



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRENTO

Dipartimento di Ingegneria e Scienza dell'Informazione

Corso di Laurea in  
Informatica

ELABORATO FINALE

TITOLO

*Sottotitolo (alcune volte lungo - opzionale)*

Supervisore  
Martin Michael Hanczyc

Laureando  
Carlotta Porcelli

Anno accademico 2015/2016

# Ringraziamenti

*qualcosa*

# Indice

<b>Sommario</b>	<b>2</b>
<b>1 Introduzione</b>	<b>3</b>
1.1 La Biologia Sintetica . . . . .	3
1.2 Il progetto EVOBLISS . . . . .	4
1.2.1 EVOBLISS a Trento . . . . .	4
<b>2 La piattaforma robot</b>	<b>5</b>
2.1 La componente hardware . . . . .	5
2.1.1 La testa . . . . .	7
2.1.2 Le siringhe . . . . .	7
2.2 La componente software . . . . .	8
2.2.1 Il controllo manuale . . . . .	8
2.2.2 La calibrazione . . . . .	8
2.2.3 L'identificazione delle <i>droplets</i> . . . . .	8
<b>3 Il sistema chimico</b>	<b>9</b>
3.1 Chemiotassi e Chemiochinesi . . . . .	9
3.1.1 L'importanza del movimento . . . . .	10
3.2 Componenti inorganiche . . . . .	10
<b>4 Raccolta dati ed analisi</b>	<b>12</b>
4.1 Il software . . . . .	12
4.1.1 Riconoscimento della droplet . . . . .	13
4.2 L'esperimento . . . . .	13
4.2.1 Tracciabilità . . . . .	14
4.3 Funzione <i>fitness</i> . . . . .	15
4.3.1 Gestione della formula . . . . .	15
4.4 Risultati . . . . .	16
4.4.1 pH 11 . . . . .	16
4.4.2 pH 12 . . . . .	18
4.4.3 pH 13 . . . . .	20
<b>5 Conclusioni e Sviluppi Futuri</b>	<b>22</b>
5.1 Problemi nella struttura del robot . . . . .	22
5.1.1 La testa ed il modulo siringa . . . . .	22
5.2 Conduzione degli esperimenti . . . . .	22
5.2.1 influenza agenti esterni . . . . .	22
5.2.2 sistemare i parametri e automazione . . . . .	22
<b>Bibliografia</b>	<b>22</b>

# Sommario

“The Three Laws of Robotics:

- 1: A robot may not injure a human being or, through inaction, allow a human being to come to harm;
- 2: A robot must obey the orders given it by human beings except where such orders would conflict with the First Law;
- 3: A robot must protect its own existence as long as such protection does not conflict with the First or Second Law;

The Zeroth Law: A robot may not harm humanity, or, by inaction, allow humanity to come to harm.”

Sommario è un breve riassunto del lavoro svolto dove si descrive l’obiettivo, l’oggetto della tesi, le metodologie e le tecniche usate, i dati elaborati e la spiegazione delle conclusioni alle quali siete arrivati.

Il sommario dell’elaborato consiste al massimo di 3 pagine e deve contenere le seguenti informazioni:

- contesto e motivazioni
- breve riassunto del problema affrontato
- tecniche utilizzate e/o sviluppate
- risultati raggiunti, sottolineando il contributo personale del laureando/a

# 1 Introduzione

“Why is it less acceptable to seek how to make a cell than how to make a molecule?”

— Stéphane Leduc

”Come è iniziata la vita?”: la domanda più interessante che l’umanità si sia mai posta. La necessità di trovare una spiegazione al fenomeno dell’origine della vita ha portato il mondo della ricerca a soffermarsi sulla possibile riproducibilità in laboratorio di aspetti semplici degli organismi viventi. Nel 1911 Stéphane Leduc, biologo francese, scrisse: «[...] la sintesi della vita deve avvenire nella produzione di forme intermedie tra il mondo organico ed il mondo inorganico, forme che possiedono soltanto alcuni rudimentali attributi di vita, alle quali altri attributi verranno aggiunti nel corso dello sviluppo dall’azione dell’ambiente circostante». Questa unione di elementi provenienti dal mondo vivente e dal mondo ”non vivente” ci permette di iniziare la costruzione di strutture semplici per poi svilupparle in forme sempre più simili ad ”esseri viventi”. Lo studio affrontato in questo progetto si avvale delle tecniche della biologia sintetica per tentare di riprodurre comportamenti molto semplici, il movimento nel nostro caso.

## 1.1 La Biologia Sintetica

Nel 1912 appare per la prima volta il termine ”biologia sintetica” coniato dal biologo francese Stéphane Leduc (1853-1939) nel libro ”La Biologie Syntetique”. Egli affermò: «Quando avremo modo di conoscere il meccanismo fisico della produzione di un oggetto o di un fenomeno,[...] diventa possibile[...] riprodurre l’oggetto o il fenomeno, in quel momento la scienza diventa sintetica. La biologia è una scienza come le altre, [...] deve essere in successione: descrittiva, analitica e sintetica». Lo scopo del nostro progetto è quello di riprodurre caratteristiche base degli organismi viventi, nello specifico ci si è soffermati sul movimento in un sistema chimico.

Il termine viene successivamente ripreso nel 1974 dal genetista polacco Wacław Szybalski: «Discutiamo ora del seguente problema, ovvero cosa avverrà dopo? Fino ad ora abbiamo lavorato sulla fase descrittiva della biologia molecolare. Ma la vera sfida partirà quando entreremo nella fase della sintesi biologica[...]. Io non credo che esauriremo idee nuove ed eccitanti[...] nella biologia sintetica.» [11]

Al fine di ”sintetizzare” un essere vivente, le caratteristiche da ricercare sono:

- un corpo: per distinguere il soggetto dall’ambiente circostante
- un metabolismo: processo per il quale il soggetto prende risorse dall’ambiente e le trasforma in sostanze di mantenimento
- informazione ereditabile: contenuta nel genoma ed in grado di essere passata alle generazioni successive

L’unione dei primi due punti ci porta ad avere un organismo in grado di muoversi e replicarsi, se in seguito aggiungessimo la capacità di passare l’informazione genomica avremmo così realizzato un soggetto evolutivo. La Biologia Sintetica prevede due approcci diversi, nel primo caso si cerca di ricreare una nuova funzione e applicazione riprogrammando organismi già esistenti. Il secondo approccio prevede la sintesi da zero di forme di vita artificiale con alcune funzionalità degli esseri viventi aggiungendo singoli componenti al sistema. Il progetto si è focalizzato su questo approccio. Varie sostanze chimiche vengono utilizzate e riorganizzate in strutture e reti che si comportano come sistemi viventi. I sistemi vengono alimentati con opportuni nutrienti e viene osservato il loro comportamento, nello specifico il movimento, altra caratteristica fondamentale di un organismo vivente.

## 1.2 Il progetto EVOBLISS

Il progetto EVOBLISS è un progetto di ricerca europeo finanziato dalla Commissione Europea FET (Future and Emerging Technologies). A questo progetto partecipano i laboratori di cinque diverse università europee:

- IT University of Copenhagen (ITU) – Denmark
- University of West of England (UWE) – Bristol, Great Britain
- Karlsruhe Institute of Technology (KIT) – Germany
- University of Glasgow (UGL) – Great Britain
- Università degli Studi di Trento – Italy

Il progetto mira a sviluppare un tipo di evoluzione artificiale e tecnologica da utilizzare per la progettazione di sistemi funzionali composti da tre forme di *living technology*: vita chimica artificiale, microrganismi viventi e da reti di reazioni chimiche complesse usate per migliorare il processamento e la purificazione di acque di scarico per la generazione di energia. Il progetto EVOBLISS combina gli approcci scientifici della robotica, dell'intelligenza artificiale, della chimica e della microbiologia per sfruttare al meglio le avanguardie di queste discipline. Lo scopo finale è quello di produrre una piattaforma robotica facilmente utilizzabile e personalizzabile per l'evoluzione artificiale di nuovi materiali e per l'ottimizzazione delle performance di sistemi psicochimici e microbici. Il prodotto su cui si è lavorato è EvoBot, un robot in grado di gestire liquidi e di fornire riscontri in tempo reale, sui sistemi da esso stesso creati.

### 1.2.1 EVOBLISS a Trento

Il laboratorio di Biologia Artificiale del CIBIO - Centre for Integrative Biology dell'Università di Trento è parte integrante del progetto EVOBLISS. Qui ci si occupa di sviluppare diversi tipi di cellule artificiali basandosi su emulsioni *droplet-based*. Le *droplets* a cui si fa riferimento sono composte da *1-Decanolo* ( $C_{10}H_{21}OH$ ). Il decanolo è formato da una catena lineare di alcol grasso con 10 atomi di carbonio.[1] Essendo incolore vi si aggiunge *Oil Red O* [2], un colorante solubile con i grassi che lo rende visibile all'occhio umano e ci permette di tenerne traccia all'interno del sistema. Le *droplets* analizzate hanno volume pari a  $30\mu l$ , il volume è stato scelto per avere una migliore tracciabilità dal programma di analisi di *computer vision*. Le caratteristiche prese in analisi sono simili a quelle che possono caratterizzare un essere vivente: l'auto-movimento, l'auto-divisione, la trasformazione biochimica e le dinamiche di gruppo.

La piattaforma è stata qui adattata alla necessità di monitorare il movimento delle *droplets* a partire dal momento in cui queste escono da un sistema di equilibrio, studiando l'ottimizzazione dei parametri che definiscono l'ambiente in cui queste si muovono. Lo scopo ultimo è quello di incrementare la conoscenza delle *living technologies* e di ideare e sfruttare al meglio sistemi bio-ibridi innovativi. Ulteriori studi hanno visto l'implementazione di programmi per il riconoscimento di droplets multiple.

## 2 La piattaforma robot

EvoBot è un robot che unisce elementi delle stampanti 3D con quelli della robotica modulare per fornire a chimici, microbiologi e ricercatori nel campo della vita (a livello chimico) artificiale, uno strumento economico ed estendibile basato su una piattaforma open source di robotica per il trattamento di liquidi. La particolarità di EvoBot sta nell'interazione continua ed in tempo reale dell'utente con l'esperimento in corso.[5] Inoltre utilizzare un robot per la gestione degli esperimenti ci ha permesso di diminuire, quasi annullare, l'incertezza e la variazione tra gli esperimenti causata dalla mano umana. Come le comuni stampanti 3D, questo robot è composto da una componente hardware guidata da una parte software.

### 2.1 La componente hardware

EvoBot è composto, a livello elettronico, da un Arduino Mega 2560 su cui è montata una scheda RAMPS (RepRap Arduino Mega Pololu Shield); queste due schede controllano la testa del robot, i moduli ad essa collegati e gli input provenienti da sensori esterni. A livello meccanico, invece, è strutturato in tre strati: *actuation layer*, *experimental layer* e *observation layer*.

Partendo dal basso si trova lo strato dell'osservazione: *observation layer*. Questo *layer* non prevede nessuna interazione con gli esperimenti in corso sul layer superiore. E' utilizzato per il posizionamento di moduli che andranno a raccogliere dati, senza manipolare direttamente l'esperimento, che verranno forniti sia al robot sia all'utente. Nel nostro caso è presente una webcam.

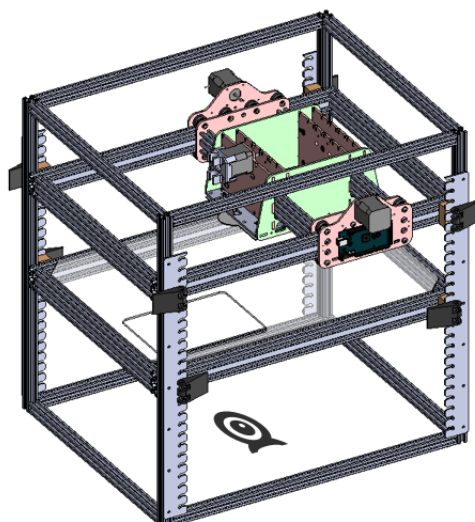


Figura 2.1: La struttura completa con l'observational layer

Il secondo strato è quello degli esperimenti: *experimental layer*. Questo strato è essenzialmente composto da una cornice in alluminio, identica a quella della struttura esterna del robot, che racchiude una piastra di vetro. Su questo strato possono essere posti i recipienti richiesti dagli specifici esperimenti. Una fessura rettangolare ad uno degli angoli permette le manovre di sostituzione dei recipienti in uso. La sua funzionalità verrà sfruttata in futuro creando un distributore automatico di *Petri dish* da posizionarvi all'interno.

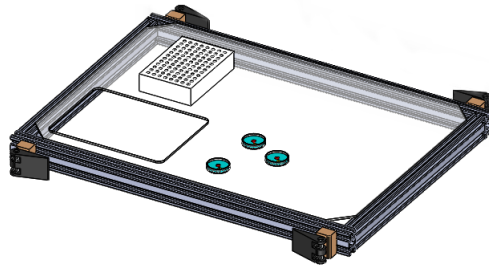


Figura 2.2: experimental layer

L'ultimo dei tre strati è lo strato di attivazione, *actuation layer*, ovvero la testa del robot. Questo layer si occupa del movimento della testa sul piano orizzontale per mezzo di un meccanismo cinghia-ruota dentata con due motori *stepper*. La testa si può muovere nelle due direzioni sul livello orizzontale:  $x$  e  $z$ .

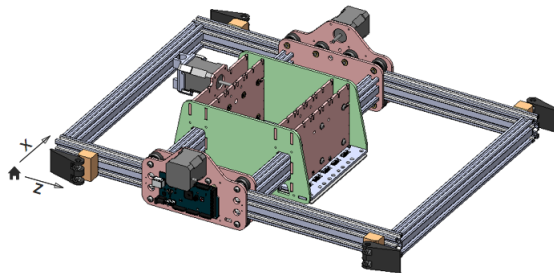


Figura 2.3: actuation layer



### 2.1.1 La testa

La *head*, testa del robot, è la componente principale dell'*actuation layer*. E' composta di 17 *socket* all'interno delle quali possono essere inseriti diversi moduli. Tuttavia, per come è stata strutturata, non c'è possibilità di inserire tutti i moduli contemporaneamente. Essa può contenere fino ad un massimo di 11 moduli per fornire funzionalità differenti. Ad oggi esiste soltanto il modulo siringa ma si prevede nel breve futuro, la costruzione di altri moduli come sensori di pH e di temperatura.

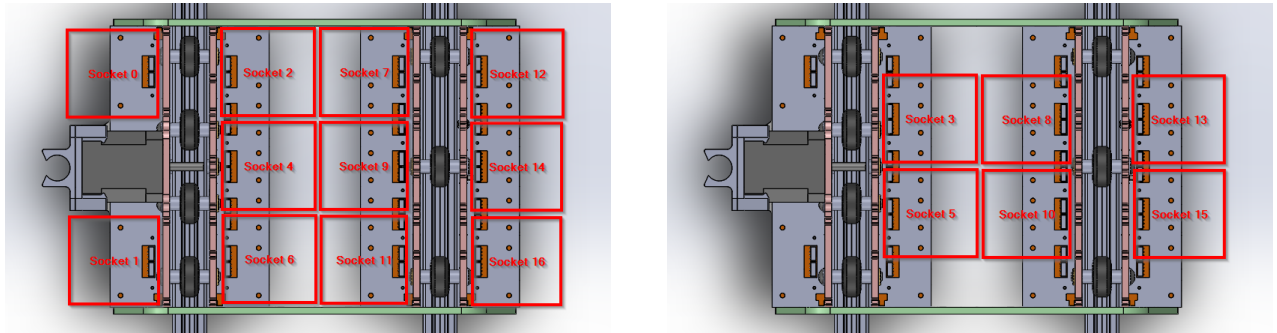


Figura 2.4: socket disposition

### 2.1.2 Le siringhe

Il modulo siringa ha due gradi di movimento verticale. Ogni modulo è composto di un motore passo-passo lineare per il movimento dello stantuffo, *plunger*, e di un meccanismo a rocchetto e cremagliera con un secondo motore passo-passo per il movimento del corpo della siringa. La siringa può essere facilmente sostituita dando all'utente l'opportunità di utilizzare siringhe con specifiche differenti in base alle necessità dell'esperimento. Le siringhe sono la componente di EvoBot che gli consente di gestire sostanze liquide.

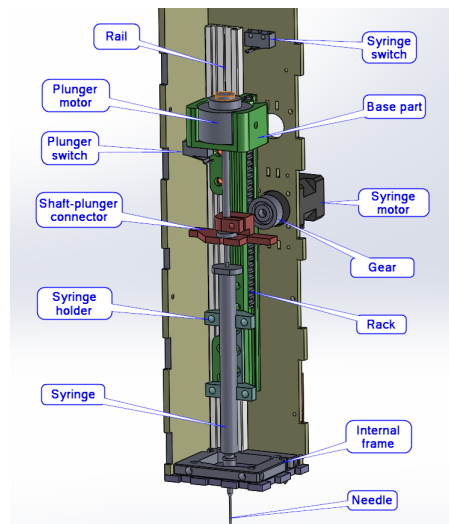


Figura 2.5: syringe module

## 2.2 La componente software

La finalità della componente software è quella di fornire all'utente finale un'interfaccia facilmente programmabile per guidare il robot. Il software è suddiviso in una *host side* e in una *robot side*. La prima comunica con la seconda attraverso una connessione USB. La *robot side* è una versione modificata del firmware Marlin usato nei programmi opensource delle stampanti 3D.

Il linguaggio di programmazione utilizzato per la stesura delle API e dei programmi successivi è Python. La suite software offerta al momento dell'installazione è composta da tre elementi: un programma di *computer vision* per la calibrazione del robot, un'interfaccia grafica per il controllo manuale del robot ed un esempio di programma, sviluppato utilizzando le API, per l'identificazione delle componenti di uno specifico esperimento.

L'obiettivo dello sviluppo della componente software è stato quello di creare un programma in grado di controllare il robot manualmente in tempo reale e raccogliere i dati necessari dagli esperimenti eseguiti, di cui si parlerà nel prossimo capitolo.

### 2.2.1 Il controllo manuale

La scelta di un software per il controllo manuale del robot nasce dalla necessità di ottenere la posizione di oggetti di interesse (Petri dishes e recipienti vari) sullo strato degli esperimenti. L'interfaccia grafica permette di testare le diverse funzioni del robot senza il bisogno di ricorrere alla programmazione. Per esempio, si può muovere la testa del robot fino a centrare uno dei contenitori, far scendere la siringa all'interno di questo e registrare la posizione del centroide dell'oggetto.

Per controllare manualmente EvoBot si utilizza Printron [4], una *3D printing host suite* opensource, con la quale, attraverso dei codici G standard, si controlla il movimento della testa del robot e con dei codici M speciali si controlla il movimento delle siringhe e degli stantuffi. Inoltre con i codici M si possono identificare i limiti dei due movimenti che una siringa può compiere.

### 2.2.2 La calibrazione

La calibrazione è il primo passo importante per correlare il sistema di coordinate della videocamera con quello del robot. A questo scopo viene creata la matrice di trasformazione compiendo le istruzioni imposte dal programma `calibrationExample.py`. Avendo la possibilità di posizionare le differenti piastre di Petri su tutto lo strato degli esperimenti o di impostare la distanza tra *l'actuation layer* e *experimental layer*, il programma è pensato per specificare i punti esatti per una massima accuratezza nella calibrazione. All'interno del programma si definisce il punto in cui è posizionata la Petri *dish*, il suo diametro e la distanza tra i due layer. Avvenuta la calibrazione, si hanno a disposizione le matrici di ogni siringa da poter utilizzare nei programmi successivi per muovere le siringhe nei punti richiesti dagli esperimenti.

### 2.2.3 L'identificazione delle *droplets*

Una delle finalità prioritarie del progetto è l'identificazione di gocce, *droplets*, per trovare l'area, il colore, il numero, la forma e, più importante, per tracciarne il movimento.

La componente principale utilizzata per l'identificazione è la libreria OpenCV (Open Source Computer Vision Library)[3] che include diverse funzioni ed algoritmi di *computer vision*.

## 3 Il sistema chimico

Una delle proprietà fondamentali degli organismi viventi è l'abilità di sentire e rispondere ai cambiamenti dell'ambiente tramite il movimento. Se consideriamo la cellula, in termini generali, come un sistema chimico aperto in una situazione di non-equilibrio, è essenziale avere a disposizione un rifornimento di materiale fresco e di energia per sostenerla. Per fare in modo che questo avvenga, la cellula modifica il suo ambiente esterno metabolizzando risorse di sostentamento e producendo dei prodotti e degli scarti. Per evitare una situazione statica, di equilibrio, il sistema deve trovare in qualche modo nuove risorse ed evitare possibili effetti inibitori dei prodotti di scarto. In questo senso puramente chimico-biologico si crede che l'abilità di movimento giochi un ruolo importante per evitare lo stato di equilibrio nella creazione di sistemi cellulari artificiali. [8]

### 3.1 Chemiotassi e Chemiochinesi

Le cellule sono in grado di avvertire molecole solubili presenti nell'ambiente esterno ad esse e di percepirne eventuali cambiamenti; sono ad esempio capaci di percepire la formazione di gradienti di concentrazione. Una cellula che percepisce delle molecole solubili può muoversi lungo il gradiente di concentrazione creato da queste fino a raggiungere la sorgente oppure allontanarsi da questa nel caso in cui le sostanze rilasciate siano repellenti o tossine. In generale, la motilità di una cellula può essere di tre tipi:

1. motilità basale casuale: avviene in assenza di stimoli chimici,
2. Chemiochinesi: corrisponde ad un movimento casuale crescente, in risposta a stimoli chimici,
3. Chemiotassi: migrazione stimolata direzionale verso un gradiente chimico.

La *chemiotassi* può essere di tipo positivo in caso di avvicinamento alla sorgente e di tipo negativo in caso di allontanamento.

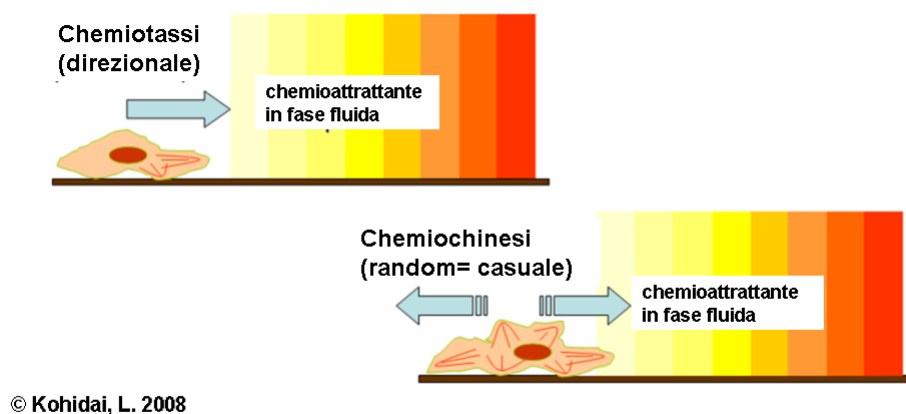


Figura 3.1: chemiotassi e chemiochinesi

E' stato qui considerato il movimento chemiotattico positivo promosso da una *droplet* di decanolo in acido decanoico lungo il gradiente di concentrazione creato dall'aggiunta di Cloruro di sodio.

### 3.1.1 L'importanza del movimento

Per gli organismi multicellulari la chemiotassi è importante nei processi fisiologici, come il reclutamento di cellule del sistema immunitario nei siti dell'infezione e negli organi dello sviluppo durante l'embriogenesi.[6] Le cellule neuronali e quelle embrionali, invece, migrano durante lo sviluppo. Durante l'angiogenesi, le cellule endoteliali vanno incontro a chemiotassi per formare i vasi sanguigni, mentre le cellule epiteliali e i fibroblasti si muovono con chemiotassi durante la guarigione di una ferita.[7] Tuttavia, oltre al ruolo in processi ovviamente benefici, la chemiotassi è coinvolta anche in tutti gli stadi cruciali del tumore cellulare, dalla disseminazione alla progressione delle metastasi. Molte cellule cancerogene, nello specifico quelle del tumore al seno, sono note per avere la preferenza nel metastatizzarsi in specifici organi e tessuti. Questa preferenza è correlata alla produzione di chemioattraenti del tessuto e degli organi bersaglio e ad una sovrapproduzione dei recettori di queste sostanze sulla superficie delle cellule cancerose [10]. Il movimento spontaneo di *droplets* liquide, particelle solide e gel in condizioni di non-equilibrio, è stato spesso studiato sia a livello teorico che sperimentale. Il movimento di auto-avanzamento di oggetti non biologici può simulare il comportamento chemiotattico o chemiocinetico di cellule viventi. Come nel caso di organelli mobili e cellule che esibiscono polarità, è necessaria una rottura spontanea della simmetria per scatenare l'auto-movimento di oggetti non biologici.

Una *droplet* posizionata sulla superficie di un substrato, può muoversi quando la superficie sottostante cambia il proprio motivo in modo asimmetrico creando una differenza nella tensione interfacciale tra il margine anteriore e il margine posteriore della *droplet*. Inoltre una *droplet* può rompere la simmetria attraverso una reazione chimica accoppiata che avviene all'interfaccia tra la *droplet* e la soluzione circostante. La reazione chimica produce una rottura della simmetria dovuta all'accumulo e al rilascio di prodotti che inducono la *droplet* a muoversi attraverso la soluzione acquosa.[9]

Il motivo del percorso della *droplet* osservato in questo studio è di tipo rettilineo ed è stato analizzato con un software di analisi visuale.

## 3.2 Componenti inorganiche

Questo studio ha esaminato in particolare la dinamica di una *droplet* di decanolo che si muove chemiotatticamente in una soluzione acquosa di Acido decanoico ( $CH_3(CH_2)_8COOH$ ) lungo i gradienti di concentrazione formati con l'aggiunta di Cloruro di sodio ( $NaCl$ ).[12]

E' stata analizzata la dipendenza parametrica della risposta chemiotattica della *droplet* al variare della concentrazione e del pH di Sodio decanoato in rapporto alla forza del gradiente di concentrazione di  $NaCl$ . Lo spazio multiparametrico utilizzato ha previsto l'esecuzione di due ripetizioni di ognuno dei nove esperimenti così composte:

molarità	pH		
	11	12	13
5mM			
10mM			
20mM			

Tabella 3.1: spazio multiparametrico degli esperimenti

Le soluzioni di acido decanoico in fase acquosa sono state preparate sciogliendo 3,44gr di Acido decanoico in 1L di acqua per avere una soluzione 20mM. Con l'aggiunta di 10mL di  $NaOH$  si è ottenuta una soluzione con  $pH13$ . Da questa si sono creati gli *stock*, a  $pH13$ , da 100mL ciascuno per le soluzioni nelle differenti molarità: 5mM diluendo 1/4 del volume con acqua, 10mM diluendone 1/2 e 20mM tenendo la soluzione non diluita.

Ulteriori 300mL della soluzione di partenza sono stati utilizzati per le soluzioni a  $pH12$ , il livello desiderato di pH è stato raggiunto con l'aggiunta di 10μL di  $HCl$ . Anche di questi si sono create le

diluizioni con molarità  $5mM$ ,  $10mM$  e  $20mM$ .

I restanti  $300mL$  sono stati utilizzati per le soluzioni a  $pH11$  con ulteriore aggiunta di  $20\mu L$  di  $HCl$ ; applicando le stesse diluizioni per le stesse molarità. La soluzione di  $NaCl$  utilizzata è stata ottenuta disciogliendo  $10,227gr$  di  $NaCl$  in acqua per avere la molarità a  $3,5M$ .

Per rendere le droplets di decanolo visibili al software di analisi, si è aggiunto il colorante Oil Red O a  $20mL$  di decanolo in piccola quantità, fino al completo scioglimento.

## 4 Raccolta dati ed analisi

Tra i parametri sperimentati si è cercata la combinazione "migliore": quella che permette alla droplet di arrivare il più possibile vicino al punto in cui il sale è stato inserito nel sistema muovendosi nel minor tempo possibile. Questo è stato possibile analizzando i diversi comportamenti della droplet in ognuna delle nove combinazioni. La scelta è stata fatta tenendo in considerazione che l'obiettivo dello studio è quello di fare in modo che la droplet si muova velocemente lungo un percorso specifico e definito. Lo studio di questo movimento di chemiotassi ci aiuta a comprendere e riprodurre le dinamiche di movimento delle cellule viventi.

### 4.1 Il software

Il software implementato per la raccolta dei dati è stato creato utilizzando le API della piattaforma robotica per gestire il robot e sfruttando delle funzioni avanzate della libreria OpenCV. Il robot viene controllato manualmente dall'utente che può scegliere tre modalità di azione: *setting mode*, *moving mode*, *tracking mode*. Il passaggio fra le varie modalità è gestito rispettivamente con il click sui numeri "1" "2" e "3" sulla tastiera. La modalità in cui l'utente si trova è mostrata in alto a sinistra nella schermata video. E' possibile registrare l'esperimento in corso in qualsiasi momento facendo click sul tasto "R" della tastiera; la scritta "RECORDING" appare accanto alla dicitura della modalità in cui ci si trova. Il video verrà salvato in una cartella definita all'interno del programma. L'interazione è possibile grazie alla semplice interfaccia grafica mostrata in figura.



Figura 4.1: setting mode e moving mode

La parte superiore della finestra mostra tre barre di controllo. La prima indica la *deepness* ovvero la profondità a cui il corpo della siringa deve arrivare affinché il puntale raggiunga il punto desiderato. I valori possono variare da 0 a 69, limiti di costruzione delle siringhe. Per arrivare nel punto desiderato si deve tenere in considerazione anche la lunghezza della punta della siringa per fare in modo che non vada contro il vetro. La seconda *trackbar* indica il volume in *mL* da far aspirare o rimettere alla siringa. Gli stantuffi delle siringhe utilizzate per questi esperimenti variano la loro posizione nel range da 0 a 35 perciò la *trackbar* del volume è stata suddivisa in 36 porzioni, ognuna delle quali equivale a 0,14mL. La terza *trackbar* viene utilizzata nella *setting mode*. Questa indica il raggio R a cui si può impostare il cerchio rosso presente in figura. Questa opzione è stata inserita per dare la possibilità di utilizzare petri dishes di diametri differenti e per annullare il rumore nel video di agenti esterni. Il cerchio rosso viene impostato per indicare l'area in cui avviene l'esperimento centrando il centro della *Petri dish* ed allargando il cerchio fino ai bordi della petri stessa; questa è l'unica porzione di schermo

a cui verranno applicati i filtri per la nitidezza dell'immagine, per il riconoscimento dei contorni della *droplet* e per tracciarne il movimento. La lunghezza dell'ultima *trackbar* varia in base al numero di moduli siringa inseriti nella testa del robot. Con questa si può scegliere la siringa da utilizzare per una determinata azione. Quando si è nella modalità di movimento, vengono visualizzati i valori impostati nelle *trackbars* in alto a sinistra nella schermata. In questa modalità l'utente può far muovere la testa del robot nei punti desiderati, spostare il corpo delle siringhe e definire i volumi di liquidi da prelevare dai pozzetti magazzino ed immettere nel sistema.

#### 4.1.1 Riconoscimento della droplet

La droplet da individuare è di colore rosso, dovuto all'aggiunta del colorante Oil Red O alla soluzione di decanolo. Tuttavia, le droplets possono essere colorate non solo con il rosso ma anche con colori scelti in base alle necessità di ogni esperimento. Per il riconoscimento di uno specifico colore si utilizza un set predefinito di tre valori che l'utente può trovare ed impostare all'interno del programma: i parametri HSV, Hue Saturation Value (tonalità, saturazione e valore). Il riconoscimento di elementi del colore impostato avviene solamente all'interno dell'area definita nella *setting mode* dal cerchio rosso.

## 4.2 L'esperimento

Il protocollo seguito per i nove esperimenti prevede quattro passaggi fondamentali da eseguire nella *moving mode*.

1. utilizzare la siringa nella socket 2 per prelevare  $50\mu L$  di decanolo dal pozzetto in posizione A
2. immettere  $30\mu L$  di decanolo nella Petri Dish, contenente  $9mL$  di Decanoato (Acido decanoico), in posizione C
3. utilizzare la siringa nella socket 4 per prelevare  $500\mu L$  di NaCl dal pozzetto in posizione B
4. immettere  $200\mu L$  di NaCl nella Petri Dish in posizione D

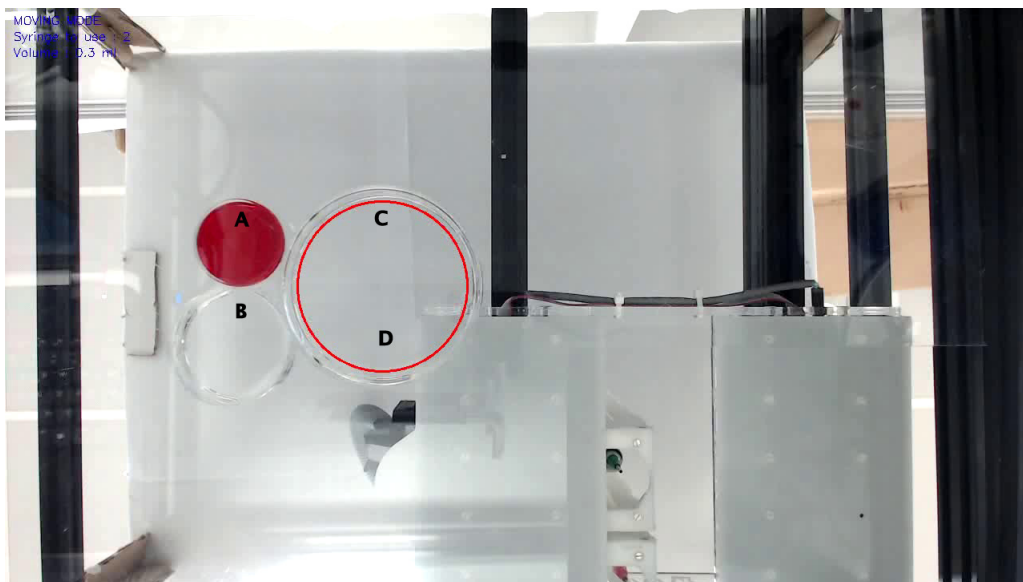


Figura 4.2: experimental layout

La dimensione della droplet è stata definita per ottenerne una buona visibilità nella tracciabilità. La scelta di prelevare una quantità maggiore di liquido ci assicura l'immissione nel sistema della corretta quantità in quanto può accadere che un volume non definito venga trattenuto nel corpo o nella punta della siringa. Le posizioni C e D all'interno della Petri sono arbitrarie e variano leggermente di esperimento in esperimento, si è cercato tuttavia, per mantenere lo spazio degli esperimenti sufficientemente uniforme, di seguire sempre lo schema proposto in figura. Questo tuttavia non è sempre stato possibile

in quanto la droplet posizionata in posizione C era influenzata da moti convettivi creati dal movimento di aria attorno alla struttura del robot e dall'inserimento del puntale della siringa sulla superficie del decanoato presente nella Petri Dish.

#### 4.2.1 Tracciabilità

Dopo aver posizionato la droplet di decanolo ed il sale NaCl all'interno della Petri dish, l'utente può far partire la *tracking mode*. In questa modalità la testa del robot viene spostata nel punto di coordinate (0,0), in fondo a destra rispetto al video mostrato dalla camera, per far in modo che non interferisca con il riconoscimento visivo. La droplet identificata viene circondata da un contorno verde ed indicato sulla schermata del video il colore riconosciuto. Nel momento in cui si decide di interrompere il programma, se la modalità di registrazione è attiva, appare a video il percorso eseguito dalla droplet, in blu, con la scritta "BEGIN" per il primo punto in cui è stata individuata, ed "END" per il punto finale di arrivo.

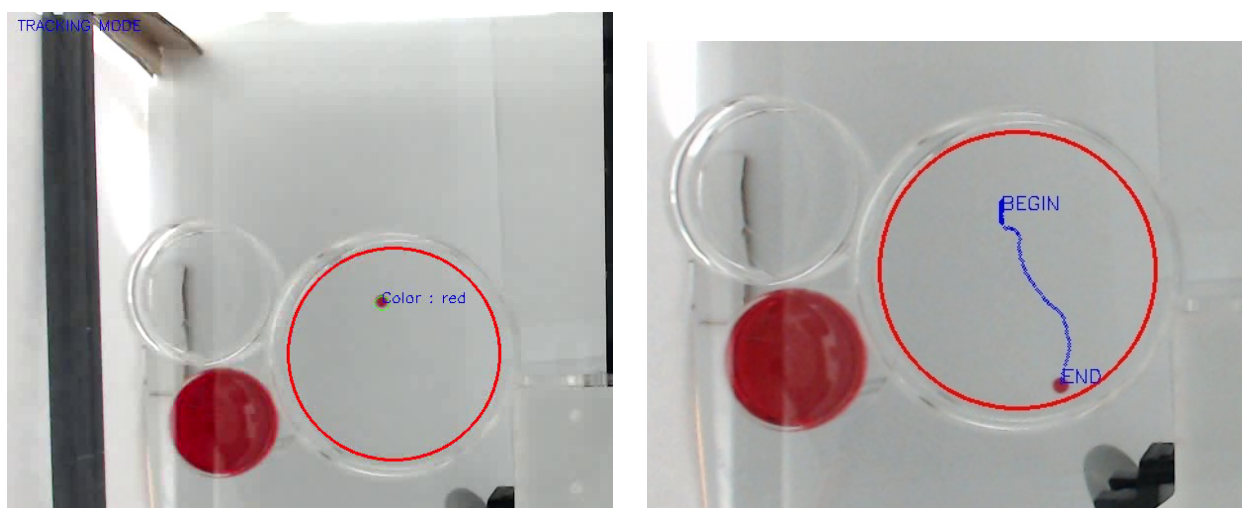


Figura 4.3: tracking mode



### 4.3 Funzione *fitness*

Per trovare la combinazione “migliore” delle componenti nello spazio degli esperimenti si è applicata una funzione di adattamento per il movimento. Questa descrive il coefficiente di precisione con cui la droplet si avvicina al punto in cui è stato inserito il sale, “analizzato in funzione del tempo” impiegato a percorrere il tracciato. La funzione è definita come:

$$k = \frac{d(C, B)}{d(A, C)} \quad \text{con} \quad \lim_{d(C, B) \rightarrow 0} k = 0 \quad (4.1)$$

dove  $A = (x, y)$  coordinate del primo punto in cui viene individuata la droplet: punto di inizio del percorso;  $B = (x, y)$  coordinate del punto in cui viene inserito il sale NaCl;  $C = (x, y)$  coordinate dell'ultimo punto in cui viene individuata la droplet, punto di fine percorso;  $d(C, B)$  è la distanza euclidea tra il punto C ed il punto B;  $d(A, C)$  è la distanza euclidea tra il punto A ed il punto C. Da (4.1) si trova il coefficiente migliore in relazione al tempo  $t$  di percorrenza della  $d(A, C)$ .

La funzione è stata applicata a due ripetizioni di ogni esperimento e la media dei due coefficienti è stata presa come valore di riferimento. Il coefficiente medio viene successivamente moltiplicato per il tempo medio, tra le due ripetizioni, impiegato. Tra le soluzioni con lo stesso  $pH$  e molarità differente  $X_{mol}$ , si definisce “migliore” quella con il valore  $k^*$  minore.

$$k_{X_{mol}}^* = \bar{k}_{X_{mol}} \times \bar{t}_{X_{mol}} \quad (4.2)$$

#### 4.3.1 Gestione della formula

Le coordinate dei punti che compongono il percorso della droplet si riferiscono ai centroidi della droplet stessa. I punti A, B, C assieme al tempo sono salvati in un file *.csv* al termine del programma, dopo aver eseguito tutti i 4 passaggi fondamentali e dopo essere entrati in *tracking mode*. Il file prodotto viene preso in input da un altro programma, esterno alla piattaforma robotica, utilizzato solamente per applicare la formula della *fitness* ai dati raccolti. Questo ci permette di avere il valore del coefficiente migliore  $k^*$ . Questa formula ci consente di trovare la combinazione migliore di parametri considerando la velocità della droplet e la distanza tra il punto di arrivo e il punto di inserimento del sale. L'obiettivo è quello di ridurre al minimo questa distanza. Di seguito viene presentata una versione schematizzata dell'ambiente analizzato.

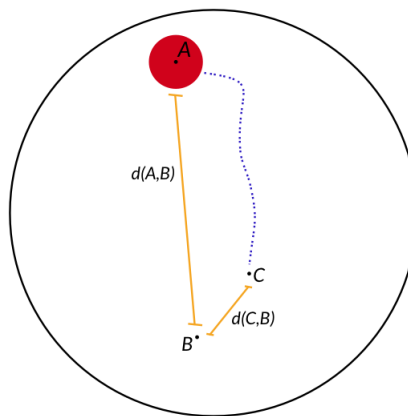


Figura 4.4: schema di un esperimento e degli elementi analizzati

## 4.4 Risultati

La soluzione di acido decanoico presente nella Petri prima dell'inizio dell'esperimento si presenta sottoforma di ione decanoato con carica negativa. Per disciogliere 20mM di acido decanoico in 1L di acqua abbiamo bisogno di aumentare il pH altrimenti l'acido resterebbe in forma solida. I risultati sono stati suddivisi per classi di  $pH$  per rendere più semplice la lettura dei dati.

### 4.4.1 pH 11

Gli esperimenti costruiti con la soluzione di Acido decanoico a  $pH11$  hanno conferito i risultati migliori di tutto lo spazio multiparametrico analizzato. Tuttavia, in un caso su due, la soluzione 20mM non risulta ottimale. In questo caso infatti la droplet compie un percorso minimo a-direzionale, rimanendo molto vicina al punto di partenza, come mostrato nella figura 4.5.



Figura 4.5: Acido decanoico 20mM a pH11

Nelle soluzioni con molarità 10mM e 5mM la droplet compie dei percorsi più lunghi, arrivando molto vicina al punto di inserimento del sale. Tutti i cammini mostrano una agitazione iniziale nel primo punto in cui la droplet viene riconosciuta. Questo movimento oscillatorio può essere dovuto alla prima interazione tra il sale ed le linee di confine della droplet.

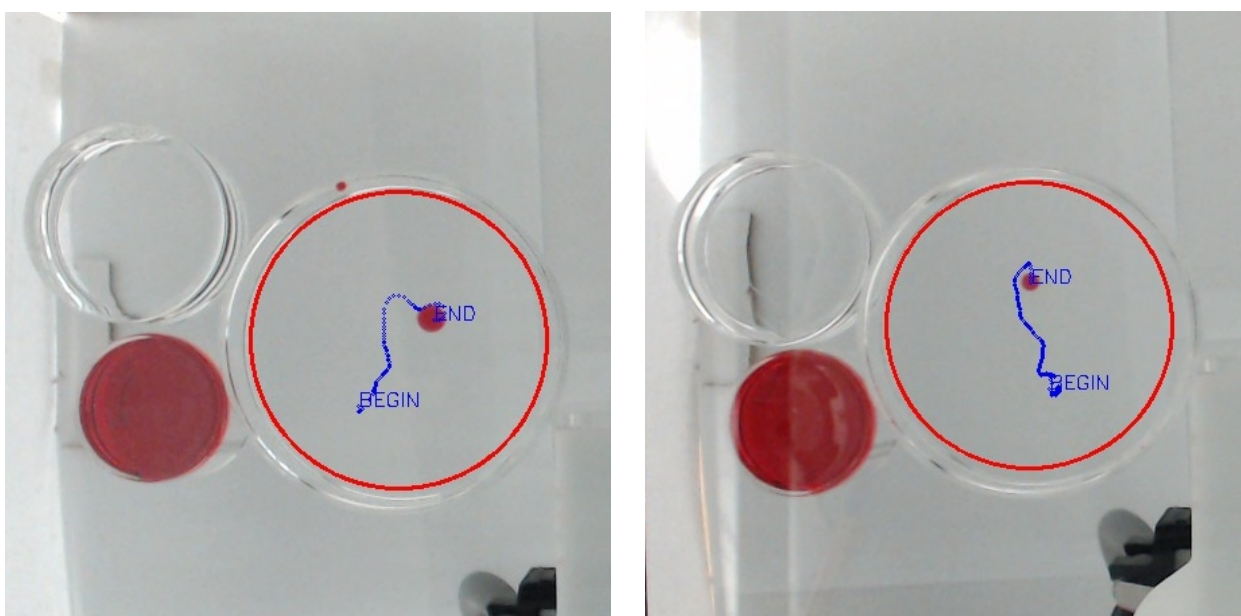


Figura 4.6: Acido decanoico 10mM a pH11

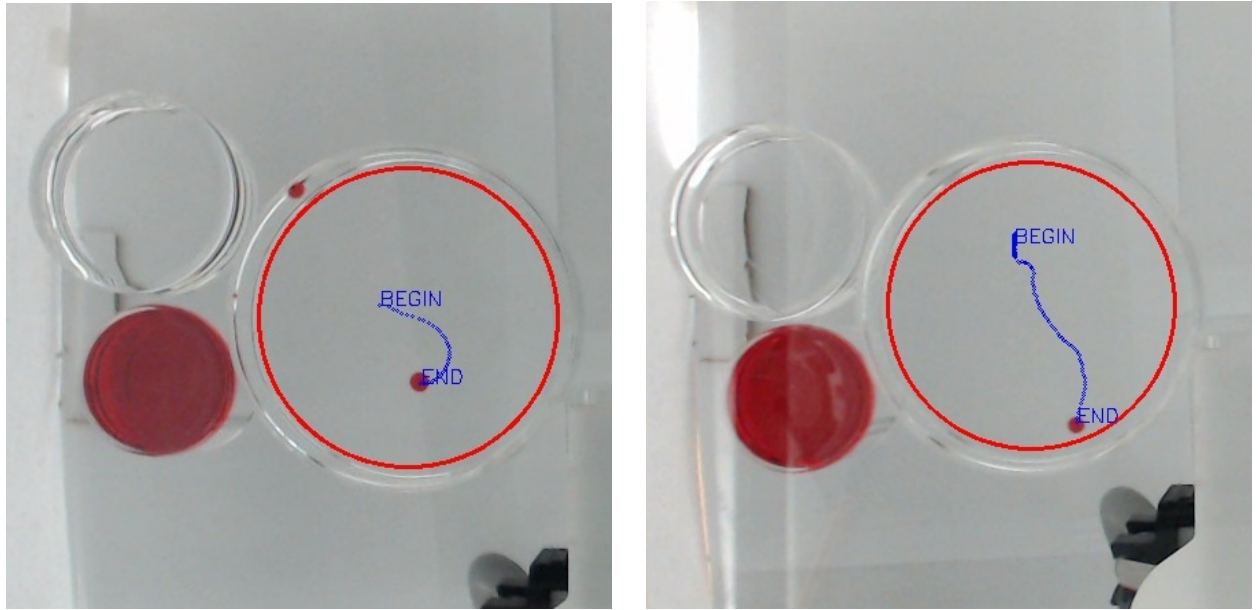


Figura 4.7: Acido decanoico 5mM a pH11

Nelle figure 4.6 e 4.7 si possono osservare dei percorsi abbastanza analoghi tra loro, la droplet si avvicina in poco tempo in un punto prossimale al punto in cui il sale è stato inserito. La tabella riportata di seguito mostra i risultati della funzione di *fitness* per ognuno dei sei esperimenti. I valori del coefficiente di precisione  $k^*$  sono stati trovati facendo al media dei risultati delle due ripetizioni. Si nota che il coefficiente migliore è quello della soluzione con molarità 5mM, con un valore di 11,413.

pH	mol (mM)	# esp	k	k medio	tempo (s)	tempo medio (s)	$k^* \forall$ molarità	$k^* \forall$ pH
11	5	1	0,180	0,215	87	53	11,413	
11	5	2	0,250		19			
11	10	1	0,530	0,302	135	88	26,612	11,413
11	10	2	0,074		41			
11	20	1	0,453	1,991	205	166,5	331,594	
11	20	2	3,529		128			

#### 4.4.2 pH 12

Tutte le soluzioni con  $pH12$  portano a risultati simili. Si osserva che la droplet non compie uno spostamento lineare determinante.

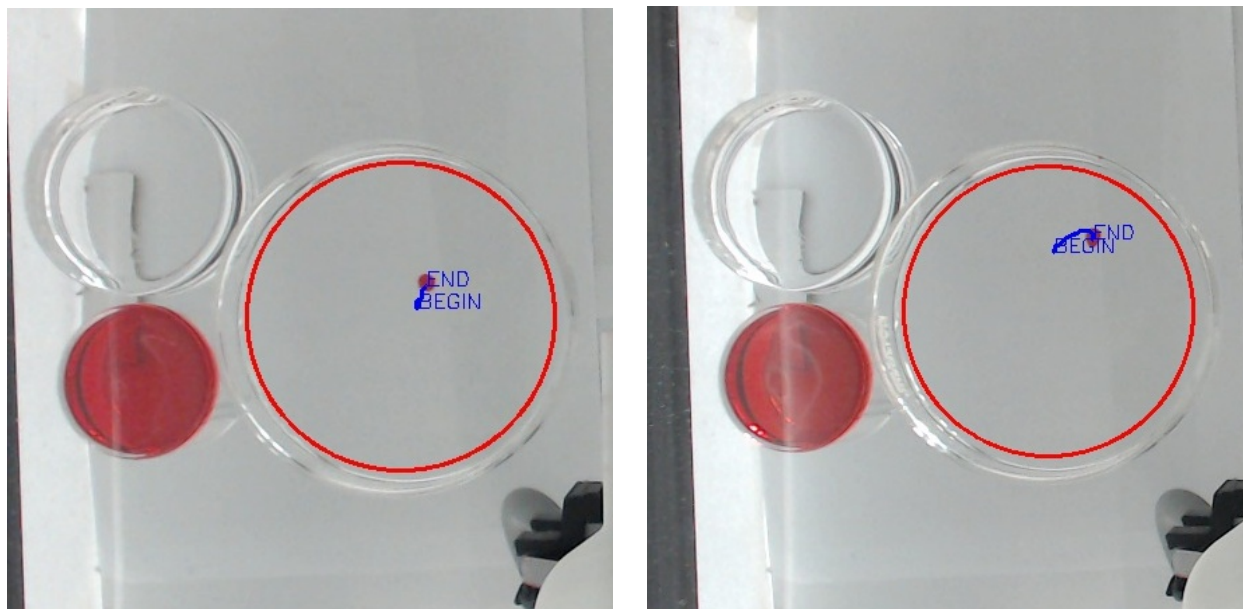


Figura 4.8: Acido decanoico 20mM a pH12

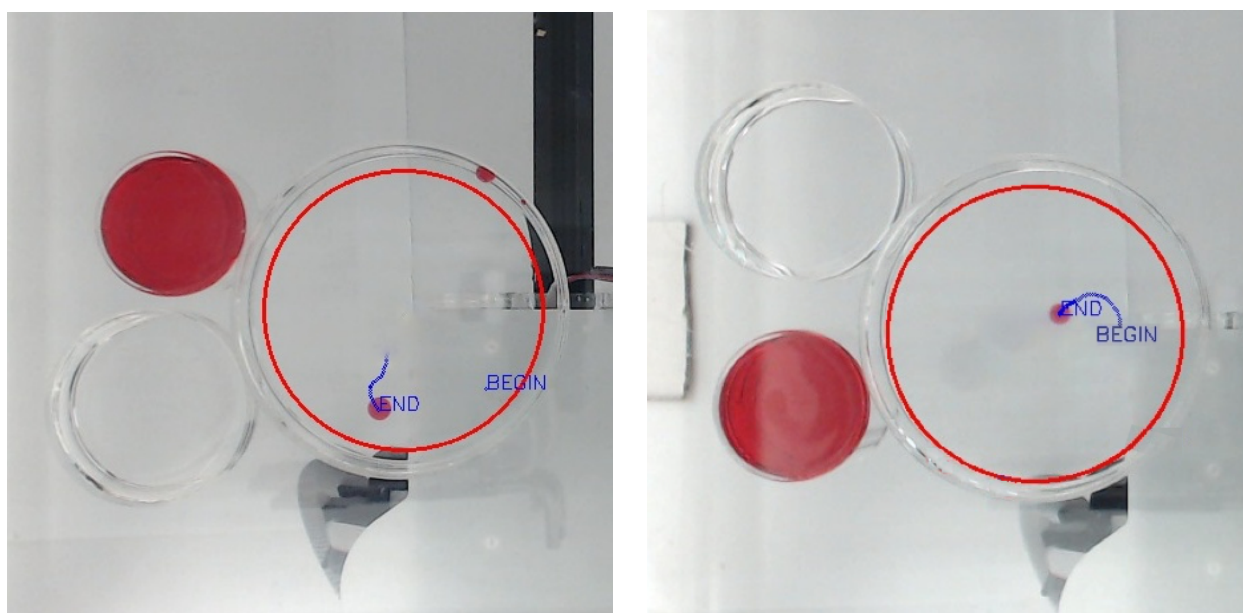


Figura 4.9: Acido decanoico 10mM a pH12



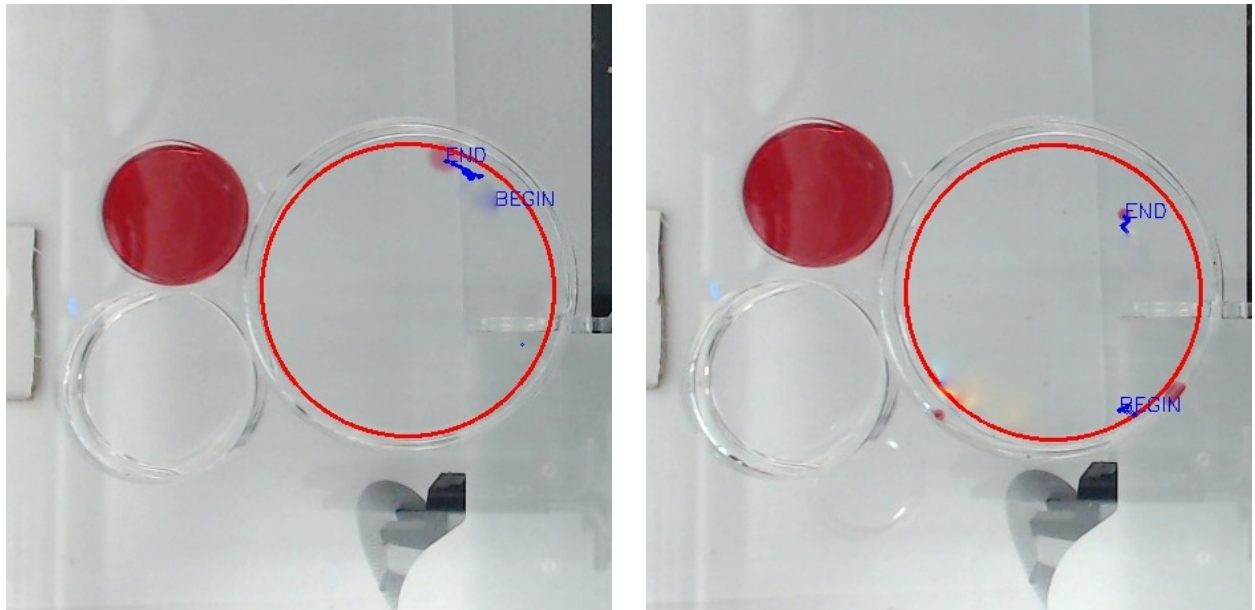


Figura 4.10: Acido decanoico 5mM a pH12

La tabella riportata di seguito mostra i risultati della funzione di *fitness* per ognuno dei sei esperimenti. I valori del coefficiente di precisione  $k^*$  sono stati trovati facendo la media dei risultati delle due ripetizioni.

pH	mol (mM)	# esp	k	k medio	tempo (s)	tempo medio (s)	$k^* \forall$ molarità	$k^* \forall$ pH
12	5	1	1,837	1,170	214	143,5	168,026	
12	5	2	0,504		73			
12	10	1	0,566	0,403	85	65,5	26,443	26,443
12	10	2	0,241		46			
12	20	1	4,075	3,407	77	84,5	287,957	
12	20	2	2,740		92			

La condizione di stabilità della droplet può essere dovuta a due fattori estranei al sistema. Infatti la droplet può essere stata influenzata dai moti convettivi creati dall'inserimento della punta della siringa all'interno della superficie dell'acido decanoico nella Petri o dagli spostamenti di aria attorno al robot. Tuttavia, queste ipotesi non possono essere confermate a causa del basso numero di ripetizioni dell'esperimento.

#### 4.4.3 pH 13

Come per le soluzioni di molarità  $20\text{mM}$  si osserva, anche in questo caso, che la droplet non compie un lungo spostamento. Questo può essere dovuto all'estrema densità della soluzione

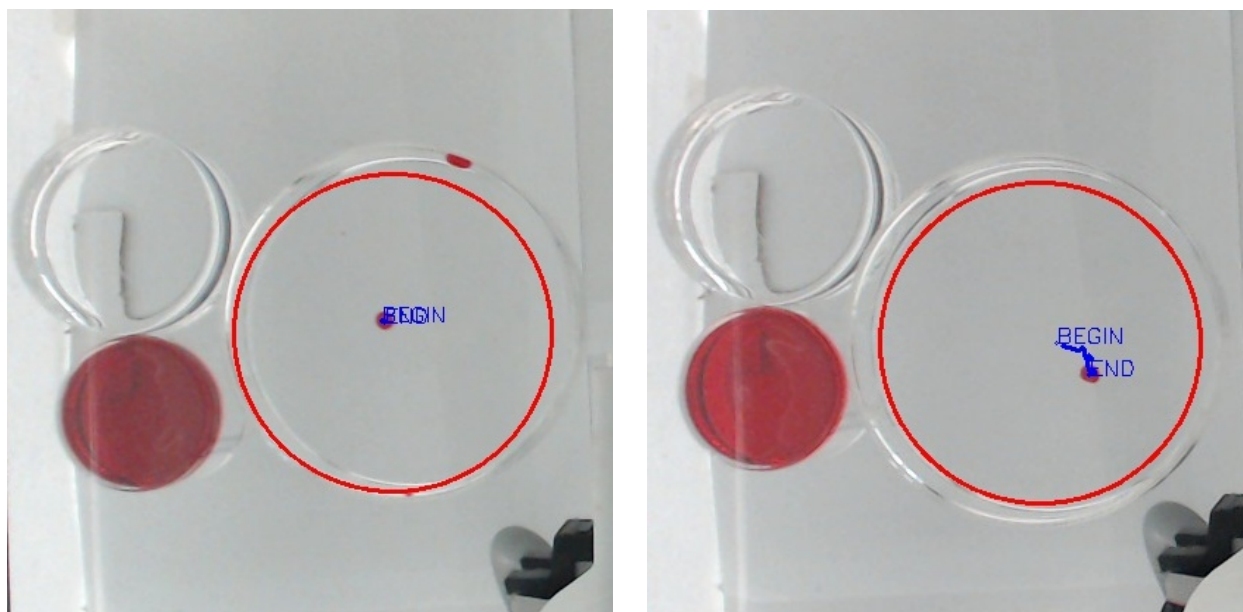


Figura 4.11: Acido decanoico  $20\text{mM}$  a pH13

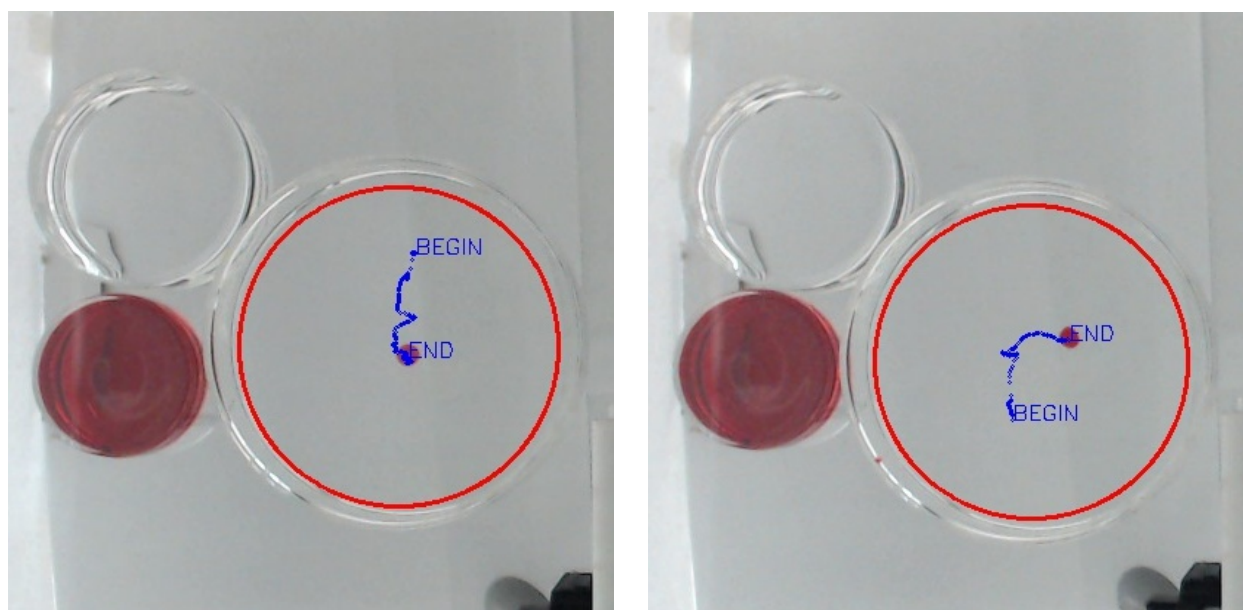


Figura 4.12: Acido decanoico  $10\text{mM}$  a pH13

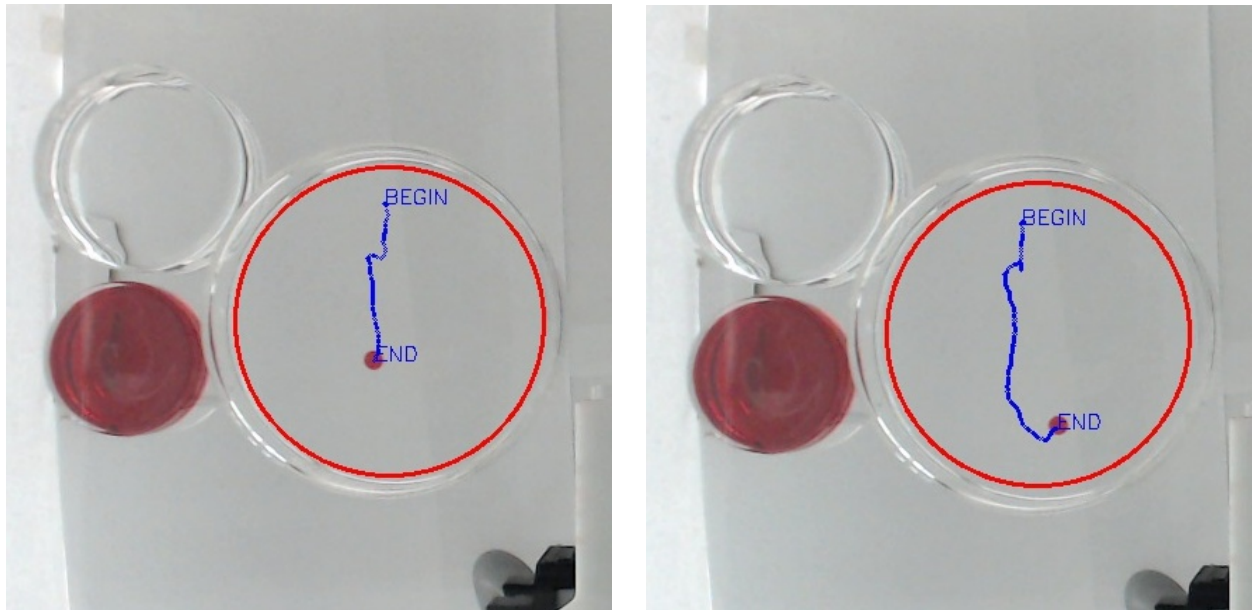


Figura 4.13: Acido decanoico 5mM a pH13

Gli esperimenti a  $pH$  maggiore hanno dimostrato che la droplet si muove con più facilità e percorrendo un percorso più lineare a molarità minori. La tabella riportata di seguito mostra i risultati della funzione di *fitness* per ognuno dei sei esperimenti. I valori del coefficiente di precisione  $k^*$  sono stati trovati facendo al media dei risultati delle due ripetizioni.

pH	mol (mM)	# esp	k	k medio	tempo (s)	tempo medio (s)	$k^* \forall$ molarità	$k^* \forall$ pH
13	5	1	0,175	0,325	63	59	19,182	
13	5	2	0,474		55			
13	10	1	0,876	0,607	61	82	49,820	19,182
13	10	2	0,338		103			
13	20	1	31,231	16,351	70	74	1210,032	
13	20	2	1,472		78			

In tutti i casi analizzati si è osservato, una volta che la droplet si avvicina al punto in cui è stato inserito il sale, che questa compie un movimento locale casuale ed oscillatorio. Inoltre è stato notato che la droplet non risponde con un movimento chemiotattico immediatamente dopo l'aggiunta del sale. Probabilmente questo periodo di latenza

# 5 Conclusioni e Sviluppi Futuri

## 5.1 Problemi nella struttura del robot

La struttura di EvoBot è stata progettata seguendo il modello di una stampante 3D. I layers che lo costituiscono sono ancorati allo scheletro esterno con delle leve bloccanti. Questo fa pensare che la struttura sia facilmente regolabile dall'utente. In realtà spostare i layers risulta alquanto complesso e macchinoso se non con l'aiuto di un'altra persona. L'*actuation layer* contiene la testa del robot e sia i cavi che collegano la scheda Arduino che il cavo di corrente dei motori che muovono la testa del robot sono esterni alla cornice in metallo per cui durante il movimento bisogna prestare attenzione a posizionarli nel modo corretto.

### 5.1.1 La testa ed il modulo siringa

La *head* di EvoBot è composta da due PCBs (printed circuit board), circuiti stampati costituiti da connettori a molla per creare i contatti elettrici con i moduli. L'inserimento e l'estrazione del modulo siringa deve avvenire quindi con delicatezza in quanto ad ogni movimento i connettori possono danneggiarsi ed il modulo resterebbe elettricamente scollegato.

Tutte le componenti del modulo siringa sono state prodotte utilizzando una stampante 3D. Il materiale di produzione risulta quindi in plastica rigida. Questa proprietà conferisce ad ogni pezzo rigidità ma allo stesso tempo fragilità.

Durante le prime fasi del lavoro il bastoncino a spirale, che unisce lo stantuffo al suo motore, per il movimento verticale, tendeva a perdere il passo all'interno del motore causando la fuoriuscita di questo dalla base in cui era fissato. Questo imprevisto ci ha impedito di proseguire con gli studi svariate volte in quanto non vi era a disposizione un elevato numero di moduli siringa da poter sostituire. Il problema è stato risolto nelle siringhe di nuova generazione fissando un blocco con delle viti sulla parte superiore della base che contiene il motore. Un altro problema incontrato risulta per il lavaggio del corpo delle siringhe: queste sono fissate con un sostegno e delle viti. E' necessario svitare il sostegno ed estrarre la siringa per eseguire almeno un lavaggio del corpo della siringa con etanolo così che non restino residui di nessuna soluzione all'interno. Il lavaggio dovrebbe avvenire alla fine di ogni giornata di lavoro; svitare ogni volta il sostegno, a lungo termine, potrebbe rovinare il filetto del buco in cui è avvitata la vite. Per evitare questo passaggio si è fatto in modo di gestire quantità di liquido sufficientemente piccole da restare nel puntale e non entrare nel corpo della siringa. Per gli esperimenti condotti si è riusciti a rispettare il limite ma in futuro si potrebbe aver bisogno di quantità di liquidi maggiori. Si è pensato ad una possibile soluzione: implementare un ciclo di "lavaggi" della siringa tirando su e spingendo fuori dell'etanolo da una Petri posizionata sull'*experimental layer* ripetute volte.

## 5.2 Conduzione degli esperimenti

La struttura del robot prevedeva una lastra di plastica bianca da apporre sopra il modulo siringhe per avere la visuale di una superficie più omogenea nel video registrato dalla camera. Lo strato di plastica non era presente al momento dell'arrivo del robot nel laboratorio quindi si è ricorsi a sostituirlo con un La prima difficoltà incontrata nella conduzione degli esperimenti era la difficoltà

### 5.2.1 influenza agenti esterni

### 5.2.2 sistemare i parametri e automazione



# Bibliografia

- [1] Decanolo. <https://en.wikipedia.org/wiki/1-Decanol>. ultimo accesso 27/02/2016.
- [2] Oil red o. [https://en.wikipedia.org/wiki/Oil\\_Red\\_O](https://en.wikipedia.org/wiki/Oil_Red_O). ultimo accesso 27/02/2016.
- [3] Opencv. <http://opencv.org/>. ultimo accesso 21/02/2016.
- [4] Pronterface. <http://www.pronterface.com/>. ultimo accesso 21/02/2016.
- [5] robotic platform. <https://blogit.itu.dk/evoblissproject/overview/progress/evolutionary-robotic-platform/>. ultimo accesso 18/02/2016.
- [6] Kurt S. Zänker Frank Entschladen. *Cellmigration: signalling and mechanisms*. Karger, 2009.
- [7] Paul Martin. Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science*, 276(5309):75–81, 1997.
- [8] † Martin M. Hanczyc, ‡ Taro Toyota, ‡ Takashi Ikegami, † Norman Packard, , and ‡ Tadashi Sugawara\*. Fatty acid chemistry at the oil–water interface: self-propelled oil droplets. *Journal of the American Chemical Society*, 129(30):9386–9391, 2007. PMID: 17616129.
- [9] Hiroki Matsuno, Martin M. Hanczyc, and Takashi Ikegami. *Progress in Artificial Life: Third Australian Conference; ACAL 2007 Gold Coast, Australia, December 4-6, 2007 Proceedings*, chapter Self-maintained Movements of Droplets with Convection Flow, pages 179–188. Springer Berlin Heidelberg, 2007.
- [10] Evanthia T. Roussos, John S. Condeelis, and Antonia Patsialou. Chemotaxis in cancer. *Nat Rev Cancer*, 11(8):573–587, 08 2011.
- [11] Waław Szybalski. *In Vivo and in Vitro Initiation of Transcription*. New York: Plenum Press, 1974.
- [12] Jitka Čejková, Matěj Novák, František Štěpánek, and Martin M. Hanczyc. Dynamics of chemotactic droplets in salt concentration gradients. *Langmuir*, 30(40):11937–11944, 2014. PMID: 25215439.