

**Dokumentace k výsledku typu funkční vzorek (G<sub>funk</sub>)**

## Autonomní elektrochemický modul pro detekci bakterie e-coli ve vodě

**Autoři:** Atripan Mukherjee, Ondřej Baštán, Michal Harvánek, Jakub Arm, Martin Pospíšil, Lukáš Richtera, Jaromír Hubálek

**Datum vzniku:** 20.12.2022

**Projekt:** H2020 Interreg ATCZ-86 WaterMon

**Popis:**

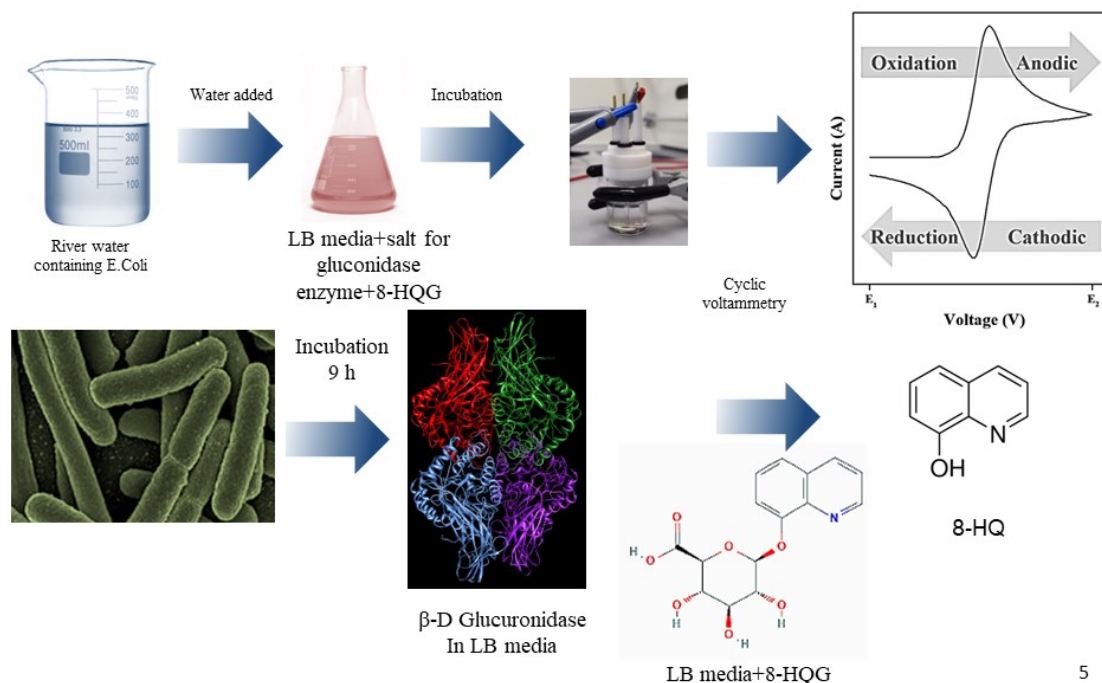
Jedná se o analyzátor, resp. voltametrický chemický senzor určený pro detekci bakterie e-coli, který je jedním z měřicích modulů autonomního plovoucího systému pro měření kvality vody v řekách.

E-coli je alimentární bakterie zodpovědná za mnoho nemocí, jako je otrava jídlem, a výsledná nemoc může v závažnějších případech vést dokonce ke smrti. Přítomnost kmene e-coli v říční/potoční vodě naznačuje nedávné míšení odpadních vod nebo kontaminaci živočišným odpadem. Přítomnost nevirulentních nebo virulentních kmenů může způsobit vážné poškození tím, že způsobí průjem, infekci močových cest, onemocnění dýchacích cest a infekce krevního řečiště. WHO, agentura EU pro monitorování vody, doporučuje, aby pitná voda měla 0 CFU ve 100 ml. Americká agentura pro ochranu životního prostředí (EPA) doporučila geometrický průměr 126 e-coli CFU/100 ml. Z tohoto důvodu agentury pro monitorování vody hledají vhodné, nákladově efektivní metody pro pravidelné a stálé monitorování toků a říčních vod. V tomto projektu jsme použili elektrochemický systém pro detekci E-coli z říční vody pomocí cyklické voltametrie.

Modul pro detekci využívá kultivačního roztoku, který je po smísení s odebraným vzorkem a následné kultivaci podroben voltametrickému měření. Použitá cyklická voltametrie jako analytická metoda, zde detekuje enzym 8-HQ, který vzniká při kultivaci přítomné bakterie e-coli. Z naměřeného průběhu lze poté stanovit přítomnost i koncentraci bakterie e-coli v odebraném vzorku.

### Ověření metodologie

K odebranému vzorku je přidáno 5,0 ml Luria bujónového růstového média (LB médium) obsahujícího aditivní sodnou sůl methyl-p-glukuronidu (MGU) a 8-hydroxychinonglukuronid (8-HQG). Přibližně 100 CFU čerstvě připravené e-coli bylo přidáno do LB média a inkubováno při 37,4 °C po dobu 9,0 hodin. Přítomnost MGU v LB médiu je indukována do e-coli za vzniku specifických  $\beta$ -glukuronidázových enzymů (ENZ) v médiu. 8-HQG působí jako substrát pro enzym  $\beta$ -glukuronidázu, štěpí 8-HQG za vzniku elektrochemicky aktivní látky 8-HQ (Obr. 1). Tento 8-HQ je oxidován na pracovní elektrodě, což vede ke specifickému výstupnímu signálu oxidačního proudu měřeného cyklickou voltametří. Pro tuto studii byl použit přenosný potenciostat „Palmsens EcoStat“, kde jako pracovní elektroda je použita tištěná uhlíková elektroda (SPCE). Pro přesnou analýzu vzorku se 1,0 ml říční vody smíchá se 4,0 ml LB média obsahujícího MGU a 8-HQG a nechá se inkubovat 9 hodin.



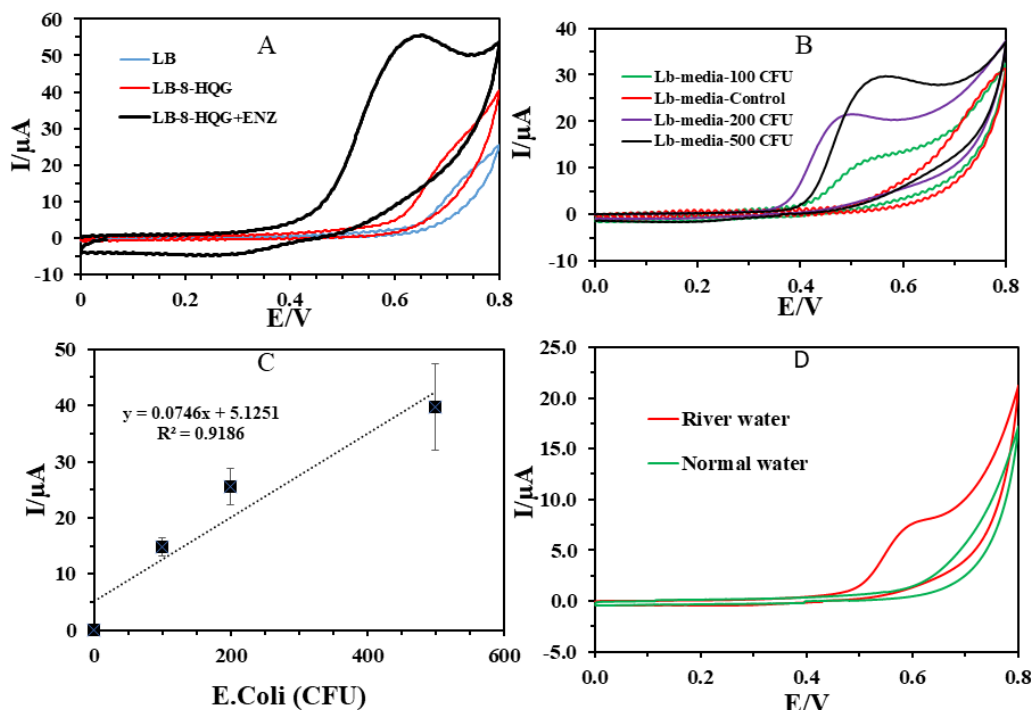
5

Obr. 1 Princip detekce e-coli

## Dosažené výsledky

Pro zajištění funkčnosti metodologie detekce byl vzorek e-coli studován pomocí cyklické voltametrie. Obrázek 2A ukazuje kontrolní experiment, kde pouze LB působí jako kontrola, LB+8-HQG působí jako negativní kontrola a LB-8-HQG+ENZ působí jako pozitivní kontrola. SPCE ukázala v této kontrolované studii, že oxidace 8-HQ byla pozorována mezi 0,5-0,7 V s rychlostí skenování 0,05 V/s. Pro ověření pracovních podmínek byla stanovena kalibrační křivka pro různé bakteriální koncentrace od 100 CFU/ml, 200 CFU/ml a 500 CFU/ml (obr. 2C). Zvýšením oxidačního proudu bylo pozorováno na základě zvyšující se koncentrací CFU, což znamená tvorbu a oxidaci 8-HQ, čímž se projevuje zvýšená tvorba ENZ v LB médiu.

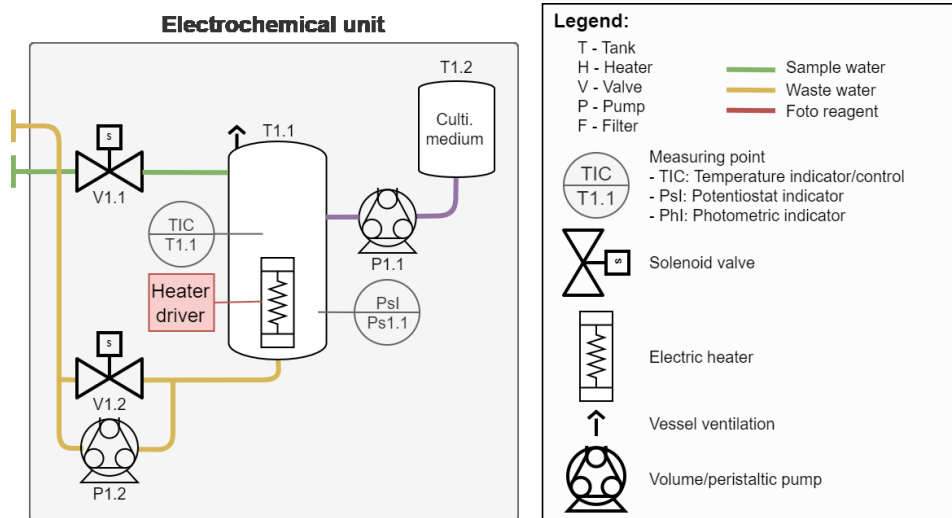
Po získání lineární kalibrační křivky byla tato modelová technika použita pro přesnou analýzu vzorků porovnáním říční a balené pitné vody. Obě vody byly přidány do LB média a inkubovány po dobu 9,0 h při 37 °C (obrázek 2D). V říční vodě byl pozorován nárůst oxidačního proudu s oxidačním proudem 7,794 µA. Žádný takový oxidační pík nebyl pozorován u balené pitné vody. Bylo zjištěno, že získaný proud z říční vody má méně než 100 CFU/ml, což je méně než doporučená koncentrace e-coli 126 CFU/ml podle US EPA.



Obr. 2 A) ukazuje kontrolní studii, B) zobrazuje různé voltamogramy oxidace 8-HQ vytvořenou různou koncentrací e-coli, C) kalibrační křivka a D) příklad analýzy skutečného říčního vzorku při porovnání s balenou pitnou vodou

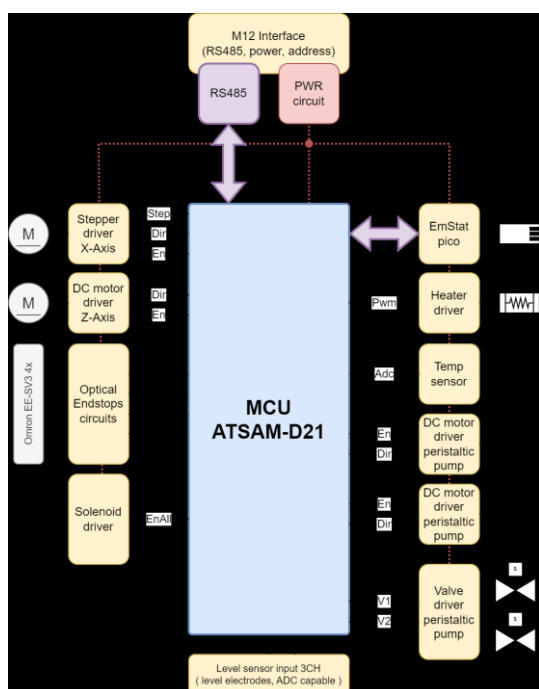
### Konstrukce a funkce autonomního analyzátoru

Na Obrázku 3 je uveden procesní diagram měřicího modulu. Při procesu měření vstupuje vzorek vody do modulu přes elektromagnetický ventil V1.1 odkud dále pokračuje do kultivačního tanku T1.1 a přes ventil V1.2 do výstupního potrubí. Po propláchnutí celého řetězce jsou oba ventily uzavřeny, a z tanku je odčerpáno definované množství vzorku prostřednictvím čerpadla P1.2. Následně je do kultivačního tanku čerpadlem P1.1 načerpáno požadované množství kultivačního roztoku ze zásobníku T1.2. Vzniklý roztok je poté při konstantní teplotě kultivován a následně podroben měření voltametrickou metodou. Po ukončení měření je nutné, aby byl celý systém dezinfikován.



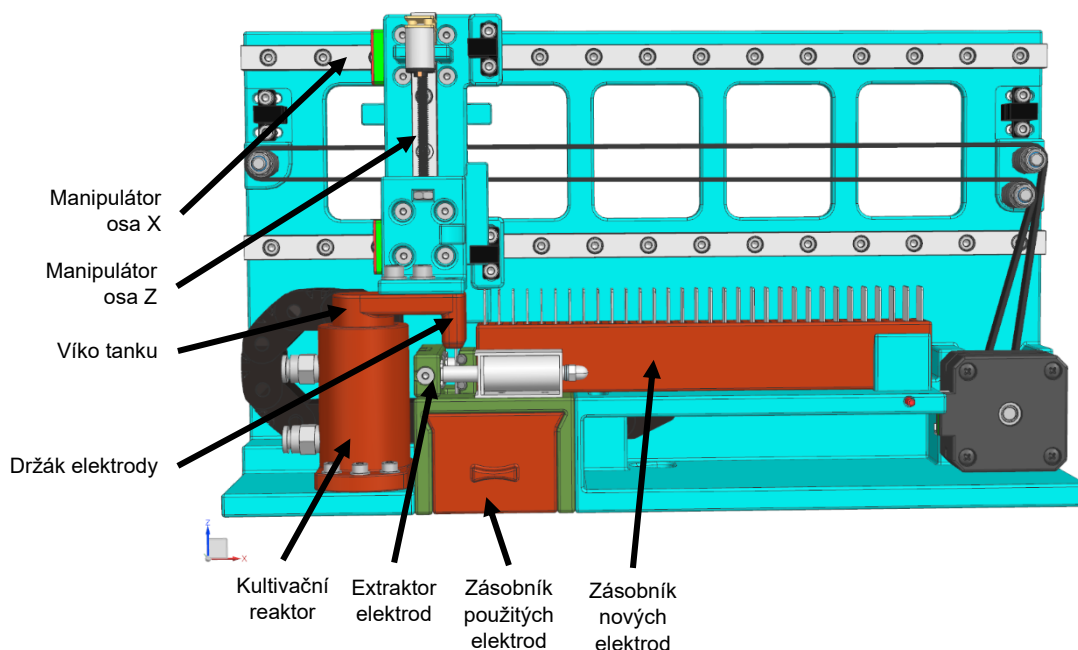
Obr. 3 Procesní diagram elektrochemického modulu

Pro řízení procesu modulu byl navržen proprietární řídicí embedded systém, jehož blokový diagram a realizace jsou uvedeny na Obr. 4. Systém lze ovládat standardním komunikačním a napájecím rozhraním, které je přizpůsobeno pro komunikaci prostřednictvím protokolu Modbus RTU s fyzickou vrstvou RS485 a napájením 12 V<sub>dc</sub>. Kromě výkonových prvků pro obsluhu akčních členů procesu jako jsou peristaltická čerpadla, ventily, nebo topný element, je systém vybaven i budiči pro obsluhu 2 D manipulátoru, který slouží pro manipulaci měřicích elektrod a budiči pro elektromagnety sloužící pro extrakci elektrod. V neposlední řadě je systém vybaven voltametrickým modulem EmStat *pico*, který v kombinaci s tištěnými elektrodami zajišťuje samotné měření.



Obr. 4 Blokový diagram řídicího systému modulu; Realizovaný řídicí systém

Vzhledem k tomu, že časová stálost tištěných elektrod je malá, jsou určeny na jedno použití. Proto byl navržen a vytvořen systém manipulátoru, který umožňuje uchopení elektrody v zásobníku a její následné ponoření do měřeného roztoku uvnitř kultivačního tanku. Po ukončení měření je manipulátorem tank uzavřen a použitá elektroda je za použití extraktoru odhozena do zásobníku použitých elektrod. Mechanické řešení manipulátoru lze vidět na Obr. 5.



Obr. 5 Vizualizace mechanického řešení manipulátoru; Manipulátor v klidové poloze.

Manipulátor se skládá ze dvou os (vodorovná X, svislá Z), které pohybují víkem tanku, jehož součástí je i držák elektrody s konektorem. V klidové poloze manipulátor uzavírá kultivační tank, přičemž držák elektrody setrvává v pozici nad extraktorem. Po spuštění procesu voltametrického měření dojde nejprve k sepnutí elektromagnetů extraktoru, což způsobí přidržení elektrody, které zůstává v držáku elektrod z předchozího měření. Následně se víko s držákem elektrod začne pohybovat ve směru osy Z, což způsobí otevření kultivačního tanku a extrakci elektrody z konektoru. Po uvolnění elektromagnetů extraktoru vypadne elektroda do zásobníku použitých elektrod. Manipulátor následně nabere novou elektrodu a ponoří ji do zkultivovaného roztoku v kultivačním tanku. Po ukončení měření je elektroda vyjmuta a manipulátor se vrátí do výchozího klidového stavu.

Obsluha systému modulu je realizována prostřednictvím Modbus RTU komunikace a je přizpůsobena integraci do celkového plovoucího řešení spojující několik měřicích modulů dohromady. Za tímto účelem byl vytvořen univerzální obslužný datový model, který je pro všechny měřicí moduly totožný, a který umožňuje transparentní obsluhu a sběr dat z libovolného typu měřicího modulu. Datový model měřicího modulu disponuje těmito parametry:

| Parametr   | Adresa registru | Popis                                                                       |
|------------|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Typ modulu | 0x0000          | Kód označující typ měřicího modulu<br>(pro kolorimetrickou jednotku 0x0003) |

|                       |        |                                                                                                                                             |
|-----------------------|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Čas tlakování potrubí | 0x0001 | Čas tlakování vstupního potrubí (v sekundách) který jednotka vyžaduje po spuštění měření pro načerpání potřebného množství měřené kapaliny. |
| Dezinfekční čas       | 0x0002 | Čas tlakování vstupního potrubí (v sekundách) dezinfekčním roztokem, který jednotka vyžaduje po spuštění procesu dezinfekce.                |
| Velikost měřených dat | 0x0003 | Počet 16bitových registrů, ve kterých jsou uložena měřená data. (Data kolorimetrického modulu jsou uložena v [BO(1)registrech])             |
| Měřená data           | 0x1000 | Počáteční adresa naměřených dat.                                                                                                            |

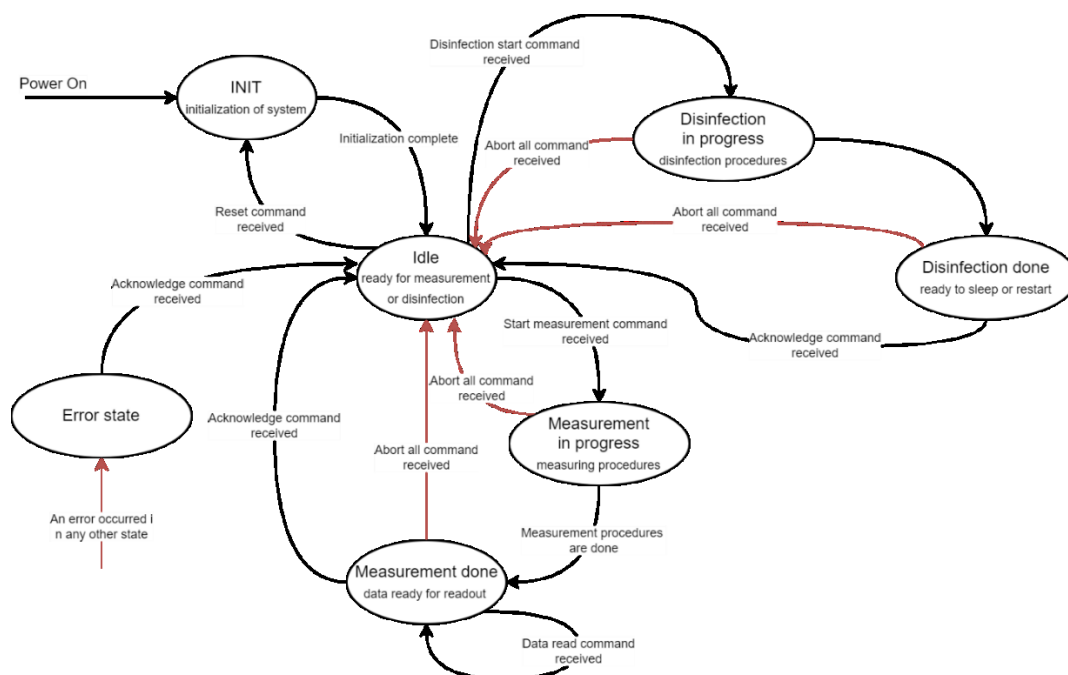
Tab. 1 Parametry měřicího modulu

Ovládání funkcí modulu je pak realizováno prostřednictvím dvou ovládacích registrů, z nichž jeden slouží ke čtení aktuálního stavu modulu a druhý k zadávání požadovaného příkazu. Tyto registry jsou popsány v Tab. 2.

| Registr         | Adresa registru | Popis                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-----------------|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Stavový registr | 0x0004          | Registr ukazuje aktuální stav modulu:<br>0x0000 – Inicializace.<br>0x0100 – Klidový stav; připraven pro měření nebo dezinfekci.<br>0x0200 – Probíhá měření.<br>0x0300 – Probíhá dezinfekce.<br>0x0400 – Měření hotovo.<br>0x0500 – Dezinfekce hotova.<br>0x80XX – ERROR; XX jsou nahrazeny typem chyby. |
| Řídicí registr  | 0x0005          | Ovládání měřicího modulu je realizováno zápisem do tohoto registru.<br>0x0000 – Rezervováno<br>0x0100 – Reset; restartuje zařízení do klidového stavu.<br>0x0200 – Start měření.<br>0x0300 – Start dezinfekce.<br>0x0400 – ACK – Potvrzení dokončení příkazu.<br>0xFFFF – Zastavit vše.                 |

Tab. 2 Popis ovládacích registrů

Přechody mezi jednotlivými stavy a jejich chování popisuje stavový diagram na Obr. 6. Jak lze vidět, spuštění měření nebo dezinfekce je možné pouze v klidovém stavu. Příkaz zastavit vše lze naopak použít kdykoliv. Po dokončení měření, dezinfekce nebo vzniku poruchy setrvává systém ve stavech done nebo ERROR do doby, než je stav potvrzen zadáním příkazu ACK.



Obr. 6 Stavový diagram obsluhy modulu.

V této době je vhodné například v případě stavu *Měření hotovo* provést vyčtení měřených dat, neboť je v tomto stavu zaručena jejich platnost. Formát dat v datové oblasti je popsán v Tab. 3.

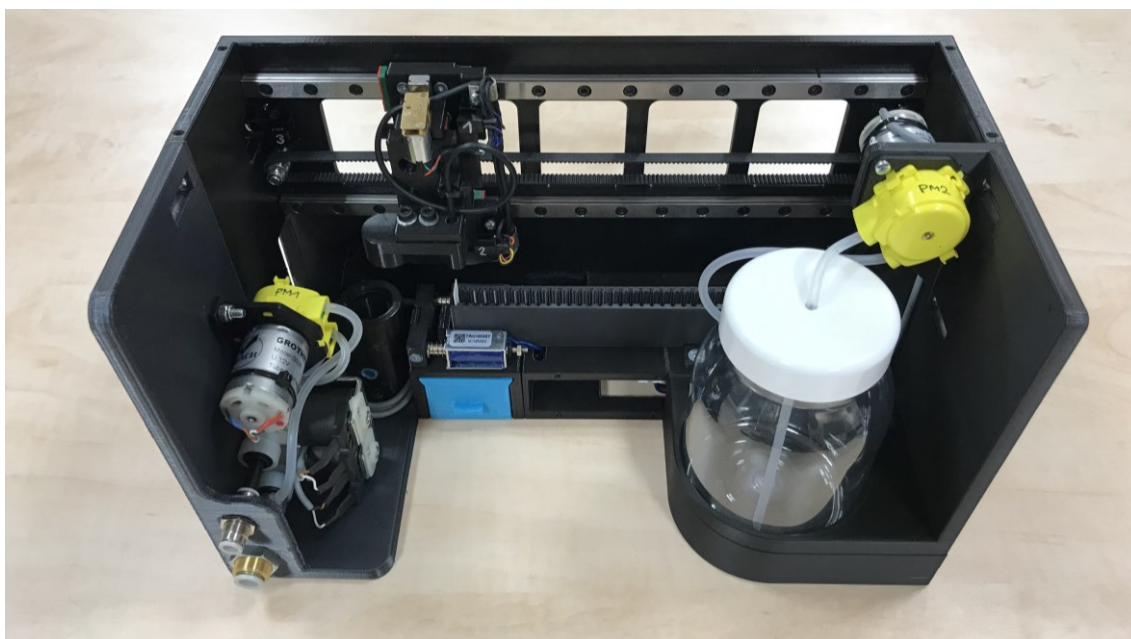
| Parametr | Adresa registru | Popis                                      |
|----------|-----------------|--------------------------------------------|
| 1        | 0x1000          | Naměřená hodnota CFU – Colony Forming Unit |

Tab. 3 Popis oblasti naměřených dat

Proces měření je odstartován příkazem (zápisem do registru). Výchozí stav pro měření je zavřený a vydezinfikovaný kultivační reaktor s prázdnou svorkou pro měřicí elektrodu. Ventily jsou zavřené, čerpadla vypnutá. Měřicí rutina postupně prochází těmito fázemi:

- Fáze odběru vzorku vody pro testování – modul otevře ventily a čeká po definovaný čas (10 s), až přívodem proteče čerstvý vzorek vody, který se má otestovat a naplní zcela kultivační reaktor.
- Fáze odměření přesného objemu vzorku – modul zavře ventily a spustí peristaltické čerpadlo P1.2 pro odčerpání vzorku vody v reaktoru na požadovaný objem.
- Fáze přidání kultivačního média – do reaktoru je pomocí peristaltického čerpadla P1.1 načerpán kultivační roztok.
- Fáze kultivace – modul provádí kultivaci v kultivačním reaktoru po specifikovanou dobu. Komora kultivačního reaktoru je regulována na teplotu 37 °C. Regulace je prováděna pomocí PWM na topném odporu a čidla teploty.
- Nabrání měřicí elektrody – po uplynutí kultivačního času modul pomocí servomotorů otevře reaktor, pomocí svorky nabere elektrodu ze zásobníku a vloží ji do kultivačního reaktoru.

- Komunikace EmStat Pico – v této fázi je do voltametrického čipu EmStat Pico nahrán měřicí skript. Měřená data jsou přijímána přes rozhraní UART do procesoru filtrována a vyhodnocena. Výsledek CFU *Colony Forming Unit* je zapsán do registru.
- Příprava na nový cyklus – v tomto stavu dojde k vyjmutí použité měřicí elektrody ze svorky a uzavření kultivačního reaktoru, tak aby byl připraven pro dezinfekci.



Obr. 7 Autonomní elektrochemický modul pro detekci bakterie e-coli ve vodě

#### Parametry modulu:

Rozměry: 170 mm x 320 mm x 180 mm

Napájení: 12 V<sub>dc</sub>

Proudový odběr (průměrný): ~ 500 mA

Proudový odběr (špičkový): ~ 1200 mA

Komunikační interface: Modbus RTU, RS485

Doba inkubace při 37 °C:

Citlivost detekce: 0,075 uA/CFU