniettare corrente mentre i due elettrodi interni sono usati per misurare la

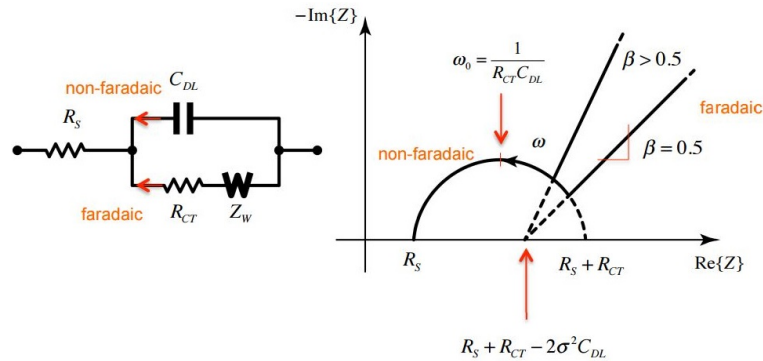


Figura 1.4: Diagramma di Cole-Cole dell'impedenza di Warburg [15]

caduta di tensione. Il vantaggio di usare misure a quattro elettrodi è che viene eliminato l'effetto di polarizzazione degli elettrodi. Con la corrente di stimolazione a una frequenza relativamente bassa è possibile evitare che la capacità parassita vada ad influenzare la misura della resistenza. Inoltre, poichè l'amplificatore differenziale ha un'impedenza d'ingresso elevata, la corrente non attraversa la capacità di double-layer degli elettrodi di misura e di conseguenza non ci sarà caduta di potenziale a causa di questa capacità e la tensione misurata sarà dovuta esclusivamente alla resistenza offerta dalla soluzione. Quindi gli effetti di polarizzazione sono rimossi.

1.2.2 Effetto di prossimità

Per tutte le celle conduttive, la corrente iniettata può essere divisa in due parti: una corrente interna che passa attraverso la soluzione delimitata dalla superficie degli elettrodi e una corrente di perdita che passa tra due elettrodi attraverso la soluzione circostante alla cella. Il rapporto tra le due correnti dipende dalla geometria del sistema. Se il liquido circostante è infinito, il rapporto tra le due correnti è costante. Anche se non è possibile avere un mezzo circostante infinito, gran parte del campo elettrico generato dal sensore risulta essere concentrato vicino agli elettrodi e il rapporto tra le correnti rimane costante se le dimensioni del liquido circostante risultano essere molto superiori rispetto alla cella. Tuttavia se la quantità di mezzo circostante non è sufficiente, oppure oggetti isolanti o conduttori si muovono

vicino alla cella, il rapporto cambia e le misure saranno affette da errore. Questo fenomeno è detto "effetto di prossimità"; una sua illustrazione è mostrata nella figura 1.5.

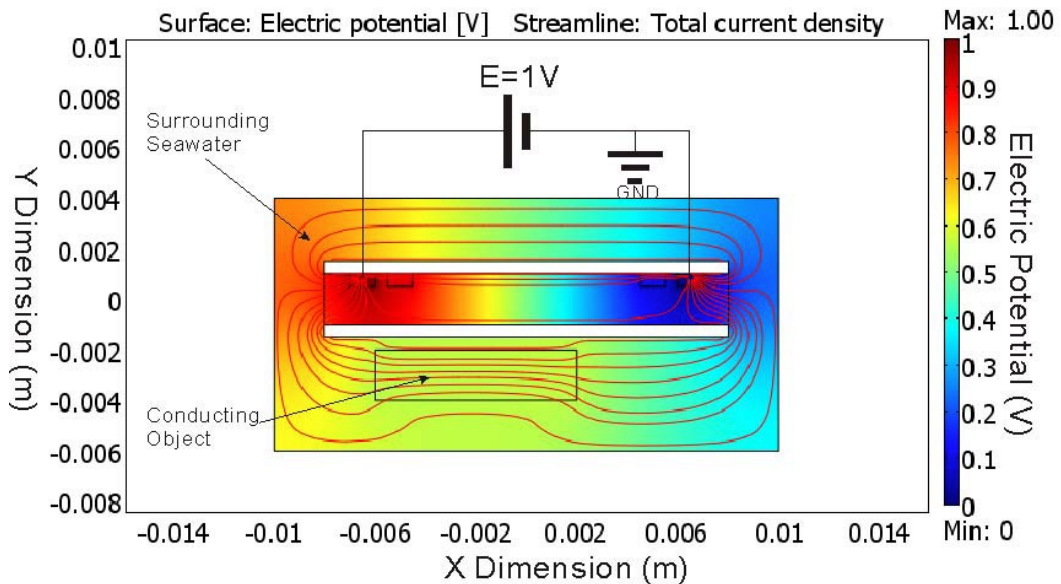


Figura 1.5: Rappresentazione in COMSOL dell'effetto di prossimità [4]

Qui viene mostrato come avvicinando un'oggetto conduttivo al sensore, il campo elettrico generato da quest'ultimo risulta essere modificato, causando un valore di conduttività misurata superiore. Nel caso contrario in cui un'oggetto isolante si avvicini al sensore oppure la quantità di liquido circostante non risulti essere sufficiente, la corrente di perdita sarà inferiore e la conduttività misurata risulta essere inferiore al valore reale. I due metodi per ridurre l'effetto di prossimità riguardano la diminuzione del campo elettrico generato dagli elettrodi ed il contenimento del campo elettrico all'interno del volume della cella. [9] Sono stati eseguiti una serie di test per valutare qualitativamente il disturbo dovuto all'effetto di prossimità; poiché i valori di conduttività misurati verranno normalizzati, il valore di conduttività assoluta non sarà di interesse. Tuttavia è stato necessario creare un set-up sperimentale stabile affinché la posizione del sensore non variasse nel tempo causando una variazione di conduttività non reale a causa di questo

effetto.

1.2.3 Il sensore di temperatura

Come detto precedentemente il sensore di conducibilità integra un sensore per la misurazione della temperatura a contatto con la soluzione. Durante la crescita batterica, la soluzione sarà posta in un incubatore con una temperatura fissa di 37°C tuttavia utilizzando il sensore integrato è possibile misurare direttamente la temperatura della soluzione, migliorando l'accuratezza. Oltre a questo, il sensore di temperatura permette di identificare la fase nella quale i batteri, non ancora ad una temperatura ottimale, non hanno iniziato a replicarsi ma si stanno adattando alle condizioni presenti nel terreno di crescita, definita "lag phase". Oltre a questo, il sensore di temperatura ci è utile per svolgere la compensazione della conducibilità in funzione della temperatura; all'aumentare della temperatura e a parità di concentrazione ionica la soluzione risulterà essere più conduttiva. Conoscendo la temperatura della soluzione e la conduttività a quella determinata temperatura, è possibile conoscere la conduttività a 25°C utilizzando la formula:

$$\kappa_{25^\circ} = \frac{\kappa_\theta}{1 + (\alpha_{\theta,25^\circ}/100)(\theta - 25)};$$

dove κ_{25° rappresenta la conduttività a 25°C, κ_θ la conduttività alla temperatura θ , $\alpha_{\theta,25^\circ}$ rappresenta il coefficiente di temperatura. In questo modo si ottiene la compensazione lineare della temperatura; la relazione tra la temperatura e la conduttività tuttavia non è lineare e quando l'assunzione di linearità non è adeguata è possibile applicare una formulazione polinomiale. Tecniche di compensazione non lineare sono ampiamente disponibili nonostante siano specifiche per le specie chimiche in soluzione [3]. Il sensore di temperatura installato è una termoresistenza (RTD) Pt1000 ovvero termoresistenze il platino (Pt) la cui resistenza alla temperatura di 0°C è pari a 1000Ω. La relazione che lega il valore di resistenza in uscita in funzione della temperatura è del tipo:

$$R(T) = R_0 \times (1 + \alpha_0 \times T + \alpha_1 \times T^2);$$

dove T indica il valore di temperatura, R_0 il valore di resistenza a 0°C, α_0 e α_1 sono i coefficienti polinomiali ottenuti dal datasheet del sensore.

1.3 Sviluppo batterico degli E.Coli ed Impedance Microbiology

Escherichia Coli è un batterio Gram-negativo ed è la specie più nota del genere Escherichia; è una delle principali specie di batteri che vivono nella parte inferiore dell'intestino di animali a sangue caldo ma è anche causa di contaminazione di tipo ambientale ed alimentare. Oltre a questo, gli E.Coli risultano essere tra i batteri più studiati e con un DNA facilmente modificabile, risultando essere batteri facilmente reperibili in commercio. Nella curva di crescita dei batteri si possono distinguere diverse fasi, caratterizzate da diverse velocità di crescita:

- lag phase: nella prima fase di crescita i batteri si adattano alle condizioni presenti nel terreno di crescita fresco sintetizzando RNA, enzimi e altre molecole utili; i batteri in questa fase maturano ma non avviene la replicazione oppure è molto lenta.
- log phase: è la fase caratterizzata dalla duplicazione batterica. In questa fase la velocità di crescita rimane costante e il numero di batteri raddoppia per ogni periodo di tempo consecutivo; graficando il logaritmo naturale della concentrazione batterica nel tempo produce una linea retta. Il rateo di crescita (e quindi la pendenza della retta) dipende dalle condizioni di crescita, quali la frequenza di divisioni cellulari e la sopravvivenza delle cellule figlie. La log phase avviene per un periodo di tempo limitato e si conclude quando il mezzo di coltura termina i nutrienti e si arricchisce di sostanze di scarto.
- stationary phase: fase di crescita in cui la replicazione batterica è limitata o annullata a causa dell'assenza di nutrimento e di fattori di crescita o dalla presenza di sostanze inibitrici come gli acidi organici. La stationary phase è il risultato di una crescita batterica uguale al tasso di morte. Il risultato è una concentrazione batterica che rimane costante e quindi una retta orizzontale nel grafico della curva di crescita.
- death phase: in questa fase la mancanza di nutrimento e le condizioni ambientali causano la morte cellulare e quindi la riduzione di concentrazione batterica. In questa fase, la rottura della membrana cellulare

causa la fuoriuscita del fluido intracellulare, più conduttivo del fluido extracellulare, e di conseguenza la conduttività della soluzione in cui i batteri sono immersi aumenta ulteriormente.

Il metabolismo fa riferimento a tutte le reazioni biochimiche che avvengono all'interno della cellula: i batteri trasformano sostanze di grandi dimensioni come polisaccaridi, lipidi, acidi nucleici e proteine in sostanze più piccole come monosaccaridi, acidi grassi, nucleotidi ed amminoacidi, per estrarre energia utile alla replicazione. Di conseguenza, questa conversione di sostanze di grandi dimensioni e poco conduttive in metaboliti carichi, piccoli e più mobili (che includono acido lattico, acido acetico, anidride carbonica, ammoniaca, bicarbonato ed urea) causa un cambiamento della composizione del terreno di crescita. Questo cambiamento può essere misurato come variazione della conducibilità e collegato alla concentrazione batterica per determinare la crescita microbica. [4]



Figura 1.6: Rappresentazione del metabolismo batterico: a sinistra le sostanze assorbite dai batteri mentre a destra le sostanze rilasciate come conseguenza del metabolismo

La tecnica dell'Impedance Microbiology si basa sulla curva di impedenza misurata nel tempo per conoscere la concentrazione batterica della soluzione ad inizio test. La variazione di impedenza viene misurata con una coppia di elettrodi immersi nella soluzione: finché la curva di crescita è nella lag phase oppure la concentrazione batterica è bassa, la variazione di conducibilità è nulla o trascurabile. Quando invece la concentrazione batterica supera un valore di soglia (generalmente intorno ai 10^6 - 10^7 CFU/ml), la

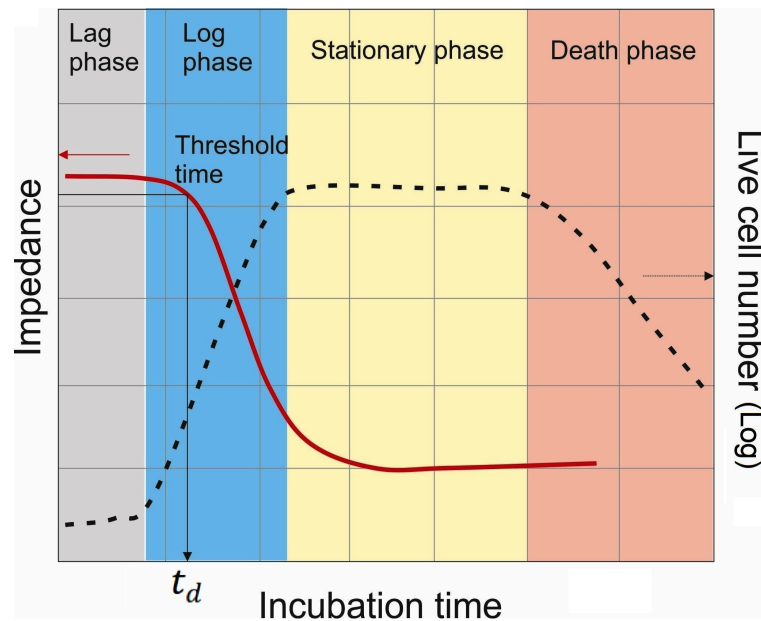


Figura 1.7: Curva di crescita batterica nel tempo e andamento dell'impedenza del terreno di coltura[4]

concentrazione di metaboliti prodotti non è più trascurabile e ciò causa la variazione di conducibilità. La soglia di concentrazione, indicata anche come *detection limit*, si riferisce alla concentrazione minima di microrganismi che devono essere presenti per ottenere la variazione di impedenza e dipende dalla geometria degli elettrodi, dal ceppo batterico, dalla composizione del terreno di coltura, etc. Il tempo richiesto dagli organismi per crescere fino al *detection limit* è chiamato *detection time*. Il *detection time* dipende da principalmente da:

- la concentrazione iniziale di batteri;
- la lag phase;
- il tempo impiegato dai batteri tra due replicazioni.

Il *detection time* può essere indicato come il punto di separazione tra la parte orizzontale e quella decrescente della curva dell'impedenza. Analisi

teoriche, confermate da osservazioni sperimentali, mostrano che il detection time (t_d) è legato alla concentrazione batterica iniziale C_0 e può essere espressa come:

$$\log(C_0) = -\alpha \cdot t_d + \beta;$$

dove α e β sono costanti e caratterizzati dal set-up sperimentale come ceppo batterico, geometria del sensore, mezzo di coltura etc. [17]

In fase di calibrazione del dispositivo, è possibile stimare i parametri α e β conoscendo il valore iniziale della concentrazione batterica di una soluzione con altre tecniche come lo Standard Plate Count (SPC) e, svolgendo il test, il valore di t_d del campione in esame:

$$\left\{ \begin{array}{l} \log(C_1) = -\alpha \cdot t_{d1} + \beta \\ \vdots = \vdots \\ \log(C_n) = -\alpha \cdot t_{dn} + \beta \end{array} \right\}$$

Applicando il metodo dei minimi quadrati si ricava il valore ottimale dei parametri; in fase di test invece, conoscendo t_d , α e β , è possibile ricavare la concentrazione di una soluzione incognita.

Il contributo totale all'impedenza può essere calcolato tramite un equivalente elettrico rappresentante la soluzione. Per l'applicazione di interesse, le frequenze di stimolo utilizzate sono inferiori a 1MHz e, per questo range di frequenze, l'impedenza totale può essere calcolata come la serie tra una resistenza (R_s) dovuta alla soluzione tra i due elettrodi e una capacità di double layer (C_{dl}) per ognuno dei due elettrodi. In base al circuito equivalente, quando il device under test viene stimolato con una tensione sinusoidale, l'impedenza (Z) del sistema è in funzione della resistenza (R_s), della capacità di double layer (C_{dl}) e della frequenza applicata (f), che possono essere espresse come:

$$|Z| = \sqrt{R_s^2 + \left(\frac{1}{\pi f C_{dl}}\right)^2};$$

Per frequenze inferiori ai 10KHz, la capacità C_{dl} contribuisce per la maggior parte al calcolo dell'impedenza totale mentre per frequenze tra i 10KHz e 1MHz l'impedenza totale risulta essere pressochè uguale alla resistenza offerta dal terreno di coltura. Come è comprensibile pensare, la produzione di metaboliti piccoli e carichi causa un'aumento della conducibilità e quindi una riduzione della resistenza imposta dal terreno di coltura. La capacità di double layer può essere espressa nella formulazione:

$$C_{dl} = \frac{\varepsilon_{dl} A}{d};$$

l'aumento della capacità di double layer è dovuto al cambio di composizione ionica nelle vicinanze della superficie dell'elettrodo. A causa del metabolismo, nelle vicinanze degli elettrodi saranno presenti un gran numero di molecole polari e di piccole dimensioni, le quali vanno a modificare la costante dielettrica e a diminuire lo spessore del double layer d . La diminuzione dell'impedenza totale è quindi dovuta ad una diminuzione della resistenza R_s e ad un aumento della capacità C_{dl} che avvengono in contemporanea a causa del metabolismo. Entrambe le variabili elettriche possono essere usate per ottenere il *detection time*; per lo sviluppo di questa tesi è stato utilizzato un sensore a conducibilità che effettua una misura a 4 punti, permettendo di trascurare la capacità di double-layer. La variazione di impedenza viene intesa come quindi come la riduzione della resistenza (quindi all'aumento di conducibilità) offerta dal terreno di coltura.

1.4 Spettrofotoscopia

Per monitorare e confrontare la concentrazione batterica nel tempo, viene utilizzato lo spettrofotometro, lo strumento che permette di svolgere le prove di spettroscopia. In questo caso si può parlare anche di spettrofotoscopia in quanto si utilizzano lunghezze d'onda appartenenti allo spettro del visibile per la luce incidente sul campione. Lo spettrofotometro basa la propria analisi sulla legge di Lambert-Beer, una relazione empirica che mette in relazione la quantità di luce assorbita con la natura chimica, lo spessore e la concentrazione del mezzo utilizzato. Lo spettrofotometro è composto da una lampada in grado di generare luce all'interno dello spettro ottico e UV; la luce emessa incide su un filtro che permette di eliminare la luce di tutte le lunghezze d'onda ad eccezione di quella di interesse. La luce monocromatica incide quindi sul campione e un sensore acquisisce la luce che è trasmessa dal campione. La quantità di luce che viene assorbita dal sensore viene rapportata con la luce emessa dalla sorgente, ottenendo in questo modo il valore di trasmittanza. Il valore in uscita dallo spettrofotometro rappresenta l'assorbanza, cioè il valore di luce assorbita dal campione, che è legato alla trasmittanza dalla relazione:

$$\frac{I_1}{I_0} = e^{-k\lambda l} = T = e^{-A}$$

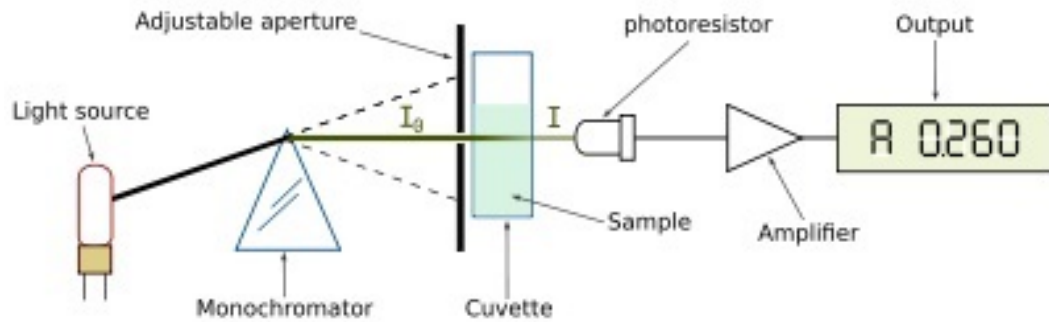


Figura 1.8: Schema di funzionamento dello spettrofotometro

dove I_1 e I_0 rappresentano la luce trasmessa ed incidente sul campione, k_λ rappresenta il coefficiente di attenuazione ad una determinata lunghezza d'onda e l lo spessore della soluzione attraversata. Definita quindi la relazione tra trasmissione e assorbanza, quest'ultima è legata al campione di interesse dalla legge:

$$A = \epsilon_\lambda l M$$

dove ϵ_λ è detta estinzione molare (considerata costante per una data sostanza ad una lunghezza d'onda), l rappresenta il cammino ottico (anche questo costante tra le varie prove poichè determinato dalla cuvetta) e M la molarità della soluzione. Durante gli esperimenti la concentrazione batterica della soluzione dipende dal valore di assorbanza mostrato dallo strumento poichè il valore misurato dipende esclusivamente dalla molarità della soluzione. Per ottenere il valore di assorbanza della soluzione è necessario avere un riferimento di zero, ottenuto come il terreno di coltura privo di batteri, e successivamente valutare l'assorbanza della soluzione di interesse. Tutte le prove di assorbanza vengono svolte in un contenitore a base quadrata di un centimetro chiamato cuvetta; questo permette di avere un cammino ottico costante e quindi di ottenere un valore di assorbanza dipendente solo dalla molarità di soluto presente in soluzione. Durante l'analisi è stata usata la luce filtrata affinché passasse solo quella con una lunghezza d'onda di 595nm, valore al quale i batteri assorbono maggiormente la luce.



Figura 1.9: Spettrofotometro utilizzato durante i test

Capitolo 2

Sviluppo del dispositivo

In questo capitolo si fornisce una descrizione del dispositivo, del suo funzionamento e dell'implementazione di nuove funzioni.

2.1 Descrizione del dispositivo

Il dispositivo utilizzato per effettuare le misure dell'impedenza è composto da una scheda PCB ("Printed Circuit Board") che interfaccia un chip adibito alla misura impedenziometrica con un microcontrollore che ne controlla il funzionamento. Il chip è un componente integrato (IC) che permette di effettuare una misura d'impedenza generando una corrente sinusoidale in uscita da applicare al DUT ("Device Under Test") ed elabora la caduta di tensione ai capi di quest'ultimo in modo da ricavare la parte reale ed immaginaria dell'impedenza misurata. Per poter generare i segnali in corrente in ingresso al DUT, il microcontrollore fornisce in ingresso al chip:

- un segnale di clock;
- un'inizializzazione per la configurazione di alcuni parametri interni (abilitazione dei core, ampiezza corrente di stimolo e guadagno dello stadio di amplificazione all'interno del chip);
- un segnale modulato che contiene informazioni sulla sinusoide.

Il protocollo SPI è un sistema di comunicazione che permette la comunicazione tra il microcontrollore e uno o più circuiti integrati. La trasmissione

avviene tra un dispositivo detto master (in questo caso il microcontrollore) e il dispositivo detto slave (il chip integrato) attraverso quattro segnali:

- SCK: Serial Clock: emesso dal master;
- SDO: Serial Data Output: dati in uscita dal dispositivo;
- SDI: Serial Data Input: dati in ingresso al dispositivo;
- SS: Slave Select: emesso dal master per scegliere con quale dispositivo comunicare.

La generazione del segnale sinusoidale avviene tramite una stringa di bit caricata nella memoria interna del microcontrollore che rappresenta la sinusoide modulata. Caricato quindi l'IC con i segnali di interesse, la corrente in uscita dal chip attraversa un LPF (Low Pass Filter) in modo da estrarre solo l'armonica di interesse ed eliminare il rumore ad alte frequenze. Il segnale pulito scorrerà attraverso il DUT e produrrà una caduta di tensione che sarà proporzionale all'impedenza misurata. La tensione prodotta viene misurata ed elaborata dal chip. Le uscite del chip sono un segnale di sincronismo e un segnale di output che vengono letti dai pin digitali del microcontrollore; sul fronte di salita del segnale di sincronismo si ottiene la parte reale dell'impedenza, sul fronte di discesa la parte immaginaria. Entrambi i segnali entrano dentro il microcontrollore; il segnale di sincronismo determina l'attivazione di un interrupt che permette il calcolo della tensione misurata a partire dai dati in input; il microcontrollore campiona sul fronte di salita o di discesa attraverso l'impostazione del registro apposito (INTCON2.INTxEP; dove x è associato ad un interrupt esterno) e applica il filtro "*sinc*³" ai dati ricevuti per ottenere il valore di tensione in uscita. L'intera scheda è alimentata tramite porta USB a 5V, a partire dalla quale sono state generate le alimentazioni dei vari componenti.

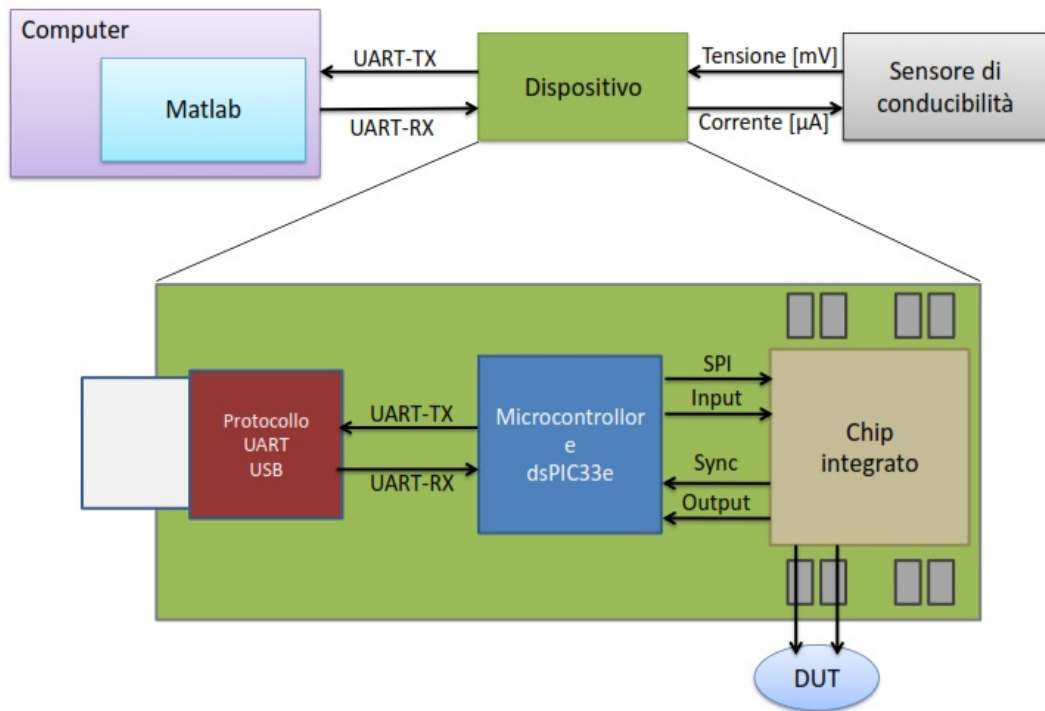


Figura 2.1: Schema a blocchi del sistema: in alto vengono mostrate le interazioni tra PC, dispositivo e sensore di conducibilità; in basso è mostrato il funzionamento interno del dispositivo

2.2 Il chip integrato

Il chip integrato nel dispositivo misura l'impedenza di un DUT basandosi su un modulatore passabanda delta-sigma (BPDS). La tensione attraverso il DUT è un segnale a banda stretta centrato a frequenza f_0 . Questo segnale viene poi sovracampionato alla frequenza f_s e convertito in una sequenza digitale a 1-bit da un modulatore BPDS in modo da mappare il rumore di quantizzazione fuori dalla banda di interesse. Le componenti complesse vengono separate campionando il segnale due volte ad una frequenza $f_s/2$ con uno sfasamento fisso di $\pi/2$ affinché siano in quadratura. Successivamente, un multiplexer digitale riconverte il segnale in banda base. Un filtro digitale poi sottocampiona il segnale per riportarlo alla propria larghezza di banda

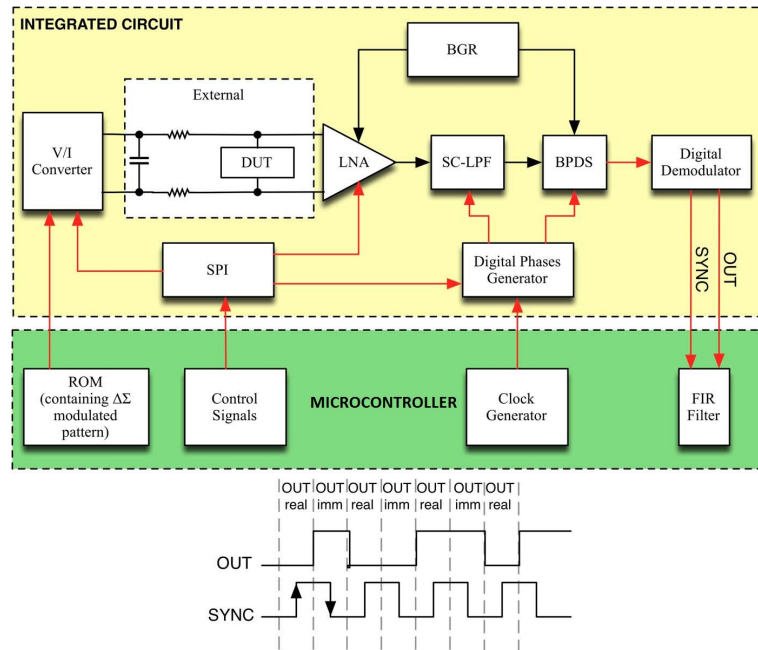


Figura 2.2: Schema a blocchi del chip per impedenziometria.[7]

e rimuove il rumore. La corrente sinusoidale alla frequenza f_{IN} è generata usando un modulatore delta-sigma ($\Delta\Sigma$); il pattern $\Delta\Sigma$ è ottenuto tramite Matlab e salvato nella memoria del microcontrollore. Il segnale in tensione viene convertito in corrente da un convertitore tensione-corrente e filtrato da un filtro LPF posizionato tra chip e DUT. Un amplificatore differenziale a basso rumore (LNA) con un'elevata impedenza in ingresso acquisisce ed amplifica la caduta di tensione misurata dal sensore. Infine per ottenere il valore dell'impedenza misurata, viene implementato nel microcontrollore un filtro FIR (Finite-Impulse-Response). Il chip integrato è completamente programmabile, con molti gradi di libertà; l'utente in questo modo può selezionare la frequenza della sinusoide, il guadagno del LNA, il rapporto di sovracampionamento, la corrente di stimolo e altri parametri. Grazie alla conversione $\Delta\Sigma$, l'utente può selezionare il trade-off tra larghezza di banda e precisione cambiando il rapporto di sovracampionamento[7].

2.3 Gestione multi-core del chip integrato

Il chip integrato presenta quattro core fisici che permettono di effettuare quattro misure attraverso diversi sensori allo stesso tempo. Ogni core a sua volta genera un segnale di output ed un segnale di sincronismo che possono essere letti indipendentemente dal microcontrollore. Ogni core può essere inizializzato tramite modulo SPI in maniera indipendente, in modo da scegliere i parametri più adatti per ogni sensore utilizzato. In figura 2.3

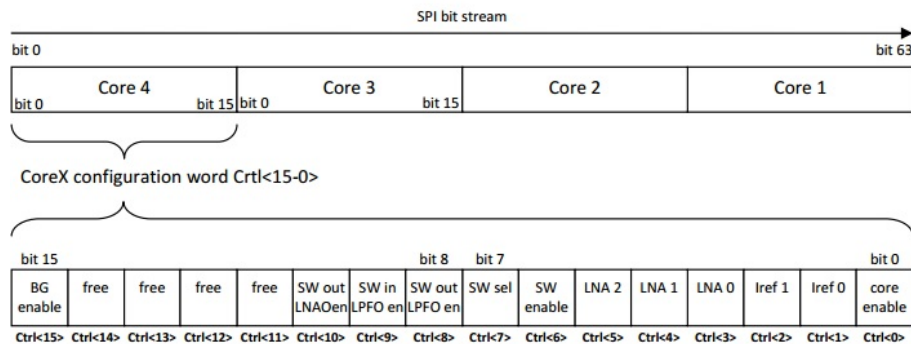


Figura 2.3: Bit di configurazione dei core del IC

vengono visualizzati i registri per inizializzare i core; in particolare:

- $\langle Ctrl3 - 5 \rangle$: LNA; permettono di settare il guadagno dell'amplificatore LNA per il core d'interesse a 0.5/1/2/5/10/20/50/100;
- $\langle Ctrl1 - 2 \rangle$: Iref; permettono di scegliere la corrente di stimolo impostandola a 10/150/300/1000 μA ;
- $\langle Ctrl0 \rangle$: Core Enable: permette di abilitare o disabilitare il core.

Ad ogni core è quindi associata una routine di interrupt che permette l'acquisizione della stringa di bit proveniente dal core per essere elaborata con il filtro *sinc*³. L'interrupt è un segnale asincrono che, quando viene attivato, genera un'uscita dalla sequenza di istruzioni presenti nel main-code per svolgere una serie di istruzioni presenti nel codice riguardante la routine di interrupt. Eseguito l'interrupt, il microcontrollore riprende il main-code dal

punto di interruzione. Sono state scritte quindi quattro routine di interrupt, una per ogni core, dove viene specificato da quale pin il microcontrollore deve acquisire l'output del chip integrato ed il segnale di sincronismo. Per selezionare il core dal quale acquisire i dati, viene abilitato solo l'interrupt di interesse modificando il bit del registro ad esso associato ("Interrupt Location Bit") come spiegato nel capitolo riguardante gli interrupt dal datasheet del microcontrollore[11]. Ottenuto il segnale di interesse, viene disabilitato l'interrupt appena compiuto ed abilitato l'interrupt associato al core successivo. Come detto precedentemente, il segnale della parte reale dell'impedenza si ottiene sul fronte di salita del segnale di sincronismo mentre la parte immaginaria sul fronte di discesa. Per fare ciò è possibile programmare il microcontrollore affinché l'interrupt venga scatenato sul fronte d'interesse modificando il bit del registro `INTCON2.INTxEP`, dove `x` indica l'interrupt esterno legato al core da cui acquisire i dati[11]. L'acquisizione dei dati provenienti da un core e la conseguente abilitazione dell'interrupt ad esso associato dura 8 secondi: 4 secondi sono adibiti all'acquisizione della parte reale e 4 secondi alla parte immaginaria dell'impedenza misurata; tutto questo viene quindi ripetuto per ogni core. I dati vengono acquisiti con una frequenza di 7,5Hz; la media dei dati verrà mostrata come singola misura nell'interfaccia utente.

2.4 Sleep-Mode e Watchdog-timer

Nel microcontrollore utilizzato sono implementate una serie di funzioni diverse che permettono di ridurre il consumo di potenza; queste funzioni sono definite appunto "Power-Saving Mode". Le due funzioni disponibili sono:

- "Sleep Mode": la sorgente di clock del sistema e tutte le periferiche sono disabilitate. È la modalità a più bassa potenza disponibile.
- "Idle Mode": la CPU viene disabilitata ma la sorgente di clock del sistema e le periferiche rimangono abilitate.

Attivando la Sleep Mode, l'oscillatore ad alta frequenza e potenza FRC viene disabilitato mentre può essere abilitato l'oscillatore a bassa frequenza LPRC se il Watch-dog Timer viene abilitato. L'attivazione della Sleep-Mode viene eseguita per due motivi: il risparmio energetico e la riduzione del numero di dati. In questi ultimi anni lo sviluppo tecnologico ha spinto

verso dispositivi sempre più potenti e piccoli, la gestione della Sleep-Mode è stata implementata in un'ottica di realizzare un dispositivo portatile, viste anche le ridotte dimensioni ottenute in fase di progettazione della scheda. La necessità di ridurre il numero di dati nasce dal fatto che la durata del test per valutare la concentrazione batterica della soluzione che si attesta mediamente alle 8 ore; in questo modo è possibile ridurre la quantità di memoria utilizzata e il numero di dati da elaborare.

È possibile uscire dalla Sleep-Mode e quindi “risvegliare” il dispositivo in tre modi:

- mediante interrupt;
- mediante Watchdog Timer;
- mediante Reset del dispositivo.

A causa delle specifiche nella realizzazione della scheda, l'unica possibilità è quella di utilizzare il Watchdog Timer. Il Watchdog è un sistema di temporizzazione hardware che permette alla CPU la rilevazione di un loop infinito di programma o una situazione di deadlock, effettuando un reset di sistema. Nel manuale del microcontrollore, oltre a questa funzione, viene espressamente indicato che il Watchdog può essere utilizzato per uscire dalla Sleep-Mode. Il Watchdog può essere abilitato e disabilitato tramite Watchdog Enable bit (FWDTEN) nel WDT Configuration Register (FWDT < 7 >). Quando il bit FWDTEN è al valore alto, il WDT è continuamente abilitato. Nel caso in cui il WDT è disabilitato dal registro FWDT, l'applicazione può opzionalmente abilitare il WDT tramite il Software Watchdog Enable Bit (SWDTEN) dal registro Reset Control (RCON < 5 >). La sorgente di clock del Watchdog-Timer è l'oscillatore a bassa potenza LFRC con funzionamento a 32KHz. Per regolare la durata del WDT si agisce configurando due registri: il "Prescaler", che viene configurato nel registro WDTPRE Configuration bit e il "Postscaler", configurato nel WDTPOST < 3 : 0 > Configuration bit. L'oscillatore alimenta il prescaler che può essere configurato a 5 bit (divido per 32) o a 7 bit (divido per 128). Con un input di 32KHz, il contatore del WDT viene aggiornato ogni 1ms nella configurazione a 5 bit oppure ogni 4ms nella configurazione a 7 bit. La variabile di postscaler divide l'output del WDT-prescaler permettendo di ottenere un maggior numero di range per il timer. Il setting del postscaler avviene tramite 4 bit, ottenendo 16 possibili configurazioni di rapporti: da 1:1 a

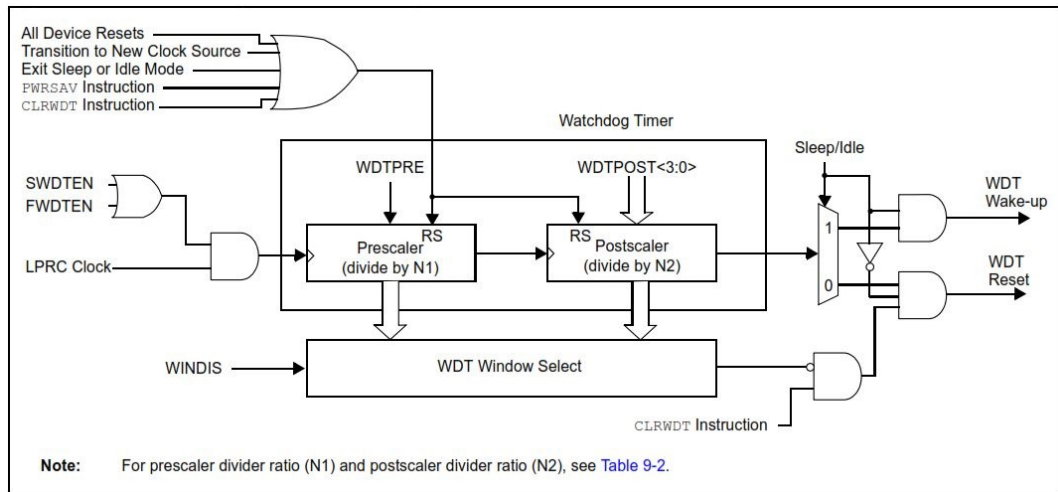


Figura 2.4: Diagramma a blocchi del Watchdog Timer [12]

1:32.768. Utilizzando il prescaler ed il postscaler è possibile ottenere un range di periodi di time-out che vanno da 1ms a 131s. Per l'applicazione di interesse è stato utilizzato un prescaler a 7 bit e un rapporto del postscaler 1:32.768; applicando la formula per calcolare la durata del WDT presente nel datasheet:

$$T_{WTO} = (N1) \times (N2) \times (T_{LPRC})$$

dove N1 è il rapporto di divisione del Prescaler, N2 è il rapporto di divisione del postscaler e T_{LPRC} il periodo dell'oscillatore a bassa potenza, si ottiene il WDT di massima durata possibile, cioè 131 secondi. Il WDT viene resettato automaticamente ogni volta che viene invocata una funzione di "Power-Saving". Quando il WDT risveglia il dispositivo dalla Sleep-Mode, il codice ricomincia ad essere eseguito dall'istruzione immediatamente successiva a quella di attivazione del "Power-Saving".

Come detto precedentemente, il dispositivo può essere risvegliato anche tramite interrupt. Questo interrupt può essere generato sia utilizzando un timer interno oppure tramite il modulo Real-Time-Clock-Calendar (RTCC) quando viene verificata una condizione specificata dall'utente. In modo particolare il modulo RTCC è particolarmente utile nelle applicazioni di elevata durata poiché permette di avere un riferimento temporale di un'applicazione

mentre questa è in funzione. L'utilizzo del timer invece permette di avere una maggiore flessibilità sulla durata del Powersaving. Tuttavia non è stato possibile implementare nessuna di queste tecniche poichè necessitano per il funzionamento di un oscillatore secondario a bassa potenza esterno, quindi indipendente dal clock del sistema; sono tuttavia tecniche più idonee per l'implementazione di un dispositivo che debba essere risvegliato dalla Sleep-Mode [12].

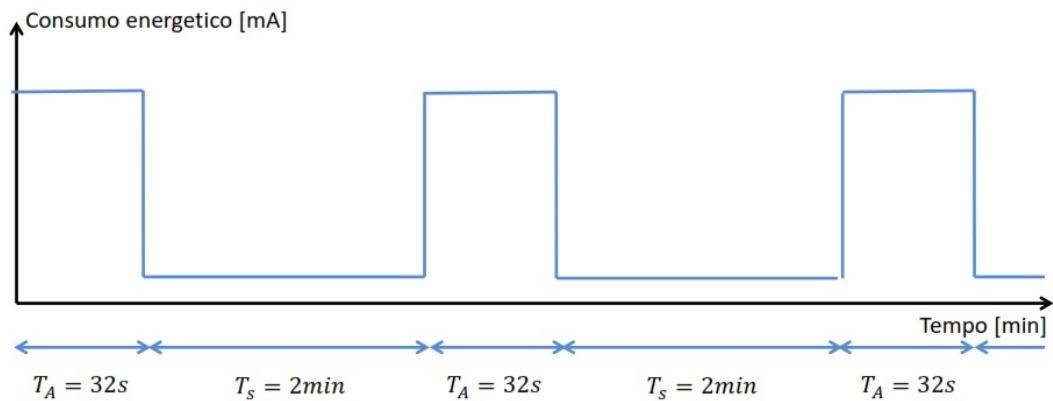


Figura 2.5: Rappresentazione delle fasi di Sleep-Mode (T_S) e di acquisizione (T_A) e relative durate

2.5 Acquisizione dei dati in real-time

I dati acquisiti dal chip ed elaborati dal microcontrollore vengono inviati al computer tramite dispositivo UART ed interfaccia microUSB-USB. Il modulo UART (acronimo di Universal Asynchronous Receiver Transmitter) è un canale di comunicazione full-duplex e asincrono per la comunicazione con i dispositivi periferici attraverso protocolli come RS-232, RS-485, LIN e IrDA. Affinchè la comunicazione tra microcontrollore e computer avvenga in maniera corretta, è necessario che l'UART venga configurato nella stessa maniera in modo che i bit per la comunicazione e i bit contenenti l'informazione vengano riconosciuti. La prima cosa da fare è settare il Baud-Rate (numero di dati trasmessi al secondo) del microcontrollore e del computer

affinchè abbiano la stessa velocità in lettura e scrittura. La trasmissione asincrona utilizza i bit per indicare l'inizio di un dato, la sua fine e se la trasmissione è avvenuta correttamente. Il bit che indica l'inizio di un dato in trasmissione si chiama bit di partenza ed ha polarità opposta alla condizione normale (valore basso o 0); il bit di stop invece è di polarità normale (valore alto o 1) e crea uno spazio prima del dato successivo. Il bit di parità è il bit adibito alla rilevazione di errori durante la trasmissione. Il bit di parità ha due varianti:

- bit di parità pari: si pone tale bit uguale a 1 se il numero di "1" in un certo insieme di bit è dispari;
- bit di parità dispari: si pone tale bit uguale a 1 se il numero di "1" in un certo insieme di bit è pari.

Modificando i registri di interesse, il microcontrollore è stato impostato affinché i dati inviati in uscita abbiano un solo bit di stop, il dato sia lungo 8 bit e non ci siano bit di parità. Queste informazioni sono anche fornite al codice Matlab adibito alla lettura dei dati provenienti dal microcontrollore affinché i bit in ricezione abbiano lo stesso significato di quelli in trasmissione. Dopo aver abilitato il modulo tramite l'apposito registro, quando un dato è pronto per essere inviato, viene generato un interrupt che permette la trasmissione del dato[13].

La fine della trasmissione di un intero dato (quindi il valore di tensione misurato ai capi del sensore di conducibilità) invece viene indicata tramite i caratteri di "Line Feed" e "Carriage Return". Questi due caratteri vengono chiamati caratteri di controllo e non rappresentano nessun simbolo scritto; il carattere di line feed è utilizzato per terminare una linea di testo mentre il carattere di Carriage Return è utilizzato per il comando di ritorno a capo. Per la lettura dei dati e per ottenere un grafico in real-time è stato realizzato un programma in Matlab tramite le funzioni che permettono la comunicazione tramite porta seriale. Al centro del programma per la comunicazione tra computer e microcontrollore c'è la funzione "serial" che crea un oggetto di porta seriale di cui è possibile modificare le proprietà della connessione in base alla configurazione scelta. In questo modo vengono impostati la porta seriale con cui avviene la trasmissione, il carattere di terminazione (in questo caso il carattere di "line feed"), il Baud-rate, la presenza del bit di parità e il numero di bit di stop; queste impostazioni devono essere fatte

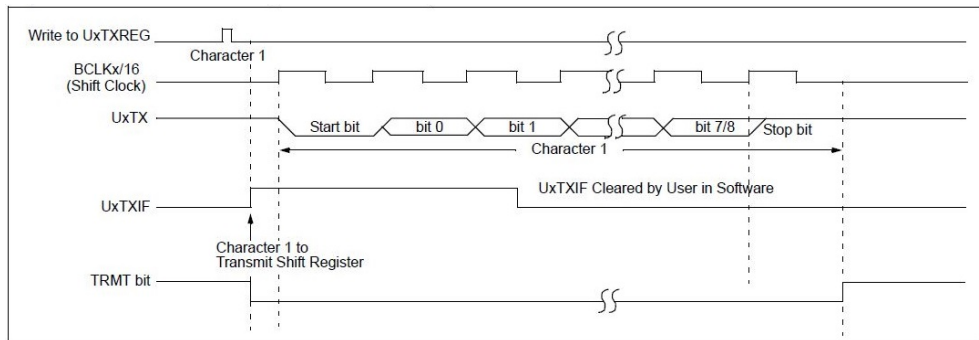


Figura 2.6: Funzionamento del modulo UART: l'interrupt flag permette la trasmissione di un dato, il quale è composto da un bit di inizio, 8 bit che rappresentano il dato vero e proprio e un bit di stop. [13]

in modo che le proprietà del modulo UART siano identiche a quelle del microcontrollore. Per identificare da quale core sono state effettuate le misure e se il dato indica la parte reale o immaginaria dell'impedenza, i dati in trasmissione sono preceduti da una stringa che ne permetta il riconoscimento. In fase di acquisizione verso il computer, il programma riconosce le stringhe e memorizza i dati in un vettore per una successiva elaborazione fino alla successiva stringa di riferimento.

Il programma in Matlab quindi acquisisce i dati provenienti dal microcontrollore, espressi in bit rappresentanti la caduta di tensione rispetto al fondoscala, calcola la resistenza misurata ed infine (nel caso di questa applicazione) la conduttività della soluzione $C = k/R$ dove C rappresenta la conduttività, R la resistenza misurata e k la costante di cella ricavata tramite calibrazione. Infine i dati ottenuti vengono graficati in real-time tramite interfaccia grafica. L'indicazione del tempo in cui viene effettuata l'acquisizione del dato si ottiene basandosi sul clock di sistema. Tramite la funzione "clock" è possibile ottenere la data corrente come vettore; ottenuta quindi la data di inizio dell'esperimento e la data di acquisizione del dato, tramite la funzione "etime" si ottiene l'istante in secondi tra le due date. Il dato in secondi ottenuto viene convertito in minuti (a causa della durata della prova) e associato al dato della misura (resistenza, conducibilità oppure temperatura) in modo da poter ottenere un grafico tempo-misura.

2.6 Interfaccia grafica

Per facilitare la visualizzazione dei dati dai quattro core del dispositivo è stata realizzata un'interfaccia grafica. La maggior parte di essa ospita il grafico dei dati provenienti da un singolo core in modo da ottenere la migliore visualizzazione possibile. Si è poi deciso di aggiungere un pannello contenente quattro pulsanti, ognuno collegato ad un core, che permettano di scegliere il grafico da visualizzare; in questo modo si rende più facile la visualizzazione real-time dei dati, vista anche la quantità di dati legati ad un esperimento. Sono presenti altri tre tasti che permettono il controllo del dispositivo:

- “Start”: permette di avviare l'analisi;
- “New Data”: permette di ottenere un dato aggiuntivo;
- “Stop”: permette di terminare l'analisi.

Prima della realizzazione dell'interfaccia grafica, il dispositivo veniva alimentato appena collegato al computer e iniziava immediatamente l'acquisizione delle misure di impedenza. Il tasto “Start” viene utilizzato con il seguente scopo: il dispositivo viene alimentato e si accende appena collegato al computer come prima e il microcontrollore esegue tutta la parte del firmware utile all'inizializzazione. A questo punto viene aggiunto un comando di Sleep prima della parte di codice adibita all'acquisizione dei dati in modo da bloccare il funzionamento del microcontrollore. Questo permette all'operatore di attivare il programma e far partire l'acquisizione dei dati senza generare un warning che richiama la funzione di timeout. Questa funzione viene chiamata automaticamente dal software quando non riceve i dati per un determinato periodo, chiudendo la comunicazione seriale. Premendo il tasto “Start” viene inviato un dato in trasmissione; questo causa un'interrupt in ricezione al microcontrollore che permette di uscire dalla modalità di “Power-Saving”. Il tasto “Stop” invece ha la funzione di bloccare il funzionamento del dispositivo: in questo caso viene attivata la modalità di “Power-Saving”, viene disattivato il Watchdog-Timer e il protocollo UART e viene disconnesso l'oggetto porta seriale tramite il programma Matlab in modo da interrompere la comunicazione seriale e il dispositivo non può essere risvegliato. A questo punto i dati e i grafici vengono salvati in un file in formato .mat. Il tasto “New Data” permette di ottenere una misura

d'impedenza quando premuto dall'utente, oltre alle misure svolte normalmente dal programma. Anche in questo caso la trasmissione tramite UART in ricezione al microcontrollore causa la generazione di un interrupt che farà uscire il dispositivo dalla modalità di "Power-Saving" per ottenere una nuova misura. I tasti vengono abilitati o disabilitati attraverso la configurazione dell'impostazione "Enable", in modo da evitare situazioni non desiderate. In fase di acquisizione le risorse computazionali offerte da Matlab sono utilizzate per la lettura dei dati provenienti dal microcontrollore e le funzioni richiamate dai tasti è rimandata a quando il microcontrollore entra in Sleep-Mode. Viene quindi mostrato un messaggio di avviso che il computer è in fase di acquisizione.

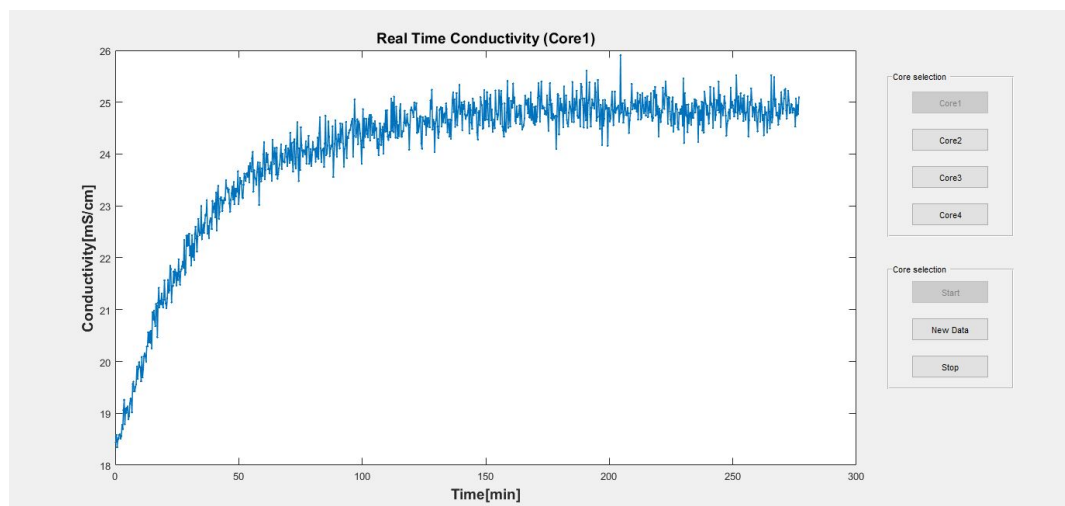


Figura 2.7: La "Graphical User Interface" sviluppata in Matlab per la visualizzazione delle misure in real-time; i pulsanti "Core 1" e "Start" vengono disabilitati per evitare conflitti tra i comandi.

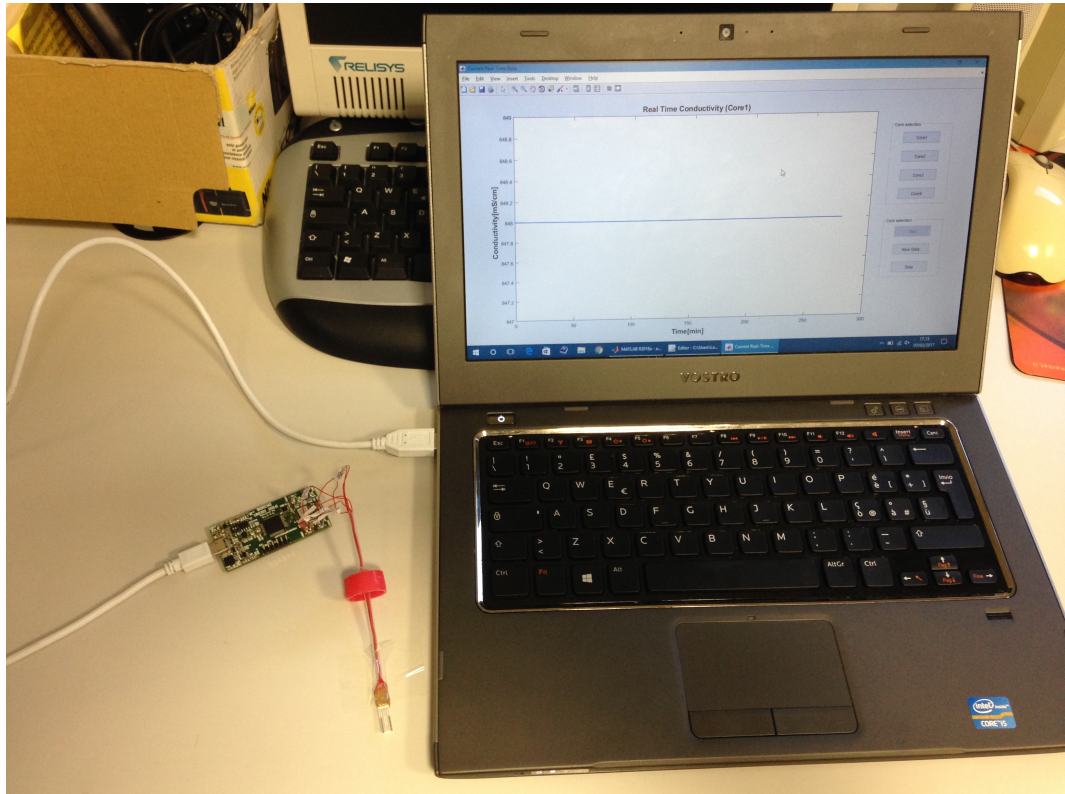


Figura 2.8: Il dispositivo utilizzato per le misure di impedenza e il collegamento al PC

Capitolo 3

Risultati

In questo capitolo vengono mostrati gli esperimenti realizzati per valutare il funzionamento del dispositivo.

3.1 Calibrazione del dispositivo

Per la calibrazione del dispositivo sono state effettuate le misure su soluzioni a conduttività nota in modo da ottenere come valore finale la costante di cella del sensore. La conduttività γ di una soluzione è legata alla concentrazione di soluto η dalla conduttività ionica equivalente Λ (o conduttanza specifica equivalente) dalla relazione:

$$\Lambda = \frac{\gamma}{\eta}.$$

Per lo svolgimento della calibrazione, sono state utilizzate cinque soluzioni di cloruro di sodio (NaCl) già presenti in laboratorio; la conduttività di queste soluzioni è nota e varia in un range da 10mS/cm a 20 mS/cm ad intervalli regolari. Il sensore di conducibilità è stato immerso in ogni soluzione in modo da ottenere un set di misure di resistenza, da cui è stata calcolata la media e la deviazione standard. Da datasheet del dispositivo [1], il sensore di conducibilità ha una costante di cella caratteristica di 0.4cm^{-1} e compresa tra 0.2cm^{-1} e 0.7cm^{-1} . Per la calibrazione del sensore, i valori di conduttività sono stati ricavati come rapporto tra un set di valori della costante di cella e le medie delle resistenze misurate da ogni soluzione. Tali valori sono stati confrontati con i valori di conduttività ottenuti con il con-

ducimetro da banco Thermorion 150A, utilizzato come gold-standard. Per ogni costante di cella utilizzata, è stata calcolata la norma dei residui:

$$|r| = \sum_{i=1}^n (f(x_i) - y_i)^2$$

ed è stata scelta la costante di cella che minimizza il valore della norma calcolata. Per il calcolo della conduttività durante gli esperimenti successivi, è stato utilizzato un valore di costante di cella $k = 0.65$.

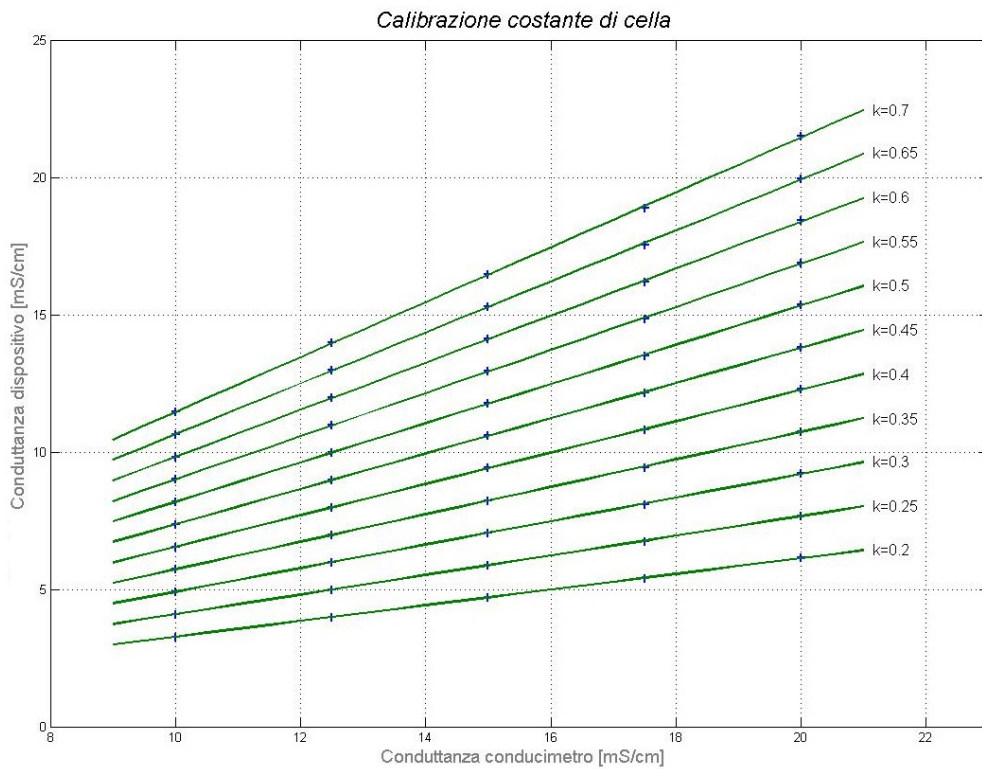


Figura 3.1: Valori di conduttività calcolati al variare della costante di cella

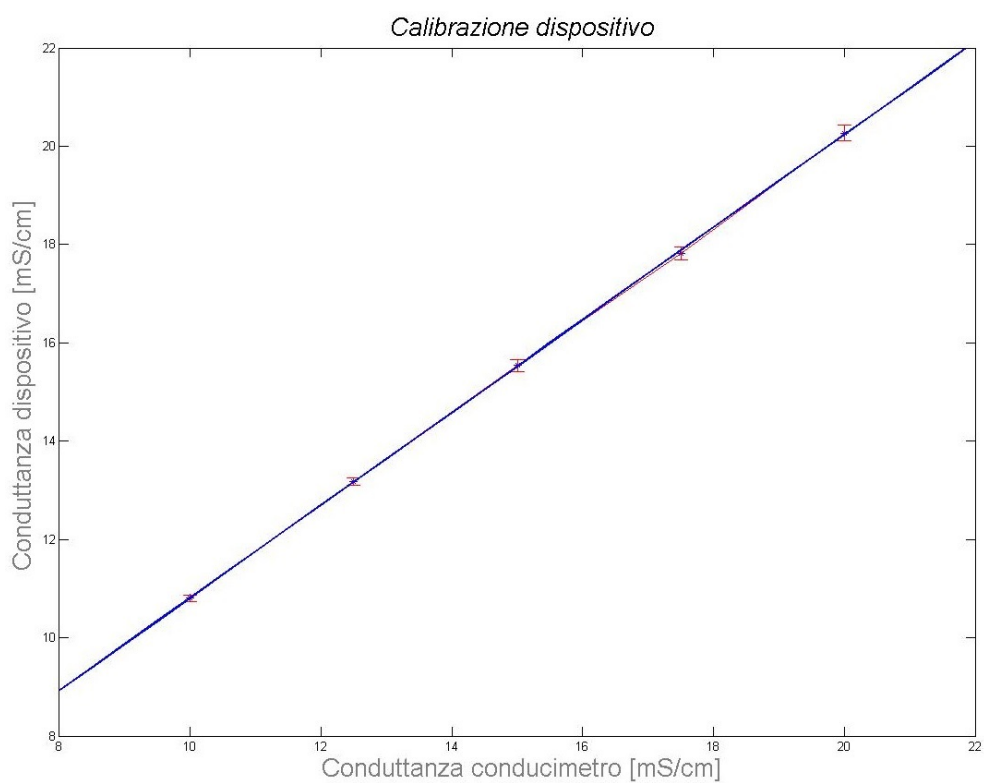


Figura 3.2: Media e deviazione standard delle misure di conduttività svolte su soluzioni a concentrazione nota con $k = 0.65$

3.2 Prove di Impedance Microbiology ad incubatore statico

Dopo aver sviluppato il dispositivo con le funzioni aggiuntive di interesse e aver creato il programma Matlab utilizzato per l'acquisizione in real-time, sono stati effettuati diversi test per valutare il funzionamento utilizzando soluzioni a concentrazione nota. Ottenuti risultati positivi dai test, si è passati alla misura di conduttività di una soluzione contenente batteri immersi in un terreno di coltura. I primi test sono stati svolti immergendo il sensore di conducibilità nelle provette Falcon da 15 ml. La scelta dell'utilizzo di queste provette è dovuta al compromesso tra la bassa quantità di terreno di coltura necessario per poter svolgere i test ed il diametro della sezione, sufficientemente grande da poter inserire il sensore. La base dell'incubatore utilizzato per i test su cui vengono appoggiate le provette può essere messa in oscillazione per migliorare l'ossigenazione e il mescolamento della soluzione, velocizzando la replicazione batterica all'interno delle provette. A causa della forma della Falcon da 15ml, tuttavia, è stato necessario svolgere i test eliminando l'oscillazione del piatto a causa della necessità di un set-up stabile. Il sensore viene quindi immerso in una soluzione contenente batteri E.Coli e terreno di coltura Lauria-Bertani posizionato in un incubatore a 37°C e il computer acquisisce i dati provenienti dal microcontrollore. I test svolti non hanno portato a nessuna conclusione a causa della scelta del set-up; sono stati svolti test della durata fino a 16 ore durante i quali non sono state osservate variazioni della conducibilità della soluzione. L'unica variazione di conducibilità della soluzione si ha ad inizio del test nel quale il campione viene portato dalla temperatura ambientale ai 37° per permettere ai batteri di crescere. Viene ipotizzato quindi che la coltura batterica non riesca a riprodursi a velocità necessarie allo svolgimento del test. A causa del mancato rimescolamento della soluzione, dovuto all'assenza di movimento del piano d'appoggio, i batteri precipitano per gravità sul fondo della provetta. Solo i batteri più sulla superficie dell'agglomerato ricevono adeguato nutrimento e solo una parte quindi riesce a replicarsi. Oltre a questo, l'ossigenazione della soluzione e la superficie di scambio risultano essere particolarmente limitati a causa della sezione della provetta. La sezione della provetta è anche causa di un valore di conducibilità misurata più bassa rispetto all'utilizzo di provette a sezione maggiore; questo è dovuto all'effetto di prossimità. Questo effetto tuttavia non causa un errore nel

test poichè non siamo interessati al valore di conducibilità assoluto della soluzione, ma all'istante in cui questo inizia a variare rispetto ad un valore di soglia.

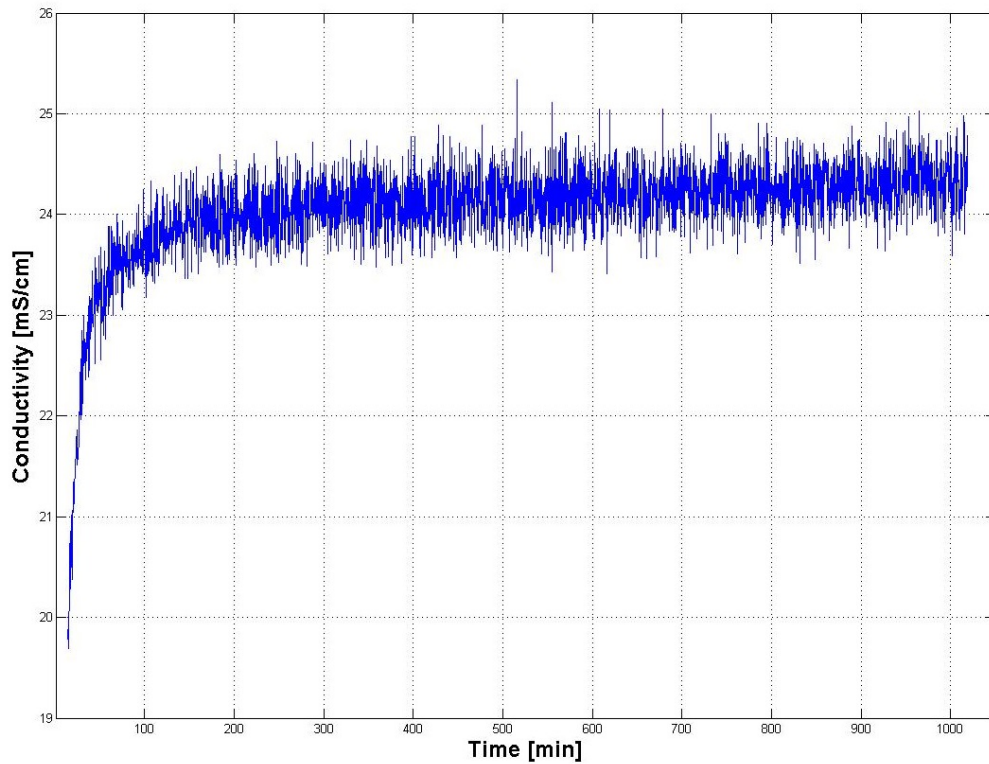


Figura 3.3: Risultati del test della misurazione della conducibilità durato 16 ore.

La bassa velocità di replicazione è dimostrata valutando il livello di assorbanza della soluzione tramite spettrofotometro. Alla fine del test il valore di assorbanza misurato era 0.65, un valore particolarmente basso se messo in confronto con il valore di assorbanza misurato nel caso di replicazione cellulare ottimale. In questo caso si raggiungono valori di assorbanza superiori ad 1 in approssimativamente 4 ore, partendo da valori di assorbanza intorno a 0.3.

3.3 Prove di Impedance Microbiology ad incubatore in movimento

Visti i risultati negativi ottenuti dal test precedente dove non si è osservata una crescita batterica significativa si è deciso di modificare il set-up sperimentale. Per garantire una crescita batterica ottimale, è necessario aggiungere il mescolamento meccanico della soluzione tramite la base oscillante dell'incubatore; in modo da ossigenare e garantire nutrimento ai batteri presenti in soluzione. Nel test svolto è stato effettuato un confronto della crescita batterica tra due soluzioni identiche fatte crescere in parallelo. Inizialmente è stata prodotta un'unica soluzione batterica che è stata divisa in due beute in modo che le due soluzioni avessero le stesse condizioni iniziali. Di queste due soluzioni, una è stata fatta crescere con il sensore di conducibilità in immersione in modo da monitorare in real-time la conducibilità della soluzione, l'altra è stata fatta crescere acquisendo i dati di assorbanza ogni 30 minuti (teoricamente la durata della replicazione batterica). Non è stato possibile acquisire la conducibilità e assorbanza dalla stessa soluzione poichè è stato necessario bloccare il sensore con la pellicola da laboratorio per migliorare la stabilità del sensore e fare in modo che la misura della conducibilità non sia affetta dal suo movimento. Le due beute sono state quindi posizionate all'interno dell'incubatore partendo da una temperatura ambientale.

Nella figura 3.4 si può notare come la crescita della conduttività nella prima fase sia dovuta ad un aumento di temperatura da quella ambientale a quella dell'incubatore. Nella fase successiva, visibile dopo che sono trascorsi 80 minuti dall'inizio della prova, la crescita della conduttività è dovuta alla produzione di metaboliti da parte dei batteri mentre la temperatura si ipotizza costante poichè ha raggiunto quella indicata dall'incubatore. Questa seconda parte della curva non era visibile nei test con il pavimento dell'incubatore fisso; si nota, in questo caso, che i batteri sono in una condizione migliore per la loro crescita e ciò è confermato dai valori di assorbanza misurati. La curva di conducibilità ottenuta tuttavia risulta essere diversa da quella ipotizzata nella tecnica dell'impedance microbiology. Dalla curva mostrata in figura 3.5 si può notare un aumento dell'assorbanza, corrispondente ad un aumento della concentrazione batterica, quando ancora il livello di conduttanza, mostrato in figura 3.4, cresce a causa della temperatura. Si può quindi dedurre che parte della curva di crescita della conduttanza dovuta

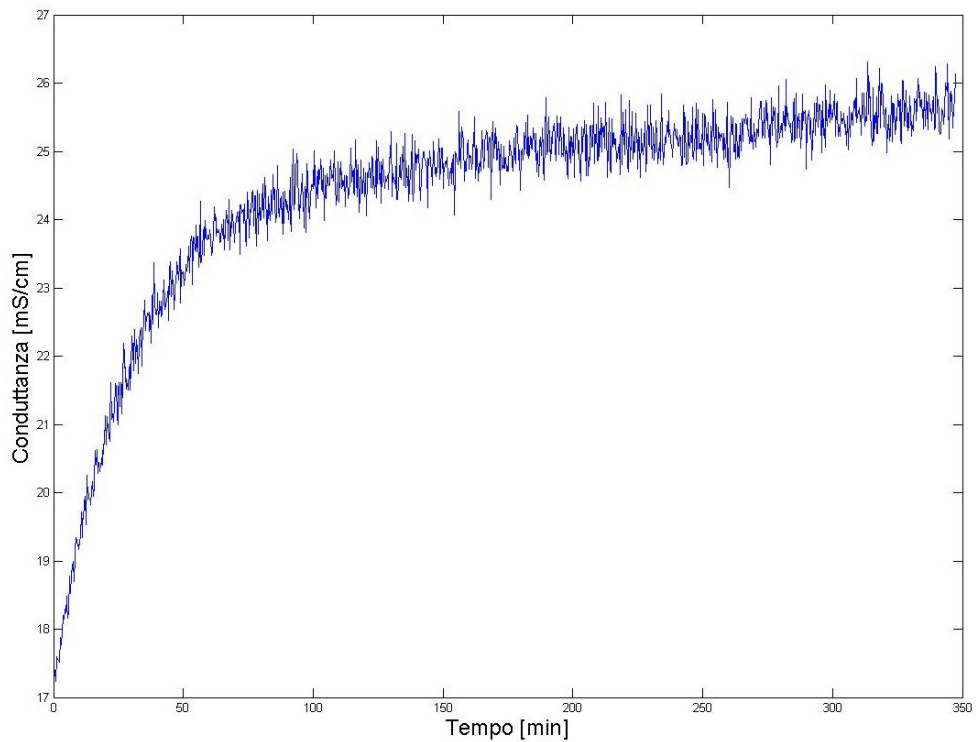


Figura 3.4: Conduttanza misurata nel tempo

alla produzione di metaboliti, viene nascosta dall'aumento di conduttanza dovuto alla temperatura e con sè l'informazione sul detection time e quindi sulla concentrazione batterica iniziale della soluzione. Poichè al momento della prova il prototipo permetteva la lettura della sola conducibilità, non è stato possibile collegare il sensore di temperatura integrato nel sensore in modo da effettuare la misura della temperatura in parallelo alla misura della conduttanza. Questo avrebbe permesso di ottenere un valore di conduttanza indipendente dalla temperatura attraverso una compensazione di tipo lineare, come mostrato nel capitolo riguardante il sensore utilizzato.

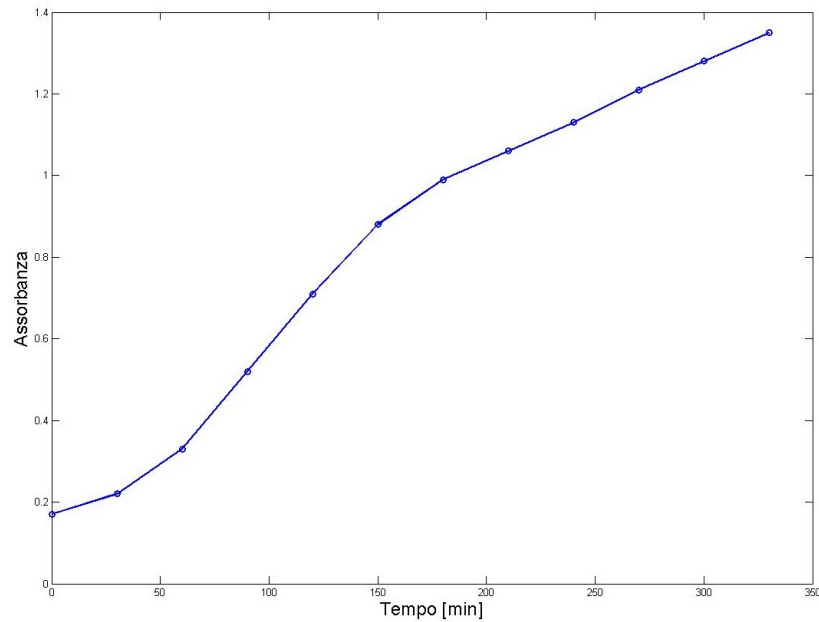


Figura 3.5: Assorbanza misurata nel tempo

3.4 Prove di Impedance Microbiology con la compensazione della temperatura

A causa del malfunzionamento dei core presenti nel dispositivo e di conseguenza, l'impossibilità di effettuare parallelamente le misure di temperatura e conduttività, la temperatura è stata misurata con una termocoppia e un multimetro ad esso collegato. Anche in questo caso è stata creata un'unica soluzione divisa in due campioni con le stesse condizioni iniziali; di un campione è stata misurata la conduttività in real-time mentre dall'altro sono stati ricavati i valori di temperatura ogni minuto e di assorbanza ogni 30 minuti. Le misure di conduttività sono state poi elaborate con un filtro a media mobile.

In figura 3.6 è mostrata la conduttività del campione applicando la compensazione lineare della temperatura. Ad ogni misura dell'impedenza ricavata con il dispositivo è stata applicata la formula:

$$k_{25^\circ} = \frac{k_\theta}{1 + (\alpha_{\theta, 25^\circ} / 100)(\theta - 25)}$$

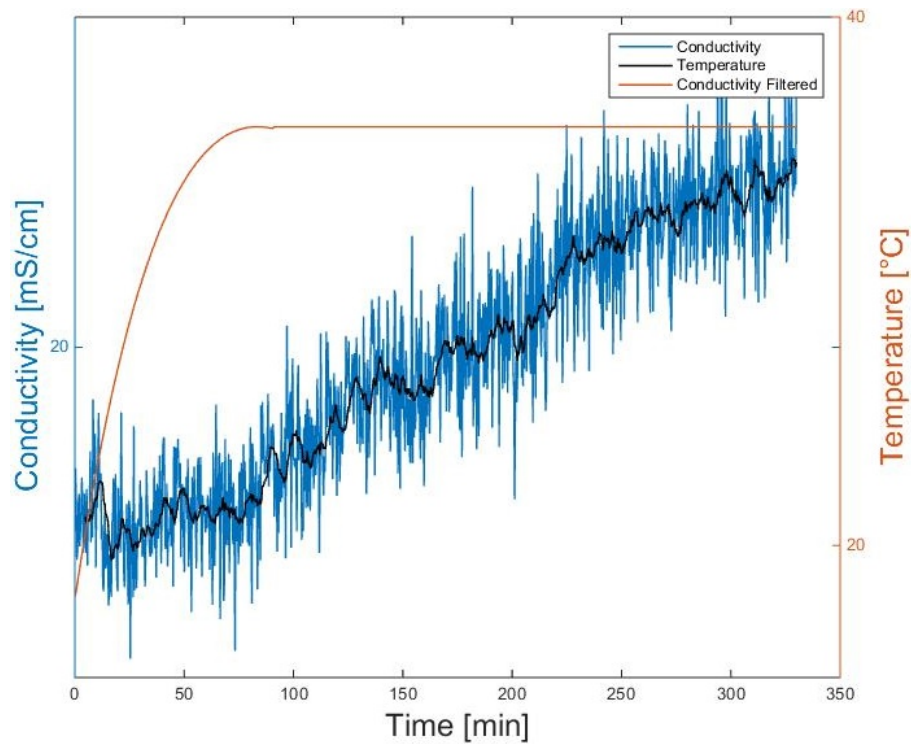


Figura 3.6: Grafico rappresentante la conduttività misurata nel tempo (in blu, in nero la curva filtrata) e la temperatura (in arancione).

Conoscendo il parametro α e la temperatura della soluzione durante la misurazione è possibile ottenere la conduttività riportata a 25°. Il parametro α viene ricavato invece tramite la formula inversa conoscendo la conduttività della soluzione a 25° e la conduttività ad una temperatura arbitraria. Dalla figura 3.6 si può notare come la conduttività rimane pressochè costante fino a quando la soluzione non raggiunge i 37°; raggiunta questa temperatura, la conduttività inizia ad aumentare. In figura 3.7 viene invece rappresentata l'assorbanza e la temperatura della soluzione nel tempo. Si può notare come l'assorbanza cresca lentamente durante la prima ora mentre quando raggiunge i 37° l'assorbanza cresce in maniera lineare. Questo è dovuto al passaggio dei batteri dalla lag-phase alla log-phase; in quest'ultima fase la concentrazione batterica aumenta in maniera esponenziale e le sostanze di scarto dovute al metabolismo cellulare causano una variazione di conduttività.

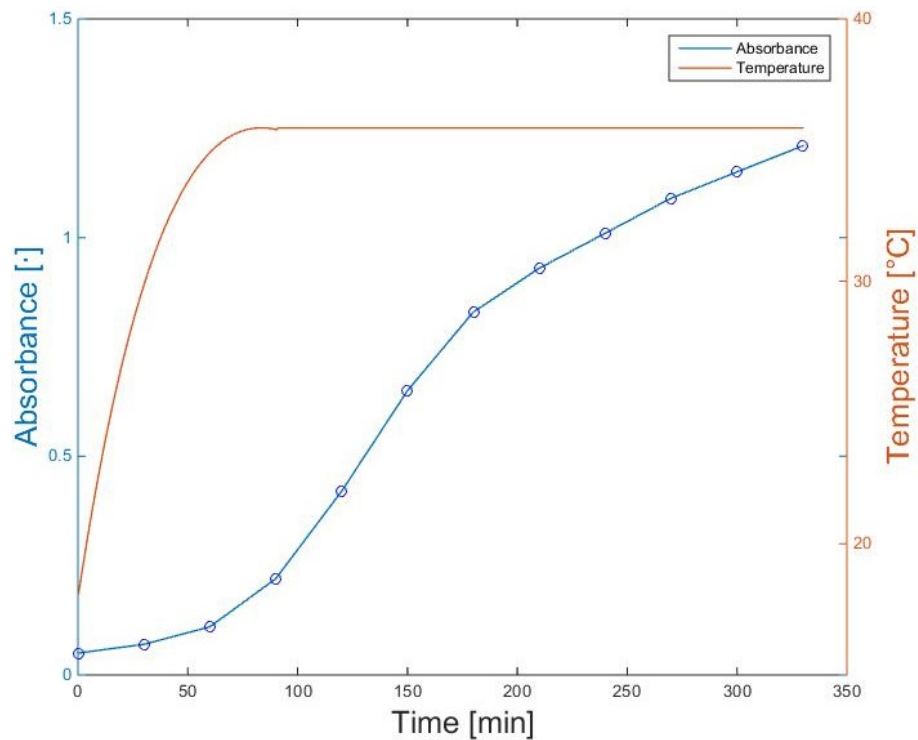


Figura 3.7: Grafico rappresentante i dati di assorbanza misurati (in blu) e la temperatura (in arancione)

vità della soluzione. Durante la lag-phase invece il metabolismo batterico è rallentato a causa della mancanza delle condizioni ambientali adeguate alla crescita batterica; ciò comporta che la conduttività non vari durante questa fase. Questo esperimento ha permesso di ottenere una curva paragonabile alla curva teorica dell'*impedance microbiology* da cui sarà possibile stimare la concentrazione batterica del campione dopo aver effettuato la calibrazione della tecnica.

Confrontando i valori di assorbanza ottenuti nel tempo tra la prova precedente (figura 3.5) e la prova attuale (figura 3.7) si può osservare come le due curve mostrino un andamento analogo, dove la traslazione tra le due curve sia dovuta al fatto che gli esperimenti inizino con soluzioni a concentrazione diversa. Questo implica che gli esperimenti sono stati svolti in un set-up adeguato che non va ad influenzare la crescita batterica. Per compensare

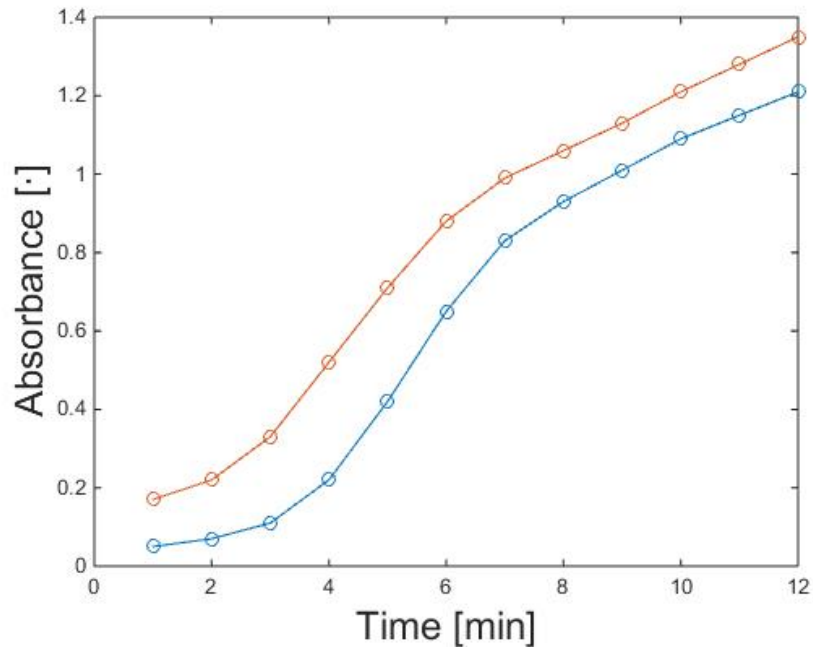


Figura 3.8: Andamento sovrapposto delle assorbanze associate ai due esperimenti svolti e mostrati figura 3.5 e 3.7

l'effetto causato dalla temperatura nella misura della conduttività, un'altra tecnica è quella di portare un terreno di coltura fresco ad una temperatura di 37° e successivamente aggiungerci i batteri. In questo esperimento sono stati aggiunti $100 \mu\text{litri}$ di terreno saturo di batteri (con un'assorbanza misurata di 1.21) a 15 ml di terreno fresco; a causa della bassa concentrazione batterica iniziale della soluzione non è stato possibile ricavare il valore di assorbanza del campione prima dell'inizio del test. In figura 3.9 viene mostrato l'andamento della conduttività della soluzione nel tempo. Durante la preparazione dell'esperimento tuttavia la temperatura del campione si è ridotta, causando un aumento di conduttività indesiderato. Nonostante ciò, anche in questo caso è possibile riconoscere la curva caratteristica dell'*impedance microbiology*, da cui sarà possibile stimare la concentrazione batterica della soluzione a seguito della calibrazione della tecnica.

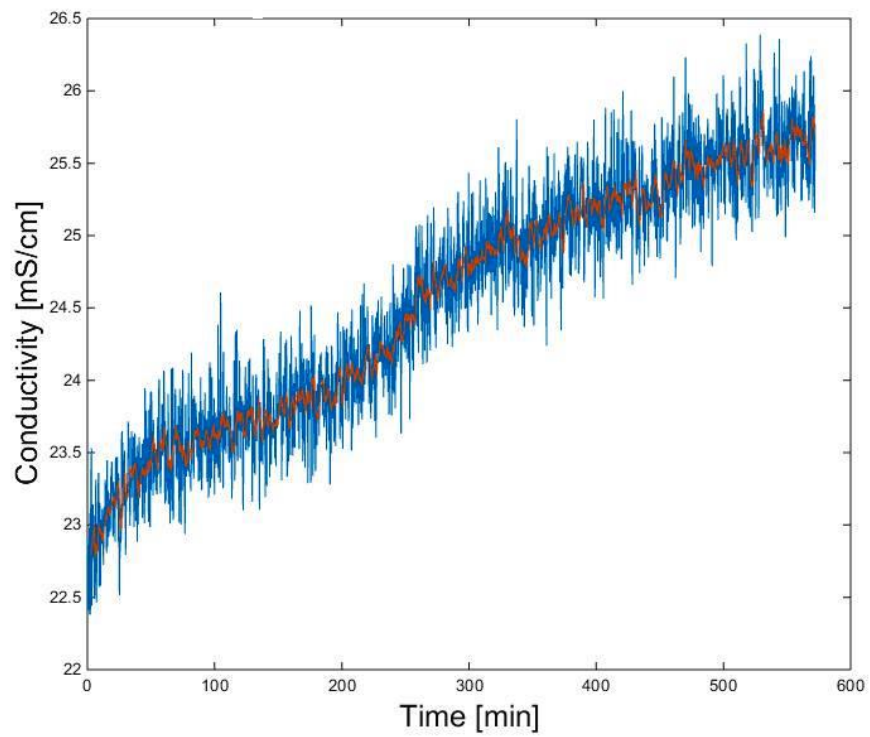


Figura 3.9: Andamento della conduttività di una soluzione batterica con terreno di coltura fresco portato a temperatura prima dell'aggiunta dei batteri

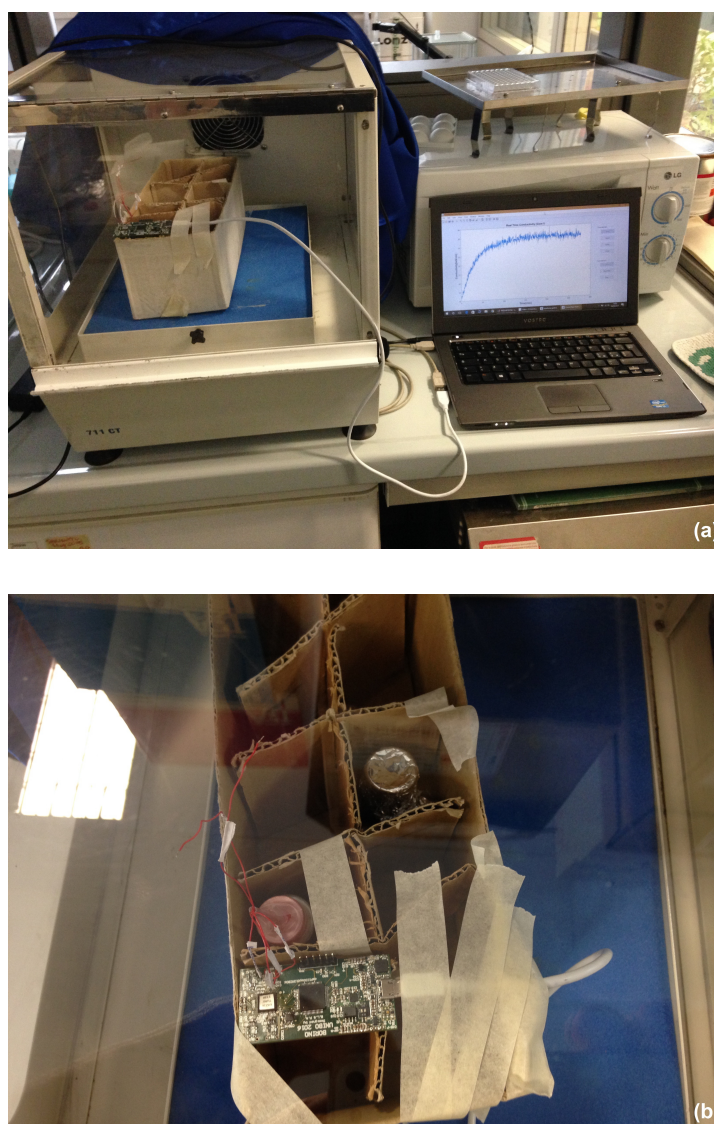


Figura 3.10: (a): il dispositivo all'interno dell'incubatore viene collegato al pc per l'acquisizione e la visualizzazione dei dati in real time. (b): particolare all'interno dell'incubatore: il sensore collegato al dispositivo è immerso all'interno della beuta vicina ad esso mentre l'altra beuta (coperta con un foglio di alluminio) contiene il campione utilizzato per effettuare le misure di assorbanza ogni 30 minuti

Capitolo 4

Conclusioni

Con questo lavoro di tesi è stato sviluppato un dispositivo che permette di stimare la concentrazione batterica di una soluzione tramite la tecnica dell' "impedance microbiology". Nella prima fase sono state implementate nuove funzionalità nel firmware del microcontrollore che permettono di sfruttare le potenzialità del dispositivo. Il dispositivo così sviluppato permette di svolgere quattro misure impedenziometriche allo stesso tempo, sfruttando le caratteristiche del chip integrato al quale il microcontrollore si interfaccia. Le ridotte dimensioni del dispositivo inoltre permettono di realizzare un dispositivo portatile; è stato quindi implementato il funzionamento in "Power-saving" del dispositivo in modo da poter ridurre il consumo energetico.

Nella seconda fase è stato realizzato, in linguaggio Matlab, il programma che permette la comunicazione tra PC e il dispositivo. Il programma acquisisce i dati provenienti dal microcontrollore, li elabora e li mostra in real-time all'utente tramite interfaccia grafica, facilitandone l'acquisizione e la visualizzazione. Attraverso l'interfaccia grafica è inoltre possibile attivare alcune funzioni aggiunte al microcontrollore per controllarne il funzionamento, come ad esempio l'accensione del dispositivo e l'avvio dell'acquisizione. Completato lo sviluppo del sistema PC-dispositivo, ne è stato valutato il funzionamento ed esso è stato applicato in ambito biologico per la valutazione della concentrazione batterica di un campione. Il dispositivo tuttavia ha mostrato un malfunzionamento su tre dei quattro core, permettendo di utilizzare solo il core rimanente e quindi collegare solo il sensore di conducibilità. Sono state svolte una serie di test nei quali è stata misurata

la conduttività nel tempo e le sue variazioni durante la crescita batterica; questa informazione viene utilizzata per ricavare la concentrazione batterica di una soluzione tramite la tecnica dell' *impedance microbiology*. In questi test viene mostrato come nel tempo la conduttività aumenti a causa del metabolismo cellulare, in accordo con la tecnica dell' *impedance microbiology*, ma non viene visualizzato l'andamento necessario per determinare il *detection time* t_d e quindi la concentrazione batterica del campione. Viene ipotizzato che la parte della curva necessaria per conoscere t_d sia nascosta dall'aumento di conduttività causato dalla variazione di temperatura nel passaggio del campione dalla temperatura ambientale a quella dell'incubatore. Per eliminare questo effetto è stato svolto un test misurando la temperatura del campione tramite l'utilizzo di una termocoppia collegata ad un multimetro per poi riportare la conduttività ad una temperatura di 25° con una compensazione lineare. In questo caso il risultato è concorde con le attese: la morfologia della curva ottenuta rispecchia quella indicata dalla tecnica dell' *impedance microbiology* dove è possibile riconoscere una fase in cui la conduttività rimane costante ed una fase in cui questa cresce a causa del metabolismo cellulare. Tuttavia, svolgendo il test con l'utilizzo della termocoppia e del multimetro, si perde l'automatismo della tecnica poichè si è reso necessario annotare a mano l'aumento di temperatura nel tempo e poi aggiungerlo nell'elaborazione dei risultati.

Un nuovo dispositivo è in fase di realizzazione e con il funzionamento di almeno due core su quattro, sarà possibile monitorare conduttività e temperatura utilizzando un unico sensore, permettendo la completa automatizzazione dell'analisi. Nel codice per l'acquisizione dei dati è già implementata la compensazione della temperatura nella misura della conduttività in modo da poter svolgere le prove di *impedance microbiology* non appena il nuovo dispositivo risulti essere pronto. Attualmente è stato possibile effettuare una sola prova che ha permesso di ottenere una curva paragonabile a quella indicata dall' *impedance microbiology*; è necessario svolgere ulteriori prove in modo da poter ricavare i valori di α e β necessari per poter ricavare la concentrazione batterica conoscendo t_d . Il dispositivo sviluppato permette di svolgere le analisi di impedenza non solo in ambito biologico, applicandolo nell'identificazione della concentrazione batterica di un campione come nel caso di questa tesi. Attualmente sono in fase di studio con lo stesso dispositivo applicazioni per il controllo dei parametri elettrici del sudore durante l'attività fisica, nell'ambito della fisiologia, e per il controllo della

qualità del cibo, nell'ambito delle scienze alimentari. Il codice del sistema PC-dispositivo sviluppato può essere applicato anche in questi casi di studio, facilitando la visualizzazione dei risultati per l'operatore.

Ringraziamenti

Con questo lavoro di tesi si chiude un capitolo importante della mia vita. Voglio ringraziare il prof. Marco Tartagni per l'opportunità che mi ha dato di sviluppare la tesi nell'ambito dei sensori che trovo interessante e che vorrei sia il punto d'inizio per il mio futuro lavoro. Un sentito ringraziamento al prof. Marco Crescentini, a Giulia e a Cinzia che mi hanno subito accolto nell'ambiente di laboratorio, sempre disponibili ad aiutarmi nel momento del bisogno e che hanno reso le lunghe giornate di lavoro più leggere.

Un ringraziamento al prof. Emanuele Giordato per avermi dato la possibilità di svolgere questa esperienza in laboratorio che mi ha sempre affascinato e che finalmente ho potuto provare. Grazie a Joseph per il supporto che mi ha offerto nella parte di laboratorio e per l'interesse che mi ha mostrato nel volermi aiutare per riuscire ad ottenere il miglior lavoro possibile.

Voglio ringraziare la mia famiglia per essermi stati sempre vicino e avermi sostenuto ogni giorno, senza di loro non avrei mai potuto vivere questa esperienza e soprattutto raggiungere questo traguardo.

Grazie alla mia ragazza Elisabetta per il supporto che mi ha dato durante questi anni, per essermi sempre vicino e strapparmi sempre un sorriso anche nei momenti più bui.

Grazie ad Alessandro, Jonathan, Mariangela e Sara per aver condiviso questo percorso con me e per i momenti assurdi che mi avete fatto vivere. Grazie a Federico, Alex e Gas per aver condiviso con me l'avventura della laurea triennale e per le giornate in compagnia, nonostante diventi sempre più difficile riuscire a passare del tempo insieme.

Grazie di tutto.

Marco

Bibliografia

- [1] Datasheet sensore di conducibilità ist lfs1k0.155. In *IST, Innovative Sensor Technology*.
- [2] E. Alocilja and S. Radke. Market analysis of biosensors for food safety. 2014.
- [3] J. J. Barron and C. Ashton. The effect of temperature on conductivity measurement.
- [4] S. Brosel-Oliu, N. Uria, N. Abramova, and B. Andrey. Impedimetric sensors for bacteria detection. In *Biosensor-Micro and Nano Application*, 2015.
- [5] S. Brosel-Oliu, N. Uria, N. Abramova, and A. Bratov. Impedimetric sensors for bacteria detection. In *Intech*, 2007.
- [6] M. Crescentini, M. Bennati, and M. Tartagni. Integrated and autonomous conductivity-temperature-depth (ctd) sensors for environmental monitoring.
- [7] M. Crescentini, M. Bennati, and M. Tartagni. A high resolution interface for kelvin impedance sensing. 2014.
- [8] C. Felice, R. Madrid, J. Olivera, V. Rotger, and M. Valentinuzzi. Impedance microbiology: quantification of bacterial content in milk by means of capacitance growth curves. In *Biosensor-Micro and Nano Application*, 2015.
- [9] X. Huang. In situ sensor system for marine measurement. 2010.

- [10] O. Lazcka, J. Del Campo, and X. Munoz. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. In *Biosensors and Bioelectronics 22*, 2007.
- [11] Microchip. In *dsPIC33/PIC24 Family Reference Manual, Interrupts*.
- [12] Microchip. In *dsPIC33/PIC24 Family Reference Manual, Watchdog Timer and Power-Saving Modes*.
- [13] Microchip. In *dsPIC33/PIC24 Family Reference Manual, UART*.
- [14] A. Romprè, P. Servais, J. Baudart, M. de Roubin, and P. Laurent. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. In *Journal of Microbiological Methods*, 2002.
- [15] M. Tartagni. Ionic transduction and impedance spectroscopy. In *Slide del corso Sensori e Nanotecnologie LM*, 2016.
- [16] WTO. International trade statistics. geneva: World trade organization. 2007.
- [17] L. Yang and R. Bashir. Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. In *Biotechnology Advances 26*, 2008.