



Конкурс для школьников «Гениальные мысли» Автореферат проекта призера II степени

Название работы – Диагностика туманов биологических объектов методом диффузионной аэрозольной спектроскопии.

Автор – Кусакина Ксения Алексеевна (11 класс, СУНЦ МГУ, г. Москва).

Основная идея работы, цели, задачи

Нами была поставлена следующая *цель*: создание метода для диагностики туманов биологических объектов в режиме «реального времени».

Отсюда вытекают *задачи*:

- создание испытательного стенда для диагностики туманов биологических объектов в режиме «реального времени»;
- изучение динамики туманов биологических объектов;
- обоснование возможности применения метода диффузионной аэрозольной спектроскопии для мониторинга туманов биологических объектов в режиме «реального времени».

Основные результаты

В качестве модельных биологических объектов в исследованиях использовали водные растворы суспензии дрожжевых клеток (*Saccharomyces cerevisiae*). На данный момент пекарские дрожжи являются наиболее изученным видом и часто используются в качестве модельных организмов в различных исследованиях. Помимо этого, данный вид не является патогенным для человека и легко культивируется [13].

Диффузионный аэрозольный спектрометр (ДАС) – прибор, позволяющий получать спектр распределения по размерам аэрозольных частиц. Принципиальная схема измерения заключается в пропускании потока с аэрозолями через диффузионные батареи и определении через них проскока (прохождения или диффузии). Затем этот проскок сравнивается с расчетным (расчетный размер определяется полуэмпирическим методом). На основании этого сопоставления рассчитывается распределение по размерам частиц в нанометровом диапазоне от 3 до 200 нанометров и в микрометровом диапазоне от 200 нанометров до 10 микрометров. При измерении проскоков частиц, учитывая изменение концентраций частиц во время измерений, получается спектр распределения аэрозольных частиц по размерам.

Диффузионный аэрозольный спектрометр состоит из диффузионных батарей, счётчика ядер конденсации и компьютера, контролирующего работу прибора. Основными узлами счётчика ядер конденсации являются конденсационный укрупнитель аэрозольных частиц и оптический счётчик частиц. Анализируемый поток воздуха или другого газа, содержащего аэрозольные частицы, пропускается через диффузионные батареи, представляющие собой ряд сеточек, на которых осаждаются высокодисперсные частицы, содержащиеся в потоке. Скорость осаждения зависит от коэффициента диффузии частиц в газе, а диффузия однозначно связана с размером частиц. Таким образом, измерив проскок частиц (долю частиц, которые прошли через батареи без осаждения) через диффузионные батареи, а затем, рассчитав его и сравнив с рассчитанным, можно оценить размер этих частиц. Малый размер измеряемых частиц исключает их прямой замер оптическим счётчиком,

обуславливая необходимость использования дополнительного узла предварительного укрупнения аэрозолей, устанавливаемого перед входом в оптический счётчик частиц. После пропускания мелкодисперсного аэрозоля через зону насыщенных паров и конденсационного роста до оптически активного размера, их концентрация определяется прямым замером оптическим счетчиком. В данном приборе используется лазерный аэрозольный счётчик, чувствительность которого составляет 0,25 мкм. Управление системой в целом производится при помощи компьютера, который также осуществляет первичную обработку полученных данных и накапливает информацию по проведённым замерам. Клапаны V1-V6 (рис.1) используются для контроля подачи газового потока через определённую стадию батареи. Датчики температуры используются для контроля температурного режима укрупнителя, обеспечивая необходимую концентрацию паров для конденсационного роста высокодисперсных аэрозолей. Расходомеры газа используются для контроля величин воздушных потоков, проходящих через батарею и укрупнитель. Дренажные клапаны применяются для дренажа конденсата укрупняющей жидкости из транспортных линий прибора. В приборе установлен автоматический расходомер измеряемого аэрозольного потока, позволяющий отслеживать и контролировать величину измеряемого аэрозольного потока (прибор оптимизирован на расход 0,5 литра в минуту). Для применения предлагаемой методологии к процессу измерения спектра размеров аэрозольных частиц измеряют проскоки через серию диффузионных батарей. Это означает, что измеряются концентрации аэрозоля после прохождения через каждую из диффузионных батарей, которых в данном приборе пять, и через канал без батарей (нулевую батарею). Проскок определяется как отношение концентраций потока с аэрозолем после прохождения через каждую из диффузионных батарей к концентрации после прохождения через нулевую батарею.

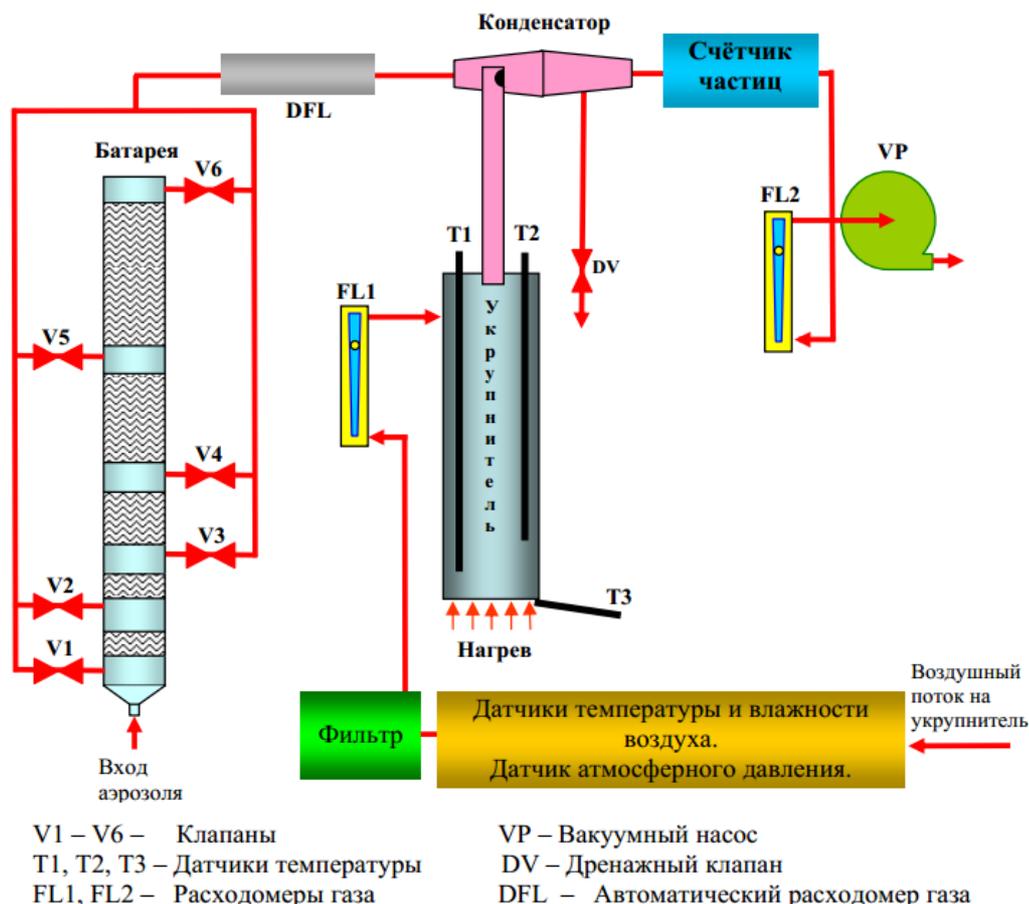


Рис.1 Блок-схема ДАС.

При выполнении наших опытов, схема ДАС была модернизирована (рис.2). Для изучения временной зависимости изменения состава туманов БО была создана установка на основе диффузионного спектрометра аэрозолей (ДАС), которая включала ультразвуковой (УЗ) генератор туманов БО, систему трубопроводов и рабочую камеру удержания искусственного тумана. Для создания туманов БО в УЗ-генератор помещали 100 мл коллоидного раствора БО в воде, после чего включали УЗ-генератор. В качестве модельных БО в исследованиях использовали водные растворы суспензии дрожжевых клеток. Эксперименты проводили при комнатной температуре, влажности и давлении окружающей среды. В результате воздействия УЗ-колебаний происходило формирование пересыщенных паров водного раствора БО, и в результате протекания дальнейших конденсационных процессов формировались многочисленные нано-/микрокапли, совокупность которых образовывала исследуемый туман. Через УЗ-генератор пропускали поток воздуха со скоростью 1 л/мин, который увлекал туман БО в ДАС. Измерение состава тумана БО проводилось каждые 100 - 105 с. После завершения процесса измерения туман БО попадал в рабочую камеру, оснащённую ядерным фильтром на основе полиэтилентерефталатной плёнки (ПЭТФ-ЯФ) в виде дисков диаметром 25 мм и толщиной 10 ± 1 мкм.

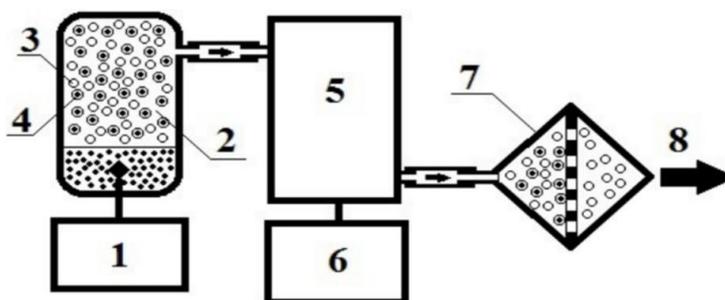


Рис.2 - Схема испытательного стенда: 1 - УЗ-генератор; 2 - камера для формирования тумана БО; 3 - микрокапли воды; 4 - микрокапли воды и БО; 5 – диффузионный аэрозольный спектрометр; 6 - система сбора, хранения и обработки экспериментальных данных и управления работой стенда; 7 - рабочая ячейка с ЯФ; 8 - выход в атмосферу

Регистрацию результатов измерений осуществляли непосредственно в ходе эксперимента с помощью автоматизированной системы управления (АСУ) встроенной в ДАС. Файлы данных получали в формате Excel и далее обрабатывали с помощью пакета прикладных программ MATLAB. Окончательно, получали временные зависимости изменения функции распределения частиц (ФРЧ) по размерам в нанометровом (от 5 до 200 нм) и в микрометровом (от 0,2 до 10 мкм) диапазонах.

Используемые подложки:

Нано структурированные материалы (НМ) на основе полимеров – это композиционные материалы, состоящие из полимерного связующего, и содержащие включения различной природы (микропоры, частицы металлов, наполнителя и т.д.), размеры которых не превышают 0,1 мкм. Важной особенностью НМ для их применения в биомедицинской инженерии является возможность прогнозирования и управления их свойствами, установленными на основе исследования структуры поверхности различными методами. Мы использовали один из видов НМ – ядерные микрофильтры (ЯМ), изготовленные из двухосно-ориентированных ПЭТФ плёнок толщиной 10 ± 1 мкм. Это тонкие полимерные плёнки, облученные потоками тяжёлых ионов и подвергшиеся химической обработке, в объёме и на поверхности которых в результате образуется пористая структура из пор нано-/микронного диаметра. [14]

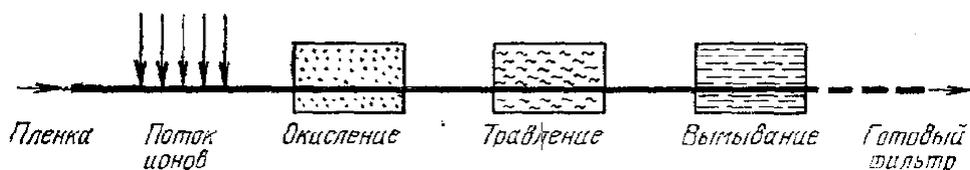


Рис.3 - Процесс изготовления ядерных фильтров с помощью пучка тяжёлых ионов

Схематически процесс изготовления таких фильтров изображен на рисунке 3. Тяжёлый ион, проходящий сквозь плёнку, образует область сильного радиационного повреждения, где сложные молекулы облучаемого вещества оказываются разорванными и расщеплёнными на более мелкие компоненты. В среде атмосферного кислорода или более сильных окислителей (например, с помощью перекиси водорода) эти продукты радиационной деструкции полимерных цепей захватывают атомы кислорода и образуют кислоты, а последующее травление переводит эти кислоты в легко растворимые соли.

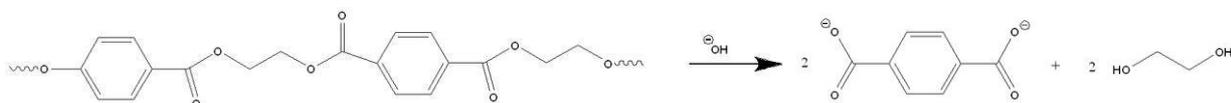


Рис.4 – Схема травления ПЭТФ пленок

После промывки в тех местах плёнки, которые были «пробиты» ионами, образуются сквозные отверстия, диаметр которых зависит от типа и энергии иона, от облучаемого материала и от условий травления. Важным преимуществом ЯФ является возможность регулировать размер пор, толщину фильтрующей плёнки, использовать практически неограниченный набор различных полимерных материалов. В настоящее время можно получать ЯФ с размерами приблизительно от 4 нм и до ~10 мкм. ЯФ устойчивы по отношению к агрессивным средам: различным растворителям, кислотам и т.п.; их можно сделать нечувствительными также и к щелочам.

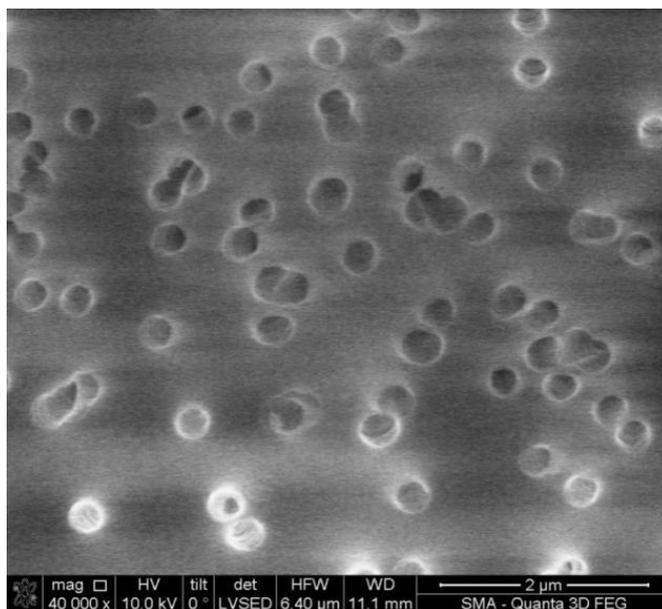


Рис.5 - Электронные микрофотографии ЯМ на основе полиэтилентерефталатной (ПЭТФ) плёнки, облученной потоком тяжёлых ионов ксенона

Осадок, образующийся на поверхности ЯФ после прохождения тумана БО, исследовали методами растровой микроскопии.

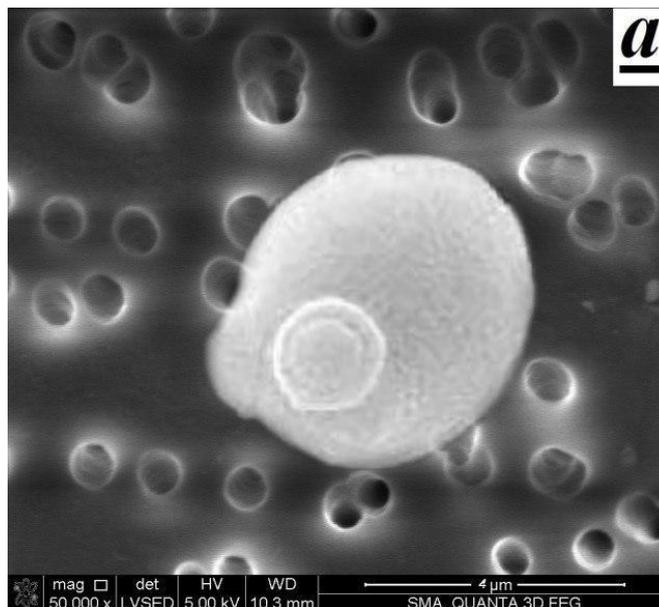


Рис.6 – Клетка дрожжей на ядерном фильтре

Были обнаружены клетки дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) на подложках, размером 4-5 нанометров в среднем, что подтверждает полученные в эксперименте результаты.

Результаты исследования:

Для проведения исследований была создана установка на базе диффузионного аэрозольного спектрометра (ДАС). В качестве модельных БО в исследованиях использовали водные растворы суспензии дрожжевых клеток. Эксперименты проводили при комнатной температуре, влажности и давлении окружающей среды.

В результате исследований были получены временные зависимости изменения размеров и концентрации частиц БО в тумане в области от 5 нм до 10 мкм, которые затем были обработаны с помощью пакета прикладных программ MATLAB.

Обнаружено снижение концентрации частиц водного тумана после впрыскивания в ДАС (рисунок 7, а). ФРЧ тумана, состоящего из микро-капель дистиллированной воды, синтезированной в контрольном эксперименте, представляет собой кривую с максимумом в области 20 – 30 мкм, который сдвигался в область меньших масштабов, и переставал наблюдаться на финальных стадиях эксперимента, откуда следует, что в рабочей камере происходило испарение (рисунок 7, б). В микрометровом диапазоне ФРЧ тумана дистиллированной воды не содержала каких-либо максимумов (рисунок 8, в). Природа максимума может быть связана с конденсацией молекул воды.

Обнаружены существенные отличия в динамике водного тумана БО по сравнению с туманом воды (рисунок 8, а). В этом случае число частиц в тумане сохраняется стабильным в течение 100 с после впрыскивания тумана БО в ДАС. ФРЧ тумана БО в нанометровом диапазоне содержит максимум при 145 – 150 нм, который также сдвигается в сторону меньших масштабов (рисунок 8, б). В микрометровом диапазоне обнаружен устойчивый максимум в области от 3 до 5 мкм (рисунок 8, в). Как известно, размер дрожжевых клеток составляет от 4 до 7 мкм, поэтому можно связать природу вновь обнаруженного максимума с наличием БО и произвести оценку концентрации дрожжевых клеток в тумане (рисунок 8, в).

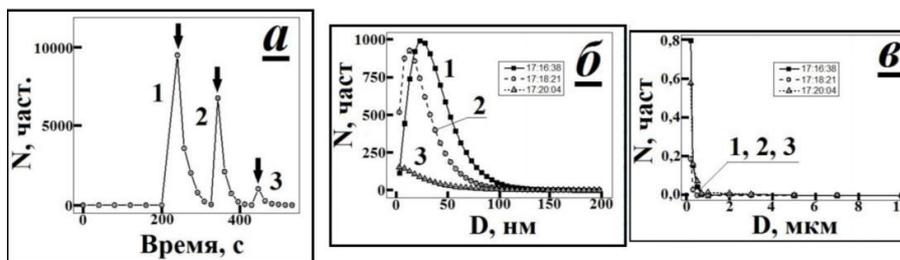


Рис.7 - Зависимость изменения количества капель воды от времени (а) и функция распределения частиц тумана воды по размерам в нанометровом (б) и микронном (в) диапазоне. Стрелки указывают момент поступления тумана в диффузионный аэрозольный спектрометр из рабочей камеры в различные моменты времени, указанные на вставке рисунков б, в

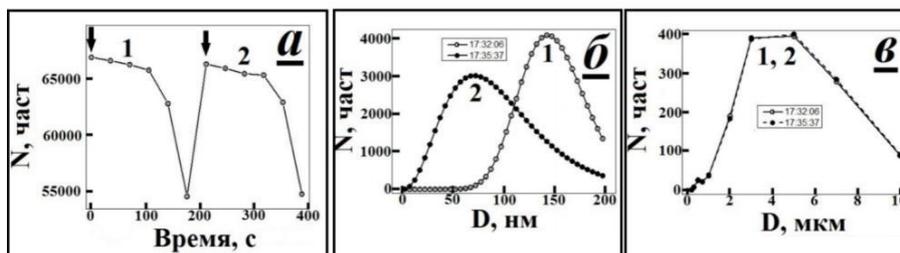


Рис.8. - Зависимость изменения количества капель воды от времени (а) и функция распределения частиц водного тумана дрожжевых клеток по размерам в нанометровом (б) и микронном (в) диапазоне. Стрелки указывают момент поступления тумана в диффузионный аэрозольный спектрометр из рабочей камеры в различные моменты времени, указанные на вставке рисунков б, в

Наномасштабные размеры вирусов (0,2 мкм) и аминокислот требуют проведения дополнительных исследований для объяснения происхождения зарегистрированных ФРЧ. Однако можно отметить, что и в этих случаях наблюдается сдвиг максимума ФРЧ в сторону больших размеров по отношению к туману воды, который в дальнейшем можно использовать для идентификации рассматриваемых БО.

Выводы, заключение, перспективы

1. Был разработан испытательный стенд для диагностики туманов биологических объектов в режиме «реального времени».
2. Были получены временные зависимости изменения размеров и концентрации частиц БО в тумане в области от 5 нм до 10 мкм.
3. Обнаружено снижение концентрации частиц водного тумана послевпрыскивания в ДАС. ФРЧ тумана, состоящего из микро-капель дистиллированной воды, синтезированного в контрольном эксперименте, представляет собой кривую с максимумом в области 20 – 30 мкм, который сдвигался в область меньших масштабов, и переставал наблюдаться на финальных стадиях эксперимента. В микрометровом диапазоне ФРЧ тумана дистиллированной воды не содержала каких-либо максимумов. Природа максимума может быть связана с конденсацией молекул воды.
4. Обнаружены существенные отличия в динамике водного тумана БО по сравнению с туманом воды. В этом случае число частиц в тумане сохраняется стабильным в течение 100 с после впрыскивания тумана БО в ДАС. ФРЧ тумана БО в нанометровом диапазоне содержит максимум при 145 – 150 нм, который также сдвигается в сторону меньших масштабов. В микрометровом диапазоне обнаружен устойчивый максимум

в области от 3 до 5 мкм. Можно связать природу вновь обнаруженного максимума с наличием БО и произвести оценку концентрации дрожжевых клеток в тумане.

5. Таким образом, созданный нами испытательный стенд подходит для диагностики туманов биологических объектов в режиме «реального времени». Создаваемый сигнализатор-анализатор должен был быть портативным (важен размер установки), простым в эксплуатации (что достигается полной автоматизацией расчетов), способным работать в «режиме реального времени» (а наши исследования проводились именно в условиях изменения концентрации веществ), метод не разрушает пробу, что позволит уже после обнаружения биологического объекта его исследовать другими методами (например, микроскопированием ядерных фильтров с осажденными объектами или ГКР для определения их состава). Таким образом, метод полностью удовлетворяет требованиям.

Список цитированных источников

1. Lushnikov A.A., Zagaynov V.A., Lyubovtseva Yu.S. «The Atmosphere Processes and Monitoring (Physics of Earth and Space Environments in the Atmosphere and Ionosphere: Dynamics, Formation of aerosols in the atmosphere», Springer. 2010. ISBN:9789048132119. P. 69–96.
2. Гудимов А.В. «Оперативный биологический мониторинг – современный подход к контролю экологической безопасности, Нефть и газ Арктического шельфа 2008 материалы Международной конференции. Сер. «Экология, мониторинг и охрана окружающей среды» под общей редакцией Г.Г. Матишова. 2008. С. 99-105.
3. Г.И.Рамендик. «Масс-спектрометрия» // Горная энциклопедия. Т.3, 1987 – с. 266 – 267
4. https://www.rosminzdrav.ru/system/.../проект_ОФС_Масс-спектрометрия
5. Н. А. Понькин. «Что в имени твоём, масс-спектрометрия?» сайт Всероссийского масс-спектрометрического общества
6. Karas M., Bachmann D., Bahr D. and Hillenkamp F. «Matrix-assisted ultraviolet-laser desorption of nonvolatile compounds» // Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc., 1987. — № 78. — С. 53-68.
7. Mellmann A, Cloud J «Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry in Comparison to 16S rRNA Gene Sequencing for Species Identification of Nonfermenting Bacteria» // J Clin Microbiol, 2008. — № Jun;46(6). — С. 1946-54.
8. Ногаре С.Д., Джувет Р.С., «Газо-жидкостная хроматография», 1966
9. Хмельницкий Р. А., Бродский Е. С, Хромато-масс-спектрометрия, М., 1984; Заикин В. Г, Микая А.И., «Химические методы в масс-спектрометрии органических соединений»
10. Смит А. «Прикладная ИК-спектроскопия: основы, техника, аналитическое применение» Пер. с англ. Б. Н. Тарасевича, под ред. А. А. Мальцева. — М.: Мир, 1982. — 328 с.
11. Пентин Ю. А. «Основы молекулярной спектроскопии» — М.: Мир; БИНОМ. Лаборатория знаний, 2008. 398 с.
12. Злобин В.И., Евстигнеев В.И. «СПЕЦИФИЧЕСКАЯ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ИНДИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ», Вестник Российской Академии медицинских наук 2002.-N 11.-С.37-42.
13. Бабьева И. П. «Семейство сахаромикетовые (Saccharomycetaceae) и другие группы дрожжей», Жизнь растений под ред. проф. М. В. Горленко. , М.: Просвещение, 1976. — Т. 2. Грибы. — С. 91—106. — 479 с.
14. А. С. Смолянский, В. Г. Василенко, Ю. А. Смирнова, С. Б. Бурухин, А. П. Подсобляев, Б. А. Брискман, Э. Р. Клишпонт, В. К. Милинчук. «Известия вузов» - Ядерная энергетика. — 1998. - № 5. — С.29 – 35.