



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

**ΤΜΗΜΑ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΜΕ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ
ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΒΕΡΑ**

ΛΟΪΖΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:

ΚΑΛΑΪΤΖΑΚΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ - ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Χανιά 2013

Πολυτεχνείο Κρήτης – Τμήμα Η.Μ.Μ.Υ.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
Ευχαριστίες.....	6
Εισαγωγή	7
Διάρθρωση Διπλωματικής.....	8
Βασικές αρχές ηλεκτροχημείας και αρχές λειτουργίας βιοαισθητήρων	9
Αρχές λειτουργίας Ποτενσιομετρικών βιοαισθητήρων	12
Κυτταρικοί βιοαισθητήρες	13
Μέθοδος ανίχνευσης ουσιών BERA	14
Αρχή λειτουργίας.....	16
Στάδια λειτουργίας.....	19
Ηλεκτρόδια ανίχνευσης.....	21
Ηλεκτρόδια – Screen Printed Electrodes.....	21
Αρχές λειτουργίας Screen printed βιοαισθητήρων.....	22
Κατασκευή βιοαισθητήρων με τεχνολογία Screen printing.....	25
Μη βιολογικό υλικό ενός ηλεκτροδίου επίστρωσης.....	26
Προσαρμογή των ηλεκτροδίων για επίλυση ειδικών προβλημάτων.....	30
Προσαγωγή ηλεκτροδίων στο πρόβλημα μας	33
Επιλογή ενσωματωμένου συστήματος μέτρησης.....	37
Open Source Toolkits.....	40
GADGETEER	41
ARDUINO	42
Επιλογή εξωτερικών εξαρτημάτων για τη δημιουργία ολοκληρωμένου κυκλώματος.....	45
Χρήση ενισχυτή οργανολογίας.....	46
Χρήση MULTIPLEXER	48

Χρήση ANALOG TO DIGITAL CONVERTER	50
Νευρωνικό δίκτυο	53
Eagle pcb design software	54
Βάση εισαγωγής ηλεκτροδίων	56
Πειραματικά αποτελέσματα	58
Ανίχνευση καρβαμικών	59
Ανίχνευση Οργανοφωσφορικών μέθοδος 1	61
Ανίχνευση Οργανοφωσφορικών μέθοδος 2	66
Πειράματα με χρησιμοποιημένα ηλεκτρόδια	67
Πειράματα με ένα μίγμα κυττάρων	69
Προϋπολογισμός Συσκευής.....	71
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	72
Βιβλιογραφία.....	74
Δημοσιεύσεις.....	74
Internet links.....	75
Βιβλία	75
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	76
Κώδικες.....	76
Multiplexer	76
Datalogger	77
AD/C.....	85
Μετρήσεις	88

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη σημερινή εποχή της ανάπτυξης της βιοϊατρικής τεχνολογίας, αλλά και της οικονομικής κρίσης στην Ελλάδα μέσω αυτής της εργασίας επιχειρήσαμε να δείξουμε ότι μπορεί ακόμη και τώρα η πανεπιστημιακή κοινότητα να είναι πρωτοπόρα. Μελετήσαμε μία αμιγώς ελληνική μέθοδο ανίχνευσης, τη μέθοδο BERA, με την βοήθεια της ομάδας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών που εδώ και δέκα χρόνια ασχολείται με την ανάπτυξή της. Στόχος της διπλωματικής μας εργασίας είναι μέσω της έρευνας μας να παρέχουμε την τεχνολογική υποστήριξη για την ορθή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της μεθόδου.

Θέλουμε να δείξουμε ότι μέσω της μελέτης των βασικών αρχών λειτουργίας των υλικών και της κατανόησης της μεθόδου ανίχνευσης BERA μπορούμε να αναπτύξουμε μία συσκευή που να είναι ισάξια των συσκευών που κατασκευάζουν εταιρίες από το εξωτερικό, χρησιμοποιώντας πολύ περισσότερους πόρους για την ανάπτυξη τους. Προτείνουμε και τη χρήση ενός ηλεκτρονικού εξαρτήματος, ενός οργανικού ενισχυτή μέσω του οποίου φιλοδοξούμε να αυξήσουμε την ακρίβεια των μετρήσεων. Επίσης μελετάμε τα ηλεκτρόδια επίστρωσης και τις χρήσεις τις οποίες θα μπορούσαν να έχουν σε διάφορα επιστημονικά προβλήματα, καθώς αποτελούν μία νέα λύση που δεν είναι ιδιαίτερος γνωστή στην Ελλάδα.

Τα πειραματικά μας αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η μέθοδος BERA μπορεί να πραγματοποιήσει ασφαλείς ανιχνεύσεις, ενώ η συσκευή μας μπορεί να αποτελέσει το μέσο «ανάγνωσης» των αποτελεσμάτων. Αρά και σε αυτές τις δύσκολες για την χώρα εποχές, η Ελλάδα έχει τα μέσα να πρωτοπορήσει και να βάλει νέες βάσεις σε ένα τόσο απαιτητικό τομέα όπως η βιοιατρική. Ακριβώς όπως φιλόδοξη ήταν πριν είκοσι χρόνια η ανίχνευση με αισθητήρα γλυκόζης και άλλαξε την ζωή εκατομμυρίων παγκόσμια έτσι φιλοδοξούμε, να κάνουμε την αρχή για να δούμε το μέλλον λίγο διαφορετικά.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω την ειλικρινή εκτίμηση και τις θερμές ευχαριστίες μου προς τον καθηγητή του Πολυτεχνείου Κρήτης Κώστα Καλαϊτζάκη και τον καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών Σπύρο Κίντζιο για την καθοδήγηση τους καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Οι πολύτιμες συμβουλές και η στήριξη τους συνέβαλαν καθοριστικά στην επιτυχημένη ολοκλήρωση αυτής.

Ευχαριστώ επίσης τους καθηγητές κ. Κωνσταντίνο Μπάλα και κ. Ευύχιο Κουτρούλη για τη συμμετοχή τους στην παρουσίαση και αξιολόγηση της εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης την ομάδα του εργαστηρίου του Μορφολογίας φυτών του Γεωπονικού για τις ώρες που περάσαμε στα πειράματα και σε όλους τους βοηθούς του Πολυτεχνείου Κρήτης που υποστήριξαν στη δημιουργία της συσκευής.

Θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω την Σοφία που ήταν δίπλα μου σε όλη τη διαδρομή και για τη βοήθεια της στην εργασία, τους φίλους μου για όσα ζήσαμε όλα αυτά τα χρόνια. Την οικογένεια μου, που πάντα είναι και θα είναι δίπλα μου να με στηρίζουν σε κάθε προσπάθεια μου και να με ενθαρρύνουν για να προχωράω μπροστά. Τους γονείς μου που με δίδαξαν τις αρχές, τις αξίες και τους τρόπους μου. Την εργασία την αφιερώνω στον καλύτερο άνθρωπο που έχω γνωρίσει, που πίστευε περισσότερο σε μένα και ας μην είναι εδώ πλέον.

Στον παππού μου

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η τεχνολογία της ηλεκτρονικής και της πληροφορικής εφαρμόζεται πλέον σε όλες σχεδόν τις βιομηχανίες παγκοσμίως, με ταχύτητες εξέλιξης όλο και μεγαλύτερες. Η ραγδαία ανάπτυξη της πληροφορικής, μας παρέχει τη δυνατότητα να υποστηρίξουμε συστήματα από πάρα πολλούς τομείς. Ένας τέτοιος τομέας είναι η ανίχνευσή ουσιών, με εκατοντάδες συστήματα που παρέχουν την δική τους εκδοχή, αλλά και εξέλιξη στις παρούσες και συνάμα παραδοσιακές τεχνικές ανίχνευσής. Ένας αισθητήρας για να επικρατήσει στην αγορά και να αντιμετωπιστεί ως αξιόπιστος χρειάζεται χρόνια και χρήματα. Αυτό συμβαίνει γιατί ανάμεσα στις εξαιρετικές ιδέες, στην πραγματική εφαρμογή και εν συνεχεία στην καθολική αποδοχή υπάρχει μεγάλη απόσταση. Τα γνωστά σε όλους τεστ γλυκόζης για διαβητικούς πήραν περισσότερο από 20 χρόνια για να γίνουν αποδεχτά σε όλο τον κόσμο.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετούμε την μέθοδο ανίχνευσης ουσιών **Bioelectric Recognition Assay (BERA)**, αναλύοντας προσεκτικά τις συνιστώσες της διαδικασίας ανίχνευσης ουσιών ενώ επιπλέον παρουσιάζουμε τη δική μας εκδοχή μίας μηχανής ανίχνευσης με την μέθοδο BERA. Ο στόχος μας είναι η δημιουργία ενός ολοκληρωμένου συστήματος μέτρησης, υψηλής ακρίβειας, προσεγγίζοντας το πρόβλημα από την αρχή με τέτοιο τρόπο ώστε να το σχεδιάσουμε ερευνώντας όλες τις συνιστώσες μέχρι το σημείο της ανίχνευσης των στοχευόμενων ουσιών. Στα πειράματα χρησιμοποιήσαμε εξοπλισμό τελευταίας τεχνολογίας, μελετήσαμε τις αρχές λειτουργίας όλων των εξαρτημάτων και σχεδιάσαμε ένα σύστημα που εκμεταλλεύεται τις δυνατότητες που μας παρέχουν αυτά, αλλά και περιορίζει το θόρυβο στις μετρήσεις μας ώστε να έχουμε όσο το δυνατό πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Συνδυάζοντας όλες αυτές τις τεχνολογίες δημιουργήσαμε ένα ολοκληρωμένο σύστημα που μπορεί να γίνει αποδεκτό ως ένας αξιόπιστος βιοαισθητήρας.

Έτσι η μελέτη για την κατασκευή της συσκευής ξεκίνησε με μοναδικό δεδομένο ότι τα ηλεκτρόδια τα οποία μπορούν να αποδώσουν ορθές μετρήσεις είναι τα screen printed ηλεκτρόδια της Dropsens. Οι αρχές λειτουργίας των screen printed electrodes μελετήθηκαν με στόχο να καταλάβουμε και να κατανοήσουμε πως μπορούν αυτά να παράγουν ένα «ασφαλές» συμπέρασμα για το αποτέλεσμα της ανάλυσης με τη μέθοδο BERA. (http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html).

ΔΙΑΡΘΡΩΣΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ

Η δομή αυτής της εργασίας έχει ως εξής:

Στο πρώτο κεφάλαιο γίνεται η εισαγωγή στο αντικείμενο της μελέτης. Γίνεται μία εισαγωγή στο αντικείμενο των βιοαισθητήρων. Αναλύεται η μέθοδος ανίχνευση ουσιών BERA, παρουσιάζοντας τα πλεονεκτήματα της, τις δυσκολίες εφαρμογής της, αλλά και τις τεράστιες δυνατότητες που μας δίνονται με τη χρήση της. Περιγράφεται το υπόβαθρο της μεθόδου αλλά και το μέρος της μεθόδου που υλοποιούμε στη διπλωματική ενώ αναλύεται συγκεκριμένα ο ηλεκτρονικός εντοπισμός των ουσιών βάσει της μεθόδου.

Στο δεύτερο κεφάλαιο αρχικά αναλύεται η χρήση των ηλεκτροδίων επίστρωσης (screen printed electrodes), οι αρχές λειτουργίας τους, οι λόγοι που αυτού του τύπου τα ηλεκτρόδια μας δίνουν μετρήσεις δυναμικού από τις ουσίες με την εφαρμογή της μεθόδου BERA. Γίνεται ανάλυση της διαδικασίας μετατροπής του σήματος των κυττάρων σε αναλογικό μέσω των ηλεκτροδίων.

Στο τρίτο κεφάλαιο παρουσιάζονται τα βασικά σημεία των λειτουργιών των ενσωματωμένων συστημάτων, οι τεχνικές απαιτήσεις του συστήματος μας, πως και γιατί εν κατακλείδι επιλέξαμε να υλοποιήσουμε το σύστημα με την υπολογιστική πλατφόρμα Arduino. Αναλύονται τα πλεονεκτήματα της πλατφόρμας σε σχέση με τις άλλες υπάρχουσες πλατφόρμες, επιπλέον εξηγούνται οι λόγοι της επιλογής να πραγματοποιήσουμε την υλοποίηση του συστήματος με μία εμπορικά διαθέσιμη πλατφόρμα και όχι να σχεδιάσουμε μία καινούργια.

Στο τέταρτο κεφάλαιο παρουσιάζεται, το πρωτότυπο της συσκευής, οι μετρήσεις της, οι δυνατότητες ανάπτυξης για το μέλλον αλλά και η αξιοπιστία που μας δίνει για τελική ανίχνευση ουσιών. Παρουσιάζονται αποτελέσματα για ανίχνευση μιας ουσίας και οι διαφορές από τις άλλες διαγνωστικές συσκευές.

Τέλος στο πέμπτο κεφάλαιο αναφέρουμε τα μελλοντικά βήματα που μπορούμε να ακολουθήσουμε για την δημιουργία ενός ανταγωνιστικού εμπορικού προϊόντος. Επίσης αναφέρουμε και τις δυνατότητες που μας παρέχουν στο σύγχρονο κόσμο οι αισθητήρες όλων των ειδών.

Το αντικείμενο της **ηλεκτροχημείας** είναι η μελέτη χημικών μετασχηματισμών ως αποτέλεσμα αντιδράσεων, στις οποίες λαμβάνει χώρα μεταφορά ηλεκτρονίων, κάτι το οποίο οδηγεί σε παραγωγή ηλεκτρικού ρεύματος, ενώ ακόμη και σε παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας ως αποτέλεσμα μετασχηματισμών. Στην ηλεκτροχημεία οι αντιδράσεις γίνονται σε ηλεκτρισμένες διεπιφάνειες ηλεκτρονιακών (ηλεκτρόδια) /ιοντικών αγωγών (ηλεκτρολύτες) ως αποτέλεσμα της διαφοράς δυναμικού, η οποία αναπτύσσεται στη διεπιφάνεια. Ένας γενικός ορισμός για το αντικείμενο της ηλεκτροχημείας είναι ότι εξετάζει τη μετατροπή της χημικής ενέργειας σε ηλεκτρική και αντίστροφα.

Η έννοια του βιοαισθητήρα, αποτελεί μία νέα έννοια που αποτελεί θεμέλιο της βιοτεχνολογίας και εισήχθη στην επιστήμη πριν μερικές δεκαετίες. Λόγω της σχετικά νέας έννοιας για την επιστήμη ο βιοαισθητήρας έχει πολλούς ορισμούς. Μπορούμε να πούμε ότι βιοαισθητήρας είναι:

«μια αυτόνομη και ολοκληρωμένη αναλυτική συσκευή, ικανή να παρέχει εξειδικευμένες ποσοτικές ή ημιποσοτικές αναλυτικές πληροφορίες, χρησιμοποιώντας ένα βιολογικό αναγνωριστικό στοιχείο, που διατηρείται σε άμεση χωρική επαφή με τον μεταλλάκτη-μετατροπέα σήματος». Επίσης σύμφωνα με το νεότερο αλλά και γενικά αποδεκτό ορισμό:

«Ο βιοαισθητήρας ονομάζεται το σύστημα δυο μεταλλακτών, ενός χημικού και ενός φυσικού, οι οποίοι βρίσκονται σε επαφή και μετατρέπουν τη συγκέντρωση του αναλυτή σε μετρούμενο σήμα».

Ουσιαστικά ο βιοαισθητήρας μετατρέπει το βιολογικό υλικό σε μετρήσιμο σήμα. Έτσι ένας ολοκληρωμένος βιοαισθητήρας αποτελείται από το βιολογικό και το ηλεκτρικό ή οπτικό τμήμα που μετατρέπει τη βιολογική αντίδραση σε ηλεκτρικό σήμα. Συνέπεια της αντίδρασης είναι η μεταβολή κάποιας χημικής ή φυσικής παραμέτρου του συστήματος, η οποία μεταδίδεται στο ηλεκτρονικό ή οπτικό τμήμα του βιοαισθητήρα που ολοκληρώνει το σύστημα που ονομάζουμε βιοαισθητήρα.



Εικόνα 1 Αρχές λειτουργίας βιοαισθητήρα

Το μετρήσιμο σήμα πρέπει να είναι διακριτό, ηλεκτρικό και αποτέλεσμα της βιολογικής αλληλεπίδρασης, παρέχοντας ποιοτικά αποτελέσματα.

Οι βιοαισθητήρες χωρίζονται στις παρακάτω κατηγορίες

ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑΣ	ΜΕΤΡΟΥΜΕΝΟ ΜΕΓΕΘΟΣ
Ποτενσιομετρικοί	Διαφορά δυναμικού υπό μηδενικό ρεύμα
Αμπερομετρικοί	Ρεύμα υπό σταθερή διαφορά δυναμικού
Οπτικοί	Απορρόφηση, φθορισμός, φωταύγεια
Συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων	Μεταβολή δείκτη διάθλασης
Θερμικοί	Εκλυόμενη θερμότητα
Πιεζοηλεκτρικοί	Μεταβολή ιδιοσυχνότητας κρυστάλλου χαλαζία
Χωρητικοί ή Εμπεδησιομετρικοί	Μεταβολή χωρητικότητας ή εμπέδησης

Επίσης, βάσει του τύπου του βιομορίου που αναγνωρίζει την στοχευόμενη ουσία, οι βιοαισθητήρες χωρίζονται σε 3 ακόμη κατηγορίες.

- *Αισθητήρες συγγένειας.* Όπως στην περίπτωση αντιδράσεων αντισώματος – αντιγόνου και υβριδισμού DNA. Ανάλογα με την μετρούμενη ιδιότητα, η παρακολούθηση της αλληλεπίδρασης του αναλυτή με το βιοαισθητήρα μπορεί να γίνει είτε άμεσα (σε ένα στάδιο χωρίς τη χρήση ιχνηθετών π.χ. ενζυμικών) είτε έμμεσα (με χρήση ιχνηθετών)

- *Ενζυμικοί αισθητήρες.* Συμφώνα με τον ορισμό των βιοαισθητήρων, η αλληλεπίδραση του αναλυτή με τα ένζυμα, που βρίσκονται ακινητοποιημένα στο φυσικό μεταλλάκτη, οδηγεί στην παραγωγή σήματος, το οποίο συσχετίζεται με τη συγκέντρωσή του αναλυτή στο δείγμα. Η ανάλυση γίνεται άμεσα.
- *Κυτταρικοί αισθητήρες.* Χρησιμοποιούν τις ιδιότητες των κυττάρων για να δώσουν μετρήσιμα μεγέθη. *Παρουσιάζουν υψηλότερη ευαισθησία λόγω αυξημένης βιοκαταλυτικής ενεργότητας.*

Για τον εντοπισμό ουσιών με την μέθοδο BERA θα χρειαστούμε ποτενσιομετρικούς βιοαισθητήρες καθώς η μέθοδος βασίζεται στη μέτρηση διαφοράς δυναμικού από το άθροισμα των πληθυσμών των κυττάρων στη μετρούμενη ουσία.

Η ηλεκτροχημεία έχει και άλλους τρόπους και τεχνικές για τη μέτρηση διαφοράς δυναμικού, όπως η κυκλική βολταμετρία, η οποία όμως δεν μπορεί να εφαρμοστεί στη μέθοδο BERA καθώς επηρεάζει τις μετρήσεις αρά και το φαινόμενο συνολικά.

Έτσι η παθητική μέτρηση από τους πληθυσμούς των κυττάρων και η μέτρηση διαφοράς δυναμικού με τη χρήση ηλεκτροδίων εργασίας αλλά και ηλεκτροδίων αναφοράς. Η ανίχνευση γίνεται με τη χρήση τελευταίας τεχνολογίας ηλεκτροδίων εκτύπωσης σε επιφάνεια (screen printed electrodes). Στα spe που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα υπάρχει και ένα τρίτο ηλεκτρόδιο (counter) το οποίο χειριζόμαστε διαφορετικά ανάλογα με τον τύπο του spe που χρησιμοποιούμε κάθε φορά. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα spe αποτελούν σημαντικό εργαλείο της ηλεκτροχημείας με το οποίο αναπτύσσεται συνεχώς με όλο και περισσότερες εφαρμογές[16].

Ο ποτενσιομετρικός βιοαισθητήρας είναι ένα χημικός αισθητήρας που μετατρέπει το αναλογικό σήμα σε μετρούμενο σήμα. Ένας τέτοιος αισθητήρας μετράει τη διαφορά δυναμικού με τη χρήση ενός ηλεκτροδίου αλλά χωρίς τη χρήση ρεύματος ή την εφαρμογή εξωτερικής διαφοράς δυναμικού. Για να γίνει η μέτρηση χρειάζεται απαραίτητα ένα ηλεκτρόδιο εργασίας, όπως επίσης και ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς.

Το ηλεκτρόδιο εργασίας μετράει την συγκεντρωτική ποσότητα του δυναμικού της μετρούμενης ουσίας ενώ το ηλεκτρόδιο αναφοράς χρησιμοποιείται για να παρέχει, όπως προδίδει και το όνομα, σημείο αναφοράς για να μπορέσουμε να πάρουμε τη μέτρηση. Σε κάθε ηλεκτρονική μέτρηση πρέπει να υπάρχει ένα σημείο αναφοράς για να παίρνεται η μέτρηση ως προς αυτό το σημείο. Δηλαδή τιμή ηλεκτροδίου μέτρησης μείον τιμή ηλεκτροδίου αναφοράς.

Όπως παρατηρούμε και από τον ορισμό των βιοαισθητήρων πρέπει να υπάρχει κάποια αντίδραση στα ηλεκτρόδια για να υπάρχει μία μετρήσιμη ποσότητα. Έτσι το ηλεκτρόδιο αναφοράς αποτελείται από μία διαφορετική ουσία από το ηλεκτρόδιο εργασίας για να διατηρήσει την ιδιότητα του.

Μία νέα ανακάλυψη στο πεδίο των διαγνωστικών εφαρμογών έχει να κάνει με τους βιοαισθητήρες κυττάρων, ιστών, οργάνων ή ολόκληρων οργανισμών. Ένας κυτταρικός βιοαισθητήρας, χρησιμοποιεί τις φυσιολογικές αποκρίσεις ζωντανών κυττάρων, (όπως κατανάλωση οξυγόνου, επιφανειακό χημικό ή ηλεκτρικό δυναμικό, κινητικότητα ή γενετική ενέργεια) ως το αισθητήριο τμήμα. Ολόκληρα-ακέραια και ζωντανά κύτταρα παρέχουν το πλεονέκτημα της ύπαρξης πολλών καταλυτών, με πολλαπλούς ρόλους.

Γενικά οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες έχουν το πλεονέκτημα της αυξημένης σταθερότητας, της μεγάλης βιοκαταλυτικής δραστηριότητας, ενώ το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η ικανότητά τους να παρέχουν σχετικές κυτταρικές πληροφορίες σε απόκριση με το δείγμα και να μετρούν τη δραστηριότητά του. Ουσιαστικά οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες, μπορούν να ανιχνεύσουν την παρουσία ενός στοιχείου, ενώ επιπρόσθετα αποκρίνονται με έναν τρόπο που προσφέρει επίγνωση της φυσιολογικής επίδρασης του δείγματος στα κύτταρα[7].

Παρόλο αυτά, όπως και με άλλους βιοαισθητήρες, η ευαισθησία και η αξιοπιστία αυτών των αισθητήρων είναι συχνά περιορισμένη λόγω των μη εξειδικευμένων παρεμβάσεων οφειλόμενων στο δείγμα και στις εξωτερικές περιβαλλοντικές μεταβολές (όπως το pH και η θερμοκρασία). Παρουσιάζουν επίσης φτωχή επιλεκτικότητα επειδή οι ιστοί περιέχουν πολλά διαφορετικά ένζυμα και υποδοχείς και ο βιοαισθητήρας μπορεί να αποκρίνεται και σε άλλες ουσίες εκτός της επιθυμητής. Ένα άλλο πρόβλημα που παρουσιάζεται στους κυτταρικούς βιοαισθητήρες είναι ότι βασίζονται σε φυσικά κύτταρα κάτι το οποίο μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα η απόκριση των αισθητήρων να παρουσιάζει καθυστέρηση. Με άλλα λόγια αυξάνεται ο χρόνος που χρειάζεται ο βιοαισθητήρας για να αποκριθεί, αφού η προς ανάλυση ουσία πρέπει να διαχυθεί διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών για να γίνει η κατάλυση από τα αντίστοιχα ένζυμα.

Επειδή τα πλεονεκτήματα είναι περισσότερα από τα μειονεκτήματα, τα οποία μέσω της έρευνας αντιμετωπίζονται, οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες σήμερα χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο σε βιομηχανικές εφαρμογές όπως ο προσδιορισμός παραγόντων μόλυνσης για παράδειγμα απόβλητα, βαρέα μέταλλα, φυτοφάρμακα, ζιζάνια κ.τ.λ.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΟΥΣΙΩΝ BERA

Η Βιοηλεκτρική Μέθοδος Αναγνώρισης (BERA) είναι μία καινοτομική μέθοδος ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών (όπως για παράδειγμα ιών) η οποία βασίζεται στη μέτρηση μεταβολών των ηλεκτρικών ιδιοτήτων ομάδας κυττάρων κατάλληλα ακινητοποιημένων εντός πηγματος, έτσι ώστε να διατηρούνται οι 'φυσιολογικές' κυτταρικές λειτουργίες κατά την αλληλεπίδραση με τους υπό ανίχνευση ιούς. Με τη μέθοδο αυτή γίνεται εφικτή η ανίχνευση ανθρώπινων αλλά και φυτικών ιών σε ένα πολύ μικρό χρονικό διάστημα (3 λεπτά) σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους ανίχνευσής. Την ίδια στιγμή η ευαισθησία της μεθόδου ανίχνευσής BERA είναι ανάλογη με τις γνωστές κυτταρολογικές και μοριακές τεχνικές.

[19]Έως σήμερα έχουν αναπτυχθεί έξι γενιές κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA. Επιγραμματικά, στην 1^η γενιά ο βιοαισθητήρας περιείχε ακινητοποιημένα κύτταρα σε 0,8% αγαρόζη και είχε τη μορφή σωλήνα 15 ml.

Η 2^η γενιά είχε, επίσης, τη μορφή σωλήνα και τα κύτταρα ήταν ακινητοποιημένα σε αγαρόζη, με την διαφορά ότι είχε πολύ μικρότερο όγκο (1 ml), οπότε απαιτείτο μικρότερη ποσότητα υλικών.

Η 3^η και 4^η γενιά κυτταρικών βιοαισθητήρων BERA είχαν τη μορφή επίπεδης στοιβάδας και στην μεν 3^η γενιά τα κύτταρα ήταν ακινητοποιημένα σε «φλούδα» αλγινικού ασβεστίου, στην δε 4^η γενιά δημιουργήθηκε ένα αγωγίμο πλέγμα αλγινικού ασβεστίου με πηγαδάκια στον πυθμένα των οποίων υπήρχαν τα ηλεκτρόδια και γινόταν εφαρμογή των κυττάρων μέσα σε αυτά τα πηγαδάκια. Οι βιοαισθητήρες BERA 3^{ης} γενιάς είναι κατάλληλοι για τη μελέτη της κυτταροδιαίρεσης και της 4^{ης} γενιάς για τη μελέτη επικοινωνίας των κυττάρων και αλληλεπίδρασης με διάφορες ουσίες.

Ένας βιοαισθητήρας BERA 5^{ης} γενιάς έχει τη μορφή σφαιριδίου (διαμέτρου 3-5 mm) αποτελούμενο από ακινητοποιημένα κύτταρα σε πήγμα αλγινικού ασβεστίου. Προκειμένου να μετρηθεί το παραγόμενο σήμα, κάθε αισθητήρας συνδέεται στο ηλεκτρόδιο μέτρησης, το οποίο αποτελείται από σιδικό κράμα ασημιού με μια στρώση χλωριούχου αργυρίου (AgCl). Τα ηλεκτρόδια συνδέονται διαμέσου ομοαξονικών καλωδίων με μια συσκευή καταγραφής δεδομένων με κάρτα PMD1608FS A/D. Οι τάσεις καταγράφονται και επεξεργάζονται μέσω προγράμματος σε H/Y.

Οι βιοαισθητήρες BERA 6^{ης} γενιάς είναι παραλλαγή της πέμπτης, όπου τα κύτταρα έχουν τροποποιηθεί, έτσι ώστε να φέρουν στην επιφάνειά τους υποδοχείς (αντισώματα ή ενζυμα) ικανούς να αντιδράσουν με τα υπό ανίχνευσή μόρια[21].

Τα κύτταρα της ουσίας που ανιχνεύουμε, όταν εισάγονται στο δείγμα πρέπει αμέσως να αντιδράσουν με τα τροποποιημένα κύτταρα, με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί η ηλεκτρική αντίδραση. Παράλληλα, ένα από τα ηλεκτρόδια θα κρατάει το αρχικό δυναμικό για να μπορέσουμε να πάρουμε τη μέτρηση διαφοράς δυναμικού, που θα οδηγήσει στην ανίχνευση της ουσίας.

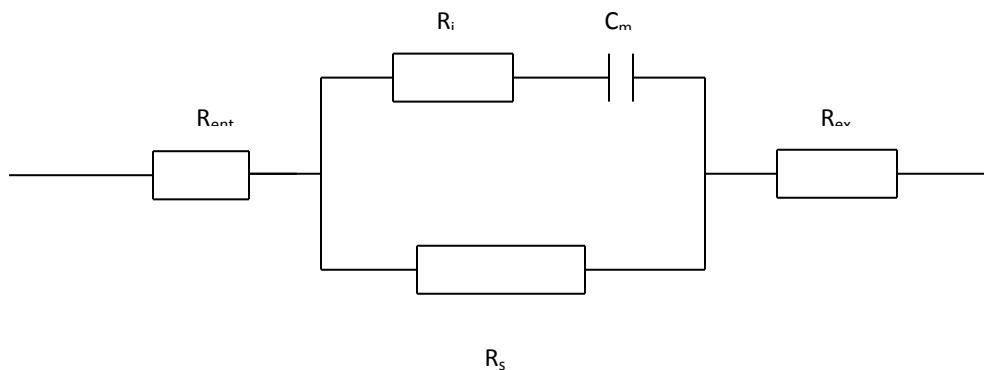
Τα κύτταρα αυτά του βιοαισθητήρα, μπορούν να θεωρηθούν και να συμπεριφερθούν είτε ως ανεξάρτητες πηγές δυναμικού είτε ως πυκνωτές όπου και θα δημιουργηθεί ή θα αποθηκευτεί η διαφορά δυναμικού που θα χαρακτηρίζει την προς ανίχνευση ουσία. Η ηλεκτρολογική συμπεριφορά των κυττάρων μελετάται στην παρούσα εργασία, όπως και οι διαφορές που παρουσιάζουν αυτά κατά τους διαφορετικούς τρόπους μέτρησης. Τα κύτταρα από τη στιγμή που τα θεωρούμε, και τα μελετάμε ως προς τις ηλεκτρονικές τους ιδιότητες πρέπει να αντιμετωπιστούν σαν ένα ιδιότυπο ηλεκτρικό κύκλωμα. Ουσιαστικά τα κύτταρα δημιουργούν ένα ισοδύναμο κύκλωμα(RC), με τη συμπεριφορά τους να καθορίζει το τελικό αποτέλεσμα του δυναμικού. Η κάθε ουσία έχει τη δική της «πατενταρισμένη» αντίδραση, που μας δίνει τεράστιες δυνατότητες για την ανίχνευση του αποτελέσματος μέσω του βιοαισθητήρα. Τα screen printed electrodes χρησιμοποιούνται ως αισθητήρες ανίχνευσης, αντιδρούν με το βιολογικό υλικό των κυττάρων και παρέχουν το τελικό σήμα προς ανίχνευση.

Υπάρχουν δυο τρόποι να υπολογίσουμε την αντίδραση του βιοαισθητήρα.

- Μέσα από το κύτταρο
- Διαμέσου του ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος.

Γενικά σε κάθε περίπτωση απόκριση του βιοαισθητήρα, θεωρούμε την διαφορά δυναμικού πριν και μετά την εφαρμογή του δείγματος. Σε παλαιότερες δημοσιεύσεις[3] έχει αναφερθεί ότι τα τροποποιημένα κύτταρα με τη μέθοδο BERA μπορούν να θεωρηθούν αλλά και να συμπεριφερθούν και ως πηγές διπολικού δυναμικού όπως και σαν ένα σύστημα με αντιστάσεις και πυκνωτές.

[4]Κάθε κύτταρο έχει αγωγιμότητα $G_{i,j}$ και χωρητικότητα $C_{i,j}$ (όπου $i=1...n$ και $j=1...m$) εξαρτημένα από την θέση τους στο ηλεκτρόδιο(spe). Επίσης το λόγο της πυκνότητας του διαλύματος, υπάρχει και μία προστιθέμενη αντίσταση R . Όλα αυτά καθορίζουν το ισοδύναμο κύκλωμα RC που αναφέραμε πιο πάνω. Το κύκλωμα αποτελείται από αντιστάσεις πυκνωτές και αντιστάσεις συνδεδεμένες μεταξύ τους (σχήμα 1) που φορτίζονται μέχρι ένα μέγιστο σημείο όπου ακολουθεί η αποφόρτιση. Ο χρόνος φόρτισης και αποφόρτισης είναι χαρακτηριστικός αλλά και αποκλειστικός για κάθε βιολογικό στοιχείο. Έτσι καταλήγουμε στο συμπέρασμα μας ότι το κάθε στοιχείο που προσπαθούμε να ανιχνεύσουμε έχει την δική του «υπογραφή».



Σχήμα 1

R_{ent}	Κυτταρική αντίσταση κατά την είσοδο
R_s	Αντίσταση του διαλύματος (matrix)
R_i	Κυτταροπλασματική αντίσταση
R_{ex}	Κυτταρική αντίσταση εξόδου
C_m	Χωρητικότητα Μembrάνης

Υποθέτουμε ότι υπάρχουν τρεις διαστάσεις L_x , L_y , L_z εντός των κυττάρων. Επιπρόσθετα θεωρούμε, ότι x διάσταση περιέχει n unit cells, και η y όπως και η z διάσταση περιέχει m και k unit cells αντίστοιχα. Όπως βλέπουμε όλες οι αντιστάσεις στο x είναι σε σειρά, υπολογίζουμε τη σύνθετη αντίσταση ενώ m και k τις έχουμε παράλληλα.

$$Z_{tot} = \rho \frac{L}{S}$$

και $L = L_x$, $S = L_y \cdot L_z$. Όλη η πληροφορία για το unit cell περιέχεται στο ρ , δηλαδή:

$$\rho = Z_1 * \frac{\Delta_y * \Delta_z}{\Delta_x}$$

όπου Z_1 η σύνθετη αντίσταση του unit cell και Δ_y , Δ_z , Δ_x οι διαστάσεις του βιολογικού υλικού.

Μια ακόμη σημαντική παράμετρος για τον ορθό υπολογισμό των μεγεθών είναι να κάνουμε μία εκτίμηση των συχνοτήτων, από την οποία προκύπτει η διασπορά των αντιστάσεων. Γενικότερα μπορούμε να θεωρήσουμε ότι υπάρχουν τρία χαρακτηριστικά εύρη συχνοτήτων που συσχετίζονται με την πόλωση του βιολογικού υλικού.

- Η περιοχή των υψηλών συχνοτήτων (10^{10} Hz) όπου παρατηρείται πόλωση του νερού.
- Η περιοχή των μεσαίων συχνοτήτων (10^6 Hz) όπου αντιστοιχεί στις κυτταρικές μεμβράνες
- Η περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων (10^2 Hz) όπως συσχετίζεται με την επιφάνεια των κυττάρων[5]

Όσον αφορά τη μέθοδο BERA, όταν η ουσία ενώνεται με την κυτταρική μεμβράνη οι συχνότητες ως αποτέλεσμα είναι της τάξης των $10^5 - 10^7$ Hz. Άρα μπορεί ναδειχτεί ότι με G_i Κυτταροπλασματική αγωγιμότητα ο «χρόνος χαλάρωσης» (relaxation time).

$$\tau = C_m / G_i$$

Ενώ για τα σφαιρικά κύτταρα:

$$\tau = r \epsilon_m \epsilon_0 / h \sigma_i$$

Με r την ακτίνα, ϵ_m , ϵ_0 οι διηλεκτρικές διαπερατότητες της μεμβράνης και του κενού αντίστοιχα, h το πάχος της μεμβράνης, σ_i κυτταροπλασματική συγκεκριμένη αγωγιμότητα.

Μία ακόμη θεωρητική ερμηνεία για τη διαφορά δυναμικού που διαβάζουμε είναι ότι προκαλείτε από τις ηλεκτροχημικές αντιδράσεις στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων. Ο αναλύτης (π.χ ο ιός, στοχευόμενη ουσία) αντιδρά είτε με τα κύτταρα, είτε με τα μέρη της μεμβράνης με αποτέλεσμα να προκληθεί απελευθέρωση ή «κατανάλωση» κάποιων ηλεκτρολυτών κάτι το οποίο με τη σειρά του αλλάζει το δυναμικό του μέσο-κυττάρου. Σε αυτή την περίπτωση η διαφορά δυναμικού μεταξύ των ηλεκτροδίων μετρείται από τη διαφορά της συγκέντρωσης του αναλύτη στο ηλεκτρόδιο. Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση οι διαφορές στην απορρόφηση του κυττάρου σε κάθε αναλύτη διαμορφώνουν τη διαφορά δυναμικού.

Ο βιοαισθητήρας είναι εκλεκτικός λόγω των υποδοχέων που έχουμε βάλει στην επιφάνειά του (π.χ. αντίσωμα για ανίχνευση TCA) ή ο ίδιος έχει λόγω της φύσης του (πχ υποδοχείς ακετυλοχολίνης - ανίχνευση φαρμάκων που δρουν στο νευρικό σύστημα). Εφόσον το μόριο που θέλουμε να ανιχνεύσουμε προσδεθεί στον υποδοχέα, έχουμε μια τοπική μεταβολή στο φορτίο της μεμβράνης κυρίως λόγω μετακίνησης ιόντων ασβεστίου (μπαίνουν ή βγαίνουν από πόρους του κυττάρου). Έτσι έχουμε μια αύξηση ή μείωση στο δυναμικό της επιφάνειας το οποίο μετράμε και η οποία είναι χαρακτηριστική (σε σχέση με το μέγεθος και το χρόνο) για κάθε διαφορετικό τύπο αισθητήρα και ουσίας.

Στάδιο Control

Αρχικά αφού επεξεργαστούμε τα κύτταρα, θα τα ενώσουμε με μία απλή ουσία που ονομάζεται θρεπτικό για να δούμε και να καταγράψουμε το δυναμικό που δίνουν τα κύτταρά από μόνα τους. Αυτό το δυναμικό ονομάζεται «μάρτυρας» γιατί μας προδίδει την τιμή του δυναμικού των τροποποιημένων κυττάρων χωρίς την ένωση με την προς ανίχνευση ουσία. Η «ένωση» των κυττάρων με την ουσία γίνεται με την χρήση μία εργαστηριακής πιπέτας για να διασφαλίσουμε ότι κάθε φορά που παίρνουμε κύτταρα, επιλέγουμε πάντα την ίδια ποσότητα. Είναι εξαιρετικά σημαντικό να γίνει η μέτρηση με μία προσέγγιση στον αριθμό των κυττάρων όσο το δυνατόν καλύτερη, καθώς όπως είπαμε το παραγόμενο δυναμικό είναι αποτέλεσμα του αθροίσματος του δυναμικού από τα κύτταρα. Επειδή τα κύτταρα μετριοούνται κατά χιλιάδες η ακρίβεια του αριθμού για κάθε ποσότητα μέτρησης 1mL είναι σχετική και κάτι τέτοιο επηρεάζει το μετρούμενο δυναμικό. Έτσι έχει επικρατήσει στις τελευταίες γενιές βιοαισθητήρων να επαναλαμβάνεται η μέτρηση με τον ίδιο όγκο δείγματος ώστε να έχουμε μία πιο ξεκάθαρη εικόνα για το εν γένει δυναμικό των κυττάρων

Σε αυτό το στάδιο ο «μάρτυρας μας» δεν έχει υποστεί καμία κυτταρική τροποποίηση.

Στάδιο εισαγωγής ουσίας

Στο επόμενο βήμα, εισάγουμε στην ουσία που θέλουμε να μετρήσουμε τα τροποποιημένα κύτταρα και καταγράφουμε την αλλαγή στην διαφορά δυναμικού. Εάν η στοχευόμενη ουσία είναι παρούσα στο δείγμα, το αντίσωμα θα ενωθεί με τα τροποποιημένα με τη μέθοδο BERA κύτταρα (π.χ Vero, Hac) και θα πρέπει να παρατηρήσουμε την άμεση αλλαγή σε σχέση με το control. Το αποτέλεσμα του δυναμικού πρέπει να εμφανίσει σημαντική διαφορά από πριν και με αυτό τον τρόπο να «προδώσει» την παρουσία της προς ανίχνευση ουσίας. Οι μετρήσεις καταγράφονται για τα πρώτα 3 λεπτά και βάση αυτών των στοιχείων που συλλέγονται αποφασίζουμε για την παρουσία ή όχι της προς ανίχνευση ουσίας.

Σε περίπτωση που το σήμα είναι το ίδιο - παρόμοιο - με το control σημαίνει ότι η στοχευόμενη ουσία δεν είναι παρούσα! Για ασφαλέστερα αποτελέσματα, οι μετρήσεις πρέπει να επεξεργάζονται στατιστικά. Για τη στατιστική επεξεργασία χρησιμοποιούνται διάφορα προγράμματα, ενώ έχει αναπτυχθεί νευρωνικό δίκτυο για την καλύτερη ανάλυση αποτελεσμάτων.

Έτσι σε 3 λεπτά έχουμε ολοκληρώσει την ανίχνευση της συγκεκριμένης ουσίας, με ένα οικονομικό και άμεσο τρόπο. Μπορούμε τοποθετώντας ένα νέο ηλεκτρόδιο στη συσκευή να προχωρήσουμε σε νέα ανίχνευση ουσίας

Το πρόβλημα της μέτρησης διαφοράς δυναμικού από τα κύτταρα, απασχολεί σε τεράστιο βαθμό και την αξιοπιστία της διαγνωστικής μεθόδου, ιδιαίτερα μίας μεθόδου που απαιτεί την ακρίβεια που χρειάζεται η μέθοδος BERA. Το ευαίσθητο σημείο της αλλαγής του δυναμικού των κυττάρων από την παρουσία ή όχι της ουσίας είναι ένα κομμάτι το οποίο διασφαλίζει την αξιοπιστία της μεθόδου ανίχνευσης.

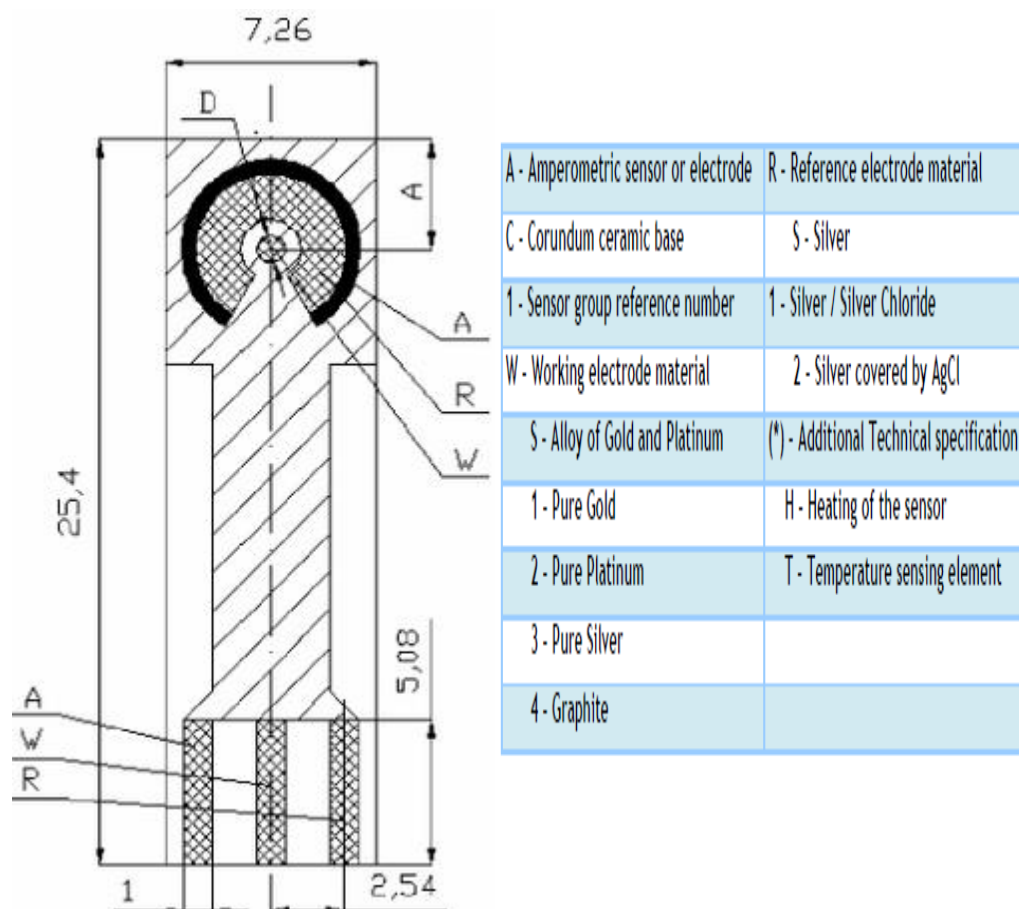
Συμφωνά με την μέθοδο BERA η διαφορά δυναμικού της κάθε ουσίας μπορεί να καθορίσει και την παρουσία της. Έτσι από τα αρχικά στάδια της εξέλιξής της μεθόδου παρατηρούμε τις προσπάθειες για να βρεθεί ένας τύπος ηλεκτροδίων που κάνουν την μέτρησης της διαφοράς δυναμικού, μία αξιόπιστη διαδικασία. [2] Η χημική τροποποίηση των ηλεκτροδίων βοηθάει στη βελτίωση της εκλεκτικότητας, στην αύξηση του χρόνου ζωής των ηλεκτροδίων αλλά και στην ευαισθησία με τις μετρούμενες ουσίες που τοποθετούνται στην επιφάνεια τους. Η τροποποίηση γίνεται ως επί το πλείστον με ηλεκτροχημικά ενεργές ουσίες ή υμένια πολυμερών τα οποία τοποθετούνται στην επιφάνεια των συμβατικών ηλεκτροδίων. **Κατά την οξείδωση ή την ανάγωση του αναλυτή στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου παράγεται ρεύμα,** το οποίο μετριέται αμπερομετρικά και συσχετίζεται με τη συγκέντρωση του αναλυτή στο διάλυμα.

Η λειτουργία των αμπερομετρικών χημικών αισθητήρων βασίζεται στη μέτρηση του ρεύματος που διαρρέει την ηλεκτροχημική κυψελίδα υπό σταθερή διαφορά δυναμικού. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε 2 ή 3 κυψελίδες ηλεκτροδίων σε συνδυασμό με τα απαραίτητα ηλεκτρικά βοηθήματα, τροφοδοτικό τάσης και ποτενσιοστάτη αντίστοιχα. Με τη μέθοδο των 2 ηλεκτροδίων, το ένα ηλεκτρόδιο αποτελεί το ηλεκτρόδιο εργασίας ενώ το δεύτερο ονομάζεται αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο και επιτελεί διπλό ρόλο. Όπως θα δούμε και στη συνέχεια ο καθορισμός των λειτουργιών των ηλεκτροδίων είναι καθοριστικός για μία αξιόπιστη μέτρηση. Το αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο λειτουργεί ως ηλεκτρόδιο αναφοράς ενώ συγχρόνως κλείνει το κύκλωμα μέσω του οποίου κινούνται τα ηλεκτρόνια είτε για να καταναλώσουν δυναμικό είτε για να αυξήσουν. Η ανάγκη για μετρήσεις σε πολύ μικρές τιμές ρεύματος και δυναμικού, επιβάλλει την αύξηση της εκλεκτικότητας αλλά και τον περιορισμό του θορύβου. Ο στόχος της μέτρησης με ηλεκτρόδια είναι να μετράμε το παραγόμενο δυναμικό από την ουσία και μόνο από την ουσία παίρνοντας έτσι όσο το δυνατόν ακριβέστερες μετρήσεις.

Η εξέλιξη των ηλεκτροδίων αλλά και των μεθόδων μέτρησης οδήγησε στο συμπέρασμα, ότι οι καλύτερες μετρήσεις παίρνονται από ένα νέο και επαναστατικό τύπο ηλεκτροδίων, τα λεγόμενα ηλεκτρόδια επίστρωσης (screen printed electrodes (spe)). Αυτού του τύπου τα ηλεκτρόδια αποτελούνται από επιστρώσεις αγώγιμων, ημιαγώγιμων ή μονωτικών υλικών. Η κατασκευή τους έχει τη βάση της σε 2 τεχνολογίες, την τεχνολογία λεπτή επίστρωσης (thin film technology) και την τεχνολογία παχείας επίστρωσης (thick film technology).

ΑΡΧΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ SCREEN PRINTED ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ

Σήμερα πολλές εταιρίες παράγουν ηλεκτρόδια επίστρωσης και ανάλογα με τις ανάγκες της κάθε μετρούμενης ουσίας επιλέγεται η ουσία που καλύπτει την επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Επίσης τα SPE έχουν ακόμη ένα ηλεκτρόδιο το οποίο ονομάζεται βοηθητικό ηλεκτρόδιο (counter ή amperometric). Το ηλεκτρόδιο αυτό χρησιμοποιείται κυρίως για αμπερομετρία που αν και δεν είναι στους στόχους μας, ούτε και παρέχει χρήσιμη πληροφορία για την μέθοδο BERA μπορεί να προσθέσει δυνατότητες στη συσκευή. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειώσω ότι τα ηλεκτρόδια επίστρωσης είναι αρκετά ευαίσθητα, επηρεάζονται από την υγρασία ίσως ακόμη και από μία έντονη επαφή. Παρόλα αυτά οι φύλαξη τους είναι εύκολη, σε μία συσκευασία μέσα στην οποία πουλιούνται στο εμπόριο.



Εικόνα.2 Ανάλυση στοιχείων μονού ηλεκτροδίου επίστρωσης.

Ο αισθητήρας ανάλογα με το υλικό που αποτελείται θα έχει και τις κατάλληλες χρήσεις. Επίσης ανάλογα και με το βιολογικό υλικό με το οποίο αντιδρούν τα ηλεκτρόδια του αισθητήρα διαμορφώνεται το σήμα εξόδου.

Αυτή η ιδιότητα των ηλεκτροδίων επίστρωσης έχει να κάνει με το γεγονός, ότι η μέτρηση λαμβάνεται από τις αντιδράσεις των υλικών στο σημείο της επαφής με την επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Αυτός ο τρόπος λειτουργίας προκαλεί και το πρόβλημα της επαναχρησιμοποίησης. Τα ηλεκτρόδια δεν αντιδρούν με τον ίδιο τρόπο, αφού μετά την πρώτη εφαρμογή υλικού στην επιφάνεια τους αλλοιώνεται το μη βιολογικό υλικό που είναι επενδυμένα, κάτι το οποίο αυξάνει στο κόστος της τελικής συσκευής καθώς σε κάθε μέτρηση πρέπει να χρησιμοποιούμε νέο ηλεκτρόδιο.

Ένα ηλεκτρόδιο όταν ετοιμάζεται επιστρώνεται με το υλικό –χρυσό, πλατίνα, ασήμι , άνθρακας- στα δύο σημεία, το counter και το working. Το ηλεκτρόδιο αναφοράς (reference) επιστρώνεται με ένα διαφορετικό υλικό. Αυτό γίνεται γιατί το δυναμικό αυτού του ηλεκτροδίου πρέπει να είναι ανεξάρτητο από την σύσταση του ηλεκτρολύτη και έτσι, ως προς αυτό «αναφέρεται» το δυναμικό του ηλεκτροδίου εργασίας σε μία ηλεκτροχημική κυψελίδα τριών ηλεκτροδίων[2].

Κατά την εφαρμογή των τροποποιημένων κυττάρων στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων τα κύτταρα αντιδρούν με την επιφάνεια και το ανάλογο υλικό κάτι το οποίο δημιουργεί την διαφορά μεταξύ των μετρούμενων μεγεθών, δηλαδή μεταξύ του ηλεκτροδίου εργασίας και του ηλεκτροδίου αναφοράς.

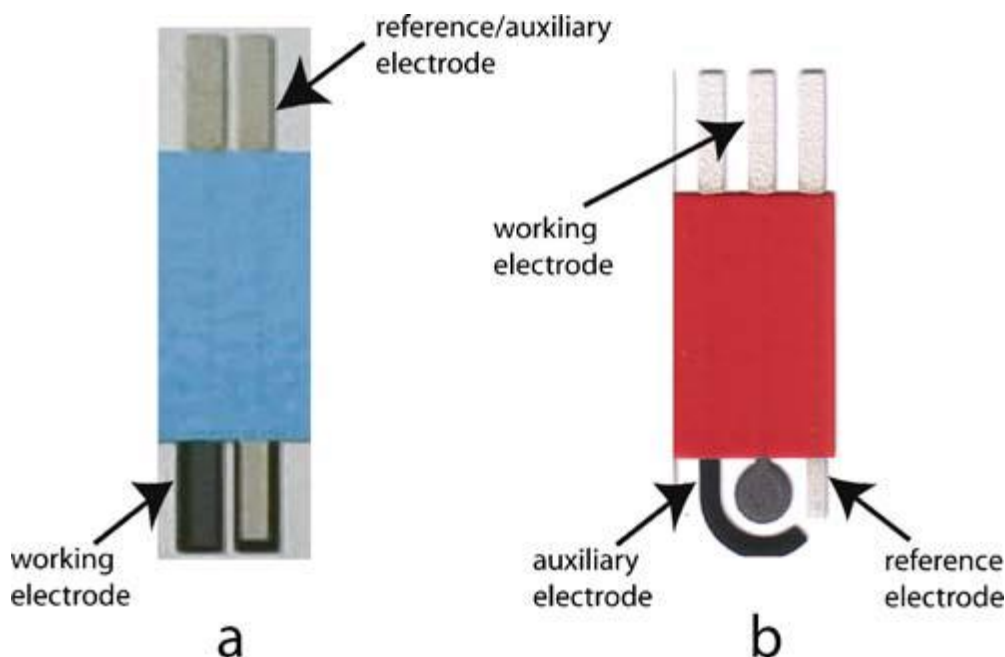
Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να σημειώσω ότι αυτού του τύπου τα ηλεκτρόδια δεν δημιουργήθηκαν αποκλειστικά για την μέτρηση διαφοράς δυναμικού, αντιθέτως έχουν χρήση σε πάρα πολλές μετρήσεις της ηλεκτροχημείας. Στο εμπόριο υπάρχουν αρκετές εταιρίες που παράγουν τους δικούς screen printed αισθητήρες (π.χ Pine Research Instrumentation, <http://www.pineinst.com/echem>; PalmSens Electrochemical Sensor Interface, <http://www.palmsens.com>; BioSens Technology, <http://www.bst-biosensor.de>; DropSens, <http://www.dropsens.com>)

Γενικότερα τα ηλεκτρόδια επίστρωσης χρησιμοποιούνται στην παραγωγή πολλών μοντέρνων αισθητήρων που μπορούν να ενσωματωθούν σε φορητά αλλά και σταθερά συστήματα. Το μικρό μέγεθος αλλά και η απλότητα χρήσης αυτού του τύπου των αισθητήρων μας δίνει την δυνατότητα για την δημιουργία αναλυτικών μεθόδων στο άμεσο περιβάλλον, χωρίς να παρεμβαίνουμε με οποιονδήποτε τρόπο στο περιβάλλον. Έτσι η φορητότητα των ηλεκτροδίων επίστρωσης μας βοηθάει σε ένα από τα σημαντικότερα ζητούμενα στην κατασκευή της συσκευής μας, δηλαδή να μπορεί να είναι και η ίδια η συσκευή φορητή [7]. Τα ηλεκτρόδια επίστρωσης έχουν πάρα πολύ μικρές διαστάσεις και μπορούν να μεταφερθούν σε πακέτα κατά δεκάδες.

Στη βιομηχανία με τεχνολογία SPE (ηλεκτρόδια επίστρωσης) οι μελέτες ανάπτυξης χωρίζονται σε 2 μέρη: βασικές μελέτες και τεχνολογικές κατασκευές. Οι βασικές μελέτες εστιάζονται στο να χαρακτηρίσουν τα υλικά που χρησιμοποιούνται στα ηλεκτρόδια, όπως και τις χημικές αντιδράσεις που προκύπτουν από την ηλεκτροχημεία των βιοαισθητήρων. Γενικότερα οι βασικές μελέτες αυξάνουν τη γνώση και την πληροφορία ενώ εν κατακλείδι εξηγούν τα πειραματικά αποτελέσματα, βοηθώντας έτσι στην περαιτέρω βελτιστοποίηση των συσκευών. Οι τεχνολογικές κατασκευές περιλαμβάνουν όλο το κλάδο των εφαρμογών που χρησιμοποιούν τα SPE, δηλαδή στην περιβαλλοντική ανάλυση όπως και στον έλεγχο του φαγητού.

Ιδανικά, ένας βιοαισθητήρας τέτοιου τύπου αποτελείται από την βασική κατασκευή του (μη-βιολογικό υλικό), βιολογικό στοιχείο (τροποποιημένα κύτταρα με την μέθοδο BERA) και με τα υπόλοιπα υλικά (η ουσία μου εξετάζουμε) με συνολικό αποτέλεσμα ένα ηλεκτροχημικό σήμα που περιέχει την πληροφορία [8].

Τα screen printed electrodes μπορούν να σχεδιαστούν είτε με 2 ηλεκτρόδια (εργασίας και αναφοράς στην πρώτη γενιά screen printed electrodes) είτε με 3 ηλεκτρόδια (εργασίας, αναφοράς και βοηθητικό στην δεύτερη γενιά). [Εικόνα 3].



Εικόνα 3 Ηλεκτρόδια επίστρωσης πρώτης(α) και δεύτερης(β) γενιάς

Η βάση των ηλεκτροδίων μπορεί να είναι κεραμική[9,10], PVC [11], άνθρακας με ακρυλική μπογιά και Polycarbonates (PC). Το ενεργό μέρος του αισθητήρα, δηλαδή τα ηλεκτρόδια, πρέπει να καταλήγουν σε βάσεις για την μεταγωγή και την είσοδο των σημάτων. Για την καλύτερη μεταγωγή χρησιμοποιείται αγώγιμη κόλλα που εφαρμόζεται στα ηλεκτρόδια. Έχει αναφερθεί και η εφαρμογή εξωτερικά αγώγιμης κόλλας για βέλτιστη απόδοση κάτι το οποίο οι πολλές εταιρίες παραγωγής πλέον το θεωρούν περιττό[13].

Ένας ηλεκτροχημικός βιοαισθητήρας ουσιαστικά αποτελείται από ένα ηλεκτροχημικό αισθητήρα με ακινητοποίηση μιας βιοδραστικής χημικής ουσίας. [17] Ο τρόπος κατασκευής και η βασικές αρχές των ηλεκτροδία επίστρωσης είναι που τα κάνουν να διαφέρουν από

άλλους αισθητήρες. Σε ένα ηλεκτροχημικό βιοαισθητήρα η στοιβάδα ακινητοποίησης βρίσκεται στο εξωτερικό στρώμα Helmholtz και στο στρώμα Nerst. Έτσι διασφαλίζει όχι μόνο την δημιουργία αντίδρασης που είναι υπεύθυνη για την εκλεκτικότητα του αισθητήρα αλλά και την επιρροή στο εσωτερικό στρώμα Helmholtz[fig 1].

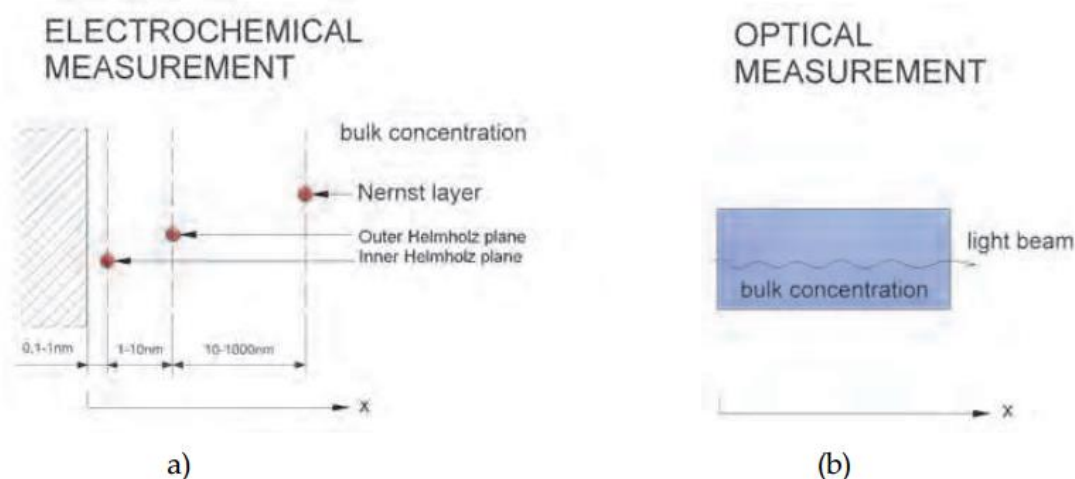


Fig. 1. Difference between electrochemical (a) and optical (b) measurement.

Εικόνα 4 Η διαφορά μεταξύ μίας ηλεκτροχημικής και μίας οπτικής μέτρησης

Η διαδικασία της ακινητοποίησης αλλάζει σημαντικά τις ιδιότητες αλλά και την προσρόφηση των ενεργών ηλεκτροδίων. Η επίδραση του βιοδραστικού στρώματος στην δομή των στρωμάτων Helmholtz και Nerst είναι δραματική. Η βιοδραστική μεμβράνη αλλάζει την κατανομή χώρου του δυναμικού, μέσω διεργασιών ενυδάτωσης και ουδετεροποίησης του pH στο εξωτερικό στρώμα Helmholtz. Το βιοδραστικό επίπεδο –η επιφάνεια- αλλάζει την δομή και στο στρώμα Nerst. Οι αλληλεπιδράσεις είναι αμοιβαίες. Η παρουσία του ηλεκτροδίου και οι αντιδράσεις στην επιφάνεια του επηρεάζουν την βιοδραστική μεμβράνη ενώ οι τοπικές αλλαγές στις τιμές του pH μπορούν να μεταφέρουν την αντίδραση εκτός του γνωστού ορίου βέλτιστου ορίου του pH. Όλες αυτές οι αλλαγές που συμβαίνουν τοπικά στην επιφάνεια ενός ηλεκτροχημικού αισθητήρα είναι που μας δίνουν το μετρήσιμο σήμα που προσπαθούμε να διαβάσουμε με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ακρίβεια.

Είναι ξεκάθαρο ότι υπάρχει μεγάλη διαφορά στην διαδικασία ανίχνευσης από ένα ηλεκτροχημικό αισθητήρα και ένα οπτικό αισθητήρα. Στον οπτικό αισθητήρα η ακτίνα φωτός περνάει μέσα από την προς ανάλυση ουσία και αντιδρά με τα μόρια και συγκεκριμένα με κάθε μόριο διαφορετικά και δεν υπάρχει επίδραση στις στοιβάδες όπως συμβαίνει με ένα ηλεκτροχημικό αισθητήρα. Προφανώς και στους οπτικούς αισθητήρες υπάρχει διακύμανση στα αποτελέσματα αλλά αυτή προέρχεται από την σχέση απόστασης και την ορθή τοποθέτηση

της πηγής της ακτίνας. Η επιφάνεια των ηλεκτροδίων επίστρωσης είναι εξαιρετικά σημαντικό να κρατηθεί σταθερά «καθαρή» από οποιαδήποτε άλλη επίδραση για να μπορεί να μας δώσει και ένα ανεπηρέαστο αποτέλεσμα. Η εικόνα της επιφάνειας δύο ηλεκτροδίων επίστρωσης παρουσιάζεται παρακάτω [Εικόνα 3]. Παρατηρούμε τις διαφορές ανάμεσα στα δύο υλικά μέσω μικροσκοπίου στην επιφάνεια ενός AC1.W1.RS (αριστερά) και ενός AC1.W2.RS (δεξιά). Η επιφάνεια του AC1.W1.RS έχει επιστρωθεί με χρυσό ενώ του AC1.W2.RS με πλατίνα.

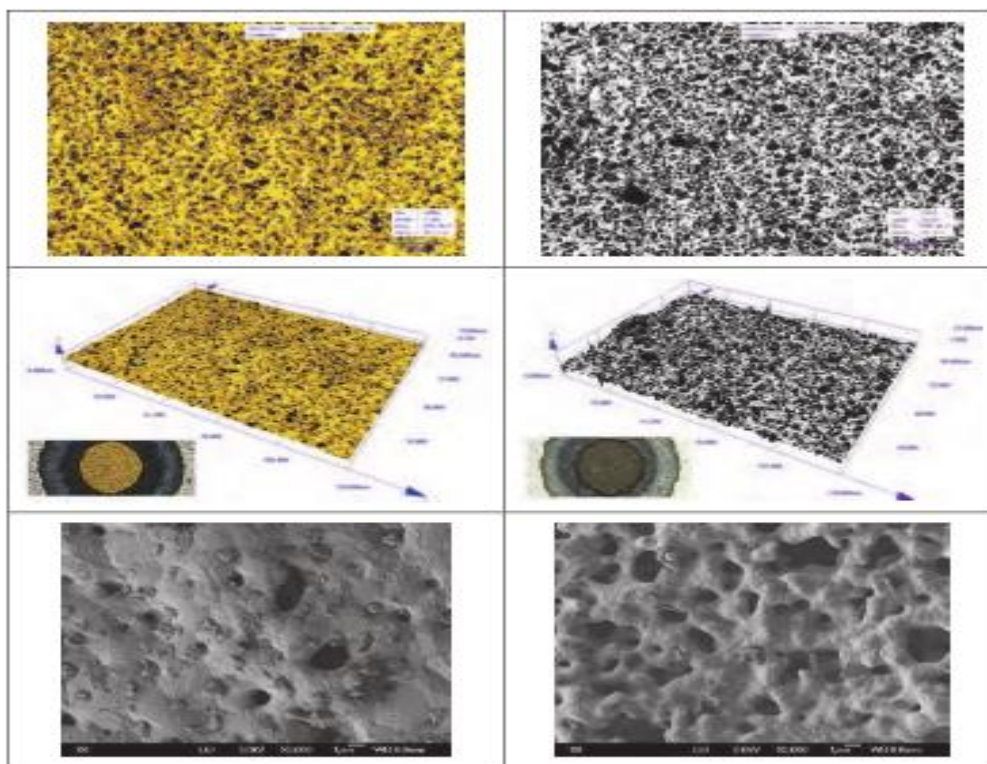


Fig. 2. The surface structure of AC1.W1.RS (left panel) and AC1.W2.RS (right panel) recorded by optical (upper and middle part) and scanning electron microscopy (bottom part).

Εικόνα 5 Εικόνες από οπτικό (πάνω και μέση) ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης

Ο χρυσός και η πλατίνα είναι 2 από τα πολλά διαφορετικά υλικά με τα οποία μπορούν να επενδυθούν τα ηλεκτρόδια για να μας δώσουν το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα.

Αυτό που επικρατεί είναι η εφαρμογή στο ένα μέρος του ηλεκτροδίου αγώγιμης κόλλας από υλικό με διαφορετικά χαρακτηριστικά για κάθε περίπτωση, δηλαδή όπως αναφέραμε και πριν χρυσός, ασήμι, πλατίνα κτλ. Οι μελέτες για την χρήση των screen printed electrodes προσανατολίζονται στην χρήση όλο και πιο σταθερών αλλά και οικονομικών υλικών. Ένα πρώτο αποτέλεσμα αυτών των μελετών είναι η αντικατάσταση της αγώγιμης κόλλας από άνθρακα και ένα sol-gel γραφίτη λύνοντας τα προβλήματα παραγωγής με άνθρακα. Μια από τις σημαντικότερες εξελίξεις και βελτιώσεις στη περιοχή των μεμβρανών και της εσωτερικής κατασκευής των ηλεκτροδίων επίστρωσης βασίζεται στην υιοθέτηση μία φωτολιθικής τεχνικής

που ευνοεί την ενσωμάτωση ενός πιο ανθεκτικού μίγματος (photo curable formulation) για να τέτοιου τύπου τεχνολογία. Τέτοιου είδους υλικά τοποθετούνται στο τελευταίο στάδιο της κατασκευής. Όπως παρατηρήσαμε και στα πειράματά μας, ένα βασικό πρόβλημα με τα ηλεκτρόδια επίστρωσης είναι ότι μετά την πρώτη μέτρηση που πραγματοποιούμε, ακόμη και μετά το προσεκτικό καθαρισμό τους με τα απαραίτητα και αντίστοιχα υλικά τα ηλεκτρόδια επίστρωσης παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές κατά την επαναχρησιμοποίησή τους. Κάτι τέτοιο είναι αναμενόμενο καθώς καμία εταιρία κατασκευής δεν εγγυάται σταθερά αποτελέσματα κατά την επαναχρησιμοποίησή τους. Η βελτίωση των υλικών με τα οποία γίνεται η επίστρωση στο τελικό στάδιο έχει αυτή την κατεύθυνση[15], δηλαδή την προστασία των υλικών των ηλεκτροδίων για να μην καταστρέφονται μετά την εφαρμογή στην επιφάνεια τους των ουσιών που εξετάζουμε. Η όποια βελτίωση επιτευχθεί πρέπει να διασφαλίζει την σταθερότητα των μετρήσεων αλλά και την εκλεκτικότητα που είναι και ένα σημαντικό πρόβλημα της ηλεκτροχημείας. Επίσης τα όποια υλικά επιλέξουμε δεν πρέπει να επηρεάζουν τις ουσίες που τοποθετούνται στο ηλεκτρόδιο, για να μπορούμε να διατηρήσουμε τη αξιοπιστία της μέτρησής μας, καθώς θα μετράμε μόνο από την αντίδραση που προκαλείται και όχι από οποιοδήποτε εξωτερικό παράγοντα, δηλαδή θόρυβο.

Το πρόβλημα της επαναχρησιμοποίησης είναι κάτι το οποίο απασχολεί πολύ, καθώς το κόστος αγοράς των ηλεκτροδίων επίστρωσης αυξάνει και το συνολικό κόστος της συσκευής μας, άρα και τις ανίχνευσης. Το γεγονός ότι η μέθοδος BERA απαιτεί για την μέτρηση της αλλαγής δυναμικού μόνο 2 ηλεκτρόδια μας δίνει περιθώριο για χρήση 2 ηλεκτροδίων, κάτι το οποίο μπορεί να μας οδηγήσει σε σημαντική εξοικονόμηση. Αξίζει φυσικά να επαναλάβουμε ότι ένα εν γένει πλεονέκτημα της χρήσης της μεθόδου BERA για ανίχνευση ουσιών είναι το εξαιρετικά χαμηλό κόστος αυτής της μεθόδου. Εν κατακλείδι είναι εξαιρετικά σημαντικό αφού η μέθοδος μας παρέχει την δυνατότητα ανίχνευσής με 2 ηλεκτρόδια, να διερευνηθεί οποιαδήποτε δυνατότητα για μείωση του κόστους ανάλυσης, χωρίς φυσικά να θυσιάζουμε ούτε στο ελάχιστο την αξιοπιστία των μετρήσεων. Στο πειραματικό μέρος πολλά πειράματα πραγματοποιήθηκαν με επαναχρησιμοποιημένα ηλεκτρόδια, με στόχο να μελετηθεί η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησής τους, αλλά και να περιοριστεί το κόστος των πειραμάτων μας.

Τα ηλεκτρόδια επίστρωσης παρά το μικρό διάστημα που βρίσκονται στην αγορά έχουν χρησιμοποιηθεί σε αρκετά προβλήματα ανίχνευσης στοιχείων από υγρά. Ο κυριότερος λόγος είναι η ευκολία χρήσης που παρέχουν στο ερευνητή.

Αυτός ο τύπος των ηλεκτροδίων είναι ιδιαίτερα δημοφιλής εξαιτίας της χαμηλής του τιμής, της υψηλής ευαισθησίας και της φορητότητας. Για την ανάγκη της μελέτης μας και της προσαρμογής των ηλεκτροδίων επίστρωσης στη μέθοδο BERA χρειάστηκε να μελετηθούν λεπτομερώς, διάφορες μελέτες για την προσαρμογή των ηλεκτροδίων επίστρωσης σε διάφορα προβλήματα ανίχνευσης.

[20] Ένα σημαντικό πρόβλημα το οποίο προτάθηκε έως μια νέα λύση η χρήση των ηλεκτροδίων επίστρωσης είναι ο εντοπισμός nitric oxide (NO). Πρώτα εφαρμόστηκε η διαδικασία κατασκευής των ηλεκτροδίων με 2 διαφορετικές ουσίες επίστρωσης ενώ στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε χημική επεξεργασία των ηλεκτροδίων για να ενισχυθούν οι επιθυμητές ιδιότητες αυτών όπως η ευαισθησία, η εκλεκτικότητα και η βιοσυμβατότητα. Η επεξεργασία των αισθητήρων έγινε κυρίως σε χημικό επίπεδο για να προσαρμοστούν τα ηλεκτρόδια στην ανίχνευση της στοχευόμενης ουσίας NO. Επίσης για να βελτιωθεί η βιοσυμβατότητα των ηλεκτροδίων οι ερευνητές επικάλυψαν την επιφάνεια των ηλεκτροδίων επίστρωσης με ένα επιπλέον στρώμα PEG polymers. Παράλληλα στο στάδιο των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκαν ηλεκτρόδια κατασκευασμένα υπό γωνία για να εντοπίσουν το βέλτιστο συνδυασμό για μέτρηση του παραγόμενου σήματος.

Παρατηρούμε ότι η προσέγγιση του προβλήματος έγινε με βάση τις χημικές ιδιότητες των ηλεκτροδίων και την προσαρμογή τους σε αυτό. Στη δική μας μελέτη προσπαθούμε να λειτουργήσουμε και να επεξεργαστούμε το ηλεκτρονικό κομμάτι των ηλεκτροδίων. Η δυνατότητα για συνεχή βελτίωση των αποτελεσμάτων μέσω διαφόρων τρόπων δίνει στην ανίχνευση με ηλεκτρόδια επίστρωσης σημαντικά πλεονεκτήματα. Αυτό γίνεται γιατί τα ηλεκτρόδια δίνουν απόκριση αμέσως μόλις γίνει η αντίδραση στην επιφάνεια τους. Την απόκριση μπορούμε να την βελτιώσουμε με ασφάλεια με τη χρήση εξωτερικών εξαρτημάτων αλλά και όπως αναφέρεται [20] και με χρήση τεχνικών επένδυσης της επιφάνειας. Επίσης αναφέρεται και η χρήση SPE διατάξεων προσαρμοσμένων στη μετρούμενη ουσία, για καλύτερη μέτρηση μέσω της γωνίας μέτρησης. Παρατηρούμε από τα αποτελέσματα ότι υπάρχει διαφοροποίηση ανάλογα με τη γωνία, αρά και ένα νέο στοιχείο που επηρεάζει την τελική τιμή, ανάλογα με τη μέθοδο της ηλεκτροχημείας που θα επιλεγεί για να γίνει η μέτρηση.

Αυτό μας δίνει τη δυνατότητα προσαρμογής στο πρόβλημα που μελετάμε και την βελτίωση των αποτελεσμάτων ακυρώνοντας παράλληλα το ενδεχόμενο θορύβου από διάφορα αναμενόμενα και μη στοιχεία. Η αναφορά διαφόρων τεχνικών για προσαρμογή είναι ιδιαίτερα σημαντική γιατί μας δίδεται η δυνατότητα προσέγγισης του προβλήματος και από διαφορετικές σκοπιές.

Στην παρούσα μελέτη η οποιαδήποτε βελτίωση των μετρήσεων επιχειρείται αφορά το ηλεκτρονικό κομμάτι όπως επίσης και από την προσαρμογή του βιολογικού υλικού σε χρήση με τα ηλεκτρόδια επίστρωσης, κάτι που σημαίνει ότι δεν έχουμε τροποποιήσει την επιφάνεια των ηλεκτροδίων για να προσαρμόσουμε στο πρόβλημα μας. Αυτό μας δίνει τη δυνατότητα μελλοντικής μελέτης και ερευνάς της προσαρμογής και τροποποίησης των ηλεκτροδίων επίστρωσης για καλύτερα αποτελέσματα για ανίχνευση με τη μέθοδο BERA.

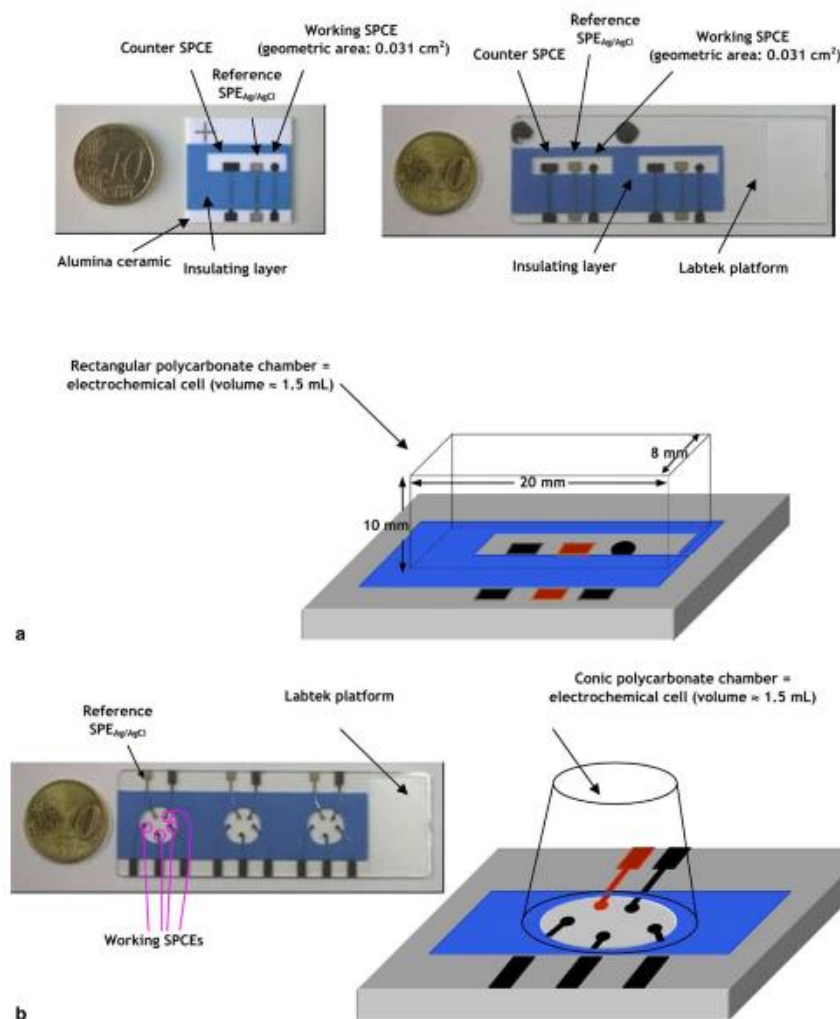


Fig. 1. Photographs and schematic drawings of the fabricated SPCE configurations on alumina ceramic and Labtek platforms and the mounted electrochemical cells on their top.

Εικόνα 6 Βλέπουμε την διαφοροποίηση των ηλεκτροδίων για προσαρμογή τους στο πρόβλημα ανίχνευσης

Γενικά τα ηλεκτροδίων επίστρωσης αποτελούν μία εξαιρετική λύση για την ανίχνευση ουσιών με τη χρήση ηλεκτροχημικών τεχνικών, λόγω των πολλών διαθέσιμων εκδόσεων που υπάρχουν αλλά και λόγω της δυνατότητα προσαρμοστικότητας τους στα προς μελέτη προβλήματα για βελτίωση της ευαισθησίας και της βιοσυμβατότητας.

Για τη χρήση των ηλεκτροδίων ως ποτενσιομετρικούς βιοαισθητήρες δεν πρέπει να εφαρμόσουμε καθόλου ρεύμα ή εξωτερικό δυναμικό. Άρα ουσιαστικά η διαδικασία μέτρησης απλοποιείται, καθώς αυτό που είναι απαραίτητο είναι να μετρήσουμε σταθερά το παραγόμενο δυναμικό των κύτταρων, μέσω του ηλεκτρονικού σήματος. Για να γίνει αυτό σωστά θα πρέπει να μελετήσουμε το σημείο αναφοράς με το οποίο θα συγκρίνουμε τις ενδείξεις των ηλεκτροδίων εργασίας.

Σημαντική παράμετρος για μία ορθή μέτρηση είναι να μπορέσουμε να αφαιρέσουμε τον παρεμβαλλόμενο θόρυβο, περιβαλλοντικό, υλικών, αλλά και ακόμη από λανθασμένη εφαρμογή του βιολογικού υλικού στον αισθητήρα. Δηλαδή να φτιάξουμε ένα σύστημα που να μπορεί να αντιμετωπίσει τα σφάλματα περιβάλλοντος, αλλά και του χρήστη.

Όπως προαναφέραμε η BERA έχει δύο τρόπους να μετρηθεί η εναλλαγή δυναμικού μετά την εισαγωγή της ουσίας. Αυτό γίνεται λόγω του διπολικού χαρακτήρα των κυττάρων που μπορούν να θεωρηθούν και να αντιμετωπιστούν είτε ως πηγές δυναμικού είτε ως αντιστάσεις.

Στους ποτενσιομετρικούς βιοαισθητήρες τα ηλεκτρόδια διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο τους. Υπάρχουν ηλεκτρόδια είτε με τρία διαφορετικά υλικά είτε με δύο διαφορετικά υλικά. Για τη μέτρηση της μεθόδου BERA χρειάζονται μόνο δυο ηλεκτρόδια. Δηλαδή μόνο ένα ηλεκτρόδιο ως ηλεκτρόδιο εργασίας (+) και ένα άλλο ως αναφοράς(-). Έτσι επειδή χρησιμοποιούμε ηλεκτρόδια επίστρωσης τελευταίας γενιάς με τρία ηλεκτρόδια (εργασίας, αναφοράς, βοηθητικό) σε κάθε τεμάχιο, πρέπει να βρούμε έναν τρόπο για να μην προστίθεται θόρυβος από το «περισσευούμενο» ηλεκτρόδιο. Πρέπει να σημειώσουμε ότι για τη χρήση ως ηλεκτρόδιο αναφοράς (reference) μπορούμε μόνο να χρησιμοποιήσουμε το φερόμενο και ως τέτοιο, καθώς το υλικό επίστρωσης είναι τέτοιο ώστε να παρέχει σταθερό σημείο αναφοράς. Στις πειραματικές μελέτες όταν προσπαθήσαμε να μετρήσουμε με ηλεκτρόδιο αναφοράς το ένα από τα 2 άλλα ηλεκτρόδια είχαμε «ασταθή» και προβληματικά αποτελέσματα.

Με βάση τους αισθητήρες BERA προηγούμενων γενιών η μετρούμενη διαφορά δυναμικού έχει να κάνει με το κανάλι που δημιουργούν τα κύτταρα μετά την αντίδραση ένωσης των ουσιών. Άρα το ηλεκτρόδιο αναφοράς μας δίνει την τάση αναφοράς με την οποία συγκρίνουμε τις τιμές του δυναμικού που λαμβάνουμε από το ηλεκτρόδιο εργασίας και το βοηθητικό ηλεκτρόδιο. Τα ηλεκτρόδια αυτά είναι με τέτοιο τρόπο κατασκευασμένα ώστε να μειώνουν τις παρεμβολές από το περιβάλλον[8]. Επειδή όπως έχουμε αναφέρει τα ηλεκτρόδια επίστρωσης (SPE) είναι γενικής χρήσης και όχι προσαρμοσμένα αποκλειστικά στην παθητική βολταμετρία έπρεπε να μελετήσουμε το ιδανικό υλικό επίστρωσης για τα καλύτερα αποτελέσματα. Όλα τα

πειράματα μας έγιναν με ηλεκτρόδια της Dropsens (<http://www.dropsens.com>) στους ακόλουθους τύπους.

- DRP-710 (http://www.dropsens.com/en/pdfs_productos/new_brochures/710.pdf)
- DRP-150 (http://www.dropsens.com/en/pdfs_productos/new_brochures/150.pdf)
- DRP-220AT (http://www.dropsens.com/en/pdfs_productos/new_brochures/gold_electrodes.pdf)

Αυτοί οι τύποι ηλεκτροδίων αποτελούνται από τα δημοφιλέστερα υλικά για την ηλεκτροχημεία, δηλαδή χρυσό, άνθρακα και ασήμι. Όλα τα υλικά είναι με τέτοιο τρόπο κατασκευασμένα και τροποποιημένα για να μην επηρεάζουν το ένα το άλλο και να μπορούν να μας δώσουν τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια στις μετρήσεις μας. Στο εμπόριο υπάρχουν πάρα πολλές εκδόσεις των ηλεκτροδίων, από διάφορες εταιρίες κάτι το οποίο, με την απαραίτητη χρηματοδότηση, μπορεί να μας προσφέρει τη δυνατότητα να επιλέξουμε την καλύτερη έκδοση ηλεκτροδίων για το πρόβλημα μας. Το σήμα είναι πάντα σε αναλογική μορφή και περιέχει την πληροφορία που πρέπει να επεξεργαστούμε για να μάθουμε το αποτέλεσμα της μεθόδου. Τα ηλεκτρόδια που χρησιμοποιήσαμε στην πειραματική μας διαδικασία ήταν όλα 2^{ης} γενιάς και ένα από τα προβλήματα που είχαμε να αντιμετωπίσουμε ήταν ο τρόπος χρησιμοποίησης του βοηθητικού ηλεκτροδίου.

Η μία τεχνική που εφαρμόσαμε ήταν να μετράμε ξεχωριστά το αποτέλεσμα των τριών ηλεκτροδίων. Σε αυτή την περίπτωση εκείνο που παρατηρήσαμε ήταν παρόμοια αποτελέσματα από τα ζεύγη βοηθητικό -αναφοράς και εργασίας-αναφοράς όταν χρησιμοποιούσαμε εκδόσεις ηλεκτροδίων επιστρώσης με τα ηλεκτρόδια εργασίας και το βοηθητικό να αποτελούνται από τα ίδια υλικά. Η μέτρηση διαφοράς δυναμικού που δίνουν τα ηλεκτρόδια διαφέρει λίγο ανά ζευγάρι, αν και τα αποτελέσματα είναι αρκετά κοντά. Αν όμως τα ηλεκτρόδια αποτελούνταν από τρία διαφορετικά υλικά τα αποτελέσματα των μετρήσεων ανά ζευγάρι ήταν σημαντικά διαφορετικά. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την επίδραση που έχουν τα διαφορετικά υλικά στην τελική τιμή διαφοράς δυναμικού που λαμβάνουμε, ενώ από την άλλη μας δίνει στοιχεία ποιος θα πρέπει να είναι ο ιδανικός συνδυασμός ηλεκτροδίων για να αποφύγουμε τις λάθος μετρήσεις και το θόρυβο των υλικών. Θα δούμε τελικά ότι και όταν μετράμε μόνο ένα ζεύγος ηλεκτροδίων τότε το τρίτο ηλεκτρόδιο πρέπει να προσέχουμε να μην μας επηρεάσει το αποτέλεσμα. Περισσότερες λεπτομέρειες για τα συμπεράσματα αλλά και αριθμητικά αποτελέσματα παραθέτουμε στο πειραματικό μέρος.

Ο δεύτερος τρόπος για να μετρήσουμε την αντίδραση του βιοαισθητήρα είναι να εφαρμόσουμε ένα συγκεκριμένο αλλά και σταθερό δυναμικό, με την βοήθεια του οποίου μπορούμε να μετρήσουμε την αντίδραση του βιοαισθητήρα μετά την εφαρμογή της ουσίας στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου επιστρώσης. Άρα εφαρμόζοντας δυναμικό στο counter ηλεκτρόδιο, μέσω του οποίου μετά την εφαρμογή του βιολογικού υλικού θα υπάρξει και η

αντίστοιχη αντίδραση. Σε αυτή την περίπτωση ο αισθητήρας μας δεν είναι πλέον ποτενσιομετρικός καθώς μετά την εφαρμογή δυναμικού θεωρείται αμπερομετρικός

Με τον ίδιο τρόπο όπως και πριν γίνεται η αρχική μέτρηση μεταξύ βιολογικού υλικού και control, ενώ στην συνέχεια γίνεται και η σύγκριση μετά την εισαγωγή της ουσίας. Οι διαφορές μεταξύ των μεθόδων έχουν να κάνουν με τον τρόπο που επηρεάζονται τα κύτταρα με την εφαρμογή δυναμικού ή χωρίς αυτή. Το δυναμικό το οποίο εφαρμόζουμε πρέπει να είναι κάτω από ένα όριο το οποίο αντέχουν να λαμβάνουν τα ηλεκτρόδια επίστρωσης. Αυτό γίνεται γιατί παρατηρήθηκε το φαινόμενο να καίγονται τα ηλεκτρόδια όταν επιχειρούμε να περάσουμε διαμέσου αυτών σχετικά υψηλή τάση. Για να προστατέψουμε τα ηλεκτρόδια από αυτό το φαινόμενο δοκιμάσαμε διάφορες αντιστάσεις μέχρι να βρούμε μία που να μας δίνει ικανοποιητικό αποτέλεσμα στην τιμή δυναμικού που λαμβάνουμε στην έξοδο χωρίς να καταστρέφουμε τα δομικά στοιχεία των ηλεκτροδίων αλλά και των κυττάρων. Αυτή η αμπερομετρική μέτρηση στη μέθοδο BERA **δοκιμάζεται για πρώτη φορά** κάτι που μας έδωσε τη δυνατότητα να πειραματιστούμε με ιδιότητες των κυττάρων πέρα από τις συνηθισμένες

Λόγω της πρώιμης μελέτης αυτής της αμπερομετρικής μέτρησης, δεν μπορούμε να πούμε με ασφάλεια αν τα τροποποιημένα κύτταρα επηρεάζονται αρνητικά στο κανάλι δυναμικού που παράγουν. Εάν εντοπιστούν δομικές αλλαγές στο κανάλι δυναμικού των κυττάρων είναι πολύ πιθανόν να απορρίψουμε αυτή τη μέθοδο μέτρησης για τα κύτταρα. Τέτοιου είδους μελέτες πρέπει να γίνουν από προσωπικό ειδικευμένο σε θέματα κυτταρικής ανάλυσης κάτι που ξεφεύγει από τα όρια αυτής της διπλωματικής εργασίας. Μπορούμε όμως να μελετήσουμε το **σήμα** που προκύπτει και να αξιολογήσουμε τα αποτελέσματα αλλά και την ακρίβεια των μετρήσεων της μεθόδου BERA.

Η εφαρμογή εξωτερικού δυναμικού συνίσταται στην ηλεκτροχημεία ως τεχνική περιορισμού του θορύβου αλλά και ως τεχνική ασφαλέστερης μεταφοράς ενός σήματος. Ένα σήμα μεγαλύτερου δυναμικού είναι δυσκολότερο να επηρεαστεί από εξωτερικούς παράγοντες όπως τη θερμοκρασία ή την απώλεια λόγω μεγέθους των συρμάτων καθώς ένα μεγαλύτερο σήμα μπορεί να φτάσει αναλλοίωτο στον προορισμό του ευκολότερα από ότι ένα σήμα ελάχιστων mV. Αυτό οφείλεται στην ποσοστιαία επίδραση του θορύβου στα μικρά σήματα.

Ουσιαστικά ο διπολικός χαρακτήρας των κυττάρων, όπως έχουμε αναφέρει και παραπάνω μας παρέχει ευελιξία για την μέτρηση του σήματος, κυρίως στη συμπεριφορά που μελετάμε για την ανίχνευση ουσιών. Μία ακόμη σημαντική παράμετρος μίας επιτυχημένης ανάλυσης είναι αν μπορούμε εκτός της παρουσίας της ουσίας, να ανιχνεύσουμε και ποσοτικά αποτελέσματα από τις προς ανίχνευση ουσίες. Θεωρητικά αυτό μπορεί να αποδεδειχθεί από τα στοιχεία της μέτρησης δυναμικού. Στο πειραματικό κομμάτι πραγματοποιήσαμε μετρήσεις που μας έδωσαν εξαιρετικά αποτελέσματα, μέσω των οποίων μπορούμε να πούμε με ασφάλεια ότι η μέθοδος BERA έχει τη δυνατότητα ποσοτικής ανίχνευσης.

Σε αυτό το στάδιο η μέθοδος BERA μπορεί να δώσει «ασφαλή» αποτελέσματα για την παρουσία συγκεκριμένων ουσιών (TCA κτλ) αλλά οι πληροφορίες για την ποσότητα των ουσιών μέσα στο αναλυόμενο δείγμα είναι δυσκολότερο να επεξεργαστούν. Μια τέτοια βελτίωση θα μπορέσει να επεκτείνει τις εφαρμογές της μεθόδου BERA, ακόμη ίσως ως μία μέθοδος που να μπορεί να πραγματοποιήσει αναλύσεις σε τέτοιο επίπεδο ώστε να θεωρηθούν αντίστοιχα αξιόπιστες με τις εργαστηριακές αναλύσεις που χρησιμοποιούνται σήμερα.

Τέτοιες μελέτες έχουν αναφερθεί και έχουν πραγματοποιηθεί [19] με ενθαρρυντικά αποτελέσματα αλλά είναι ακόμη σε πρώιμο στάδιο για να μπορούμε να εγγυηθούμε με ασφάλεια τα αποτελέσματα. Η καλύτερη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων μπορεί να δώσει στοιχεία τα οποία να απλοποιήσουν αυτή τη διαδικασία.

ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΝΣΩΜΑΤΩΜΕΝΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ

Στο σύγχρονο τεχνολογικό περιβάλλον τα ενσωματωμένα συστήματα έχουν επεκταθεί στην παγκόσμια αγορά γιατί παρέχουν φθηνές και αξιόπιστες λύσεις για κάθε είδους προβλήματα. Συστήματα με ευκολία αποθήκευσης και χρήσης για κάθε μέγεθος, ώστε ο υπολογιστής να μην αποτελεί τη μοναδική πηγή επεξεργασίας. Τα ενσωματωμένα συστήματα αποτελούν ένα μεγάλο κομμάτι από το μέλλον των αναλύσεων και των ιατρικών εφαρμογών.

Αυτό μας κάνει τη δυνατότητα να διαλέξουμε ένα σύστημα που είναι ήδη διαθέσιμο στο εμπόριο, με έτοιμες εφαρμογές για επικοινωνία και επεξεργασία από τον προσωπικό μας υπολογιστή, tablet ή laptop.

Τα περισσότερα ενσωματωμένα συστήματα, ελέγχου χαμηλού και μεσαίου κόστους, χρησιμοποιούν μικροελεγκτές γιατί αυτοί μπορούν να λειτουργήσουν με ελάχιστα εξωτερικά εξαρτήματα, λόγω των πολλών ενσωματωμένων υποσυστημάτων που διαθέτουν.

Ας καθορίσουμε τις απαιτήσεις και τα ζητήματα που θα πρέπει να καλύπτει το σύστημα μέτρησης που θέλουμε να υλοποιήσουμε.

ΖΗΤΟΥΜΕΝΑ

- Χαμηλό κόστος
- Σωστές μετρήσεις
- Εύκολη επεξεργασία
- Φορητότητα
- Μελλοντική ανάπτυξη

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ

- Επεξεργασία όλης της καμπύλης
- Power Supply: On board
- Processor: On board
- Data acquisition: 5 sample/sec
- Applied Potential Range: $\pm 400\text{mV}$
- Applied Potential accuracy: 12bit
- Applied Potential Resolution: approximately 0,5mV

Όσον αφορά τις απαιτήσεις αλλά και τα στοιχεία μετρήσεων πρέπει να τα επιλέξουμε ώστε να είναι εύκολη υπόθεση η αλλαγή για λόγους μελλοντικής ανάπτυξης και για επιπρόσθετες απαιτήσεις, όπως φυσικά και να σχεδιάσουμε ένα σύστημα με προδιαγραφές για χρήση και στο εμπόριο..

- Το σύστημα μας επιλέξαμε να έχει σαν πυρήνα ένα μικροελεγκτή αντί της κλασικής λύσης του μικροεπεξεργαστή. Αυτό το κάναμε για τρεις λόγους. Ο μικροελεγκτής έχει έτοιμα και απλούστατα interface, μικρότερη κατανάλωση ενέργειας αρά και μεγαλύτερη αυτονομία για το σύστημα μας με μπαταρία, ενώ είναι πολύ φθηνότερος από το μικροεπεξεργαστή.

Ένας μικροεπεξεργαστής θα έκανε σίγουρα την επεξεργασία που χρειαζόμαστε αλλά θα αυξάνει χωρίς κάποιο κέρδος για το ολοκληρωμένο αποτέλεσμα το κόστος αλλά και την πολυπλοκότητα του συστήματος.

- Το σύστημα μας αλλά και όλα τα εξωτερικά εξαρτήματα θέλουμε να έχει αντοχή σε δυναμικό μέχρι 10 V τουλάχιστον για να μην έχουμε το πρόβλημα της υπερφόρτωσης τάσης που θα μπορέσει να βλάψει το σύστημα.

Η υπολογιστική δύναμη που χρειάζεται για να επιλυθεί το πρόβλημα της ζητούμενης δειγματοληψίας είναι πάρα πολύ μικρή οπότε κανένα πρόβλημα δεν θα προκύψει .

Για την ακρίβεια της μέτρησης δυναμικού να είναι 12bit, απαιτείται ένας ενσωματωμένος analog to digital converter στο σύστημα που θα επιλέξουμε. Εάν τα συστήματα όμως μας ικανοποιούν όλες τις άλλες προϋποθέσεις δεν υπάρχει κανένα πρόβλημα καθώς μπορούμε να

αυξήσουμε το εύρος της δειγματοληψίας με την χρήση εξωτερικού ADC. Η επιλογή του εξωτερικού ADC πρέπει να συμβαδίζει με τις προδιαγραφές του συστήματος.

Ένα ακόμη δεδομένο που έπρεπε να λάβουμε υπόψη μας, είναι ότι αυτά τα συστήματα που είναι βασισμένα σε μικροελεγκτή έχουν πάρα πολύ μικρή μνήμη. Έτσι δεν είναι δυνατόν να αποθηκεύσουμε αποτελέσματα εκεί για τον όγκο των δεδομένων που θέλουμε να διαχειριστούμε. Γι αυτό το ολοκληρωμένο σύστημα που θα χρησιμοποιήσουμε, πρέπει να έχει τη δυνατότητα επέκτασης μνήμης, αλλά και του συνδυασμού μίας πληθώρας περιφερειακών συσκευών που να μπορούν να μας χρησιμεύουν στην καλύτερη διαχείριση των στοιχείων μας. Συμπληρώνοντας θα ήθελα να αναφέρω ότι το σύστημα μας θα πρέπει να έχει την απαραίτητη υπολογιστική ισχύ για να μπορέσει να υποστηρίξει και το ενδεχόμενο να παρέχει τη δυνατότητα για ανάπτυξη και αυτόματο υπολογισμό των αποτελεσμάτων από ένα νευρωνικό δίκτυο. Κάτι τέτοιο προφανώς θα αυξήσει την πολυπλοκότητα του συστήματος, από την άλλη μας παρέχει τη δυνατότητα να φτιάξουμε μία συσκευή που να λαμβάνει αυτόματα, χωρίς την χρήση Η/Υ, αποφάσεις για την παρουσία ή μη της προς ανίχνευση ουσίας. Η βελτίωση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων με την χρήση νευρωνικού δικτύου είναι δεδομένη καθώς με αυτό τον τρόπο επεξεργαζόμαστε όλες τις πληροφορίες που εξάγουμε από την καμπύλη διαφοράς δυναμικού των τροποποιημένων κυττάρων.

Στόχος της εργασίας είναι τα συστήματα τα οποία θα μελετηθούν να είναι ανοικτά (open source toolkits) για να μπορεί όποιος θέλει να κάνει χρήση του κώδικα των συστημάτων για την δική του εφαρμογή αλλά ίσως και την περεταίρω ανάπτυξη αυτής. Όλες οι συσκευές που μελετήσαμε έχουν αναπτυχθεί με αυτή τη λογική, δίνοντας μας έτσι την δυνατότητα να χρησιμοποιήσουμε έτοιμους κώδικες από προηγούμενες εφαρμογές.

Στη σημερινή αγορά έχει επικρατήσει η χρήση και η λειτουργία διάφορων ανοικτών συστημάτων που βασίζονται σε μικροελεγκτές για συγκεκριμένες λειτουργίες.

Η χρήση μικροελεγκτή, παρότι περιορίζει τις δυνατότητες σε σχέση με ένα επεξεργαστή, παρέχει έτοιμες εφαρμογές στο χρήστη, περιορίζει το κόστος και αυξάνει την αυτονομία. Αυτές οι πλατφόρμες είναι ανοικτές στο διαδίκτυο κάτι που χαρίζει τεράστιες δυνατότητες εξέλιξης ειδικότερα για τις πιο ευρέως διαδεδομένες πλατφόρμες. Τέτοιου είδους συστήματα ονομάζονται *embedded systems* και κυκλοφορούν σε εκατοντάδες εκδόσεις για χρήση είτε για ερασιτέχνες είτε και για ανάπτυξη εκπαιδευτικών ή εργαστηριακών εφαρμογών. Όλα τα συστήματα προγραμματίζονται μέσω θυρών που επικοινωνούν με ηλεκτρονικό υπολογιστή για εύκολη επεξεργασία αλλά και τροφοδοσία. Για πολλές πλατφόρμες υπάρχουν και αρκετά περιφερειακά εξαρτήματα για να επεκτείνουν τις δυνατότητες τους.

Στην αρχή της έρευνας μας μελετήσαμε διάφορες πλατφόρμες και εκδόσεις, όμως βασισμένοι στις απαιτήσεις τους συστήματος καταλήξαμε στην πιο εντατική μελέτη δύο υπολογιστικών πλατφορμών. Του GADGETEET της Microsoft, αλλά και του Arduino της Arduino Italy. Παρακάτω αναλύονται οι δυνατότητες των δύο πλατφορμών αλλά και οι λόγοι της τελικής επιλογής για υλοποίηση. Ο λόγος που επικεντρωθήκαμε σε αυτές τις δύο πλατφόρμες είναι γιατί αποτελούν εξαιρετικά δημοφιλή αντικείμενα, με αποτέλεσμα η βιβλιογραφία τους να επεκτείνεται σε δεκάδες εφαρμογές. Θέλαμε το σύστημα που θα χρησιμοποιήσουμε να είναι δοκιμασμένο και σε σχετικά μεγάλο χρονικά διάστημα για θεωρήσουμε με μεγαλύτερη ασφάλεια ότι το θεμέλιο της συσκευής μας είναι αξιόπιστο. Ένα επίσης σημαντικό στοιχείο για την επιλογή μας ήταν η αξιοπιστία των εργαλείων προγραμματισμού, καθώς το Arduino υποστηρίζεται από μία τεράστια online κοινότητα χρησιμοποιώντας το δικό της λογισμικό που έχει αναπτυχθεί στο MIT, ενώ η Microsoft χρησιμοποιεί το γνωστό και αξιόπιστο Visual Studio.

Η open-source πλατφόρμα της Microsoft για ηλεκτρονικές συσκευές που χρησιμοποιούν το .NET Micro Framework και το Visual Studio/Visual C# Express. Μας παρέχει τη δυνατότητα μέσω μερικών πολύ ισχυρών εξαρτημάτων να χρησιμοποιήσεις πολλούς αισθητήρες παράλληλα και να δημιουργήσουμε πολλά διαφορετικά projects. Η Microsoft παρέχει πληθώρα έτοιμων εφαρμογών για την πλατφόρμα της, με επιλογές για χρήση ως μηχανή καταγραφής δεδομένων, σύστημα παιχνιδιών και άλλα πολλά. Η πλατφόρμα προγραμματίζεται από το αντίστοιχο πρόγραμμα της Microsoft μέσω Visual Studio πάντα μέσω USB.



Εικόνα 7. NET Gadgeteer πρωτότυπα διαθέσιμα στην αγορά.

Οι δυνατότητες της πλατφόρμας είναι πάρα πολύ μεγάλες όπως και η υπολογιστική της δύναμη. Ενώ και η υποστήριξη αυτής από έναν κολοσσό, όπως η Microsoft μπορεί να εγγυηθεί την συνεχή ανάπτυξη και τον εμπλουτισμό των δυνατοτήτων της. Το πρόβλημα με αυτή την πλατφόρμα είναι η ιδιαίτερα αυξημένη τιμή, αλλά και ότι οι δυνατότητες που μας δίνει είναι πολύ μεγαλύτερες από αυτές που χρειαζόμαστε για το πρόβλημα μας. Έτσι με την επιλογή αυτής της πλατφόρμας ενώ θα έχουμε την υπολογιστική ισχύ για να επεξεργαστούμε τις μετρήσεις μας, ξεφεύγουμε από τον αρχικό στόχο του χαμηλού προϋπολογισμού. Επίσης δεν παρέχεται η δυνατότητα ενσωμάτωσης κυκλωμάτων από την ελεύθερη αγορά και επιπλέον η διαμόρφωση και της συσκευασίας της συσκευής όπως θέλουμε, τουλάχιστον στο επίπεδο που μας δίνει αυτές τις δυνατότητες το Arduino. Με βάση αυτά τα δεδομένα προχωρήσαμε στην εντατικότερη μελέτη της επόμενης υπολογιστικής πλατφόρμας.

Η πιο ευρέως διαδεδομένη πλατφόρμα για open-source projects με το μοναδικό πλεονέκτημα των πολλών εκδόσεων για όλες τις ανάγκες αλλά και την εκτενέστατη βιβλιογραφία που την υποστηρίζει. Επίσης αυτή η πλατφόρμα είναι εξαιρετικά διαδεδομένη στους πανεπιστημιακούς κύκλους και με πολλά παραδείγματα από έτοιμα projects, όπως και ένα εξαιρετικό forum για να πάρουμε τις απαντήσεις σε απαιτητικά ερωτήματα. Το Arduino έχει πάρα πολλές διαφορετικές εκδόσεις εκ των οποίων μας δίνεται η δυνατότητα να διαλέξουμε την καταλληλότερη συσκευή για την εργασία μας. Όπως είναι λογικό το σημαντικότερο σημείο για την επιλογή του μοντέλου του Arduino που θα χρησιμοποιήσουμε είναι οι προδιαγραφές της ζητούμενης συσκευής. Πολύ σημαντικό σημείο για τη μέτρηση των ζητούμενων μεγεθών είναι να μπορεί το ενσωματωμένο σύστημα να πραγματοποιήσει τη δειγματοληψία που μας χρειάζεται. Στο δικό μας πρόβλημα είναι πολύ αργή η ζητούμενη δειγματοληψία – δύο δείγματα ανά δευτερόλεπτο - ένας ρυθμός που όλες οι εκδόσεις του Arduino μπορούν να ανταποκριθούν.

[C] Μία πλακέτα Arduino αποτελείται από ένα μικροελεγκτή Atmel AVR κυρίως ATmega328 για τις νεότερες αλλά και ισχυρότερες εκδόσεις. και συμπληρωματικά εξαρτήματα για τη διευκόλυνση του χρήστη στον προγραμματισμό και την ενσωμάτωση του σε άλλα κυκλώματα. Όλες οι πλακέτες περιλαμβάνουν ένα γραμμικό ρυθμιστή τάσης 5V και έναν κρυσταλλικό ταλαντωτή 16MHz). Ο μικροελεγκτής είναι από κατασκευής προγραμματισμένος με ένα *boot loader*, έτσι ώστε να μην χρειάζεται εξωτερικός προγραμματιστής. Γενικά οι περισσότερες πλακέτες είναι προγραμματισμένες μέσω μιας σειριακής σύνδεσης RS-232, αλλά ο τρόπος με τον οποίο αυτό υλοποιείται ποικίλλει ανάλογα με την έκδοση. Οι σειριακές πλακέτες Arduino περιέχουν ένα απλό κύκλωμα αντιστροφής για την μετατροπή ανάμεσα στα σήματα των επιπέδων RS-232 και TTL. Οι πλακέτες Arduino που κυκλοφορούν σήμερα στην αγορά, προγραμματίζονται μέσω USB, εφαρμόζοντας ένα τσιπ προσαρμογέα USB-to-serial όπως το FTDI FT232.

Παρατηρώντας προσεκτικά το υλικό που αποτελείτε η πλατφόρμα μας παρέχει τη δυνατότητα να εκπληρώσουμε τους στόχους και τα ζητούμενα για ένα ολοκληρωμένο σύστημα μέτρησης, σε πάρα πολύ χαμηλή τιμή με εξαιρετικές δυνατότητες μελλοντικής επέκτασης. Επιπλέον μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους σχεδίασης για την συσκευή μας είναι να μπορεί να βελτιωθεί και ακόμη και να έχει την δυνατότητα να ενσωματωθούν πάνω της πολύ μεγαλύτερες δυνατότητες ανάλογα με την εξέλιξη της μεθόδου BERA. Λόγω της εξαιρετικά γρήγορης ανάπτυξης της υπολογιστικής πλατφόρμας Arduino ακόμη και αυτή η παράμετρος ικανοποιείται με αυτή την επιλογή.

Ένας από τους βασικούς στόχους της μελλοντικής ανάπτυξής της συσκευής είναι να καταφέρουμε να ενσωματώσουμε ένα σύστημα απόφασης (π.χ. Νευρωνικό δίκτυο) μέσω του

οποίου θα μπορούμε να παίρνουμε όλο ορθότερες, αλλά και περισσότερες πληροφορίες για τις προς ανίχνευσή ουσίες. Κάτι τέτοιο απαιτεί πολύ μεγαλύτερη υπολογιστική δύναμη την οποία μόνο συγκεκριμένες εκδόσεις του Arduino μπορούν να αποδώσουν. Θεωρήσαμε επίσης πολύ σημαντικό να μπορεί η συσκευή μας να έχει την δυνατότητα να συνδεθεί με ένα δίκτυο (τοπικό, ιντερνέτ) για να μπορούν οι πληροφορίες των μετρήσεων να αποθηκεύονται με διάφορους τρόπους, αλλά και να μπορεί να γίνει διαχείριση ενός οποιουδήποτε όγκου πληροφοριών που μπορεί να προκύψει από τις μετρήσεις. Οι καλύτερες εμπορικές συσκευές του εμπορίου προσαρμόζονται στην αποθήκευση των δεδομένων τους μέσω Cloud Computing, για μεγαλύτερη ευκολία πρόσβασης και αποθήκευσης. Θεωρήσαμε απαραίτητο να υπάρχει αυτό το στοιχείο στη συσκευή μας.

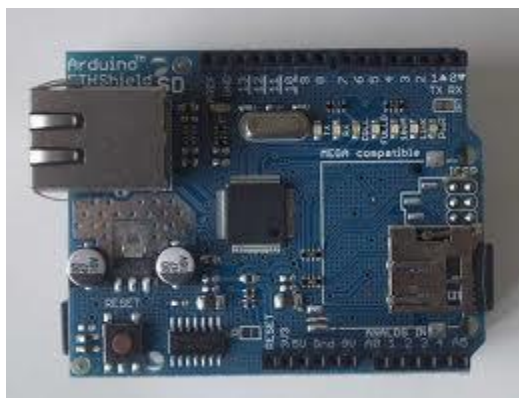
Για τη χρήση της μεθόδου BERA και για να εκμεταλλευτούμε τις απεριόριστες πραγματικά δυνατότητες που μας δίνει, οφείλουμε να απλοποιήσουμε τα πράγματα, αλλά και να μικρύνουμε τις «αποστάσεις» μεταξύ των επιστημονικών κλάδων που ασχολούνται με την ανάπτυξη της. Ουσιαστικά ο στόχος είναι μία συσκευή «μαύρο κουτί» που θα αποφασίζει με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ακρίβεια εάν το δείγμα προς ανίχνευση περιέχει την ζητούμενη ουσία ή όχι. Κάτι τέτοιο θα μας δώσει τη δυνατότητα αύξησης της απόδοσης του συνολικού συστήματος λόγω της μειωμένης πολυπλοκότητας της ανίχνευσής. Η συσκευή μας πρέπει να είναι όσο το δυνατόν απλούστερη για να γίνεται εύκολα κατανοητή η χρήση της από επιστήμονες όλων των κλάδων.

Στο πλαίσιο της διπλωματικής εργασίας πειραματιστήκαμε με το Arduino Mega 2560, το Arduino Nano, LCD οθόνες[σχήμα 5], αισθητήρες θερμοκρασίας, αφής, LED κτλ. Χρησιμοποιήσαμε προγράμματα όπως τη Matlab για την επεξεργασία των μετρήσεων για να μπορέσουμε να έχουμε μία σφαιρική κατανόηση της φιλοσοφίας χρήσης του Arduino.

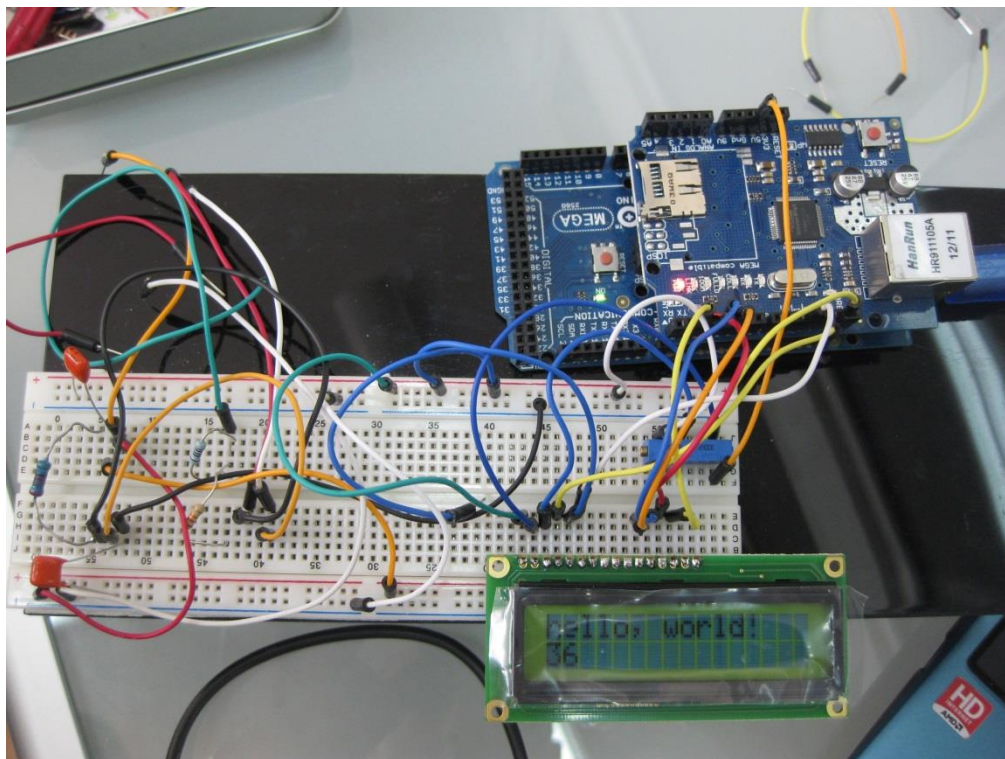
Καταλήξαμε στην χρήση του Arduino Mega 2560 σε συνδυασμό με ένα Ethernet, sd shield για εξωτερική αποθήκευση των μετρήσεων, με τη λογική της χρήσης της συσκευής σε χώρο εξωτερικούς περιβάλλοντος. Το Ethernet θα καλύψει τις ανάγκες για σύνδεση δικτύου αλλά μπορεί να χρησιμεύσει και για μελλοντικά update του λογισμικού του συστήματος. Η κάρτα sd μας δίνει τεράστιο χώρο αποθήκευσης-μέχρι 32 GB- κάτι το οποίο σημαίνει ότι μπορούν να πραγματοποιηθούν εκατοντάδες πειράματα εκτός εργαστηρίου και να αποθηκευτούν οι πληροφορίες για επεξεργασία μέσω του σταθμού βάσης για αργότερα.



Εικόνα 8 Arduino Mega 2560



Εικόνα 9 Arduino SD shield with Ethernet



Εικόνα 10 Σύνδεση Arduino με LCD και ένα απλό πρόγραμμα προβολής

Όπως έχουμε αναφέρει μία σημαντική παράμετρος για τη μέτρηση των διαφορών δυναμικού της μεθόδου BERA είναι να μπορέσουν να διαβάσουμε με όσο το δυνατό μεγαλύτερη ακρίβεια, αλλά και να επιτύχουμε το αποτέλεσμα της μέτρησης μας να είναι όσο το δυνατόν λιγότερο επηρεασμένο από το θόρυβο. Οι παράγοντες που μπορεί να προσθέσουν θόρυβο, δηλαδή λανθασμένες τιμές, στις μετρήσεις μας είναι πολλοί αλλά με διαφορές μεθόδους μπορούμε να μειώσουμε, ίσως και να εξαλείψουμε και τελείως, τις αρνητικές παρεμβολές.

Το arduino έχει on-board ενσωματωμένο ένα analog to digital converter 10 bit. Έτσι από την στιγμή που οι απαιτήσεις του συστήματος μας ήταν για 12+ bits η προσθήκη ενός εξωτερικού adc ήταν σημαντική. Πριν φτάσουμε όμως στο σημείο να προσθέσουμε τον adc έπρεπε πρώτα να διασφαλίσουμε ότι η μέτρηση του σήματος είναι ορθή έστω και στα 10bit.

Για να το επιτύχουμε αυτό, αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε ένα εξωτερικό εξάρτημα με εξαιρετική ακρίβεια, που οι εσωτερικές αντιστάσεις έχουν τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια στη τιμή του καθώς ετοιμάζονται έτσι από τα εργοστάσια παραγωγής τους και δεν τις εισάγουμε εμείς μέσω breadboard. Το breadboard μπορεί να αποτελεί εξαιρετική λύση για πειράματα και για εύκολες συνδέσεις μεταξύ ηλεκτρονικών εξαρτημάτων, αλλά αποτελεί ακόμη και μία πηγή θορύβου για το κύκλωμα.

Η διαφορά δυναμικού που μας δίνει το αποτέλεσμα της μεθόδου BERA, όπως αναφέραμε και παραπάνω, προκύπτει με βάση την διαφορά μεταξύ του ηλεκτρόδιου εργασίας και ηλεκτροδίου αναφοράς. Από τα βιομηχανικά κυκλώματα που είναι διαθέσιμα το ιδανικότερο εξάρτημα για να μας δώσει διαφορά μεταξύ δύο σημείων είναι οι ενισχυτές οργανολογίας.

Οι ενισχυτές οργανολογίας (instrumentation amplifiers, IA) χρησιμοποιούνται ευρύτατα σε εφαρμογές συλλογής δεδομένων, στη μέτρηση βιοϊατρικών και ακουστικών σημάτων, καθώς και για την ενίσχυση σημάτων υψηλής ταχύτητας. Χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση διαφορικών μικρού πλάτους τα οποία λαμβάνονται από τους αισθητήρες και την καταστολή της τάσης κοινού σήματος που αυτά περιέχουν. Όπως αναφέραμε και παραπάνω οι ενισχυτές οργανολογίας διατίθενται σαν ολοκληρωμένα κυκλώματα με χρήση τελεστικών της καλύτερης ποιότητας. Το γεγονός ότι η κατασκευή τους γίνεται στο εργοστάσιο, δίνει την καλύτερη δυνατή αξιοπιστία στις εσωτερικές αντιστάσεις και προστατεύει το κύκλωμα από τον περιβαλλοντικό θόρυβο.

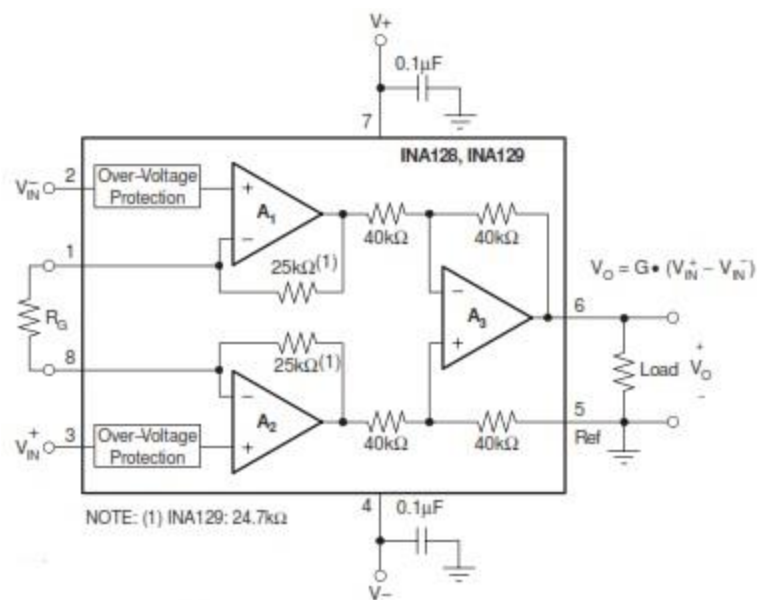
Μετά από δοκιμή διαφόρων δειγμάτων και μελέτη των εγχειριδίων τους καταλήξαμε ότι ο ενισχυτής οργανολογίας που ταιριάζει καλύτερη στις ανάγκες μας είναι ο INA129P από την Texas instruments. Μας προσφέρει λύσεις σε όλα τα ζητούμενα όσο αφορά το ηλεκτρονικό κομμάτι και μας δίνει με όσο το δυνατό πιο καθαρό από θόρυβο σήμα για τη διαφορά δυναμικού του σήματος των κυττάρων. Τον επιλέξαμε παρότι χρειάζεται θετική και αρνητική τάση, άρα και διπλή τροφοδοσία, έχει μεγάλο εύρος τροφοδοσίας μεταξύ 2.25V to 18V αλλά και μεγάλη ακρίβεια στη μέτρηση όπως λόγω του εξαιρετικού CMR, δηλαδή της χαμηλής παρεμβολής του θορύβου. Αναλυτικά τα στοιχεία του παρουσιάζονται παρακάτω [Σχήμα 3].

- **LOW OFFSET VOLTAGE: 50 μ V max**
- **LOW DRIFT: 0.5 μ V/ $^{\circ}$ C max**
- **LOW INPUT BIAS CURRENT: 5nA max**
- **HIGH CMR: 120dB min**
- **INPUTS PROTECTED TO $\pm$ 40V**
- **WIDE SUPPLY RANGE: $\pm$ 2.25V to $\pm$ 18V**
- **LOW QUIESCENT CURRENT: 700 μ A**
- **8-PIN PLASTIC DIP, SO-8**

Σχήμα 3

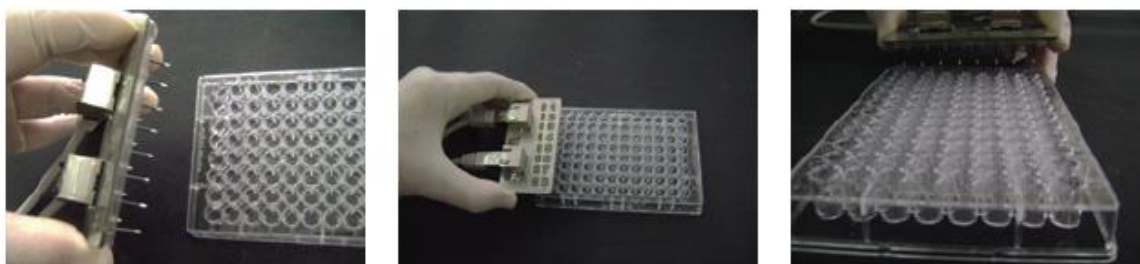
Ο INA129P χρησιμοποιείται σε ευαίσθητα συστήματα λόγω των χαρακτηριστικών του, που εξασφαλίζουν μεγάλη ακρίβεια. Συγκεκριμένα αναφέρονται εφαρμογές σε διάφορους ενισχυτές ακριβείας (π.χ. bridge amplifier, thermocouple amplifier) αλλά σε πλήθος ιατρικών εφαρμογών. Αυτά τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του INA129P συμβαδίζουν, όπως είναι φυσιολογικό με την ιδιαίτερα αυξημένη τιμή του (4,5 \$ ανά κομμάτι). Ο δικός μας στόχος είναι

μία εφαρμογή που να μπορεί να εγγυηθεί με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ακρίβεια στις μετρήσεις οπότε η προσθήκη ενός τέτοιου εξωτερικού εξαρτήματος μόνο ως πλεονέκτημα μπορεί να θεωρηθεί, ανεξάρτητα με το κόστος του. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι για το καλύτερο αποτέλεσμα ο οργανικός ενισχυτής στις δύο του υποδοχές τροφοδοσίας συνδέθηκε και με πυκνωτές για να κρατιούνται σταθερά τα ρεύματα στις υποδοχές, κάτι που μας κρατάει σταθερή την τάση εξόδου[Σχήμα 4].

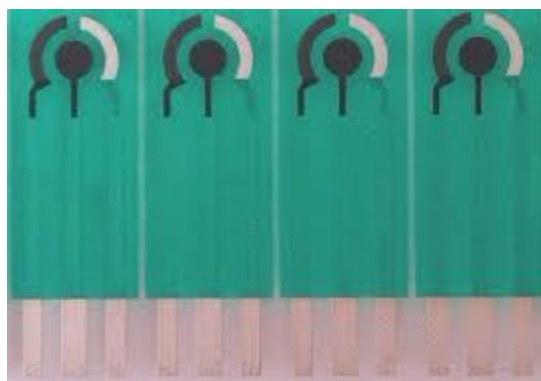


Σχήμα 4. Προτεινόμενη διάταξη INA129

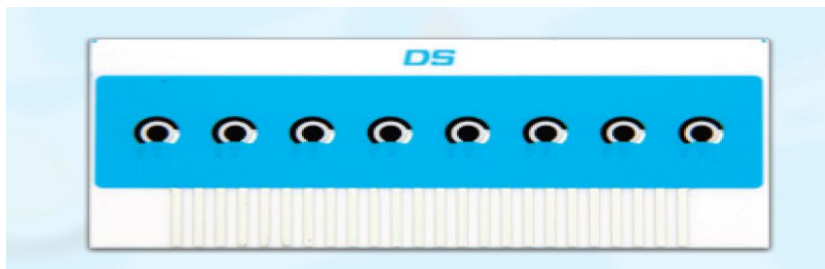
Μία ακόμη παρατήρηση που κάναμε με βάση τα εργαστηριακά αποτελέσματα των προηγούμενων γενεών βιοαισθητήρων BERA είναι ότι για να αυξήσουμε την ακρίβεια των αποτελεσμάτων, δηλαδή και την ασφάλεια των μετρήσεων, είναι καλύτερο να επαναλάβουμε τις μετρήσεις σε πολλά κανάλια. Σε μερικές συσκευές αυτό γινόταν με την χρήση ELISA plate - Enzyme-linked immuno sorbent assay- [Εικόνα 11] και συστήματος πολλαπλών ηλεκτροδίων ενώ στην τελευταία γενιά με τη χρήση ηλεκτροδίων επίστρωσης αυτό μπορεί να γίνει με την χρήση οκταπλού ηλεκτροδίου [Εικόνα 12] ή με την μέτρηση πολλών μονών ηλεκτροδίων μαζί [Εικόνα 13].



Εικόνα 11. Επίδειξη μέτρηση σε οκταπλά ηλεκτρόδια από αισθητήρα 6 γενιάς



Εικόνα 12. Τέσσερα μονά ηλεκτρόδια δίπλα δίπλα έτοιμα για ομαδική μέτρηση.



Εικόνα 13. Ένα πολλαπλό (οκταπλό) ηλεκτρόδιο

Είναι ξεκάθαρο ότι για να βελτιωθεί η αξιοπιστία στις μετρήσεις πρέπει να αυξήσουμε τις εισόδους, ίσως και για μπορέσουμε να ανιχνεύσουμε περισσότερες από μία ουσίες. Πολύ καλύτερα αποτελέσματα θα έχουμε και για μία ουσία με πολλαπλά δείγματα από ότι για ένα. Φυσικά τα πολλαπλά ηλεκτρόδια έχουν και αρκετά αυξημένη τιμή, όπως φυσικά και η χρήση περισσότερων μονών ηλεκτροδίων αυξάνει το κόστος της κάθε ανάλυσης. Κατά την διάρκεια των πειραμάτων μας, παρατηρήσαμε ουσίες να αναγνωρίζονται ξεκάθαρα από την πρώτη σειρά μετρήσεων αλλά και άλλες να χρειάζονται ένα σημαντικό αριθμό επαναλήψεων για να κρίνουμε ότι έχουμε ολοκληρώσει με επιτυχία την ανάλυση μας.

Για να διαβάσουμε το σήμα που προκύπτει από τα πολλαπλά ηλεκτρόδια επίστρωσης πρέπει να έχουμε 8 εισόδους στο Arduino. Ένας πολύ απλός τρόπος για εξοικονομήσουμε εισόδους είναι να χρησιμοποιήσουμε ένα πολυπλέκτη (multiplexer) ο οποίος να μπορεί να διαβάζει οκτώ διαφορετικές εισόδους αλλά να απασχολεί μόνο μία είσοδο κάθε φορά. Ο ρυθμός της δειγματοληψίας του πολυπλέκτη είναι τέτοιος που μπορούμε με ένα εξάρτημα να διαβάζουμε και τις 8 εισόδους αλλά και να επιτύχουμε την ζητούμενη δειγματοληψία των δειγμάτων που χρειαζόμαστε από τα κύτταρα για μία σωστή ανάλυση.

Ο πολυπλέκτης (multiplexer) είναι ένα ψηφιακό κύκλωμα το οποίο αποτελείται από “x” γραμμές επιλογής (**select**), «y» γραμμές εισόδου, και μία έξοδο. Συνήθως προσδιορίζουμε τους πολυπλέκτες με την κωδική λέξη MUX και ακολουθεί το πλήθος των εισόδων επί το 1 (δηλαδή το πλήθος των εξόδων).

Ο πολυπλέκτης που επιλέξαμε, αποφασίσαμε να έχει όριο λειτουργίας σημαντικά μεγαλύτερο από το αναμενόμενο σήμα μας, ώστε να αποφύγουμε το ενδεχόμενο να καταστραφεί από την εισερχόμενη τάση. Τέτοιου είδους λεπτομέρειες είναι σημαντικές για την αξιοπιστία του συστήματος αλλά και για την ευελιξία που πρέπει να δώσουμε στο σύστημα μας για να μπορεί μελλοντικά να υποστηρίξει αλλαγές στα εξαρτήματα. Επίσης λόγω του ότι οι υποστηριζόμενες εκδόσεις των ηλεκτροδίων επίστρωσης υποστηρίζουν οκτώ κανάλια θέλουμε και ο δικός πολυπλέκτης να είναι MUX 8 to 1, δηλαδή οκτώ είσοδοι σε μία έξοδο, καλύπτοντας έτσι τις λειτουργικές μας απαιτήσεις.

Στις ζητούμενες προδιαγραφές του συστήματος BERA είχαμε θέσει την ανάγκη για μεγάλη ανάλυση στο σήμα που λαμβάνουμε από τα ηλεκτρόδια επίστρωσης.

Όπως αναφέραμε και πιο πάνω το μετρούμενο σήμα, είναι αναλογικό όπως και όλα τα σήματα που προέρχονται από το φυσικό περιβάλλον. Για να γίνει μετρήσιμο από τον υπολογιστή σήμα πρέπει να το μετατρέψουμε σε ψηφιακό.

Ένα αναλογικό σήμα είναι μια χρονικά μεταβαλλόμενη τιμή δεδομένων με ορισμό ως μια ομαλά μεταβαλλόμενη τιμή ηλεκτρικής τάσης ή έντασης ρεύματος (δηλ. ένα σήμα με πλάτος χρονικά μεταβαλλόμενο) η οποία μπορεί να περιγραφεί από μια μαθηματική συνάρτηση, με το χρόνο να αποτελεί την ανεξάρτητη και την τιμή του σήματος, κάθε χρονική στιγμή, την εξαρτημένη μεταβλητή. Ένα διακριτό σήμα είναι το αποτέλεσμα που παίρνουμε μέσω της μεθόδου της δειγματοληπτικής μείωσης από το αρχικό αναλογικό σήμα : δηλαδή, η τιμή των δεδομένων σημειώνεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα (που εμείς ορίζουμε) και όχι συνεχώς (όπως είναι εκ φύσεως τα μηχανικά κύματα).

Αν οι ατομικές τιμές του σήματος αντί να μετρηθούν επακριβώς, επάνω στον άξονα του χρόνου, είναι εναρμονισμένες με κάποια ορισμένη ακρίβεια, τότε η ροή δεδομένων που προκύπτει είναι το **ψηφιακό σήμα**. Η διαδικασία προσέγγισης αυτής της ακρίβειας (δηλ. μιας συγκεκριμένης τιμής), μέσα από ένα σταθερό αριθμό ψηφίων (δηλ. bit) ονομάζεται **ψηφιοποίηση**.

Σε γενικές γραμμές, **ένα ψηφιακό σήμα είναι ένα ψηφιοποιημένο σήμα διακριτού χρόνου. Το διακριτό σήμα είναι το αποτέλεσμα της επεξεργασίας ενός αναλογικού σήματος με τη μέθοδο της δειγματοληπτικής μείωσης.**

Για να γίνει ορθή δειγματοληψία σε ένα αναλογικό σήμα πρέπει να υπάρχει και ο απαραίτητος ρυθμός δειγματοληψίας. Η τιμή αυτού του ρυθμού καθορίζεται σύμφωνα με το θεώρημα δειγματοληψίας του Shannon και είναι

$$\varphi = 2\chi + 1$$

όπου φ τα δείγματα που παίρνουμε ανά δευτερόλεπτο και χ η περίοδος του σήματος.

Έτσι καθορίζεται ο απαραίτητος ρυθμός δειγματοληψίας.

Στη μέθοδος BERA λόγω της αργής αλλαγής των τιμών η συχνότητα δειγματοληψίας είναι πάρα πολύ μικρή, ζητήθηκαν δυο δείγματα ανά δευτερόλεπτο. Η επιλογή του ad/c έγινε με βάση τα ζητούμενα αλλά λόγω της πάρα πολύ μικρής τιμής είναι εύκολο χωρίς καθόλου κόστος να αυξήσουμε την δειγματοληψία, άρα και την προσέγγιση του αναλογικού σήματος που παράγεται από τα ηλεκτρόδια επίστρωσης. Δεν αυξήσαμε την δειγματοληψία καθώς θέλαμε να συγκρίνουμε τα αποτελέσματα μας με αυτά των έτοιμων συσκευών BERA που

έχουν σταθερά δύο δείγματα/δευτερόλεπτο. Η αλλαγή στη δειγματοληψία γίνεται με μία απλή αλλαγή στον κώδικα του Arduino.

Αυτή η διαδικασία μετατροπής γινόταν σε όλες τις γενιές βιοαισθητήρων BERA. Στις πρώτες γενιές γινόταν με ένα εξωτερικό ad/c [Εικόνα 14] ενώ αργότερα στα μεταγενέστερα συστήματα αυτό γινόταν με ένα ολοκληρωμένο κύκλωμα που επικοινωνούσε με τον μικροεπεξεργαστή. Ένα τέτοιο ολοκληρωμένο κύκλωμα αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε και εμείς για την μετατροπή.



Εικόνα 14. Εξωτερικός ad/c

Ένα τέτοιο ολοκληρωμένο ονομάζεται analog to digital converter και μας δίνει την ακρίβεια που θέλουμε, μας προστατεύει το κύκλωμα από το θόρυβο αλλά και μας παρέχει την απαραίτητη δειγματοληψία.

Τέλος για την ορθή λειτουργία των εξωτερικών εξαρτημάτων χρησιμοποιήσαμε διάφορα ηλεκτρικά εξαρτήματα όπως πυκνωτές, αντιστάσεις και μπαταρίες . Κατά την διάρκεια της επιλογής εξαρτημάτων πειραματιστήκαμε σε διάφορα βασικά ηλεκτρονικά κυκλώματα όπως γέφυρες Whitestone, για να βρούμε τους καλύτερους συνδυασμούς αποκοπής θορύβου για το πρόβλημα μας.

Η επιλογή μας για εξωτερικό ad/c είναι ο MCP3424 της microchip. Ο διαφορικός αυτός ad/c συνδυάζει την δυνατότητα χρήσης σε τέσσερα διαφορετικά κανάλια, διαθέτει έτοιμο κώδικα για το Arduino με την υποστηριζόμενη βιβλιοθήκη. Ικανοποιεί πλήρως την ζητούμενη δειγματοληψία και μας δίνει τη δυνατότητα αποφυγής της χρήσης του πολυπλέκτη

μειώνοντας έτσι την πολυπλοκότητα του κυκλώματος μας. Επίσης ο MCP3424 έχει την εξαιρετική δυνατότητα να μπορούμε ηλεκτρονικά να μεταβάλουμε το εύρος ανάλυσης του. Έχει δυνατότητες μέτρησης με 12bit,14bit,16bit αλλά και 18bit.

Υπάρχουν δύο λόγοι για τους οποίους δεν επιλέγουμε τη μέγιστη δυνατή ανάλυση σε κάθε μέτρηση. Ο πρώτος έχει να κάνει με τον αριθμό των δειγμάτων που πρέπει να πάρουμε καθώς όπως αναφέρεται στο σχετικό datasheet η μέγιστη δειγματοληψία διαφέρει ανάλογα με την ανάλυση που επιλέγουμε στο σήμα μας.

- **Programmable Data Rate Options:**
 - 3.75 SPS (18 bits)
 - 15 SPS (16 bits)
 - 60 SPS (14 bits)
 - 240 SPS (12 bits)

Σχήμα 5 Δειγματοληπτική δυνατότητα. SPS= SAMPLES PER SECONDS

Η αύξηση του εύρους ανάλυσης των τιμών αυξάνει επίσης και την πιθανότητα ενός λάθος bit άρα και μίας λάθους τιμής. Η ψηφιοποίηση σε κάθε bit μπορεί να παρουσιάσει σφάλμα σε οποιοδήποτε bit με μία συγκεκριμένη πιθανότητα ανάλογα με τις συνθήκες τις οποίες είναι συνδεδεμένο το κύκλωμα. Αν το σφάλμα συμβεί σε ένα bit μεγάλης τιμής να έχουμε διαφορετικές τιμές. Φυσικά με τη χρήση τεχνικών στη θωράκιση της συσκευής από τις παρεμβολές αλλά και καλού σημείου γείωσης, προσπαθούμε να μειώσουμε στο ελάχιστο τις περιβαλλοντικές παρεμβολές που επηρεάζουν τις μετρήσεις μας, όμως το πρόβλημα όσο αυξάνεται η δειγματοληψία δυσκολεύει κάτι το οποίο μας οδηγεί στην απόφαση για προσεκτική αύξηση του εύρους μέτρησης του ad/c. Ειδικά σε ένα εργαστήριο οι παρεμβολές που ενδέχεται να επηρεάσουν είναι πολλές, καθώς προέρχονται από τα ασύρματα δίκτυα, τα διάφορα άλλα μηχανήματα αλλά και τη θερμοκρασία.

[D]Το νευρωνικό δίκτυο είναι ένα «δίκτυο» από απλούς υπολογιστικούς κόμβους (νευρώνες), διασυνδεδεμένους μεταξύ τους. Είναι εμπνευσμένο από το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), το οποίο προσπαθεί να προσομοιώσει και να προσαρμόσει και την λειτουργία του νευρωνικού συστήματος χρησιμοποιώντας την για να επίλυση προβλημάτων.

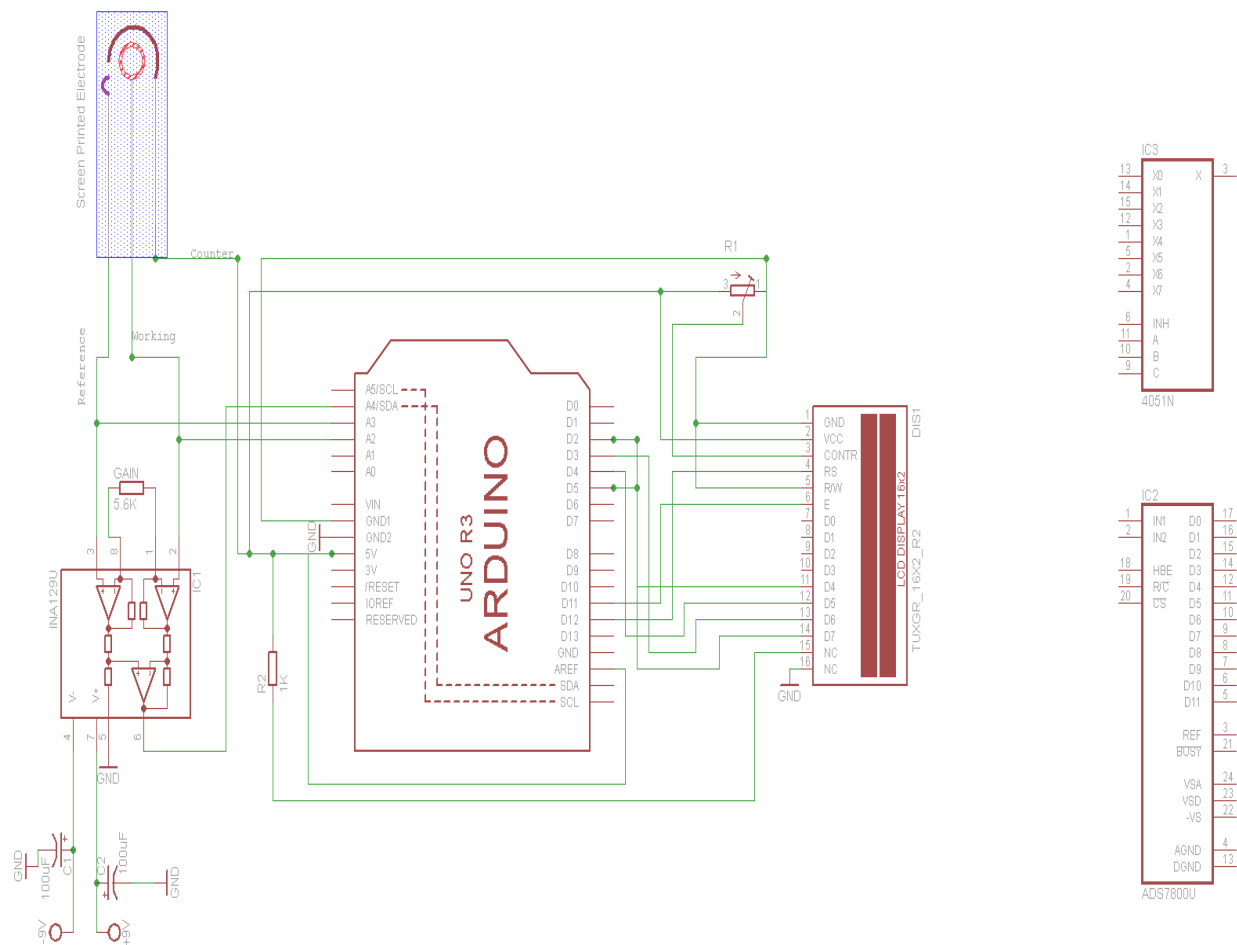
Κάθε τέτοιος κόμβος δέχεται ένα σύνολο αριθμητικών εισόδων από διαφορετικές πηγές (είτε από άλλους νευρώνες, είτε από το περιβάλλον), επιτελεί έναν υπολογισμό με βάση αυτές τις εισόδους και παράγει μία έξοδο. Οι «νευρώνες» είναι τα δομικά στοιχεία του δικτύου και η έξοδος που βγάζουν είτε κατευθύνεται στο περιβάλλον, είτε τροφοδοτείται ως είσοδος σε άλλους νευρώνες του δικτύου. Υπάρχουν τρεις τύποι νευρώνων: οι «νευρώνες εισόδου», οι «νευρώνες εξόδου» και οι «υπολογιστικοί νευρώνες» ή «κρυμμένοι νευρώνες». Οι νευρώνες εισόδου δεν επιτελούν κανέναν υπολογισμό, μεσολαβούν απλώς ανάμεσα στις περιβαλλοντικές εισόδους του δικτύου και στους υπολογιστικούς νευρώνες. Οι νευρώνες εξόδου διοχετεύουν στο περιβάλλον τις τελικές αριθμητικές εξόδους του δικτύου. Οι υπολογιστικοί νευρώνες πολλαπλασιάζουν κάθε είσοδό τους με το αντίστοιχο «συναπτικό βάρος» και υπολογίζουν το ολικό άθροισμα των γινομένων. Το άθροισμα αυτό τροφοδοτείται ως όρισμα στη «συνάρτηση ενεργοποίησης», την οποία υλοποιεί εσωτερικά κάθε κόμβος. Η τιμή που λαμβάνει η συνάρτηση για το εν λόγω όρισμα είναι και η έξοδος του νευρώνα για τις τρέχουσες εισόδους και βάρη.

Για να κατασκευαστεί μία τελική εμπορική εφαρμογή όλο το κύκλωμα πρέπει να τυπωθεί σε μία πλακέτα που θα περιέχει όλα τα στοιχεία τα οποία ενώσαμε και δουλέψαμε για να λύσουμε το πρόβλημα μας. Ένα εκτυπωμένο κύκλωμα μπορεί να μειώσει το θόρυβο και τις παρεμβολές στο ελάχιστο δίνοντας μας έτσι και καλύτερα αποτελέσματα. Επίσης ένα τέτοιο κύκλωμα μπορεί να αποτελέσει και την βάση για ένα εμπορικό προϊόν ως ένας ολοκληρωμένος βιοαισθητήρας.

Επιλέξαμε να σχεδιάσουμε το κύκλωμα μας με το λογισμικό σχεδίασης κυκλωμάτων EAGLE. Το ακρώνυμο σημαίνει Easily Applicable Graphical Layout Editor. Αυτό το εξαιρετικό πρόγραμμα περιέχει επιλογές από χιλιάδες εξαρτήματα για να βάλει στο κύκλωμα σου, για ένα τελικό αποτέλεσμα όπως ακριβώς το χρειαζόμαστε. Έχει δύο εκδόσεις τη δωρεάν και την επί πληρωμή, στο δικό μας σχεδιασμό η δωρεάν έκδοση έχει όλα τα απαραίτητα εργασία για να ολοκληρώσουμε την δουλεία μας.

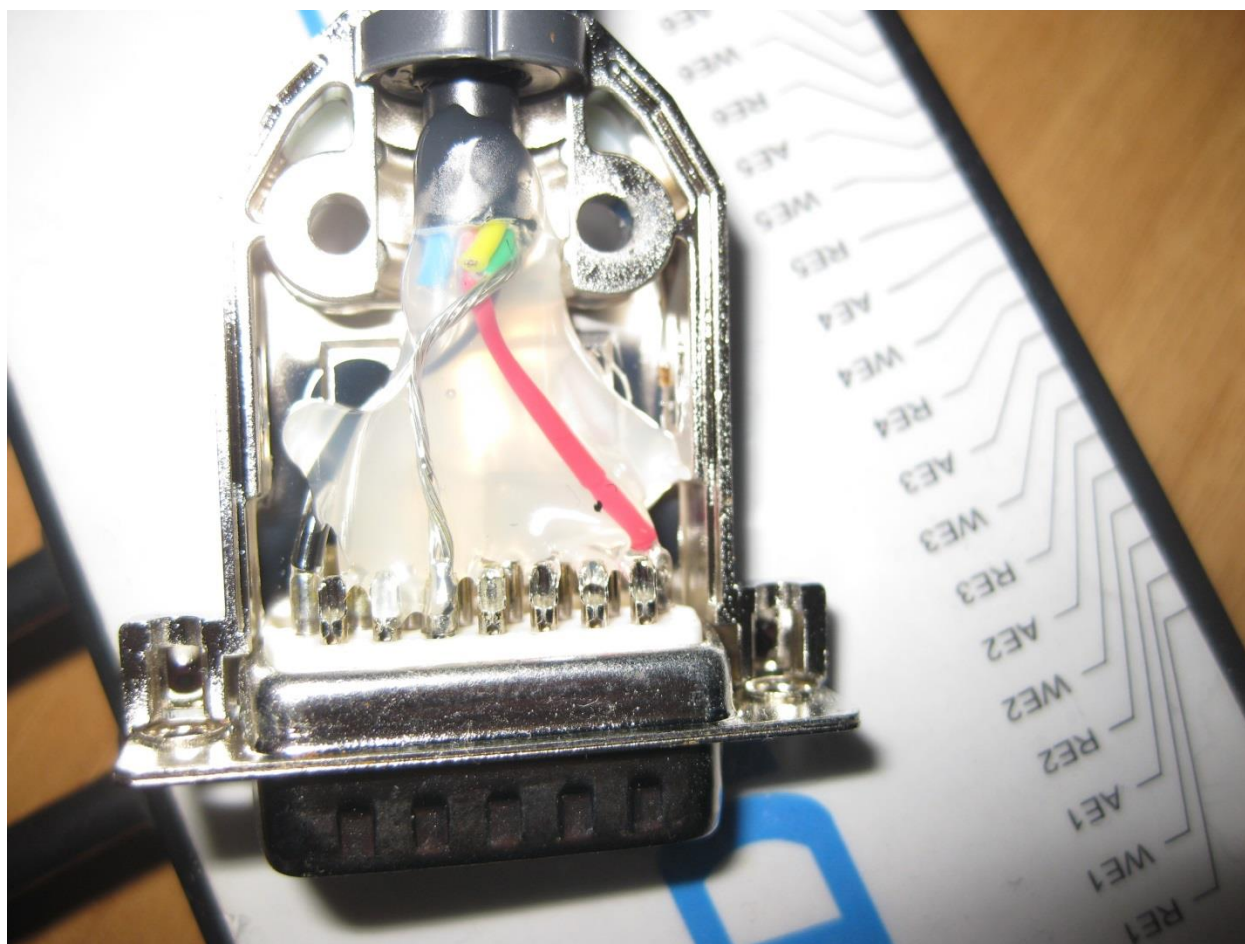
Στο τελικό σχεδιαστικό κομμάτι βλέπουμε όλα τα κομμάτια τα οποία παρουσιάσαμε και δοκιμάσαμε πειραματικά, ενώ προσθέσαμε και μια οθόνη LCD 16 x 2 στο πλαίσιο της ιδέας για ένα τελικό προϊόν «μαύρο κουτί» το οποίο να βγάζει ένα αξιόπιστο αποτέλεσμα για την ανίχνευση ουσιών με την μέθοδο BERA. Μέσω του προγράμματος μπορούμε να επιλέξουμε τα απαραίτητα υλικά για την πλακέτα μας στο μέγεθος στο οποίο θέλουμε, αλλά και σε όποια τιμή (αντίστασης, πυκνωτή) χρειαζόμαστε. Το μέγεθος της πλακέτας που θα σχεδιάσουμε θέλουμε να είναι εφαρμόσιμο πάνω στο Arduino για να μπορεί να λειτουργήσει και αυτό σαν ένα Arduino Shield. Ένα τέτοιο κύκλωμα θα μπορεί να εφαρμόζει σε όλες τις συσκευές Arduino και να πραγματοποιεί τις λειτουργίες για τις οποίες σχεδιάστηκε με μόνη επιπρόσθετη διαδικασία την ενσωμάτωση του κώδικα μας στο κάθε Arduino. Είναι ακόμη δυνατό σε περίπτωση που προτιμηθεί μία διαφορετικού τύπου ανάπτυξη να σχεδιαστεί ένα κύκλωμα βασισμένο στο πρότυπο, το οποίο να πραγματοποιεί μόνο τις αναγκαίες λειτουργίες για την διαγνωστική μας μέθοδο. Τέτοιου είδους διαδικασίες είναι εξαιρετικά περίπλοκες, όμως με το σωστό σχεδιασμό του κυκλώματος σε ένα σχεδιαστικό λογισμικό έχουμε την ευελιξία να κάνουμε τις απαραίτητες αλλαγές χωρίς ιδιαίτερες δυσκολίες. Η επί πληρωμή έκδοση του Eagle παρέχει και τη λειτουργία της προσομοίωσης.

Στο σχεδιασμό του συστήματος, χρησιμοποιήσαμε το Arduino Uno R3 καθώς αποτελεί την δημοφιλέστερη έκδοση αυτής της πλατφόρμας με υποστήριξη με από όλα τα περιφερειακά. Το Mega είναι η βελτιωμένη έκδοση του Uno με λίγο αυξημένη τιμή αλλά πολύ μεγαλύτερες δυνατότητες, αλλά και περισσότερες θύρες εισόδων/ εξόδων.



Σχήμα 6. Σχεδίαση συστήματος με Eagle design

Ένα από τα πρώτα προβλήματα που έπρεπε να αντιμετωπίσουμε ήταν το πώς θα λαμβάναμε το σήμα από τα ηλεκτρόδια. Οι βάσεις τις Dropsens ήταν πολύ ακριβότερες από τον προϋπολογισμό μας ενώ και οι άλλες εταιρίες που παρέχουν το προϊόν έχουν βάλει τις τιμές τους πολύ ψηλότερα από τα χρήματα που είχαμε διαθέσιμα. Γνωρίζοντας ότι τα τρία ηλεκτρόδια που υπάρχουν στα ηλεκτρόδια επίστρωσης δίνουν το σήμα που εμείς θέλαμε να μετρήσουμε, αρχικά κολλήσαμε καλώδια στα ηλεκτρόδια για να διαβάσουμε αυτό το σήμα. Οι βάση της Dropsens συνδεόταν με την συσκευή μέσω RGB καλωδίων. Κάνοντας την τομή του καλωδίου σύνδεσης είδαμε ότι κάθε κανάλι χρησιμοποιεί μόνο τρία καλώδια που αντιστοιχούν στα 3 ποδαράκια των ηλεκτροδίων.[Εικόνα 1] Όταν κατανοήσαμε τον τρόπο λειτουργίας των ηλεκτροδίων επίστρωσης επιχειρήσαμε να φτιάξουμε μία βάση από καλώδιο usb extension καθώς είχε τις ίδιες αποστάσεις μεταξύ των ηλεκτροδίων.

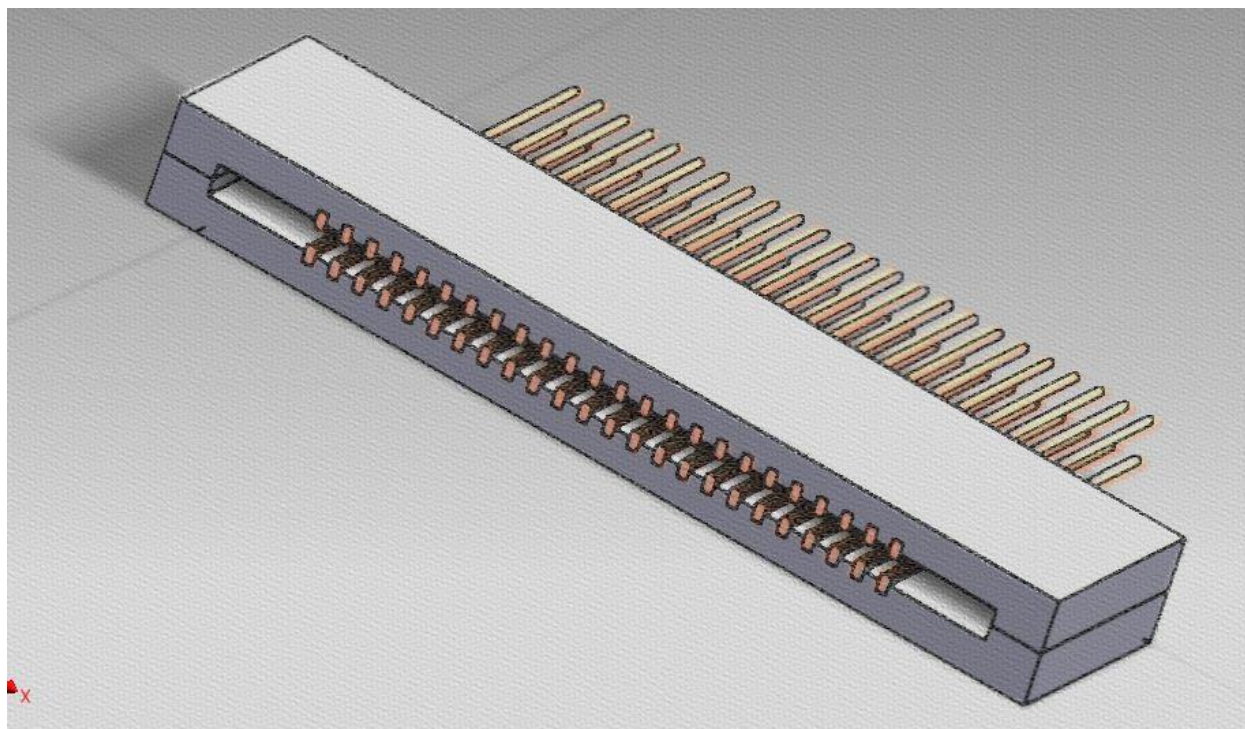


Εικόνα 151 Τομή RGB καλωδίου

Παρατηρήσαμε ότι παθητικά δεν μπορούσαμε να λάβουμε σήμα στο Arduino, κάτι που το αποδώσαμε στο ότι το σήμα χάνεται στις απώλειες μέσω των καλωδίων. Αντίθετα όταν ενισχύσαμε τα κύτταρα με δυναμικό παρατηρήσαμε σήμα στο Arduino και αλλαγές. Τελικά καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι πρέπει να βρούμε μία βάση που να ταιριάζει στα ηλεκτρόδια και την σχεδιάσαμε χρησιμοποιώντας το AutoCAD [Σχήμα 2].

Επειδή δεν υπήρχε μία τέτοια βάση στο εμπόριο, πήραμε μία παλιά βάση για τα παιχνίδια του Nintendo 64, της παιχνιδοκονσόλας του 1996 και την τροποποιήσαμε για τις δικές μας ανάγκες.

Το θετικό με αυτή την επιλογή ήταν ότι μπορούσαμε να διαβάσουμε από τα 2/3 των ηλεκτροδίων επίστρωσης, δηλαδή από το ηλεκτρόδιο εργασία και το ηλεκτρόδιο αναφοράς. Επίσης επειδή το βοηθητικό ηλεκτρόδιο έμπαινε στη βάση δεν το επηρέαζε ο περιβαλλοντικός θόρυβος. Το αρνητικό ήταν ότι λόγω διαφορετικών αποστάσεων της βάση με τα ηλεκτρόδια επίστρωσης, δεν μπορούσαμε πάρα να πάρουμε σήμα από ένα ηλεκτρόδιο επίστρωσης κάθε φορά. Τουλάχιστον έτσι μπορέσαμε να καλύψουμε τις ανάγκες μας για τα πειράματα, χωρίς κανένα πρόβλημα.



Σχήμα 7 Πρότυπο βάσης

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στο τελικό στάδιο αυτής της διπλωματικής εργασίας παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα για ανίχνευση ουσιών με την μέθοδο BERA. Για να γίνει δυνατή αυτή η πειραματική διαδικασία όλα τα αποτελέσματα πάρθηκαν στο εργαστήριο Μορφολογίας Φυτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών όπου γίνεται και η τροποποίηση των κυττάρων. Η ανίχνευση δείγματος έγινε με την προβλεπόμενη διαδικασία με τα νέα στοιχεία που προσθέσαμε εμείς στη διάγνωση να είναι προς μελέτη.

Το πρώτο πείραμα που πραγματοποιήσαμε, χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο BERA για να ανιχνεύσουμε στοιχεία καρβαμιδικών εντομοκτόνων στο δείγμα μας. Το επιθυμητό αποτέλεσμα είναι να μπορούμε με βάση τη χαρακτηριστική καμπύλη της τάσης εξόδου να παρατηρήσουμε σημαντική διαφορά μεταξύ του δείγματος Control και του μολυσμένου δείγματος με καρβαμικά εντομοκτόνα.

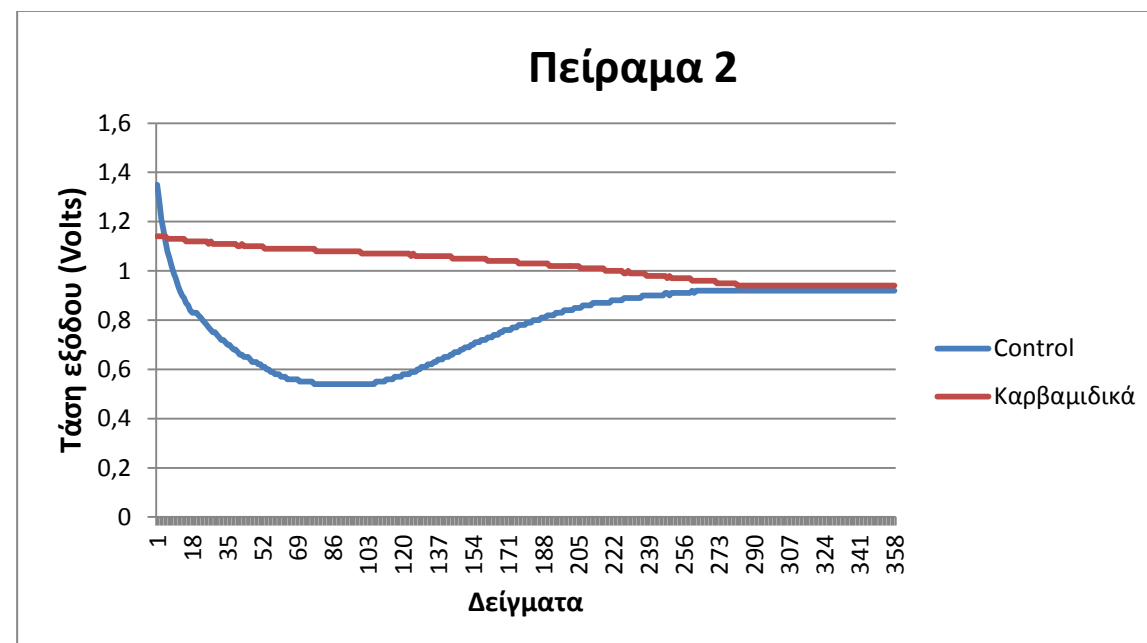
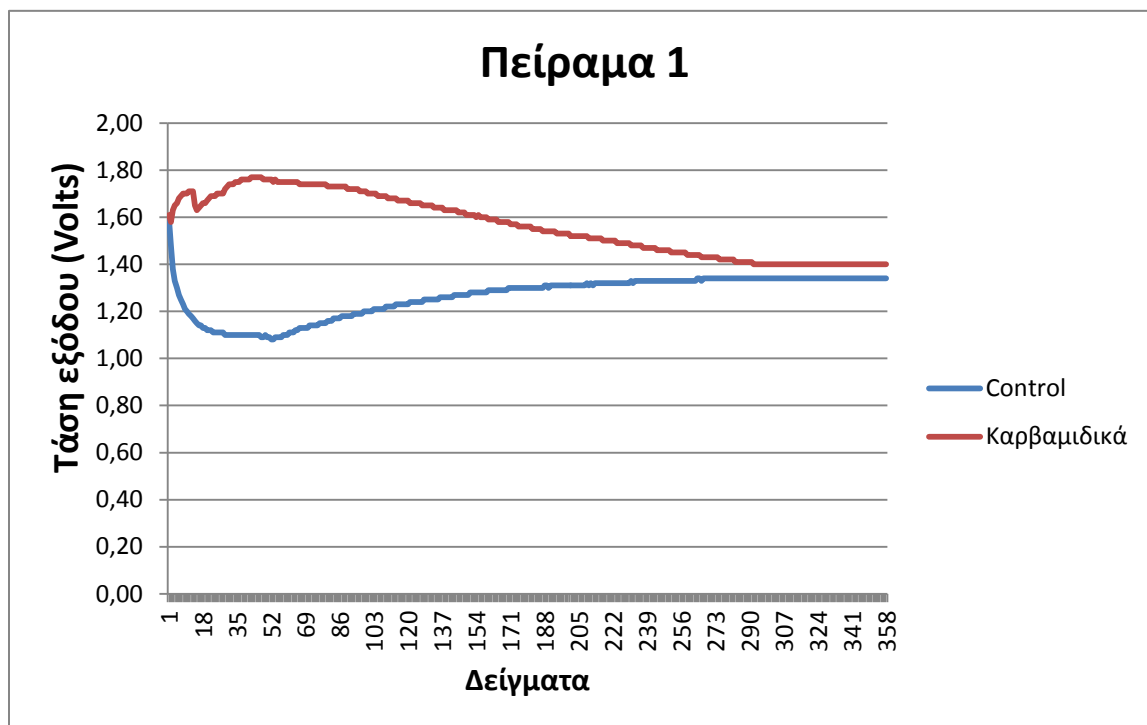
Μαζί με τον οργανικό ενισχυτή χρησιμοποιήσαμε μία αντίσταση $10\text{K}\Omega (R_G)$, με αποτέλεσμα η τάση εξόδου(Volt) να είναι πολλαπλασιασμένη(Gain) κατά 5.94 σύμφωνα με το παρακάτω τύπο που δίνεται στο εγχειρίδιο χρήσης του INA129.

INA129:

$$G = 1 + \frac{49.4\text{k}\Omega}{R_G}$$

Όλες οι μετρήσεις που παραθέτουμε παρακάτω έγιναν με την χρήση ηλεκτροδίων άνθρακα της Dropsens τα οποία ήταν διαθέσιμα.

Παρακάτω θα παραθέσουμε τις μετρήσεις και τα αποτελέσματα με τον απαραίτητο σχολιασμό μετά από κάθε πείραμα.

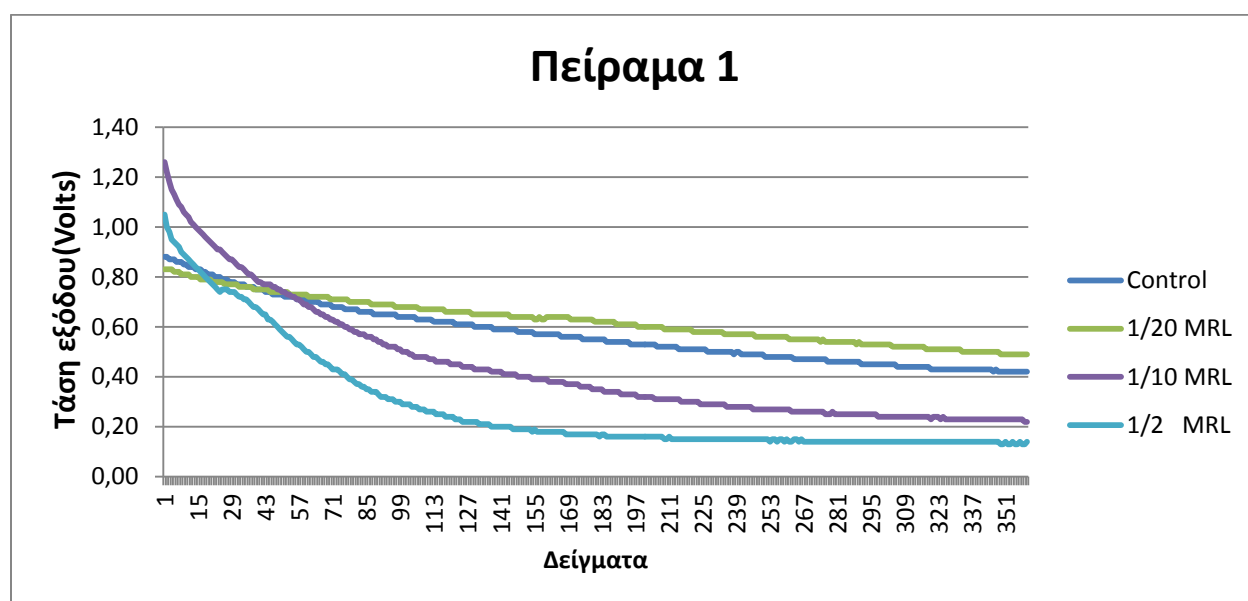


Παρατηρούμε ότι η τάση εξόδου στα δείγματα μας παρουσιάζει σημαντικές διαφορές, τέτοιες ώστε να μπορούμε να «ξεχωρίσουμε» την κάθε ουσία. Στα δύο πειράματα που πραγματοποιήσαμε ξεκινήσαμε την μέτρηση αμέσως όταν τοποθετήσαμε τα κύτταρα, με την προς ανίχνευση ουσία πάνω σε ένα καινούργιο SPE. Και στα δύο πειράματα το καθαρό δείγμα έχει πολύ διαφορετική καμπύλη δυναμικού σε σχέση με το μολυσμένο δείγμα. Είναι ξεκάθαρο από τις μετρήσεις μας ότι μπορούμε να ξεχωρίσουμε τα δείγματα μας και να χαρακτηρίσουμε την ανίχνευση επιτυχημένη.

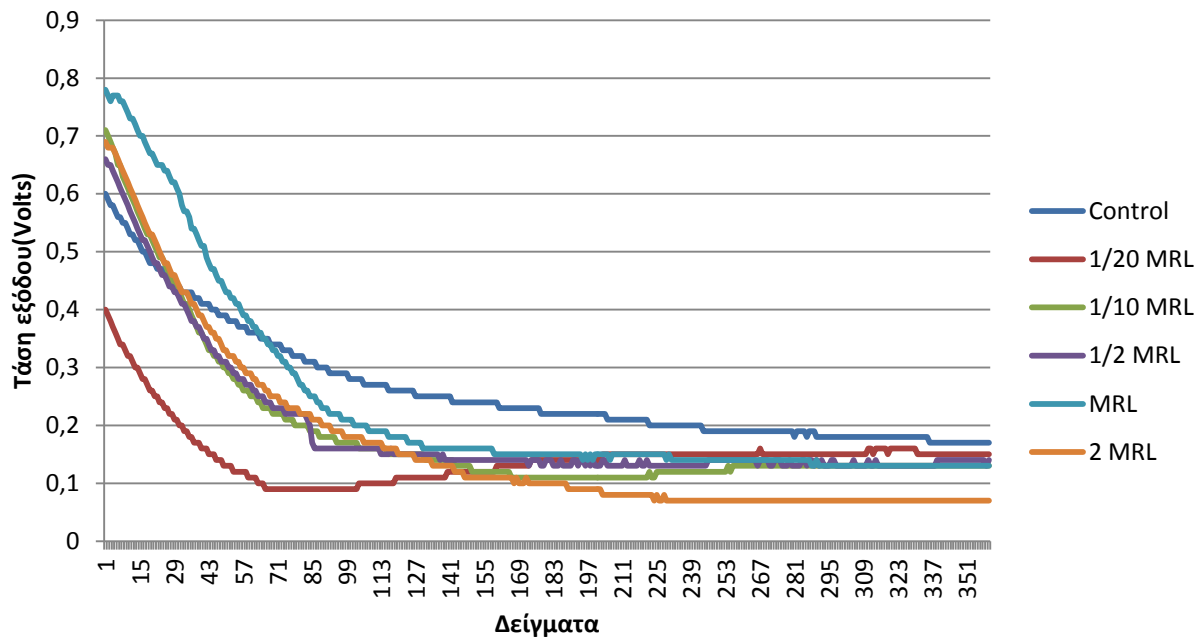
Οι καμπύλες των καρβαμιδικών είναι αρκετά διαφορετικές μεταξύ τους, κάτι το οποίο πιθανότατα να προκαλείτε με βάση τη συγκέντρωση της στοχευόμενης ουσίας. Δηλαδή το ποσοστό καρβαμιδικών στο πρώτο δείγμα είναι διαφορετικό από το δεύτερο. Με τα στοιχεία που έχουμε αυτή την στιγμή δεν μπορούμε να έχουμε περισσότερες πληροφορίες για τη συγκέντρωση των ουσιών, στο συγκεκριμένο πείραμα. Παρακάτω, στα πειράματα που ακολουθούν δοκιμάζουμε γνωστές συγκεντρώσεις και βλέπουμε τα αποτελέσματα της μεθόδου BERA. Το σημαντικότερο όμως στοιχείο είναι ότι μπορούμε με πολύ μεγάλη βεβαιότητα, με βάση τις εξαγόμενες καμπύλες δυναμικού να εντοπίσουμε την παρουσία καρβαμιδικών εντομοκτόνων. Σε αυτό το σημείο μπορούμε να θεωρήσουμε ότι πραγματοποιήσαμε το αρχικό στόχο της εργασίας μας, δηλαδή να πραγματοποιήσουμε με ακρίβεια μέτρηση διαφοράς δυναμικού για εντοπισμό ουσιών με την μέθοδο BERA. Στα επόμενα πειράματα προσπαθούμε παράλληλα με τον εντοπισμό των ουσιών να πάρουμε και στοιχεία για τη συγκέντρωση αυτών. Για την ανίχνευση χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα VERO τα οποία επεξεργάστηκαν με την μέθοδο BERA.

Η ανίχνευση οργανοφωσφορικών είναι ένα ακόμη δύσκολο πρόβλημα το οποίο στο δεύτερο μας πείραμα, προσπαθούμε να μελετήσουμε με τη χρήση της μεθόδου BERA. Ο στόχος μας είναι να μετρήσουμε αρχικά ένα «καθαρό» δείγμα, ενώ στη συνέχεια δοκιμάζουμε συγκεντρώσεις οργανοφωσφορικών μέχρι το επιτρεπόμενο όριο MRL. Μετά θα επιχειρήσουμε να ανιχνεύσουμε ένα δείγμα που περιέχει τη διπλάσια από το επιτρεπτό όριο των οργανοφωσφορικών, δηλαδή 2MRL.

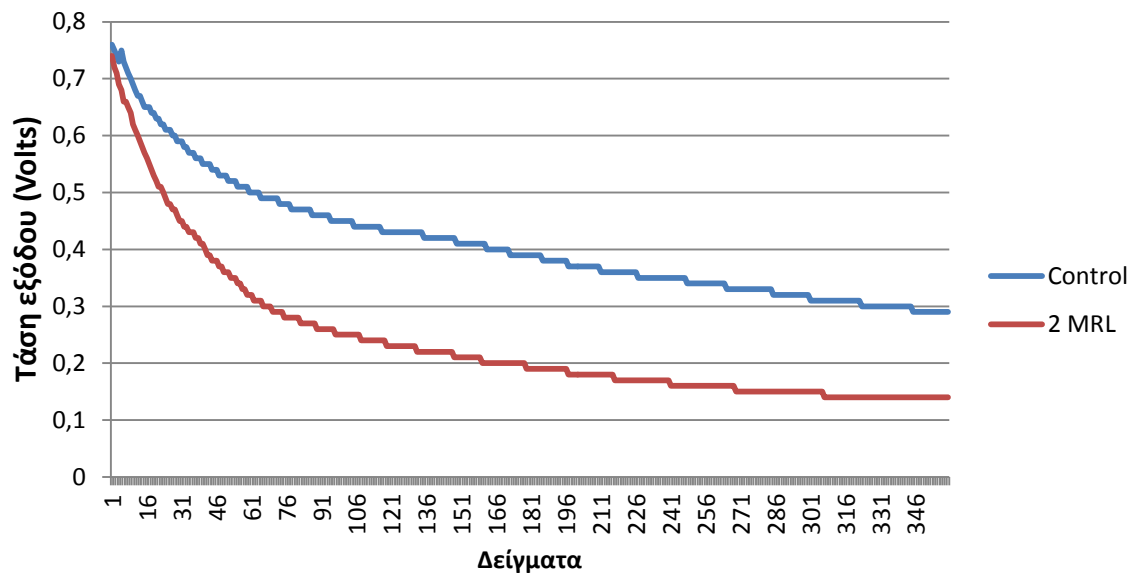
Για την ανίχνευση χρησιμοποιήσαμε κύτταρα N2A.



Πείραμα 2



Σύγκριση Μέσων όρων Control με 2 MRL



Με βάση τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις μπορούμε να πούμε ότι και σε αυτό το δυσκολότερο πείραμα, η συσκευή μας ανταποκρίθηκε πλήρως. Αρχικά στο πείραμα 1 παρατηρούμε τη διαφορά στις καμπύλες μεταξύ της «καθαρής» ουσίας αλλά και των ουσιών με συγκέντρωση οργανοφωσφορικών. Η καμπύλη με συγκέντρωση 1/20 είναι πολύ κοντά στην καμπύλη Control, που αποτελεί κάτι λογικό γιατί είναι πάρα πολύ μικρή συγκέντρωση. Στις επόμενες δύο καμπύλες παρατηρούμε όλο και μειωμένο δυναμικό εξόδου, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση οργανοφωσφορικών. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα μπορούμε ξεχωρίσουμε με ασφάλεια τις προς ανίχνευση ουσίες, καθώς ξεκάθαρα η περιεκτικότητα σε οργανοφωσφορικά των ουσιών καθορίζει τη μορφή των καμπυλών.

Στο πείραμα 2 προσπαθούμε να ανιχνεύσουμε μία ολόκληρη σειρά συγκεντρώσεων οργανοφωσφορικών. Τα αποτελέσματα μας σε αυτή την σειρά μετρήσεων είναι λίγο διαφορετικά αυτή τη φορά. Και πάλι το Control είναι η ουσία με την υψηλότερη τιμή, όμως υπάρχει μία διαφορετική καμπύλη στη συγκέντρωση 1/20 οργανοφωσφορικών, αν και καταλήγει και πάλι στη δεύτερη υψηλότερη τιμή. Οι επόμενες τρεις συγκεντρώσεις μοιάζουν αρκετά μεταξύ τους, παρόλα αυτά καμία δεν έχει τελική τιμή χαμηλότερη της ουσίας MRL, κάτι που μόνο ως θετικό μπορούμε να το λάβουμε καθώς η ουσία αυτή αποτελεί και το εμπορικό όριο παρουσίας φυτοφαρμάκων σε τρόφιμα. Ακολουθώντας παρατηρούμε ότι η ουσία με συγκέντρωση οργανοφωσφορικών 2 MRL, δηλαδή διπλάσια συγκέντρωση από το επιτρεπόμενο όριο, έχει μία πολύ διαφορετική καμπύλη της τάσης εξόδου. Η διαφορά αυτής της καμπύλης μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η συσκευή μας σε συνδυασμό με την μέθοδο BERA έχει πετύχει το στόχο της και σε αυτό το δυσκολότερο κομμάτι, της ανίχνευσης συγκεντρώσεων μέσω των καμπυλών.

Στο τρίτο γράφημα εμφανίζουμε τις καμπύλες που προέκυψαν μετά από επεξεργασία των μέσων όρων τριών μετρήσεων του Control αλλά και τριών μετρήσεων 2MRL. Ο λόγος που παρουσιάζουμε τους μέσους όρους μετά από τρεις μετρήσεις είναι για να επιβεβαιώσουμε και την λογική υπόθεση ότι όσες περισσότερες μετρήσεις πάρουμε από ένα δείγμα τόσο πιο αντιπροσωπευτική θα είναι και η καμπύλη που το χαρακτηρίζει. Το αποτέλεσμα μπορούμε να το χαρακτηρίσουμε ως πάρα πολύ καλό καθώς είναι ξεκάθαρη η διαφορά μεταξύ των δύο καμπυλών, δηλαδή της καθαρής αλλά και της μολυσμένης ουσίας. Η καμπύλη των 2 MRL φθίνει πολύ πιο γρήγορα από την αντίστοιχη καμπύλη του Control, με αποτέλεσμα να μπορούμε εύκολα να εντοπίσουμε την παρουσία οργανοφωσφορικών στα τρόφιμα μεγαλύτερων του επιτρεπόμενου ορίου.

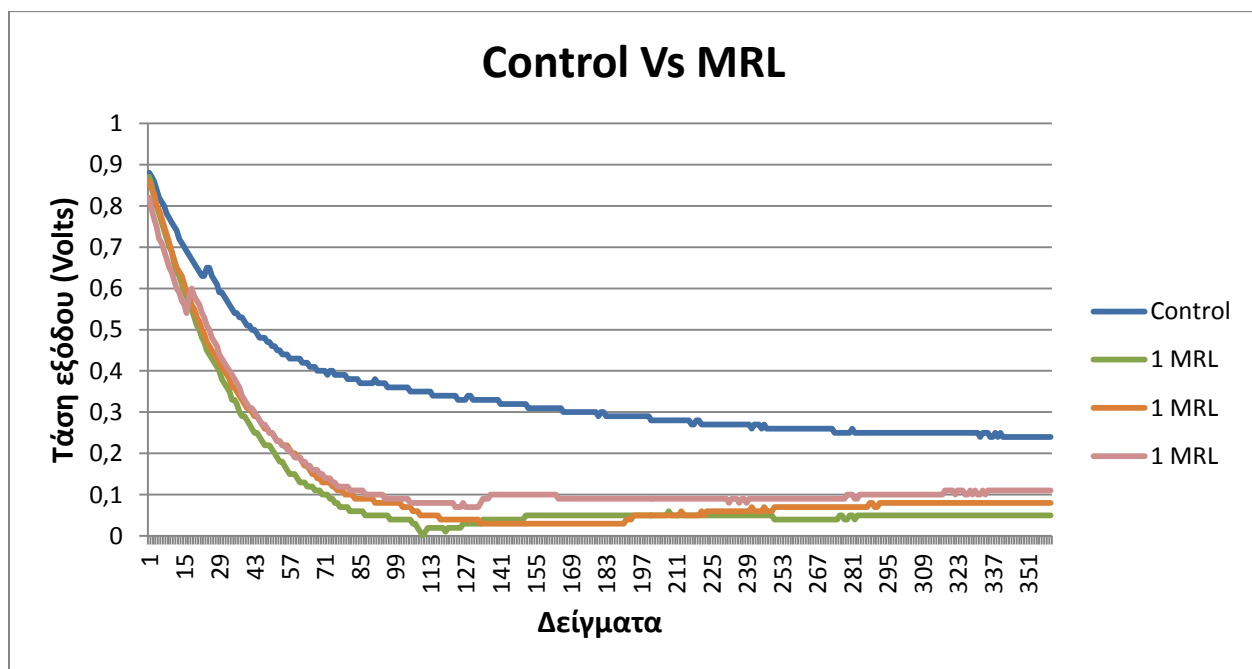
Η διαδικασία ελέγχου των δειγμάτων έγινε για κάθε δείγμα ξεχωριστά και τα αποτελέσματα αποθηκεύονταν στην SD card για να τα επεξεργαστούμε όποτε θέλαμε εμείς.

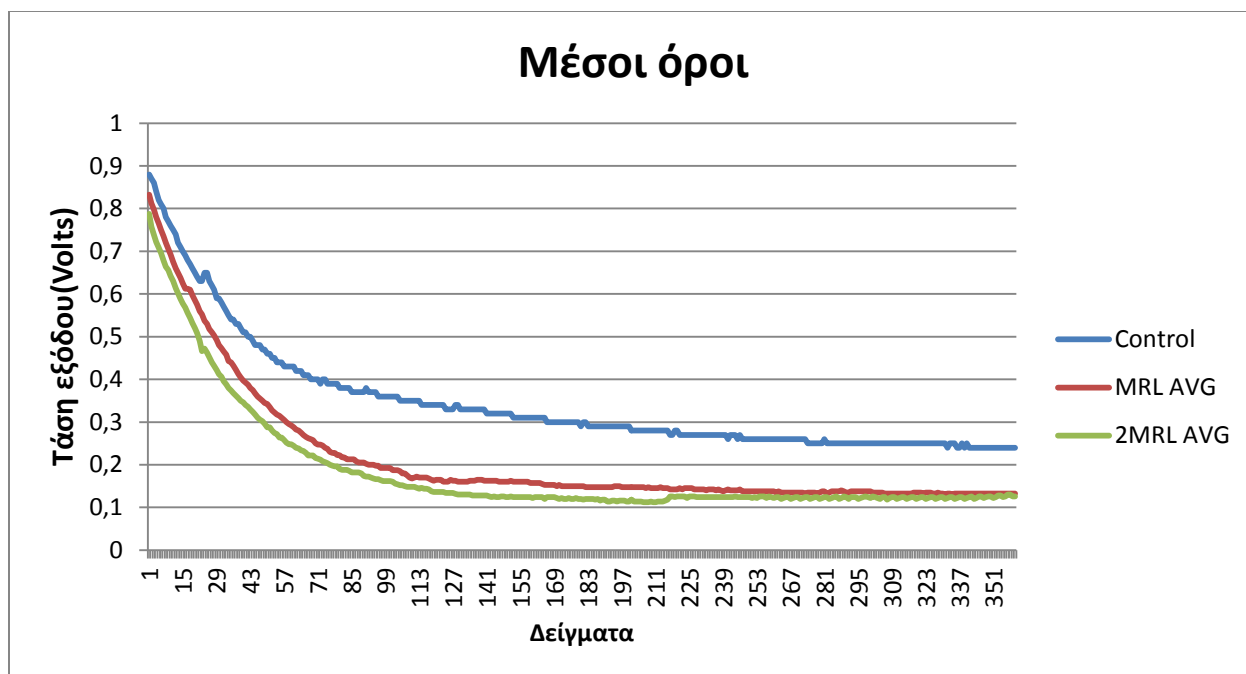
Το αποτέλεσμα μας στηρίζονται στη στατιστική επεξεργασία των καμπυλών μέσω των μορφών τους αλλά και μέσω των μέσων όρων των τάσεων εξόδου. Με μία καλύτερη και

εξειδικευμένη στατιστική επεξεργασία πιθανότατα να μπορέσουμε να παρατηρήσουμε στοιχεία τα οποία δεν είναι ορατά στον παρατηρητή.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΟΡΓΑΝΟΦΟΣΦΩΡΙΚΩΝ ΜΕ ΝΈΟ ΠΕΙΡΑΜΑ

Σε μία νέα σειρά μετρήσεων με ένα N2A κύτταρα, χρησιμοποιήσαμε τη συσκευή για ανίχνευση των σημαντικών ορίων οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων, δηλαδή το MRL αλλά και τα 2MRL.



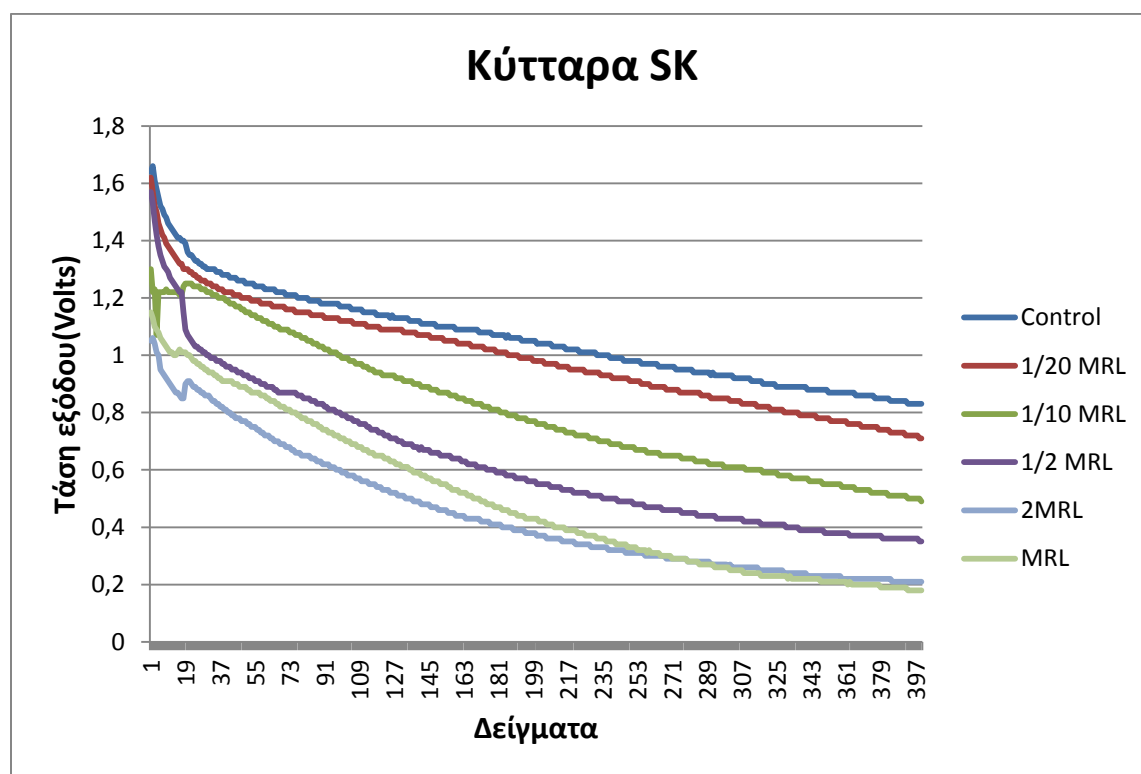


Παρατηρούμε ότι μετά τη μέτρηση Control όλες οι μετρήσεις για τη συγκέντρωση MRL, είναι πολύ καλές καθώς διαφέρουν από το Control αλλά και μοιάζουν μεταξύ τους. Αυτό σημαίνει ότι η συσκευή μας δίνει το σταθερό αποτέλεσμα που ήταν ένα από τα βασικά ζητούμενα μας.

Οι διαφορές μεταξύ των μετρήσεων, τόσο για το MRL όσο και γενικά μεταξύ ουσιών, είναι φυσιολογικές καθώς οφείλονται στις ιδιότητες των κυττάρων που χρησιμοποιούμε για ανίχνευση. Το βασικό ζητούμενο που θέλουμε να παρατηρήσουμε είναι ότι η συμπεριφορά της συσκευής μας απέναντι στα κύτταρα είναι σταθερή και εξαρτάται μόνο από το παραγόμενο δυναμικό των κυττάρων. Αυτό θέλουμε να δείξουμε εδώ και με τις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις.

Στο πείραμα 2 δείχνουμε το Control με τα δύο σημαντικά όρια, εμφανίζοντας τους μέσους όρους των καμπυλών. Στο γράφημα μπορούμε να δούμε τη διαφορά μεταξύ των δύο ουσιών και του Control ξεκάθαρα, παρόλα αυτά θα θέλαμε να παρατηρήσουμε και λίγο μεγαλύτερη διαφορά μεταξύ και του MRL και του 2MRL. Το θετικό είναι ότι όντως το 2MRL είναι κάτω από τη καμπύλη του MRL όχι όμως με τέτοια διαφορά που να μπορούμε να κρίνουμε με ασφάλεια. Για καλύτερη ανίχνευση με τέτοια περίπτωση καλό είναι να χρησιμοποιηθεί μία καλύτερη μέθοδος στατιστικής επεξεργασίας, που θα μας παρέχει και καλύτερο αποτέλεσμα.

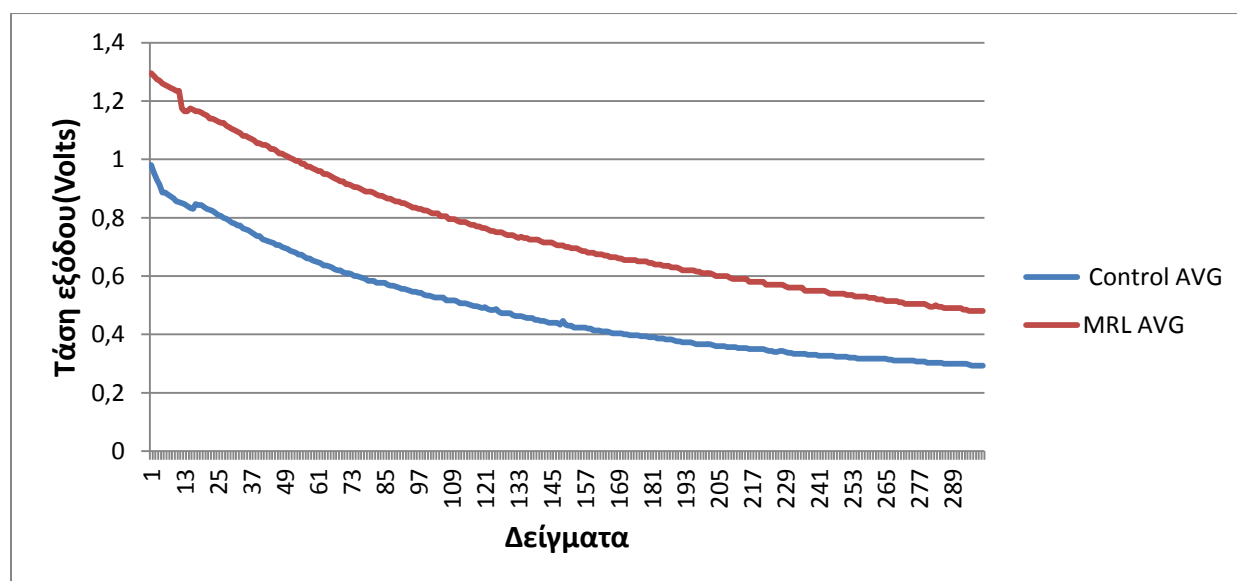
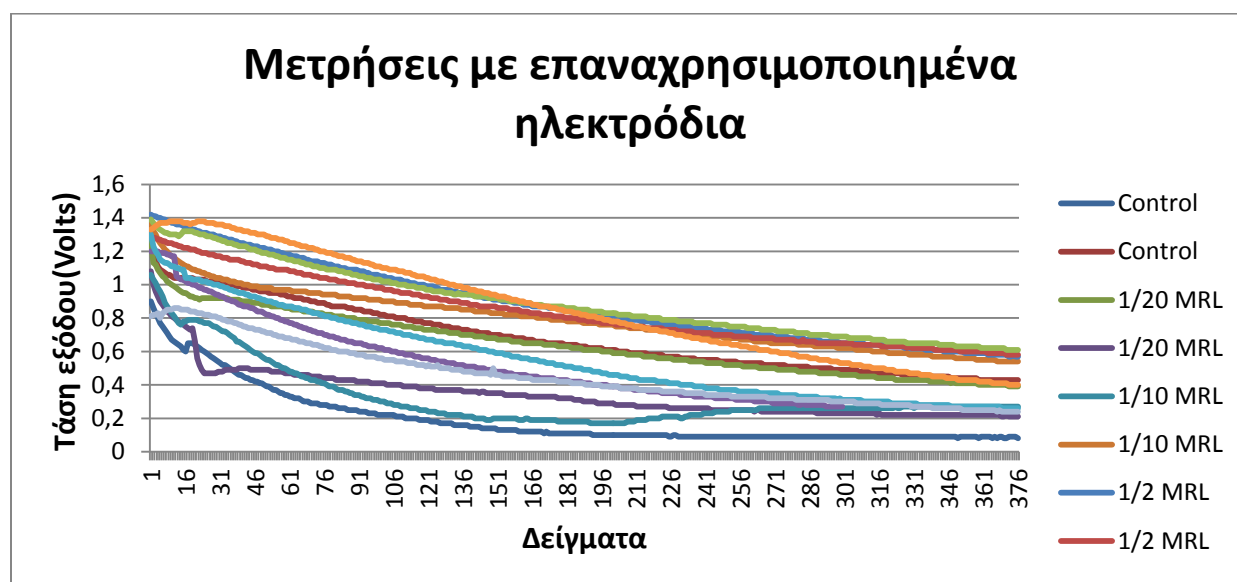
Για το επόμενο πείραμα μας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα SK τα οποία μόλις είχαν ετοιμαστεί στο εργαστήριο. Πρόκειται για πάρα πολύ σημαντική παράμετρο καθώς θα δούμε ότι τα αποτελέσματα μας για την ανίχνευσή της στοχευόμενης ουσίας είναι εξαιρετικά, κάνοντας την ανίχνευση εύκολη υπόθεση καθώς είναι εφικτό να «ξεχωρίσουμε» τις ουσίες από την πρώτη μέτρηση, άρα και να εξοικονομήσουμε χρήματα χρησιμοποιώντας λιγότερα ηλεκτρόδια.



Τα αποτελέσματα δείχνουν τη δυνατότητα της μεθόδου BERA να εντοπίζει με ακρίβεια συγκεντρώσεις καθώς όλες οι μετρήσεις είναι εξαιρετικές και ακριβώς όπως θα θέλαμε να είναι. Η κάθε συγκέντρωση έχει την δική της χαρακτηριστική και όλες εμφανίζονται στο γράφημα μας με στοιχεία που μαρτυράνε την σύστασή τους. Είναι ξεκάθαρο πλέον ότι όσο πολύ ψηλή είναι η παρουσία οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων τόσο μικρότερο είναι και το δυναμικό που ανιχνεύουμε στην τάση εξόδου.

Η συσκευή μας, μετράει όπως επιθυμούσαμε κάτι που δικαιώνει το σχεδιασμό μας.

Όπως φαίνεται στα παραπάνω πειράματα η ανίχνευση με νέα ηλεκτρόδια είναι δυνατή και εφικτή, κάτι που μας δίνει την δυνατότητα να προχωρήσουμε στα επόμενα στάδια των πειραμάτων μας. Ένα από τα πράγματα τα οποία οι παρούσες συσκευές μετρήσεις με τα ηλεκτρόδια τύπου SPE δεν μπορούν να εγγυηθούν είναι οι μετρήσεις με επαναχρησιμοποιημένα ηλεκτρόδια. Σε αυτό το σημείο προσπαθήσαμε να μετρήσουμε με τα κύτταρα που είχαμε τα καλύτερα αποτελέσματα, τα SK, πάνω σε επαναχρησιμοποιημένα ηλεκτρόδια άνθρακα.

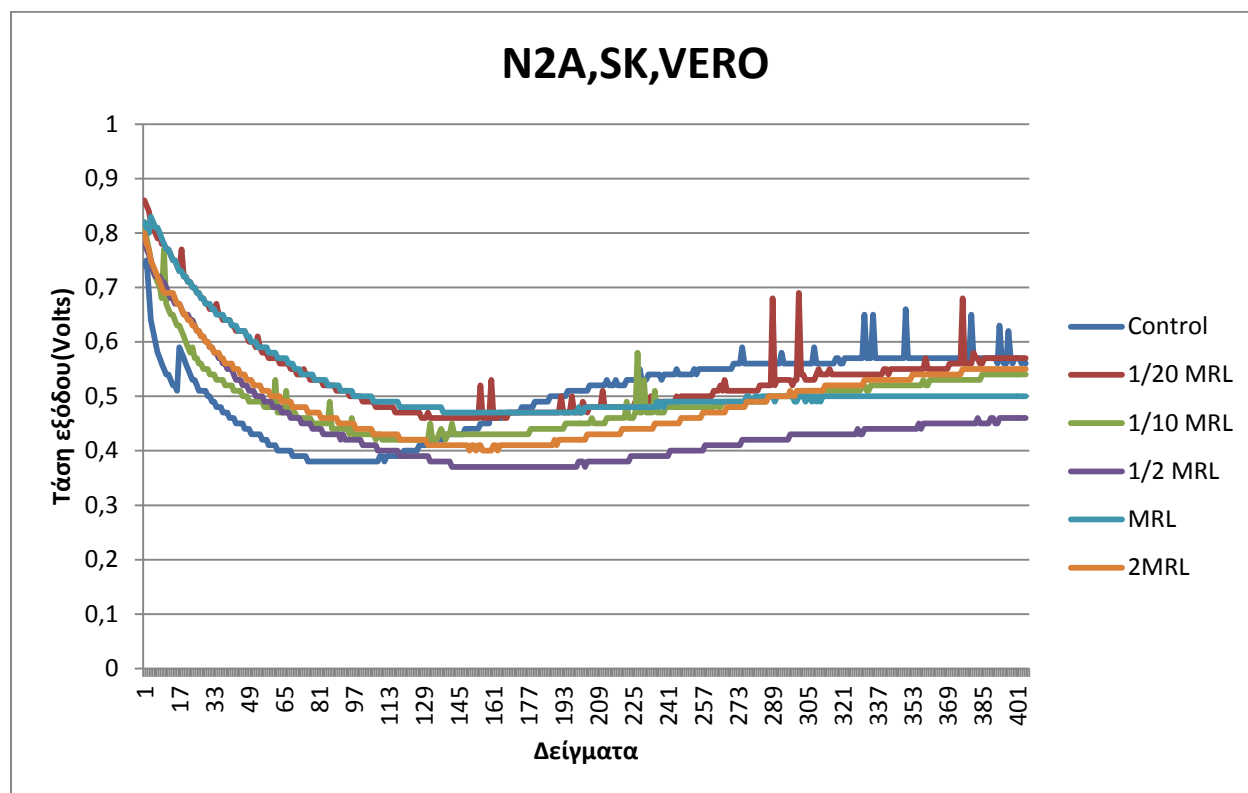


Τα αποτελέσματα των μετρήσεων δείχνουν ξεκάθαρα ότι οι μετρήσεις μεταξύ χρησιμοποιημένων και αχρησιμοποίητων ηλεκτροδίων διαφέρουν κατά πολύ. Είναι ξεκάθαρα ότι οι χημικές αντιδράσεις που έχουν γίνει στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου επηρεάζουν και το αποτέλεσμα της τάσης εξόδου ανεξάρτητα με το τι ουσίες έχουμε εισάγει. Αυτό φαίνεται ξεκάθαρα καθώς στο πιο πάνω γράφημα μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι την χαμηλότερη καμπύλη την εμφανίζει το Control, ενώ γενικότερα οι μετρήσεις δεν έχουν μία σταθερή διαβάθμιση όπως εμφάνιζαν στις μετρήσεις με νέα ηλεκτρόδια.

Στο δεύτερο γράφημα παρατηρούμε τους μέσους όρους του Control και του MRL, με τα αποτελέσματα να είναι ακριβώς αντίθετα με τα αναμενόμενα. Αυτό αποτελεί μία ακόμη απόδειξη για το ότι τα επαναχρησιμοποιημένα ηλεκτρόδια δεν μπορούν να μας δώσουν αξιόπιστη ανίχνευση με τη μέθοδο BERA.

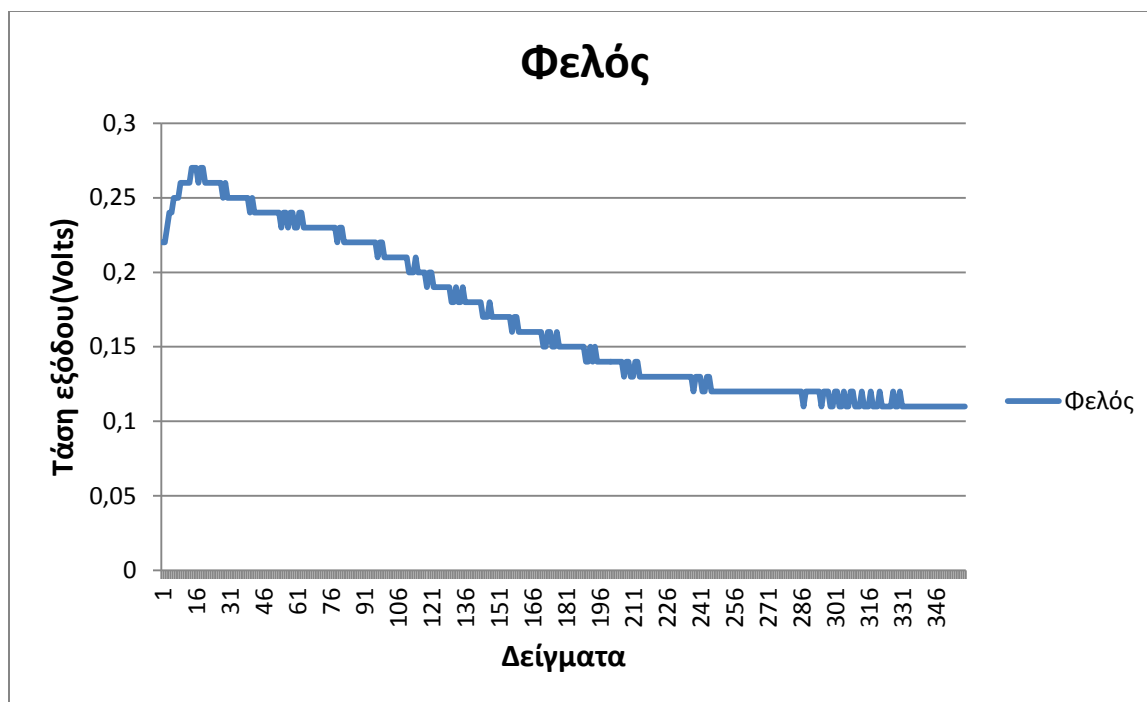
Το θετικό στοιχείο είναι πως μπορούμε να ανιχνεύσουμε σήμα και από επαναχρησιμοποιημένα ηλεκτρόδια κάτι που κάνει τη συσκευή μας εξαιρετικά αποδοτική. Μια ακόμη παρατήρηση που έχει να κάνει με τα επαναχρησιμοποιημένα ηλεκτρόδια έχει να κάνει με το γεγονός ότι το παραγόμενο δυναμικό κατά την επαναχρησιμοποίηση τους επηρεάζεται από την προηγούμενη ουσία που είχαμε τοποθετήσει. Θεωρούμε λοιπόν ότι όποια πειράματα γίνουν μελλοντικά για την επαναχρησιμοποίηση των ηλεκτροδίων πρέπει να λάβουν υπόψη αυτή τη παράμετρο. Κάτι τέτοιο δικαιολογείται και από τα κατασκευαστικά στοιχεία των SPE καθώς το σήμα που λαμβάνουμε στην έξοδο επηρεάζεται από τις αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρο στην επιφάνεια.

Στο τελευταίο στάδιο των πειραμάτων μας επιλέξαμε να δοκιμάσουμε ένα νέο μείγμα κυττάρων ανίχνευσης, που αποτελείτε από N2A,SK και HAC. Προχωρήσαμε σε αυτές τις δοκιμές για να παρατηρήσουμε την συμπεριφορά της συσκευής μας σε ένα μη δοκιμασμένο τύπο κυττάρων.



Σε αυτό το τύπο των κυττάρων δεν υπάρχουν καταγεγραμμένα αποτελέσματα από άλλες συσκευές, έτσι δεν γνωρίζουμε εάν αυτός ο τύπος των κυττάρων μπορεί να φέρει αποτελέσματα παρόμοια με τα άλλα κύτταρα. Αυτό που θέλαμε να επιτύχουμε με την μέτρηση ουσιών με αυτά τα κύτταρα είναι να δείξουμε ότι η συσκευή μας μπορεί να πάρει μετρήσεις από οποιοδήποτε κύτταρο χωρίς να χρειαστεί να γίνεται κάποια ιδιαίτερη διαδικασία. Η συσκευή μας είναι πολύ σημαντικό να είναι ευσταθής και να μην χρειάζονται χρονοβόρες διαδικασίες για να πάρουμε μετρήσεις από ένα νέο τύπο κυττάρων.

Σύμφωνα με το παραπάνω γράφημα μπορούμε πάρουμε μετρήσεις από ένα νέο τύπο κυττάρων, κάτι που αποδεικνύει την ευστάθεια της συσκευής. Λόγω του ότι η μέθοδος BERA χρειάζεται τροποποίηση διαφορετικών κυττάρων για κάθε διαφορετική ουσία που θα ανιχνεύσει είναι απαραίτητη προϋπόθεση η ευστάθεια ή έστω η εύκολη τροποποίηση.



Η τελευταία σειρά μετρήσεων που προσπαθήσαμε να πάρουμε, ήταν από δείγματα φελλού χωρίς εκχύλιση, ένα φιλόδοξο εγχείρημα για ακόμη ευκολότερη ανίχνευση άμεσα από το δείγμα. Το σήμα το οποίο λαμβάναμε ήταν πολύ πιο ασθενές έτσι αλλάξαμε την ενίσχυση του INA129 με αντίσταση 5KΩ, άρα $\text{Gain} = 10.88$. Παρατηρήσαμε ότι με μία πολύ αλλαγή πήραμε μετρήσεις ακόμη και από ένα δείγμα που μόλις τώρα δοκιμάζεται.

Σε αυτό το στάδιο η ανίχνευση απευθείας από το φελλό δεν είναι δοκιμασμένη, άρα δεν μπορούμε γνωρίζουμε αν τα αποτελέσματα που πήραμε είναι ορθά. Αυτό όμως που μπορούμε να πούμε είναι ότι η ανίχνευση με την συσκευή μας είναι δυνατή ακόμη και για νέες και μη δοκιμασμένες ουσίες.

ΠΡΟΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΣΥΣΚΕΥΗΣ

Παραθέτω τον προϋπολογισμό της συσκευής μας. Στόχος μας ήταν από την αρχή να περιορίσουμε το κόστος και να πάρουμε αξιόπιστα αποξέσματα. Ας δούμε τώρα το συνολικό κόστος όλων των εξαρτημάτων, που χρησιμοποιήσαμε στην τελική φάση των πειραμάτων μας.

- | | |
|---|--------|
| 1. Arduino Mega 2560 | ->20€ |
| 2. Arduino SD Shield | ->18€ |
| 3. INA 129 instrumentation amplifier | ->4€ |
| 4. Cable ties, Πυκνωτές και αντιστάσεις | ->1€ |
| 5. Μπαταρίες 9V | ->5€ |
| 6. Βάση ηλεκτροδίου | ->1,5€ |

Σύνολο->49,5€

Όλα τα υλικά βρίσκονται εύκολα στο εμπόριο και σε μαζική παραγωγή θα έχουμε την δυνατότητα να τα πάρουμε σε χαμηλότερες τιμές. Συγκεκριμένα με ένα δικής μας παραγωγή κύκλωμα μπορούμε να είμαστε αισιόδοξη για μία τιμή κάτω από 20 €.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ένα από τα βασικότερα στοιχεία ενός επιτυχημένου τελικού αποτελέσματος είναι να ικανοποιήσουμε όλα τα ζητούμενα του προβλήματος μας. Τα παραθέτω σε σειρά παρακάτω, δίπλα από την λύση την οποία προτείνεται μέσω αυτού του κειμένου.

- Χαμηλό κόστος

Το κόστος των προηγούμενων συσκευών ήταν πολύ μεγαλύτερο από το κόστος της προτεινόμενης συσκευής ανίχνευσής. Επίσης μέσω της παρούσας διπλωματικής προτείνονται στοιχεία και επιλογές για μαζική παραγωγή που θα ρίξει ακόμη περισσότερο το κόστος ανά συσκευή. Ο κυριότερος λόγος που συμβαίνει αυτό είναι γιατί όλα τα εξαρτήματα τα οποία επιλέξαμε για να χρησιμοποιήσουμε στο κύκλωμα μας έχουν αρκετά χαμηλότερες τιμές. Επίσης όλες οι επιλογές των εξαρτημάτων έγιναν και με λογική της καλύτερης επιλογής μέσω της καλύτερης επίδοσης αλλά και τιμής. Πολλά από τα εξαρτήματα που χρησιμοποιήσαμε είναι από παλαιότερες ηλεκτρικές συσκευές, όπως τις βάσεις για την τοποθέτηση των ηλεκτροδίων που την μετατρέψαμε στις δικές μας ανάγκες, ενώ η αρχική της χρήση ήταν η τοποθέτηση ηλεκτρονικής κασέτας τύπου Nintendo 64.

- Σωστές μετρήσεις

Όπως παρατηρούμε και από τις μετρήσεις και στα αποτελέσματα, γίνεται η πρόταση για ενίσχυση του σήματος μέσω εξαιρετικής ποιότητας ενισχυτών όπως περιγράφουμε στο αντίστοιχο κεφάλαιο. Είναι η πρώτη φορά που προτείνεται σε μία γενιά αισθητήρων BERA ενίσχυση του σήματος και ότι αυτή η τεχνική αποδίδει, είναι κάτι πολύ ενθαρρυντικό για το μέλλον αλλά και την προσέγγιση του προβλήματος μέτρηση τιμών διαφοράς δυναμικού με οποιοδήποτε ποτενσιόμετρο αισθητήρα. Το ακριβές μέγεθος της ενίσχυσης του σήματος του αισθητήρα, μπορεί να πειραχθεί από την τιμή της αντίστασης, δίνοντας μας τη δυνατότητα ευκολότερης προσαρμογής σε πολλές ουσίες, που δεν θα μπορούσαμε να εντοπίσουμε χωρίς ενίσχυση. Επίσης από τη στιγμή που γνωρίζουμε το ακριβές μέγεθος της ενίσχυσης μπορούμε με μία απλή διαίρεση να βρούμε και το πραγματικό σήμα που εκπέμπουν τα κύτταρα.

- Εύκολη επεξεργασία

Η χρήση της πλατφόρμας του Arduino μας παρέχει την απαραίτητη ευκολία και ευελιξία στην επεξεργασία των μετρήσεων. Επίσης ο σχεδιασμός έγινε για την αποθήκευση των μετρήσεων σε ένα txt το οποίο μπορεί να τροφοδοτήσει το Νευρωνικό δίκτυο. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων μπορούν να προβάλλονται είτε μέσω της LCD οθόνης είτε μέσω του ηλεκτρονικού υπολογιστή και της κονσόλας του Arduino. Όπως αναφέραμε ο στόχος είναι η λειτουργία μίας συσκευής που να μην απασχολεί το χρήστη με την οποιαδήποτε επεξεργασία αλλά να

απλοποιεί τη διαδικασία για την ανίχνευση των ουσιών. Μέσω αυτής της μελέτης παρουσιάζονται βελτιώσεις στο σύστημα. Η επιλογή της πλατφόρμας Arduino για την επεξεργασία των μετρήσεων έγινε με την προϋποθέσει αυτή να μπορεί να ικανοποιήσει τις όποιες επιπρόσθετες ρυθμίσεις γίνουν για ευκολότερη επεξεργασία. Τα προγράμματα που υποστηρίζουν την πλατφόρμα του Arduino μας δίνουν την δυνατότητα να κατασκευάσουμε ένα πρόγραμμα με γραφική διεπαφή χρήστη για να παρουσιάζονται φιλικά προς τον απλό χρήστη τα αποτελέσματα της μεθόδου.

- Φορητότητα

Τα αποτελέσματα εκτός από την εμφάνιση τους μέσω υπολογιστή αποθηκεύονται σε μία micro SD κάρτα, κάτι το οποίο μας δίνει την δυνατότητα για χρήση της συσκευής και εκτός εργαστηρίου. Το μέγεθος της κάρτας είναι αρκετά μεγάλο για να αποθηκεύσει όσες μετρήσεις θέλουμε. Ακόμη η επιλογή για χρήση των SPE ως ηλεκτροδίων μέτρησης μας δίνει την δυνατότητα να αλλάζουμε με ευκολία τα ηλεκτρόδια μέτρησης, οπουδήποτε και αν βρισκόμαστε. Το μικρό μέγεθος της συσκευής την κάνει εύκολη στην μεταφορά της αλλά και η λειτουργία είτε με μπαταρία, είτε με USB μέσω υπολογιστή, είτε μέσω τροφοδοτικού μας δίνει την δυνατότητα ευελιξίας για την χρήση της.

- Μελλοντική ανάπτυξη

Με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα αλλά και την βιβλιογραφία μπορούμε να πούμε ασφάλεια ότι η μέθοδος BERA μπορεί να πραγματοποιήσει εύκολα και αξιόπιστα ανίχνευση ουσιών, σε προβλήματα που μέχρι σήμερα αντιμετωπίζονται με χρονοβόρες διαδικασίες και με πολύ μεγαλύτερο κόστος. Όλα τα εξαρτήματα και οι διαδικασίες επιλέχθηκαν για να μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε επόμενες εκδόσεις της συσκευής, αλλά και ο σχεδιασμός αυτής έγινε με βάση την εύκολη περαιτέρω ανάπτυξη. Επιχειρήσαμε μέσω αυτή της διπλωματικής εργασίας να θέσουμε την βάση για μία συσκευή που να πραγματοποιεί με την καλύτερη δυνατή ασφάλεια και ευκολία μέτρηση διαφοράς δυναμικού μέσω των SPE. Θέλαμε η μελλοντική ανάπτυξη να έχει να κάνει με την ευκολότερη επεξεργασία των μετρήσεων αλλά και την καλύτερη παρουσίαση τους. Η θύρα Ethernet στο Arduino επιλέχτηκε ακριβώς για αυτό το λόγο, όπως και για την δυνατότητα που μας δίνεται για εύκολη επεξεργασία του κώδικα της πλατφόρμας, αλλά και των δεδομένων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Biosensors based on screen-printing technology and their application in environmental and food analysis (2007), Madalina Tudorache, Camelia Bala.
2. Ηλεκτροχημικοί Αισθητήρες & Βιοαισθητήρες, Μάμαντος Προδρομίδης
3. Kintzios, S., Pistola, E., Konstas, J., Matakias, T., Alexandropoulos, N., Bem F., Biselis, J., Levin, R. 2001b. Application of the Bioelectric recognition assay (BERA) on the detection of human and plant viruses. *Biosensors and Bioelectronics* 16, 467-480.
4. BERA Kyoto
5. Hölzel and Lamprecht 1994
6. Kintzios 2006
7. Gilchrist et al. 2001, Stenger et al. 2001
8. Biosensors based on screen printing technology and their application in environmental and food analysis
9. Rantala TS, Pirttiaho L, Lantto V (1993) *Sens Actuators B* 15/ 16:323–327
10. Bilitewski U, Chemnitius GC, Ruger P, Schmid RD (1992) *Sens Actuators B* 7:351–355
11. Hart JP, Hartley IC (1994) *Analyst* 119:259–263
12. Weetall HH, Hotelling T (1987/88) *Biosensors* 3:57–63
13. Wring SA, Hart JP (1992) *Analyst* 117:1281–1286
14. Prodromidis MI, Karayannis MI (2002) *Electroanalysis* 14:241–261
15. Bilitewski U, Jager A, Ruger P, Weise W (1993) *Sens Actuators B* 15/16:113–118
16. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 7 **(2012)** 4702 – 4715
17. Screen Printed Electrodes with improved mass transfer
18. S. Kintzios et al. / *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2006) 1365–1373
19. Διπλωματική Γεωργίας Μοσχοπούλου
20. Biocompatible carbon-based spe for the electrochemical detection of nitric oxide(S. Miserere et al. *Electrochemistry Communication* (2006))
21. Moschopoulos Kintzios 2006, Moschopoulou et al 2008

INTERNET LINKS

- A. <http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A8%CE%B7%CF%86%CE%B9%CE%B1%CE%BA%CF%8C%CF%83%CE%AE%CE%BC%CE%B1>
- B. http://users.teiath.gr/patsisg/DIGITAL_LABS/index_files/Page1550.htm
- C. <http://el.wikipedia.org/wiki/Arduino>
- D. <http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9D%CE%B5%CF%85%CF%81%CF%89%CE%BD%CE%B9%CE%BA%CF%8C%CE%B4%CE%AF%CE%BA%CF%84%CF%85%CE%BF>

BIBΛΙΑ

- Ηλεκτροχημικοί Αισθητήρες & Βιοαισθητήρες , Μάμαντος Προδρομίδης
- Ηλεκτρικές μετρήσεις και αισθητήρες Καλαιτζάκης, Κουτρούλης

MULTIPLEXER

```
int r0 = 0; //value of select pin at the 4051 (s0)
int r1 = 0; //value of select pin at the 4051 (s1)
int r2 = 0; //value of select pin at the 4051 (s2)
int count = 0; //which γ pin we are selecting

void setup()
{
  Serial.begin(9600); //serial read

  pinMode(2, OUTPUT); // s0
  pinMode(3, OUTPUT); // s1
  pinMode(4, OUTPUT); // s2
}

void loop ()
{
  Serial.println(".....");
  Serial.println("");
  Serial.println("");
  for (count=0; count<=7; count++) {

    // select the bit
    r0 = bitRead(count,0); // use this with arduino 0013 (and newer versions)
    r1 = bitRead(count,1); // use this with arduino 0013 (and newer versions)
    r2 = bitRead(count,2); // use this with arduino 0013 (and newer versions)
    //r0 = count & 0x01; // old version of setting the bits
    //r1 = (count>>1) & 0x01; // old version of setting the bits
    //r2 = (count>>2) & 0x01; // old version of setting the bits
    digitalWrite(2, r0);
    digitalWrite(3, r1);
    digitalWrite(4, r2);
    //Either read or write the multiplexed pin here
    int z=analogRead(2);
    Serial.print("r0");
    Serial.print(",");
    Serial.print("r1");
    Serial.print(",");
    Serial.println("r2");
    Serial.print(r0);
    Serial.print(",");
    Serial.print(r1);
    Serial.print(",");
    Serial.println(r2);
    Serial.println(z);
    delay(500);
  }
}
```

DATALOGGER

```
//TZ_adjust=-8; echo T$(($(date +%s)+60*60*$TZ_adjust)) > /dev/tty.usbserial-A8008pym

#include <SD.h>
#include <Time.h>
#include <EEPROM.h>

/* Include the serial library for communicating with the COM port */
#include <SPI.h>

/* Include the standard Ethernet library */
#include <Ethernet.h>

#define TIME_MSG_LEN 11 // time sync to PC is HEADER followed by Unix time_t as ten ASCII digits
#define TIME_HEADER 'T' // Header tag for serial time sync message
#define TIME_REQUEST 7 // ASCII bell character requests a time sync message

// On the Ethernet Shield, CS is pin 4. Note that even if it's not
// used as the CS pin, the hardware CS pin (10 on most Arduino boards,
// 53 on the Mega) must be left as an output or the SD library
// functions will not work.
const int chipSelect = 4; // for using with mega
int led = 13;

// Variables of the system
int refrate=475; //the refresh rate will give the time the a measurement will take;
int samplesperSec=2;
int Running_min=4; //posa lepta na trexei
int runt=0; //running time kathorizetai edw os 0 kai metavalete me vasi ta lepta apo pio panw
float gain=1.89;
int error=0;

File dataFile ;
char filename[20] ;

int k=0; //

float change;
float decim2,decim3,decim4;
float divVolt=204.6;

/* MAC address of the Ethernet shield. If you are using this on your
own network, then the MAC address below will be fine, but remember if
you use more than one shield on your network they will need to be assigned
unique MAC addresses */
byte mac[] = {
```

```

    0xDE, 0xAD, 0xBE, 0xEF, 0xFE, 0xED };

/* The IP address of the shield. Make sure this matches the IP
address range of your network and is not in use by any other
device on it */
IPAddress ip(192, 168, 2, 55 );

/* The port number the shield will respond to. Use port 80
for standard HTTP requests */
EthernetServer server(80);


void setup()
{
    /* Start the Ethernet interface */
    Ethernet.begin(mac, ip);
    server.begin();

    // Open serial communications and wait for port to open:
    Serial.begin(9600);
    Serial.print("Initializing SD card...");
    // make sure that the default chip select pin is set to
    // output, even if you don't use it:
    pinMode(4, OUTPUT);
    pinMode(led, OUTPUT);
    // see if the card is present and can be initialized:
    if (!SD.begin(chipSelect)) {
        Serial.println("Card failed, or not present");
        error=1;
        // don't do anything more:
        return;
    }
    Serial.println("card initialized.");

    sprintf(filename, "test_%02d.txt", k);
    Serial.println(filename);
    dataFile = SD.open(filename, FILE_WRITE);

    // if the file is available, write to it:
    if (dataFile) {

        dataFile.println(".....NEW MEASUREMENT....."); //Just a
        leading blank line, incase there was previous data
        dataFile.println(", , ,"); //Just a leading blank line, incase there was previous data
        String header = "white, green, result ";
        dataFile.println(header);
        dataFile.close();
    }
}

```

```

    Serial.println(header);

}
// if the file isn't open, pop up an error:
else {
    Serial.println("error opening txt");
    Serial.println("Enter SD card and then press the Reset button");
}

}

void digitalClockDisplay()
{
    // digital clock display of the time
    Serial.print(hour());
    printDigits(minute());
    printDigits(second());

    /*Serial.print(" ");
    Serial.print(day());
    Serial.print(" ");
    Serial.print(month());
    Serial.print(" ");
    Serial.print(year());
    */
    Serial.println();
}

void printDigits(int digits){
    // utility function for digital clock display: prints preceding colon and leading 0
    Serial.print(":");
    if(digits < 10)
        Serial.print('0');
    Serial.print(digits);
}

void processSyncMessage() {
    // if time sync available from serial port, update time and return true
    while(Serial.available() >= TIME_MSG_LEN){ // time message consists of header & 10 ASCII digits
        char c = Serial.read();
        Serial.print(c);
        if( c == TIME_HEADER ) {
            time_t pctime = 0;
            for(int i=0; i < TIME_MSG_LEN -1; i++){
                c = Serial.read();
                if( c >= '0' && c <= '9'){
                    pctime = (10 * pctime) + (c - '0') ; // convert digits to a number
                }
            }
        }
        setTime(pctime); // Sync Arduino clock to the time received on the serial port NOT WORKING
    }
}

```

```

    Serial.println("PC time ");
    Serial.print(pctime);
  }
}
}

void ethernet_page()
{

  /***** ETHERNET PAGE CODE *****/START*****/

  /* All client requests are terminated with a blank line. This flag will
  signify if the current line received from this client is a blank line */
  boolean bBlankLineFlag = true;

  /* Used to hold the current byte received from the client */
  char cCurrentByte;

  /* Used to hold the current byte read from the test.txt file located on the SD card */
  char cCurrentSDByte;

  /* Wait for a request from a client */
  EthernetClient ethernet = server.available();

  if (ethernet)
  {
    /* Continue to read data from the client one byte at a time until
    there is no more data */
    while (ethernet.connected())
    {
      /* Is there still data available to be read? ethernet class
      ethernet.connected() returns the number of bytes available */
      if (ethernet.available())
      {
        /* If data is available read the next byte */
        cCurrentByte = ethernet.read();

        /* Is the next byte read is a new line termination ? */
        if (cCurrentByte == '\n')
        {
          /* If so was it a blank line? */
          if (bBlankLineFlag)
          {

            /* If it was then we can now send a response to the client's http request... */
            ethernet.println("HTTP/1.1 200 OK");
            ethernet.println("Content-Type: text/html");
            ethernet.println();

            ethernet.println("<body>");
          }
        }
      }
    }
  }
}

```

```

        ethernet.println("<big><span style=\"font-weight: bold;\">www.hobbycomponents.com Ethernet Shield
Example</span></big><br>");
        ethernet.println("*****<br>");

```

```

/* ...and the append the contents of the text.txt file */
Serial.println(filename);
dataFile = SD.open(filename);

```

```

/* Sequentially read the data from the file until there is no more data available */
while (dataFile.available())
{
    cCurrentSDByte = dataFile.read();

    /* Check if the current byte is a line break ASCII and if so send an HTML line break */
    if (cCurrentSDByte == '\n')
    {
        ethernet.println("<br>");
    }
    else
    {
        /* If not then just send it to the client */
        ethernet.print((char)cCurrentSDByte);
    }
}

```

```

/* Close the file */
dataFile.close();

```

```

ethernet.println("</body>");

```

```

/* Disconnect from the client */
ethernet.stop();
}

```

```

/* The last byte received from the client was the start of a
new line so flag as no data received for this line yet */
bBlankLineFlag = true;

```

```

/* If the last byte received wasn't a new line then it must be data... */
}
else if (cCurrentByte != '\r')
{
    /* ...and so flag this as not a blank line. */
    bBlankLineFlag = false;
}
}
}
}

```

```

/***** ETHERNET PAGE CODE *****/

```

```

}

void loop()
{
  if (error)
    return;

  /***** ETHERNET PAGE CODE *****/START*****/
  //ethernet_page();
  /***** ETHERNET PAGE CODE *****/END*****/

  if(Serial.available() )
  {
    processSyncMessage(); //stop measure
  }
  if(timeStatus() == timeNotSet)
    Serial.println("waiting for sync message");
  else
    digitalClockDisplay();
  delay(10000);

  // make a string for assembling the data to log:
  String dataString = "";
  int count=0;
  long one=0;
  long two=0;
  float dif=0;
  digitalClockDisplay();

  runt=samplesperSec* Running_min*60 ; //60sec for running minutes and the sample per sec

  for(count;count<runt;count++)
  {
    dataString = "";

    //Serial.println(count);
    digitalWrite(led, HIGH);
    // read three sensors and append to the string:
    for (int analogPin = 2; analogPin < 5; analogPin++)
    {
      int sensor = map(analogRead(analogPin),0,1023,0,5000);
      //sensor=sensor/1000; //turn into millivolts

      //for volt change 1-5 volts
      decim2 = (analogRead(0)/divVolt);
      decim3 = (analogRead(1)/divVolt);
      decim4 = (analogRead(4)/divVolt);

      //if (analogPin ==4)

```

```

//sensor=round (sensor/1.89);txt

    dataString += String(sensor);
    if (analogPin ==2)
        one=sensor;
    if (analogPin ==3)
        two=sensor;
    if (analogPin < 4)
    {
        dataString += ", ";
    }

}

// open the file. note that only one file can be open at a time,
// so you have to close this one before opening another.
Serial.println("loop");
Serial.println(filename);

dataFile = SD.open(filename, FILE_WRITE);

// if the file is available, write to it:
if (dataFile) {

    dif=decim3-decim2;
    /*
    dataString += ", Mathematical diff: " + String(abs(dif)) ;
    dataString += ", "+ String(abs(dif)) ;
    dataFile.println(dataString);

    dataFile.print(decim2);
    dataFile.print(", ");
    dataFile.print(decim3);
    dataFile.print(", ");
    */
    dataFile.print(decim4);
    dataFile.println("");

    dataFile.close();
    // print to the serial port too:

//    Serial.println("");
//    Serial.println(decim2);
//    Serial.println(decim3);
    Serial.print("Counter ");
    Serial.println(count);
    Serial.print("div output ");
    Serial.println(decim4);
    Serial.println("");

```

```

// Serial.print(dif);
// Serial.print(" ");
// Serial.print("Estimated gain: ");
// Serial.print(gain*abs(dif));
// Serial.print(" logos : ");
// Serial.println(decim4/(gain*abs(dif)));
// Serial.println(decim4);
}
// if the file isn't open, pop up an error:
else {
    Serial.println("error opening .txt");
}

digitalWrite(led, LOW);
delay(refrate);
}
k++;
sprintf(filename, "test_%02d.txt", k);
Serial.println(filename);
dataFile = SD.open(filename, FILE_WRITE);
if (dataFile) {

    dataFile.println(" Repeating measurement ");
    dataFile.println();
    dataFile.close();
    // print to the serial port too:
    Serial.println(" Repeating measurement ");
    Serial.println();
}
//error=0; // use this to stop the program

}

```

AD/C

#include <Wire.h>

// I2C address for MCP3422 - base address for MCP3424

#define MCP3422_ADDRESS 0X68

// fields in configuration register

#define MCP342X_GAIN_FIELD 0X03 // PGA field

#define MCP342X_GAIN_X1 0X00 // PGA gain X1

#define MCP342X_GAIN_X2 0X01 // PGA gain X2

#define MCP342X_GAIN_X4 0X02 // PGA gain X4

#define MCP342X_GAIN_X8 0X03 // PGA gain X8

#define MCP342X_RES_FIELD 0X0C // resolution/rate field

#define MCP342X_RES_SHIFT 2 // shift to low bits

#define MCP342X_12_BIT 0X00 // 12-bit 240 SPS

#define MCP342X_14_BIT 0X04 // 14-bit 60 SPS

#define MCP342X_16_BIT 0X08 // 16-bit 15 SPS

#define MCP342X_18_BIT 0X0C // 18-bit 3.75 SPS

#define MCP342X_CONTINUOUS 0X10 // 1 = continuous, 0 = one-shot

#define MCP342X_CHAN_FIELD 0X60 // channel field

#define MCP342X_CHANNEL_1 0X00 // select MUX channel 1

#define MCP342X_CHANNEL_2 0X20 // select MUX channel 2

#define MCP342X_CHANNEL_3 0X40 // select MUX channel 3

#define MCP342X_CHANNEL_4 0X60 // select MUX channel 4

#define MCP342X_START 0X80 // write: start a conversion

#define MCP342X_BUSY 0X80 // read: output not ready

//-----

// default adc configuration register - resolution and gain added in setup()

uint8_t adcConfig = MCP342X_START | MCP342X_CHANNEL_1 | MCP342X_CONTINUOUS;

// divisor to convert ADC reading to milivolts

uint16_t mvDivisor;

//-----

void halt(void)

```
{
  Serial.println("Halted");
  while(1);
}
```

//-----

// read mcp342x data

uint8_t mcp342xRead(int32_t &data)

```
{
  // pointer used to form int32 data
  uint8_t *p = (uint8_t *)&data;
  // timeout - not really needed?
  uint32_t start = millis();
  do {
    // assume 18-bit mode
```

```

Wire.requestFrom(MCP3422_ADDRESS, 4);
if (Wire.available() != 4) {
    Serial.println("read failed");
    return false;
}
for (int8_t i = 2; i >= 0; i--) {
    p[i] = Wire.read();
}
// extend sign bits
p[3] = p[2] & 0X80 ? 0XFF : 0;
// read config/status byte
uint8_t s = Wire.read();
if ((s & MCP342X_RES_FIELD) != MCP342X_18_BIT) {
    // not 18 bits - shift bytes for 12, 14, or 16 bits
    p[0] = p[1];
    p[1] = p[2];
    p[2] = p[3];
}
if ((s & MCP342X_BUSY) == 0) return true;
} while (millis() - start < 500); //allows rollover of millis()
Serial.println("read timeout");
return false;
}
//-----
// write mcp342x configuration byte
uint8_t mcp342xWrite(uint8_t config)
{
    Wire.beginTransmission(MCP3422_ADDRESS);
    Wire.write(config);
    Wire.endTransmission();
}

//-----
void setup()
{
    Serial.begin(9600);
    Wire.begin();
    uint8_t chan = 0XFF, gain = 0XFF, res = 0XFF;
    do {
        Serial.flush();
        Serial.print("\nEnter channel (1, 2, 3, 4): ");
        while (Serial.available() == 0);
        chan = Serial.read() - '1';
    } while(chan > 3);
    Serial.println(chan + 1, DEC);
    do {
        Serial.println();
        Serial.flush();
        Serial.print("Enter gain (1, 2, 4, or 8): ");
        while(Serial.available() < 1);
        switch (Serial.read()) {
            case '1': gain = 0; break;
            case '2': gain = 1; break;

```

```

        case '4': gain = 2; break;
        case '8': gain = 3; break;
    }
} while (gain > 3);
Serial.println(1 << gain, DEC);
do {
    Serial.flush();
    Serial.println();
    Serial.print("Enter resolution (12, 14, 16, or 18): ");
    while (Serial.available() < 2);
    if (Serial.read() != '1') continue;
    switch (Serial.read()) {
        case '2': res = 0; break;
        case '4': res = 1; break;
        case '6': res = 2; break;
        case '8': res = 3; break;
    }
} while (res > 3);
Serial.println(12 + 2*res, DEC);

adcConfig |= chan << 5 | res << 2 | gain;
// divisor to convert ADC reading to millivolts
mvDivisor = 1 << (gain + 2*res);
}
//-----
void loop()
{
    // Really only needed write once in contiguous mode. Could move to setup.
    mcp342xWrite(adcConfig);
    int32_t data;
    if (!mcp342xRead(data)) halt();
    // voltage in millivolts
    double mv = (double)data/mvDivisor;
    // convert reading to microvolts
    int32_t uv = (data*1000L)/mvDivisor;
    Serial.print(mv);Serial.print(" mv, ");
    Serial.print(uv);Serial.println(" uv");
    delay(1000);
}

```

ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ

Παρακάτω παραθέτω τις αριθμητικές μετρήσεις με τα αποτελέσματα από τα οποία προέκυψαν τα γραφήματα τα οποία αναλύσαμε παραπάνω. Τα στοιχεία μετριοούνται με δειγματοληψία 2 δείγματα ανά δευτερόλεπτο, ενώ μία ολοκληρωμένη μέτρηση αποτελείται από 360 δείγματα, δηλαδή 3 λεπτά ανά μέτρηση.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΡΒΑΜΙΔΙΚΩΝ

Control	Καρβαμικά
1.38	1.61
1.33	1.58
1.30	1.63
1.27	1.65
1.25	1.66
1.23	1.68
1.21	1.69
1.20	1.70
1.19	1.70
1.18	1.70
1.17	1.71
1.16	1.71
1.15	1.71
1.14	1.65
1.14	1.63
1.13	1.64
1.13	1.65
1.12	1.66
1.12	1.66
1.12	1.67
1.11	1.68
1.11	1.69
1.11	1.69
1.11	1.69
1.11	1.70
1.11	1.70
1.10	1.70
1.10	1.70
1.10	1.72

1.10	1.73
1.10	1.74
1.10	1.74
1.10	1.74
1.10	1.75
1.10	1.75
1.10	1.75
1.10	1.76
1.10	1.76
1.10	1.76
1.10	1.76
1.10	1.76
1.10	1.77
1.10	1.77
1.10	1.77
1.09	1.77
1.09	1.77
1.10	1.77
1.09	1.76
1.09	1.76
1.08	1.76
1.08	1.76
1.09	1.76
1.09	1.75
1.09	1.76
1.09	1.75
1.10	1.75
1.10	1.75
1.10	1.75
1.11	1.75
1.11	1.75
1.11	1.75
1.12	1.75
1.12	1.75
1.13	1.75
1.13	1.75
1.13	1.74
1.13	1.74
1.13	1.74
1.14	1.74
1.14	1.74

1.14	1.74
1.14	1.74
1.14	1.74
1.15	1.74
1.15	1.74
1.15	1.74
1.15	1.74
1.16	1.74
1.16	1.74
1.16	1.73
1.17	1.73
1.17	1.73
1.17	1.73
1.17	1.73
1.18	1.73
1.18	1.73
1.18	1.73
1.18	1.73
1.18	1.72
1.19	1.72
1.19	1.72
1.19	1.72
1.19	1.72
1.19	1.72
1.20	1.71
1.20	1.71
1.20	1.71
1.20	1.71
1.20	1.70
1.21	1.70
1.21	1.70
1.21	1.70
1.21	1.70
1.21	1.69
1.21	1.69
1.22	1.69
1.22	1.69
1.22	1.69
1.22	1.68
1.22	1.68

1.23	1.68
1.23	1.68
1.23	1.68
1.23	1.67
1.23	1.67
1.23	1.67
1.23	1.67
1.24	1.67
1.24	1.67
1.24	1.66
1.24	1.66
1.24	1.66
1.24	1.66
1.24	1.66
1.25	1.66
1.25	1.65
1.25	1.65
1.25	1.65
1.25	1.65
1.25	1.65
1.25	1.65
1.25	1.64
1.26	1.64
1.26	1.64
1.26	1.64
1.26	1.64
1.26	1.63
1.26	1.63
1.26	1.63
1.27	1.63
1.27	1.63
1.27	1.63
1.27	1.63
1.27	1.62
1.27	1.62
1.27	1.62
1.27	1.62
1.28	1.61
1.28	1.61
1.28	1.61
1.28	1.61

1.28	1.61
1.28	1.60
1.28	1.61
1.28	1.60
1.28	1.60
1.29	1.60
1.29	1.60
1.29	1.59
1.29	1.59
1.29	1.59
1.29	1.59
1.29	1.59
1.29	1.58
1.29	1.58
1.29	1.58
1.30	1.58
1.30	1.58
1.30	1.58
1.30	1.57
1.30	1.57
1.30	1.57
1.30	1.57
1.30	1.56
1.30	1.56
1.30	1.56
1.30	1.56
1.30	1.56
1.30	1.56
1.30	1.56
1.30	1.55
1.30	1.55
1.30	1.55
1.30	1.55
1.31	1.55
1.31	1.54
1.30	1.54
1.31	1.54
1.31	1.54
1.31	1.54
1.31	1.54
1.31	1.54

1.31	1.53
1.31	1.53
1.31	1.53
1.31	1.53
1.31	1.53
1.31	1.53
1.31	1.53
1.31	1.52
1.31	1.52
1.31	1.52
1.31	1.52
1.31	1.52
1.31	1.52
1.32	1.52
1.31	1.52
1.32	1.52
1.31	1.51
1.32	1.51
1.32	1.51
1.32	1.51
1.32	1.51
1.32	1.51
1.32	1.51
1.32	1.50
1.32	1.50
1.32	1.50
1.32	1.50
1.32	1.50
1.32	1.50
1.32	1.50
1.32	1.49
1.32	1.49
1.32	1.49
1.32	1.49
1.33	1.49
1.32	1.49
1.33	1.48
1.33	1.48
1.33	1.48
1.33	1.48

1.33	1.48
1.33	1.48
1.33	1.47
1.33	1.47
1.33	1.47
1.33	1.47
1.33	1.47
1.33	1.47
1.33	1.47
1.33	1.46
1.33	1.46
1.33	1.46
1.33	1.46
1.33	1.46
1.33	1.46
1.33	1.46
1.33	1.45
1.33	1.45
1.33	1.45
1.33	1.45
1.33	1.45
1.33	1.45
1.33	1.45
1.33	1.45
1.33	1.44
1.33	1.44
1.33	1.44
1.34	1.44
1.34	1.44
1.33	1.44
1.34	1.44
1.34	1.43
1.34	1.43
1.34	1.43
1.34	1.43
1.34	1.43
1.34	1.43
1.34	1.43
1.34	1.43
1.34	1.42

1.34	1.42
1.34	1.42
1.34	1.42
1.34	1.42
1.34	1.42
1.34	1.42
1.34	1.42
1.34	1.41
1.34	1.41
1.34	1.41
1.34	1.41
1.34	1.41
1.34	1.41
1.34	1.41
1.34	1.41
1.34	1.41
1.34	1.40

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ

Control	1/20 Οργανοφωσφορικά	1/10 Οργανοφωσφορικά	1/2 Οργανοφωσφορικά
0,88	0,83	1,26	1,05
0,88	0,83	1,22	1,00
0,87	0,83	1,18	0,98
0,87	0,83	1,15	0,95
0,87	0,82	1,13	0,94
0,86	0,82	1,11	0,93
0,86	0,82	1,09	0,92
0,86	0,81	1,08	0,90
0,85	0,81	1,06	0,89
0,85	0,81	1,05	0,88
0,84	0,81	1,04	0,87
0,84	0,80	1,02	0,86
0,84	0,80	1,01	0,85
0,83	0,80	1,00	0,84
0,83	0,80	0,99	0,83
0,83	0,79	0,98	0,82
0,82	0,79	0,97	0,81
0,82	0,79	0,96	0,80
0,81	0,79	0,95	0,79
0,81	0,79	0,94	0,78
0,81	0,78	0,93	0,77
0,80	0,78	0,92	0,76
0,80	0,78	0,91	0,75
0,80	0,78	0,91	0,74
0,79	0,78	0,90	0,75
0,79	0,77	0,89	0,75
0,79	0,77	0,88	0,75
0,78	0,77	0,87	0,74
0,78	0,77	0,87	0,74
0,78	0,77	0,86	0,74
0,77	0,77	0,85	0,73
0,77	0,76	0,84	0,72
0,77	0,76	0,84	0,72
0,77	0,76	0,83	0,71
0,76	0,76	0,82	0,71

0,76	0,76	0,81	0,70
0,76	0,76	0,81	0,69
0,76	0,75	0,80	0,68
0,75	0,75	0,79	0,68
0,75	0,75	0,78	0,67
0,75	0,75	0,78	0,66
0,75	0,75	0,77	0,65
0,74	0,75	0,77	0,65
0,74	0,75	0,77	0,63
0,74	0,74	0,77	0,63
0,73	0,74	0,76	0,62
0,73	0,74	0,76	0,61
0,73	0,74	0,75	0,60
0,73	0,74	0,75	0,59
0,73	0,74	0,74	0,58
0,72	0,74	0,74	0,57
0,72	0,74	0,73	0,56
0,72	0,73	0,73	0,56
0,72	0,73	0,72	0,55
0,72	0,73	0,72	0,54
0,71	0,73	0,71	0,53
0,71	0,73	0,71	0,53
0,71	0,73	0,70	0,52
0,71	0,73	0,69	0,51
0,71	0,73	0,69	0,50
0,70	0,72	0,68	0,50
0,70	0,72	0,68	0,49
0,70	0,72	0,67	0,48
0,70	0,72	0,66	0,48
0,70	0,72	0,66	0,47
0,69	0,72	0,65	0,46
0,69	0,72	0,65	0,46
0,69	0,72	0,64	0,45
0,69	0,72	0,64	0,45
0,69	0,71	0,63	0,44
0,68	0,71	0,63	0,43
0,68	0,71	0,62	0,43
0,68	0,71	0,62	0,43
0,68	0,71	0,61	0,42
0,68	0,71	0,61	0,41
0,67	0,71	0,60	0,41

0,67	0,71	0,60	0,40
0,67	0,70	0,59	0,39
0,67	0,70	0,59	0,39
0,67	0,70	0,58	0,38
0,67	0,70	0,58	0,37
0,66	0,70	0,57	0,37
0,66	0,70	0,57	0,36
0,66	0,70	0,57	0,36
0,66	0,70	0,56	0,35
0,66	0,70	0,56	0,35
0,66	0,69	0,56	0,34
0,65	0,69	0,55	0,34
0,65	0,69	0,55	0,34
0,65	0,69	0,54	0,33
0,65	0,69	0,54	0,32
0,65	0,69	0,53	0,32
0,65	0,69	0,53	0,32
0,65	0,69	0,52	0,31
0,65	0,69	0,52	0,31
0,65	0,69	0,52	0,31
0,65	0,68	0,52	0,30
0,64	0,68	0,51	0,30
0,64	0,68	0,51	0,30
0,64	0,68	0,50	0,29
0,64	0,68	0,50	0,29
0,64	0,68	0,50	0,29
0,64	0,68	0,49	0,29
0,64	0,68	0,49	0,28
0,64	0,68	0,48	0,28
0,63	0,68	0,48	0,28
0,63	0,67	0,48	0,27
0,63	0,67	0,48	0,27
0,63	0,67	0,48	0,27
0,63	0,67	0,48	0,26
0,63	0,67	0,47	0,26
0,63	0,67	0,47	0,26
0,62	0,67	0,47	0,26
0,62	0,67	0,46	0,25
0,62	0,67	0,46	0,25
0,62	0,67	0,46	0,25

0,62	0,66	0,46	0,24
0,62	0,66	0,46	0,24
0,62	0,66	0,45	0,24
0,62	0,66	0,45	0,24
0,61	0,66	0,45	0,23
0,61	0,66	0,45	0,23
0,61	0,66	0,45	0,23
0,61	0,66	0,44	0,22
0,61	0,66	0,44	0,22
0,61	0,66	0,44	0,22
0,61	0,66	0,44	0,22
0,61	0,65	0,44	0,22
0,60	0,65	0,43	0,22
0,60	0,65	0,43	0,22
0,60	0,65	0,43	0,21
0,60	0,65	0,43	0,21
0,60	0,65	0,43	0,21
0,60	0,65	0,43	0,21
0,60	0,65	0,43	0,21
0,60	0,65	0,43	0,21
0,60	0,65	0,42	0,20
0,59	0,65	0,42	0,20
0,59	0,65	0,42	0,20
0,59	0,65	0,42	0,20
0,59	0,65	0,42	0,20
0,59	0,65	0,41	0,20
0,59	0,65	0,41	0,20
0,59	0,65	0,41	0,20
0,59	0,64	0,41	0,20
0,59	0,64	0,41	0,19
0,59	0,64	0,41	0,19
0,58	0,64	0,40	0,19
0,58	0,64	0,40	0,19
0,58	0,64	0,40	0,19
0,58	0,64	0,40	0,19
0,58	0,64	0,40	0,19
0,58	0,64	0,40	0,19
0,58	0,64	0,40	0,19
0,58	0,64	0,39	0,18
0,57	0,63	0,39	0,19
0,57	0,63	0,39	0,18
0,57	0,64	0,39	0,18
0,57	0,63	0,39	0,18

0,57	0,63	0,39	0,18
0,57	0,64	0,39	0,18
0,57	0,64	0,38	0,18
0,57	0,64	0,38	0,18
0,57	0,64	0,38	0,18
0,57	0,64	0,38	0,18
0,57	0,64	0,38	0,18
0,56	0,64	0,38	0,18
0,56	0,64	0,38	0,18
0,56	0,64	0,37	0,17
0,56	0,64	0,37	0,17
0,56	0,63	0,37	0,17
0,56	0,63	0,37	0,17
0,56	0,63	0,37	0,17
0,56	0,63	0,37	0,17
0,56	0,63	0,37	0,17
0,56	0,63	0,36	0,17
0,55	0,63	0,36	0,17
0,55	0,63	0,36	0,17
0,55	0,63	0,36	0,17
0,55	0,63	0,36	0,17
0,55	0,63	0,35	0,17
0,55	0,62	0,35	0,17
0,55	0,62	0,35	0,17
0,55	0,62	0,35	0,16
0,55	0,62	0,35	0,17
0,55	0,62	0,34	0,17
0,54	0,62	0,34	0,16
0,54	0,62	0,34	0,16
0,54	0,62	0,34	0,16
0,54	0,62	0,34	0,16
0,54	0,61	0,34	0,16
0,54	0,61	0,34	0,16
0,54	0,61	0,33	0,16
0,54	0,61	0,33	0,16
0,54	0,61	0,33	0,16
0,54	0,61	0,33	0,16
0,53	0,61	0,33	0,16
0,53	0,61	0,33	0,16
0,53	0,61	0,33	0,16
0,53	0,60	0,32	0,16
0,53	0,60	0,32	0,16

0,53	0,60	0,32	0,16
0,53	0,60	0,32	0,16
0,53	0,60	0,32	0,16
0,53	0,60	0,32	0,16
0,53	0,60	0,32	0,16
0,53	0,60	0,31	0,16
0,52	0,60	0,31	0,16
0,52	0,60	0,31	0,16
0,52	0,60	0,31	0,16
0,52	0,59	0,31	0,15
0,52	0,59	0,31	0,15
0,52	0,59	0,31	0,16
0,52	0,59	0,31	0,15
0,52	0,59	0,31	0,15
0,52	0,59	0,31	0,15
0,52	0,59	0,31	0,15
0,51	0,59	0,31	0,15
0,51	0,59	0,30	0,15
0,51	0,59	0,30	0,15
0,51	0,59	0,30	0,15
0,51	0,59	0,30	0,15
0,51	0,59	0,30	0,15
0,51	0,58	0,30	0,15
0,51	0,58	0,30	0,15
0,51	0,58	0,30	0,15
0,51	0,58	0,29	0,15
0,51	0,58	0,29	0,15
0,51	0,58	0,29	0,15
0,50	0,58	0,29	0,15
0,50	0,58	0,29	0,15
0,50	0,58	0,29	0,15
0,50	0,58	0,29	0,15
0,50	0,58	0,29	0,15
0,50	0,58	0,29	0,15
0,50	0,57	0,29	0,15
0,50	0,57	0,28	0,15
0,50	0,57	0,28	0,15
0,50	0,57	0,28	0,15
0,49	0,57	0,28	0,15
0,50	0,57	0,28	0,15
0,50	0,57	0,28	0,15

0,49	0,57	0,28	0,15
0,49	0,57	0,28	0,15
0,49	0,57	0,28	0,15
0,49	0,57	0,28	0,15
0,49	0,57	0,28	0,15
0,49	0,57	0,27	0,15
0,49	0,56	0,27	0,15
0,49	0,56	0,27	0,15
0,49	0,56	0,27	0,15
0,49	0,56	0,27	0,15
0,48	0,56	0,27	0,15
0,48	0,56	0,27	0,15
0,48	0,56	0,27	0,14
0,48	0,56	0,27	0,15
0,48	0,56	0,27	0,15
0,48	0,56	0,27	0,14
0,48	0,56	0,27	0,15
0,48	0,56	0,27	0,15
0,48	0,56	0,27	0,14
0,48	0,56	0,27	0,15
0,48	0,55	0,27	0,14
0,48	0,55	0,26	0,14
0,47	0,55	0,26	0,15
0,47	0,55	0,26	0,15
0,47	0,55	0,26	0,14
0,47	0,55	0,26	0,15
0,47	0,55	0,26	0,14
0,47	0,55	0,26	0,14
0,47	0,55	0,26	0,14
0,47	0,55	0,26	0,14
0,47	0,55	0,26	0,14
0,47	0,55	0,26	0,14
0,47	0,55	0,26	0,14
0,47	0,55	0,26	0,14
0,47	0,54	0,26	0,14
0,47	0,55	0,26	0,14
0,47	0,54	0,25	0,14
0,46	0,54	0,25	0,14
0,46	0,54	0,25	0,14
0,46	0,54	0,26	0,14
0,46	0,54	0,25	0,14
0,46	0,54	0,25	0,14

0,46	0,54	0,25	0,14
0,46	0,54	0,25	0,14
0,46	0,54	0,25	0,14
0,46	0,54	0,25	0,14
0,46	0,54	0,25	0,14
0,46	0,54	0,25	0,14
0,46	0,54	0,25	0,14
0,46	0,53	0,25	0,14
0,46	0,54	0,25	0,14
0,45	0,53	0,25	0,14
0,45	0,53	0,25	0,14
0,45	0,53	0,25	0,14
0,45	0,53	0,25	0,14
0,45	0,53	0,25	0,14
0,45	0,53	0,25	0,14
0,45	0,53	0,25	0,14
0,45	0,53	0,24	0,14
0,45	0,53	0,24	0,14
0,45	0,53	0,24	0,14
0,45	0,53	0,24	0,14
0,45	0,53	0,24	0,14
0,45	0,53	0,24	0,14
0,45	0,52	0,24	0,14
0,45	0,52	0,24	0,14
0,45	0,52	0,24	0,14
0,44	0,52	0,24	0,14
0,44	0,52	0,24	0,14
0,44	0,52	0,24	0,14
0,44	0,52	0,24	0,14
0,44	0,52	0,24	0,14
0,44	0,52	0,24	0,14
0,44	0,52	0,24	0,14
0,44	0,52	0,24	0,14
0,44	0,52	0,24	0,14
0,44	0,52	0,24	0,14
0,44	0,52	0,24	0,14
0,44	0,51	0,24	0,14
0,44	0,51	0,24	0,14
0,43	0,51	0,23	0,14
0,43	0,51	0,24	0,14
0,43	0,51	0,24	0,14

Πείραμα 2

Control	1/20 Οργανοφωσφορικά	1/10 Οργανοφωσφορικά	MRL	1/2 Οργανοφωσφορικά	2 MRL
0,6	0,4	0,71	0,78	0,66	0,69
0,59	0,39	0,7	0,77	0,65	0,68
0,58	0,38	0,69	0,76	0,65	0,68
0,58	0,37	0,68	0,77	0,64	0,68
0,57	0,36	0,67	0,77	0,63	0,67
0,56	0,35	0,65	0,77	0,62	0,66
0,56	0,34	0,65	0,76	0,61	0,65
0,55	0,34	0,63	0,76	0,6	0,64
0,55	0,33	0,62	0,75	0,59	0,63
0,54	0,32	0,61	0,74	0,58	0,62
0,53	0,32	0,6	0,73	0,57	0,61
0,53	0,31	0,59	0,73	0,56	0,6
0,52	0,3	0,58	0,72	0,55	0,59
0,52	0,3	0,57	0,71	0,54	0,58
0,51	0,29	0,56	0,7	0,53	0,57
0,5	0,28	0,55	0,7	0,52	0,56
0,5	0,28	0,54	0,69	0,52	0,55
0,49	0,27	0,53	0,68	0,51	0,54
0,48	0,26	0,53	0,67	0,5	0,53
0,48	0,26	0,52	0,67	0,49	0,53
0,48	0,25	0,51	0,66	0,48	0,52
0,47	0,25	0,5	0,65	0,48	0,51
0,47	0,24	0,49	0,65	0,47	0,5
0,47	0,24	0,49	0,65	0,46	0,49
0,46	0,23	0,48	0,64	0,46	0,48
0,46	0,23	0,47	0,64	0,45	0,48
0,45	0,22	0,46	0,63	0,44	0,47
0,45	0,22	0,45	0,62	0,44	0,46
0,44	0,21	0,44	0,62	0,43	0,46
0,44	0,21	0,43	0,61	0,43	0,45
0,44	0,2	0,43	0,6	0,42	0,44
0,43	0,2	0,42	0,58	0,41	0,43
0,43	0,19	0,41	0,57	0,41	0,43
0,43	0,19	0,41	0,57	0,4	0,43
0,43	0,18	0,4	0,56	0,39	0,42
0,43	0,18	0,39	0,54	0,38	0,41
0,42	0,17	0,38	0,54	0,38	0,41

0,42	0,17	0,37	0,53	0,37	0,4
0,42	0,17	0,36	0,52	0,37	0,39
0,41	0,16	0,36	0,51	0,36	0,39
0,41	0,16	0,35	0,51	0,35	0,38
0,41	0,16	0,34	0,49	0,35	0,37
0,41	0,15	0,33	0,48	0,34	0,37
0,4	0,15	0,33	0,47	0,33	0,36
0,4	0,15	0,32	0,47	0,33	0,36
0,4	0,14	0,32	0,46	0,32	0,35
0,39	0,14	0,31	0,45	0,32	0,35
0,39	0,14	0,31	0,45	0,31	0,34
0,39	0,13	0,3	0,44	0,31	0,33
0,39	0,13	0,3	0,43	0,31	0,33
0,38	0,13	0,29	0,43	0,3	0,32
0,38	0,13	0,29	0,42	0,3	0,32
0,38	0,12	0,28	0,42	0,29	0,32
0,38	0,12	0,28	0,41	0,29	0,31
0,37	0,12	0,27	0,41	0,28	0,31
0,37	0,12	0,27	0,4	0,28	0,3
0,37	0,12	0,26	0,39	0,28	0,3
0,37	0,12	0,26	0,39	0,27	0,29
0,36	0,11	0,26	0,38	0,27	0,29
0,36	0,11	0,25	0,38	0,27	0,29
0,36	0,11	0,25	0,37	0,26	0,28
0,36	0,11	0,25	0,37	0,26	0,28
0,36	0,1	0,24	0,36	0,25	0,27
0,35	0,1	0,24	0,36	0,25	0,27
0,35	0,1	0,23	0,35	0,25	0,27
0,35	0,09	0,23	0,35	0,24	0,26
0,35	0,09	0,23	0,34	0,24	0,26
0,34	0,09	0,23	0,34	0,24	0,25
0,34	0,09	0,22	0,33	0,23	0,25
0,34	0,09	0,22	0,33	0,23	0,25
0,34	0,09	0,22	0,32	0,23	0,25
0,34	0,09	0,22	0,32	0,23	0,24
0,33	0,09	0,22	0,31	0,23	0,24
0,33	0,09	0,21	0,31	0,22	0,24
0,33	0,09	0,21	0,3	0,22	0,23
0,33	0,09	0,21	0,3	0,22	0,23
0,32	0,09	0,21	0,29	0,22	0,23
0,32	0,09	0,2	0,29	0,22	0,23

0,32	0,09	0,2	0,28	0,22	0,23
0,32	0,09	0,2	0,27	0,22	0,22
0,32	0,09	0,2	0,27	0,22	0,22
0,31	0,09	0,2	0,26	0,22	0,22
0,31	0,09	0,2	0,26	0,21	0,22
0,31	0,09	0,19	0,25	0,2	0,22
0,31	0,09	0,19	0,25	0,17	0,21
0,31	0,09	0,19	0,25	0,16	0,21
0,3	0,09	0,19	0,24	0,16	0,21
0,3	0,09	0,18	0,24	0,16	0,21
0,3	0,09	0,18	0,23	0,16	0,2
0,3	0,09	0,18	0,23	0,16	0,2
0,3	0,09	0,18	0,23	0,16	0,2
0,29	0,09	0,18	0,22	0,16	0,2
0,29	0,09	0,18	0,22	0,16	0,19
0,29	0,09	0,18	0,22	0,16	0,19
0,29	0,09	0,17	0,22	0,16	0,19
0,29	0,09	0,17	0,22	0,16	0,19
0,29	0,09	0,17	0,21	0,16	0,19
0,29	0,09	0,17	0,21	0,16	0,18
0,29	0,09	0,17	0,21	0,16	0,18
0,28	0,09	0,17	0,21	0,16	0,18
0,28	0,09	0,17	0,21	0,16	0,18
0,28	0,09	0,17	0,2	0,16	0,18
0,28	0,09	0,17	0,2	0,16	0,18
0,28	0,1	0,16	0,2	0,16	0,18
0,28	0,1	0,16	0,2	0,16	0,18
0,27	0,1	0,16	0,2	0,16	0,17
0,27	0,1	0,16	0,2	0,16	0,17
0,27	0,1	0,16	0,19	0,16	0,17
0,27	0,1	0,16	0,19	0,16	0,17
0,27	0,1	0,16	0,19	0,16	0,17
0,27	0,1	0,16	0,19	0,16	0,17
0,27	0,1	0,16	0,19	0,16	0,17
0,27	0,1	0,16	0,19	0,15	0,17
0,27	0,1	0,16	0,19	0,15	0,16
0,27	0,1	0,16	0,19	0,15	0,16
0,26	0,1	0,15	0,18	0,15	0,16
0,26	0,1	0,15	0,18	0,16	0,16
0,26	0,1	0,15	0,18	0,15	0,16
0,26	0,11	0,15	0,18	0,15	0,16

0,26	0,11	0,15	0,18	0,15	0,15
0,26	0,11	0,15	0,18	0,15	0,15
0,26	0,11	0,15	0,18	0,15	0,15
0,26	0,11	0,15	0,18	0,15	0,15
0,26	0,11	0,15	0,17	0,15	0,15
0,26	0,11	0,15	0,17	0,15	0,15
0,26	0,11	0,15	0,17	0,15	0,15
0,25	0,11	0,15	0,17	0,15	0,14
0,25	0,11	0,15	0,17	0,15	0,14
0,25	0,11	0,15	0,17	0,15	0,14
0,25	0,11	0,15	0,16	0,15	0,14
0,25	0,11	0,14	0,16	0,15	0,14
0,25	0,11	0,14	0,16	0,15	0,14
0,25	0,11	0,14	0,16	0,15	0,14
0,25	0,11	0,14	0,16	0,15	0,13
0,25	0,11	0,14	0,16	0,15	0,13
0,25	0,11	0,14	0,16	0,15	0,13
0,25	0,11	0,14	0,16	0,14	0,13
0,25	0,11	0,14	0,16	0,15	0,13
0,25	0,11	0,14	0,16	0,14	0,13
0,25	0,12	0,14	0,16	0,14	0,13
0,25	0,12	0,14	0,16	0,14	0,13
0,24	0,12	0,14	0,16	0,14	0,13
0,24	0,12	0,13	0,16	0,14	0,12
0,24	0,12	0,13	0,16	0,14	0,12
0,24	0,12	0,13	0,16	0,14	0,12
0,24	0,12	0,13	0,16	0,14	0,12
0,24	0,12	0,13	0,16	0,14	0,11
0,24	0,12	0,13	0,16	0,14	0,11
0,24	0,12	0,13	0,16	0,14	0,11
0,24	0,12	0,12	0,16	0,14	0,11
0,24	0,12	0,12	0,16	0,14	0,11
0,24	0,12	0,12	0,16	0,14	0,11
0,24	0,12	0,12	0,16	0,14	0,11
0,24	0,12	0,12	0,16	0,14	0,11
0,24	0,12	0,12	0,16	0,14	0,11
0,24	0,12	0,12	0,16	0,14	0,11
0,24	0,12	0,12	0,16	0,14	0,11
0,24	0,12	0,12	0,15	0,14	0,11
0,24	0,13	0,12	0,15	0,14	0,11

0,23	0,13	0,12	0,15	0,14	0,11
0,23	0,13	0,12	0,15	0,14	0,11
0,23	0,13	0,12	0,15	0,14	0,11
0,23	0,13	0,12	0,15	0,14	0,11
0,23	0,13	0,12	0,15	0,14	0,11
0,23	0,13	0,11	0,15	0,14	0,11
0,23	0,13	0,11	0,15	0,14	0,1
0,23	0,13	0,11	0,15	0,14	0,11
0,23	0,13	0,11	0,15	0,14	0,1
0,23	0,13	0,11	0,15	0,14	0,1
0,23	0,13	0,11	0,15	0,14	0,11
0,23	0,13	0,11	0,15	0,13	0,1
0,23	0,14	0,11	0,15	0,14	0,1
0,23	0,14	0,11	0,15	0,14	0,1
0,23	0,14	0,11	0,15	0,14	0,1
0,23	0,14	0,11	0,15	0,14	0,1
0,22	0,14	0,11	0,15	0,13	0,1
0,22	0,14	0,11	0,15	0,13	0,1
0,22	0,14	0,11	0,15	0,14	0,1
0,22	0,14	0,11	0,15	0,14	0,1
0,22	0,14	0,11	0,15	0,14	0,1
0,22	0,14	0,11	0,15	0,13	0,1
0,22	0,14	0,11	0,15	0,13	0,1
0,22	0,14	0,11	0,15	0,13	0,1
0,22	0,14	0,11	0,15	0,13	0,1
0,22	0,14	0,11	0,15	0,14	0,1
0,22	0,14	0,11	0,15	0,13	0,1
0,22	0,14	0,11	0,15	0,13	0,1
0,22	0,14	0,11	0,15	0,13	0,09
0,22	0,14	0,11	0,15	0,13	0,09
0,22	0,14	0,11	0,15	0,14	0,09
0,22	0,14	0,11	0,15	0,14	0,09
0,22	0,14	0,11	0,15	0,13	0,09
0,22	0,14	0,11	0,15	0,14	0,09
0,22	0,14	0,11	0,14	0,14	0,09
0,22	0,14	0,11	0,15	0,13	0,09
0,22	0,14	0,11	0,14	0,14	0,09
0,22	0,14	0,11	0,15	0,13	0,09
0,22	0,14	0,11	0,14	0,14	0,09
0,22	0,14	0,11	0,15	0,13	0,09
0,22	0,14	0,11	0,15	0,13	0,09

Συνέχεια πειραμάτων για οργανοφωσφορικά

Control	1 MRL	1 MRL	1 MRL
0,88	0,87	0,86	0,82
0,87	0,85	0,84	0,79
0,86	0,82	0,83	0,77
0,84	0,8	0,8	0,75
0,82	0,78	0,79	0,72
0,81	0,76	0,77	0,71
0,8	0,74	0,75	0,69
0,78	0,72	0,73	0,67
0,77	0,7	0,71	0,65
0,76	0,69	0,69	0,64
0,75	0,66	0,67	0,62
0,74	0,64	0,65	0,6
0,72	0,63	0,64	0,59
0,71	0,61	0,63	0,57
0,7	0,59	0,61	0,56
0,69	0,58	0,59	0,54
0,68	0,56	0,58	0,58
0,67	0,55	0,56	0,6
0,66	0,53	0,55	0,58
0,65	0,51	0,53	0,57
0,64	0,5	0,52	0,56
0,63	0,48	0,5	0,54
0,63	0,47	0,49	0,53
0,65	0,45	0,47	0,51
0,65	0,44	0,46	0,5
0,63	0,43	0,45	0,48
0,62	0,42	0,44	0,47
0,61	0,41	0,43	0,46
0,59	0,4	0,42	0,44
0,59	0,38	0,41	0,43
0,58	0,37	0,4	0,42
0,57	0,36	0,39	0,41
0,56	0,35	0,38	0,4
0,55	0,33	0,36	0,39
0,54	0,33	0,36	0,38
0,54	0,32	0,35	0,37
0,53	0,3	0,34	0,36
0,53	0,29	0,33	0,34
0,52	0,29	0,32	0,33
0,51	0,28	0,31	0,32
0,51	0,27	0,31	0,31
0,5	0,26	0,3	0,31
0,5	0,25	0,29	0,3

0,49	0,25	0,29	0,29
0,48	0,24	0,28	0,28
0,48	0,23	0,27	0,27
0,48	0,22	0,26	0,27
0,47	0,22	0,26	0,26
0,47	0,22	0,25	0,25
0,46	0,21	0,25	0,25
0,46	0,2	0,24	0,24
0,45	0,19	0,23	0,23
0,45	0,18	0,23	0,23
0,44	0,18	0,22	0,22
0,44	0,17	0,22	0,22
0,44	0,16	0,22	0,21
0,43	0,15	0,21	0,21
0,43	0,15	0,2	0,2
0,43	0,15	0,2	0,19
0,43	0,14	0,19	0,19
0,43	0,13	0,19	0,19
0,42	0,13	0,18	0,18
0,42	0,13	0,17	0,18
0,42	0,12	0,17	0,17
0,41	0,12	0,16	0,17
0,41	0,12	0,15	0,16
0,41	0,11	0,15	0,16
0,4	0,11	0,14	0,16
0,4	0,11	0,14	0,15
0,4	0,1	0,13	0,15
0,4	0,1	0,13	0,14
0,39	0,1	0,13	0,14
0,4	0,09	0,13	0,14
0,4	0,09	0,12	0,13
0,39	0,08	0,12	0,13
0,39	0,08	0,11	0,12
0,39	0,07	0,11	0,12
0,39	0,07	0,11	0,12
0,39	0,07	0,1	0,12
0,38	0,07	0,1	0,12
0,38	0,06	0,1	0,11
0,38	0,06	0,1	0,11
0,38	0,06	0,09	0,11
0,38	0,06	0,09	0,11
0,37	0,06	0,09	0,11
0,37	0,06	0,09	0,11
0,37	0,05	0,09	0,1
0,37	0,05	0,09	0,1
0,37	0,05	0,09	0,1

0,37	0,05	0,09	0,1
0,38	0,05	0,08	0,1
0,37	0,05	0,08	0,1
0,37	0,05	0,08	0,1
0,37	0,05	0,08	0,1
0,37	0,05	0,08	0,09
0,36	0,05	0,08	0,09
0,36	0,04	0,08	0,09
0,36	0,04	0,08	0,09
0,36	0,04	0,08	0,09
0,36	0,04	0,08	0,09
0,36	0,04	0,08	0,09
0,36	0,04	0,08	0,09
0,36	0,04	0,07	0,09
0,36	0,04	0,07	0,09
0,36	0,04	0,07	0,09
0,35	0,04	0,07	0,08
0,35	0,03	0,06	0,08
0,35	0,03	0,06	0,08
0,35	0,02	0,06	0,08
0,35	0,01	0,05	0,08
0,35	0	0,05	0,08
0,35	0,01	0,05	0,08
0,35	0,02	0,05	0,08
0,35	0,02	0,05	0,08
0,34	0,02	0,05	0,08
0,34	0,02	0,05	0,08
0,34	0,02	0,05	0,08
0,34	0,02	0,04	0,08
0,34	0,02	0,04	0,08
0,34	0,01	0,04	0,08
0,34	0,02	0,04	0,08
0,34	0,02	0,04	0,08
0,34	0,02	0,04	0,08
0,34	0,02	0,04	0,07
0,33	0,02	0,04	0,07
0,33	0,02	0,04	0,07
0,33	0,03	0,04	0,08
0,33	0,03	0,04	0,07
0,34	0,03	0,04	0,07
0,34	0,03	0,04	0,07
0,33	0,03	0,04	0,07
0,33	0,03	0,04	0,07
0,33	0,03	0,04	0,07
0,33	0,03	0,03	0,08
0,33	0,04	0,03	0,09
0,33	0,04	0,03	0,09

0,25	0,04	0,07	0,09
0,25	0,04	0,07	0,09
0,25	0,05	0,07	0,09
0,25	0,05	0,07	0,09
0,25	0,04	0,07	0,09
0,25	0,04	0,07	0,1
0,25	0,05	0,07	0,1
0,26	0,05	0,07	0,1
0,25	0,04	0,07	0,09
0,25	0,05	0,07	0,09
0,25	0,05	0,07	0,1
0,25	0,05	0,07	0,1
0,25	0,05	0,07	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,07	0,1
0,25	0,05	0,07	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,1
0,25	0,05	0,08	0,11
0,25	0,05	0,08	0,11

