



# ZASTOSOWANIA MIKROPRZEPŁYWÓW W BIOLGII I MEDYCYNIE



Warszawa,  
VI 2019 r.

Witold Postek



Promotor: Prof. dr hab. Piotr Garstecki

Promotor pomocniczy: dr Ladislav Derzi

Rozprawa została przygotowana

w ramach Międzynarodowych Studiów Doktoranckich

w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk,

ul. Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa

Biblioteka Instytutu Chemii Fizycznej PAN

F-B.515/19



1000000105658 [pau.org.pl](http://pau.org.pl)

A - 2A-7  
K - S - 136  
K - f - 137  
K - f - 144



B. 515/19



*Mojej żonie*



---

Dziękuję wszystkim, którzy przyczynili się do powstania tej pracy, co oznacza głównie współpracowników i wspierającą mnie rodzinę.

Przede wszystkim Piotrowi Garsteckiemu za zaufanie mi i przyjęcie do swojego zespołu, za cenne dyskusje i rady, których udzielił mi przez lata, za wsparcie w osiąganiu kolejnych celów.

Laciemu Derzsiemu za wsparcie, jakiego udzielał mi zwłaszcza w końcowej fazie prowadzenia badań.

Tomkowi Kamińskiemu za nieocenioną pomoc w pierwszych etapach moich badań i za służenie mentorską radą zawsze, kiedy o nią prosiłem. Bez niego ta rozprawa na pewno wyglądałaby zupełnie inaczej.

Dziękuję wszystkim członkom zespołu za bycie dobrymi kolegami, zaś Łukaszowi Kozoniowi, Adamowi Opalskiemu i Magdzie Czekalskiej za bycie mi przyjaciółmi w tej wyprawie po doktorat. Śmieszkom z pokoju 135 – Natalii Pacosze, Arturowi Ruszczakowi i Michałowi Horce za utrzymywanie radosnej atmosfery pracy. Karolowi Patyrakowi, Patrykowi Adamczukowi i Bogdanowi Dąbrowskiemu za sumienne wykonywanie nawet najdziwniejszych zamówionych przeze mnie układów, a Joannie Smydzie i Justynie Gruszcze za ogromne wsparcie przy zagadnieniach administracyjnych.

Dziękuję wszystkim moim rodzicom i całemu rodzeństwu za to, że jesteście.

Dziękuję Weroniczce za miłość i wsparcie, bez których ta praca miałaby gorzki posmak.



---

## Finansowanie badań

„Microfluidic Combinatorial On Demand Systems: a Platform for High-Throughput Screening in Chemistry and Biotechnology (microCODE)” przyznany przez Europejską radę ds. Badań, nr grantu 279647

„BacterOMIC – opracowanie systemów oferujących kompleksową diagnostykę lekowrażliwości bakterii” przyznany przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej, nr grantu POIR.04.04.00-00-2159/16-00

„Zastosowania mikroprzepływów w biologii i medycynie” przyznany przez Narodowe Centrum Nauki, nr grantu UMO-2018/28/T/ST4/00318

NanoFun, przyznany przez Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego, nr projektu POIG.02.02.00-00-025/09



## Lista publikacji naukowych związanych z rozprawą

### A. W periodykach naukowych

**W. Postek**, T. S. Kamiński, P. Garstecki, "A precise and accurate microfluidic droplet dilutor", *Analyst*, 2017, 142, 2901–2911

**W. Postek**, T. S. Kamiński, P. Garstecki, "A passive microfluidic system based on step emulsification allows the generation of libraries of nanoliter-sized droplets from microliter droplets of varying and known concentrations of a sample", *Lab Chip*, 2017, 17, 1323–1331

**W. Postek**, P. Garguliński, T. S. Kamiński, P. Garstecki, "Microfluidic label-free screening of antibiotic susceptibility at a single-cell level shows inoculum effect of cefotaxime in *E. coli*", *Lab Chip*, 2018, 18, 3668–3677

Ott Scheler\*, **W. Postek**\* (\*równy wkład), P. Garstecki, "Recent developments of microfluidics as a tool for biotechnology and microbiology", *Current Opinion in Biotechnology* 2019, 55:60–67

**W. Postek**, P. Garguliński, L. Derzsi, P. Garstecki, "Robust step emulsification of multiple aqueous plugs", w recenzji

### B. Zgłoszenia patentowe

**W. Postek**, T. S. Kaminski, P. Garstecki, „Układ do pasywnego podziału kropli na emulsje i znakowania emulsji oraz sposób pasywnego podziału kropli na emulsje i znakowania emulsji”, zgłoszenie nr P.420615, 22.02.2017.

## STRESZCZENIE

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie wysokoprzepustowej metody badania odporności na antybiotyki na poziomie pojedynczych komórek bakterii. Badania opisane w tej rozprawie doktorskiej można podzielić na konstrukcję systemu mikroprzepływowego (A, B, C) i wykorzystanie tego systemu do badań nad odpornością na antybiotyki pojedynczych komórek (D).

### **A. Precyzyjne i dokładne rozcieńczanie substancji w kroplach o objętości rzędu jednego mikrolitra**

W tej części rozprawy za cel postawiono skonstruowanie mikroprzepływowego urządzenia, służącego do generowania szeregu rozcieńczeń próbki, tak by rozcieńczenia były możliwie jak najbardziej powtarzalne i by do każdego rozcieńczenia z szeregu dodawać osobno inną próbkę o stałym stężeniu. Uwagi wymagał problem niedoskonałego wykonania wielu nominalnie identycznych kopii geometrii kanałów do odmierzenia objętości kropeł.

Opracowano rozwiązanie, które wykorzystuje jedną kopię pułapki hydrodynamicznej do przeprowadzania wszystkich operacji odmierzenia kropeł w protokole rozcieńczania, co pozwala na osiągnięcie stałego współczynnika rozcieńczeń z wysoką precyzją i dokładnością. Ponadto opracowano metodę dodawania do każdej kropli z szeregu precyzyjnie odmierzonej kropli innej substancji.

Ta część badań jest opisana w rozdziałach 3.1. i 4.1.

### **B. Pasywna emulsyfikacja szeregu mikrolitrowych kropeł**

Celem tej części rozprawy było opracowanie geometrii kanału, która pasywnie generowałaby szeregowo rozcieńczenie substancji w serii kropeł, a następnie emulsyfikowałaby otrzymane krople z rozcieńczoną próbką. Opracowane rozwiązanie w sposób pasywny generuje z jednej kropli próbki i szeregu kropeł rozcieńczalnika szereg monodispersyjnych emulsji, z której każda emulsja zawiera inne stężenie próbki. Emulsyfikacja odbywa się na progu (ang. microfluidic step emulsification, MSE) i jest wolna od objętości martwych próbek dzięki pochylni, prowadzącej krople przeznaczone do emulsyfikacji do progu emulsyfikującego.

Zbadano zachowanie kropli w geometrii MSE. Zbadano wpływ napięcia powierzchniowego i prędkości przepływu na parametry generowanych emulsji i na częstotliwość generacji kropeł. Opracowano pasywne rozwiązanie problemu zatykania dysz przez krople powstającej emulsji. Opracowano paralelizację modułu emulsyfikującego ze zwróceniem uwagi na oddziaływania między dyszami i na wpływ przepływu fazy ciągłej wokół emulsyfikowanych kropeł na proces emulsyfikacji. Zaobserwowano także ruch wsteczny płynów przy pasywnym odrywaniu kropeł emulsji na progu.

Ta część badań jest opisana w rozdziałach 3.2. i 4.2.

### **C. Separacja emulsji, ich inkubacja i detekcja wzrostu bakterii**

Celem tej części rozprawy było opracowanie metody generacji szeregu emulsji nanolitrowych kropeł pożywki bakteryjnej z bakteriami i z różnym stężeniem antybiotyku, rozdzielania tych emulsji bez usuwania ich z urządzenia mikroprzepływowego, inkubacji tych emulsji w podwyższonej temperaturze, i detekcji sygnału fluorescencyjnego z inkubowanych kropeł. W skonstruowanym urządzeniu wykorzystano nowatorską metodę separacji emulsji w szeregu w przewodzie polietylenowym przy użyciu trzeciej fazy ciekłej, która nie mieszała się z pozostałymi fazami w układzie. Ta metoda pozwoliła na identyfikację emulsji bez konieczności ich chemicznego znakowania. Inkubacja odbywała się w przewodzie polietylenowym, który można było odłączać od modułu generującego emulsje. Detekcja sygnału fluorescencyjnego z każdej kropli była prowadzona przy użyciu mikroskopu konfokalnego.

Ta część badań jest opisana w rozdziałach 3.3. i 4.3.

### **Badanie odporności na antybiotyki z uwzględnieniem efektu inoculum do poziomu populacji składających się z jednej komórki**

Celem tej części rozprawy była analiza przeżywalności bakterii w izolowanych populacjach w obecności antybiotyku o różnym stężeniu przy różnej liczebności początkowej populacji bakterii, włącznie z badaniem populacji składających się z pojedynczej izolowanej komórki. Każda populacja była zamknięta w kropli, co izolowało daną populację od pozostałych populacji. Wyznaczono z wysoką przepustowością poziom odporności na antybiotyk w zależności od początkowej liczebności populacji. Pokazano także wpływ stężenia antybiotyku na morfologię populacji bakterii. Wskazano także na możliwość dystrybucji poziomu odporności w izogenicznej populacji bakterii, wskazując na zmienność fenotypową. Opisane tu badania z zakresu mikrobiologii, wykonane klasycznymi metodami, byłyby niezwykle czasochłonne lub co najmniej nietrywialne.

Ta część badań jest opisana w rozdziałach 3.4. i 4.4.

---

## SUMMARY

The aim of this doctoral dissertation was to develop a high-throughput method of screening and analyzing antibiotic resistance at the level of single bacterial cells. The research conducted by the author can be divided into the construction of the microfluidic platform (A, B, C) and the application of this platform to studies of antibiotic resistance at the single-cell level (D).

### **A. Precise and accurate dilution of samples in microliter droplets**

In this part of the dissertation the goal was to develop a microfluidic device that would generate a series of dilutions of a sample so that the dilutions would be as reproducible as possible, and so that it would be possible to add a precisely metered portion of another sample to each of the dilution the series.

The problem of imperfect fabrication of numerous copies of channel geometries for metering of droplets needed to be addressed. The developed and here described solution allows for achieving a constant dilution factor with high precision and accuracy by metering all the droplets participating in the dilution process in a single metering trap. An add-on module was developed that allowed for addition of precisely metered droplets with another sample to each droplet in the dilution series.

This part of work is described in the chapters 3.1. and 4.1.

### **B. Passive emulsification of multiple aqueous microliter plugs**

The goal of this part of the dissertation was to develop a microchannel geometry that would produce a dilution series in droplets and later enforce emulsification of this series. The developed solution passively generates a dilution series and later emulsifies the series passively by step emulsification. The emulsification of droplets is free of dead droplet volumes because of a slope that leads to the emulsification module.

The behavior of the droplet in the step emulsification module was analyzed and the influence of surface tension and flow rate in the system on the parameters of the generated emulsions and on the frequency of droplet generation was elucidated. A passive solution to the problem of nozzle clogging was developed. Parallelization of the passive nozzles was also done with remarks to the interplay between nozzles and the influence of gutter flow on emulsification in a parallelized step emulsification system. Backflow of liquids during droplet breakup in step emulsification was registered directly for the first time.

This part of work is described in the chapters 3.2. and 4.2.

### **C. Separation, incubation, and detection of signals from emulsions**

The aim of this part of the dissertation was to develop a method of generation of series of nanoliter droplet emulsions of bacterial medium with bacteria in the same concentration and with antibiotic diluted between emulsions that would allow for separation of these emulsions without removing them from the microfluidic device, for incubation of these emulsions, and for detection of fluorescent signals from each droplet from each emulsion. A novel method of separation of emulsions with a third immiscible liquid phase was used to separate emulsions and to gather them in a polyethylene tubing. This new method allowed for identification of reaction conditions with only knowing the order of generated emulsions without chemical labeling of droplets. Incubation was possible in the tubing, and the detection was done with a confocal microscope.

This part of work is described in chapters 3.3. and 4.3.

### **D. Screening of antibiotic resistance and the inoculum effect down to the single-cell level**

The aim of this part of the dissertation was to analyze the viability of bacteria in isolated populations in the presence of an antibiotic at different concentrations with different initial number of the bacterial cells in the populations, including populations containing only single isolated cells. Each population was separated from others in droplets of bacterial medium. Dependency of the level of antibiotic resistance on the initial number of cells in the populations was measured at high throughput. Influence of antibiotic concentration on the morphology of bacterial populations was shown. A hint towards a distribution of antibiotic resistance in a population of isogenic cells was found, suggesting phenotypic heterogeneity. The assays described here would be laborious and time-consuming or non-trivial if the methods described in A, B and C were not employed.

This part of work is described in the chapters 3.4. and 4.4.

---

Lista skrótów:

---

<b>CV</b>	coefficient of variance, współczynnik wariancji
<b>MH</b>	Pożywka Mueller-Hinton
<b>MIC</b>	Minimum Inhibitory Concentration, minimalne stężenie (antybiotyku) hamujące (wzrost bakterii)
<b>MSE</b>	Microfluidic Step Emulsification, emulsyfikacja wymuszona geometrią kanału
<b>PC</b>	Polycarbonate, poliwęglan
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction, reakcja łańcuchowa polimerazy
<b>PDMS</b>	Poli(dimetylosiloksan)
<b>PMMA</b>	Poli(metakrylan metylu), szkło akrylowe
<b>scMIC</b>	single cell Minimum Inhibitory Concentration, minimalne stężenie hamujące wzrost pojedynczej izolowanej bakterii

---

# SPIS TREŚCI

Finansowanie badań .....	5
Lista publikacji naukowych związanych z rozprawą.....	6
<b>STRESZCZENIE .....</b>	<b>7</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>9</b>
<b>SPIS TREŚCI.....</b>	<b>12</b>
<b>MOTYWACJA I CEL BADAŃ.....</b>	<b>15</b>
<b>1. WPROWADZENIE.....</b>	<b>17</b>
1.1. Mikroprzepływy i techniki mikroprzepływowe.....	18
1.1.1. Techniki mikroprzepływowe oparte na kroplach.....	20
1.1.2. Transport masy w układach opartych na kroplach.....	21
1.1.3. Generacja kropeł .....	24
1.1.4. Emulsyfikacja wymuszona geometrią kanału .....	26
1.1.5. Opływanie kropeł przez fazę ciągłą w kanałach o prostokątnym przekroju poprzecznym .....	29
1.1.6. Szeregowe rozcieńczanie próbki.....	31
1.1.6.1. Rozcieńczanie w układach jednofazowych.....	31
1.1.6.2. Rozcieńczanie w układach dwu- i wielofazowych .....	32
1.1.6.3. Pułapki hydrodynamiczne i rozcieńczanie szeregowe .....	35
1.2. Odporność na antybiotyki .....	40
1.2.1. Oznaczanie odporności na antybiotyki i efekt <i>inoculum</i> .....	41
1.3. Techniki mikroprzepływowe w mikrobiologii i biotechnologii.....	44
1.3.1. Cyfrowa biologia .....	45
1.3.1.1. Techniki mikroprzepływowe do oznaczania odporności na antybiotyki.....	48
1.3.1.1.1. Detekcja wzrostu po inkubacji .....	49
1.3.1.1.2. Detekcja podziału pojedynczych komórek.....	53
1.3.1.1.3. Techniki molekularne .....	55
1.4. Sformułowanie problemu .....	56
<b>2. MATERIAŁY I METODY EKSPERYMENTALNE.....</b>	<b>58</b>
2.1. Materiały .....	59
2.1.1. Odczynniki.....	59
2.1.2. Układy mikroprzepływowe .....	59
2.1.3. Bakterie.....	60
2.1.4. Kontrola przepływu.....	60
2.1.5. Obrazowanie układów .....	60
2.1.6. Detekcja sygnałów fluorescencyjnych .....	60
2.2. Metody.....	61
2.2.1. Matryce układów mikroprzepływowych.....	61
2.2.2. Układy mikroprzepływowe PDMS.....	61
2.2.3. Zamykanie układów mikroprzepływowych PDMS płytkami szklanymi.....	62
2.2.4. Ruch płynów .....	62
2.2.5. Wymuszanie koalescencji w polu elektrycznym.....	62
2.2.6. Pomiar objętości kropeł .....	63
2.2.7. Oznaczanie współczynnika rozcieńczeń .....	64



2.2.8.	Pomiar częstotliwości generacji kropeł emulsji.....	64
2.2.9.	Przygotowanie bakterii .....	64
<b>3.</b>	<b>REZULTATY.....</b>	<b>66</b>
3.1.	Precyzyjne i dokładne rozcieńczanie substancji w kroplach o objętości rzędu jednego mikrolitra.....	67
3.1.1.	Wprowadzenie.....	67
3.1.2.	System do generacji szeregu dokładnie dwukrotnych rozcieńczeń.....	68
3.1.3.	System do generacji szeregu dokładnie dwukrotnych rozcieńczeń z niezależnym dodawaniem drugiej próbki do każdego z rozcieńczeń w szeregu .....	73
3.2.	Pasywna emulsyfikacja szeregu mikrolitrowych kropeł .....	80
3.2.1.	Wprowadzenie.....	80
3.2.2.	Ogólna architektura układów .....	81
3.2.3.	Pochylnia prowadząca do progu emulsyfikującego .....	84
3.2.4.	Pochylnia prowadząca do progu emulsyfikującego wyposażona w bypassy ..	86
3.2.5.	Pochylnia z bypassami zintegrowana z prostym szeregowym rozcieńczalnikiem .....	90
3.2.6.	Zwiększenie przepustowości modułu emulsyfikującego – podwójna dysza dla szeregu emulsji o wysokim stopniu upakowania.....	95
3.2.7.	Zwiększenie przepustowości modułu emulsyfikującego – dysza wielokrotna dla szeregu emulsji o wysokim stopniu upakowania.....	97
3.3.	Separacja emulsji, ich inkubacja i detekcja wzrostu bakterii .....	107
3.3.1.	Wprowadzenie.....	107
3.3.2.	Separacja emulsji – cysterny mikroprzepływowe.....	109
3.3.3.	Inkubacja emulsji .....	114
3.3.4.	Detekcja sygnałów i przemieszczanie się kropeł między cysternami .....	116
3.4.	Badanie odporności na antybiotyki z uwzględnieniem efektu inoculum do poziomu populacji składających się z jednej komórki .....	119
3.4.1.	Wprowadzenie.....	119
3.4.2.	Ilościowe oznaczanie odporności na antybiotyki na poziomie pojedynczych komórek 120	
3.4.3.	Ilościowe oznaczanie efektu inoculum .....	125
3.4.4.	Wpływ cefotaksymu na morfologię populacji bakterii .....	125
<b>4.</b>	<b>DYSKUSJA .....</b>	<b>128</b>
4.1.	Precyzyjne i dokładne rozcieńczanie substancji w kroplach o objętości rzędu jednego mikrolitra.....	129
4.2.	Pasywna emulsyfikacja szeregu mikrolitrowych kropeł .....	134
4.3.	Separacja emulsji, ich inkubacja i detekcja wzrostu bakterii .....	140
4.4.	Badanie odporności na antybiotyki z uwzględnieniem efektu inoculum do poziomu populacji składających się z jednej komórki .....	143
4.4.1.	Oznaczanie wartości scMIC.....	146
4.4.2.	Zmienność fenotypowa.....	146
4.4.3.	Efekt inoculum.....	147
4.4.4.	Morfologia.....	147
<b>5.</b>	<b>WNIOSKI .....</b>	<b>149</b>
5.1.	Precyzyjne i dokładne rozcieńczanie w kroplach .....	149
5.2.	Pasywna emulsyfikacja szeregu kropeł.....	149
5.3.	Separacja emulsji, ich inkubacja i detekcja wzrostu bakterii.....	151
5.4.	Badanie wpływu antybiotyku na bakterie przy użyciu opracowanego systemu ..	152

5.5. Wnioski końcowe.....	157
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>158</b>

## MOTYWACJA I CEL BADAŃ

Walka z odpornością bakterii na antybiotyki jest kluczowa dla problematyki zdrowia publicznego. Według danych Komisji Europejskiej rocznie w Unii Europejskiej 25 tysięcy osób umiera na skutek zakażenia bakteriami odpornymi na co najmniej jeden antybiotyk (dane za 2009 rok),<sup>1</sup> zaś na całym świecie rocznie z tego powodu umierać może nawet 700 tysięcy osób<sup>2</sup>. W Stanach Zjednoczonych Ameryki rocznie z powodu infekcji bakteryjnych odpornych na antybiotyki umiera ok. 23 tysięcy osób (dane Center for Disease Control and Prevention za 2013 rok<sup>3</sup>). Poza oczywistą koniecznością ochrony zdrowia i życia ludzi, istotny jest jeszcze aspekt ekonomiczny infekcji wywołanych przez bakterie odporne na antybiotyki: według Komisji Europejskiej w samej tylko Unii Europejskiej roczny koszt leczenia osób zainfekowanych takimi bakteriami i spowodowane przez to straty produktywności pracowników to około półtora miliarda Euro<sup>1</sup>. Skala występowania bakterii odpornych na antybiotyki jest nie do przecenienia: według raportu AMR w Polsce ok. 70 % testowanych izolatów klinicznych bakterii *Escherichia Coli* i powodującej zapalenie płuc bakterii *Klebsiella Pneumoniae* było odpornych na co najmniej jeden antybiotyk (średnia UE dla *E. Coli* 58,6 %, dla *K. Pneumoniae* 34,5 %).<sup>4</sup> Niestety, rokrocznie spada liczba nowych antybiotyków dopuszczonych do użycia w praktyce klinicznej.<sup>5</sup> W połączeniu z coraz powszechniej występującymi szczepami bakterii odpornych na antybiotyki, przepowiada to zgoła ponurą przyszłość w przypadku nie podjęcia walki ze zjawiskiem odporności bakterii na antybiotyki.

Jednym z aspektów tej walki jest nabywanie odporności przez bakterie wcześniej wrażliwe na antybiotyki. Z tego punktu widzenia ważny jest efekt inoculum, który opisuje fakt, iż do powstrzymania wzrostu mniejszej populacji bakterii potrzeba mniejszego stężenia antybiotyku niż w przypadku bardziej licznej populacji bakterii. W praktyce klinicznej stosuje się standardowe stężenie bakterii z pewną tolerancją, jednak wykazano, że nawet w zakresie tego tolerowanego rozrzutu stężeń początkowych bakterii widać różnice w mierzonych wartościach MIC<sup>6</sup>. Duże znaczenie ma efekt inoculum odchylony w stronę większych stężeń bakterii, bowiem dla dużych populacji bakterii antybiotyk przepisany przez lekarza może być niewystarczający do powstrzymania infekcji<sup>7,8</sup>. Ekstremalnym przypadkiem efektu inoculum odchylonego w stronę niskich stężeń bakterii jest populacja bakterii, zawierająca tylko jedną komórkę. Stężenie antybiotyku

niezbędne od zahamowania wzrostu pojedynczej, izolowanej komórki bakteryjnej to z ang. single cell minimum inhibitory concentration, scMIC. Wydawać by się mogło, że efekt inoculum odchylony w stronę niskich stężeń bakterii nie jest problematyczny klinicznie, bowiem standardowe stężenie antybiotyku i tak powstrzyma wzrost niższego stężenia bakterii niż standardowe. Jednakże wykazano, że stężenie antybiotyku przewyższające scMIC, ale nie hamujące wzrostu całej populacji bakterii, wywiera presję ewolucyjną na większych populacjach bakterii w kierunku nabycia odporności na ten antybiotyk<sup>9</sup>, co czyni z parametru scMIC niezwykle ważny i interesujący temat badań z punktu widzenia ewolucji odporności na antybiotyki. W praktyce klinicznej zaś łatwo sobie wyobrazić pacjentów, którzy stwierdzając, że nie są już chorzy, przestają przyjmować antybiotyk lub przyjmują mniejsze dawki niż zalecone przez lekarza: w ten sposób tacy pacjenci mogliby się przyczyniać do nabywania odporności na antybiotyki przez bakterie poprzez przyjmowanie zbyt niskich porcji antybiotyku<sup>10</sup>. Jednakże wyznaczanie wartości scMIC klasycznymi metodami mikrobiologii jest żmudne i cechuje się niską przepustowością.

Niniejsza rozprawa doktorska traktuje o szeregu interdyscyplinarnych projektów, mających na celu skonstruowanie systemu mikroprzepływowego do efektywnego oznaczania scMIC. Celem badań było opracowanie poszczególnych elementów systemu, opisanie ich z punktu widzenia ich przydatności jako samodzielnych modułów mikroprzepływowych, a finalnie ich integracja w wysokoprzepustowy system w celu uzyskania informacji o odporności na antybiotyki pojedynczych komórek.

# 1. WPROWADZENIE



## 1.1. Mikroprzepływy i techniki mikroprzepływowe

Mikroprzepływy to stosunkowo młoda dziedzina nauki, traktująca o przepływach płynów w kanałach o wymiarach mniejszych niż 1 mm. W kanałach o tak małych rozmiarach najczęściej liczba Reynoldsa,

$$Re = \frac{u \cdot l}{\nu}, \quad (1)$$

gdzie:

$u$  – prędkość charakterystyczna płynu

$l$  – wymiar charakterystyczny

$\nu$  – lepkość kinematyczna płynu

tj. stosunek sił bezwładności do sił lepkości, osiąga bardzo niskie wartości, co oznacza reżim laminarny przepływu płynów w kanałach.

Ponadto, małe rozmiary kanałów mikroprzepływowych sprawiają, że grawitacja odgrywa w nich dużo mniejszą rolę niż w kanałach czy rurach o dużych średnicach. Mały wpływ grawitacji w układach mikroprzepływowych jest wyrażony niską liczbą Bonda, opisującą stosunek sił grawitacji do sił napięcia powierzchniowego:

$$Bo = \frac{\rho \cdot g \cdot l^2}{\sigma}, \quad (2)$$

gdzie:

$\rho$  – gęstość

$g$  – przyspieszenie ziemskie

$l$  – wymiar charakterystyczny

$\sigma$  – napięcie powierzchniowe

W przepływach odbywających się w tak małej skali znaczenia nabierają siły powierzchniowe, które są wyrażone w liczbie kapilarnej, opisującej stosunek naprężeń ścinających do sił kapilarnych:

$$Ca = \frac{\mu * V}{\sigma}, \quad (3)$$

gdzie:

$\mu$  – lepkość dynamiczna płynu

$V$  – prędkość charakterystyczna płynu

$\sigma$  – napięcie powierzchniowe

Przytoczone tu cechy technik mikroprzepływowych wskazują na wiele możliwości wykorzystania tych technik do wykonywania skomplikowanych operacji na płynach, które to operacje nie byłyby możliwe lub byłyby nietrywialne w urządzeniach opartych na kanałach o większych średnicach. W przyrodzie występuje wiele przykładów kanałów mikroprzepływowych, takich jak naczynia włosowate układu krwionośnego ssaków, jednak techniki mikroprzepływowe zostały zaproponowane do kontrolowanego przepływu płynów w systemach opracowanych przez człowieka dopiero w latach 90. XX wieku<sup>11</sup> i od tamtej pory cieszą się niegasnącym zainteresowaniem naukowców i inżynierów na całym świecie<sup>12-16</sup>.

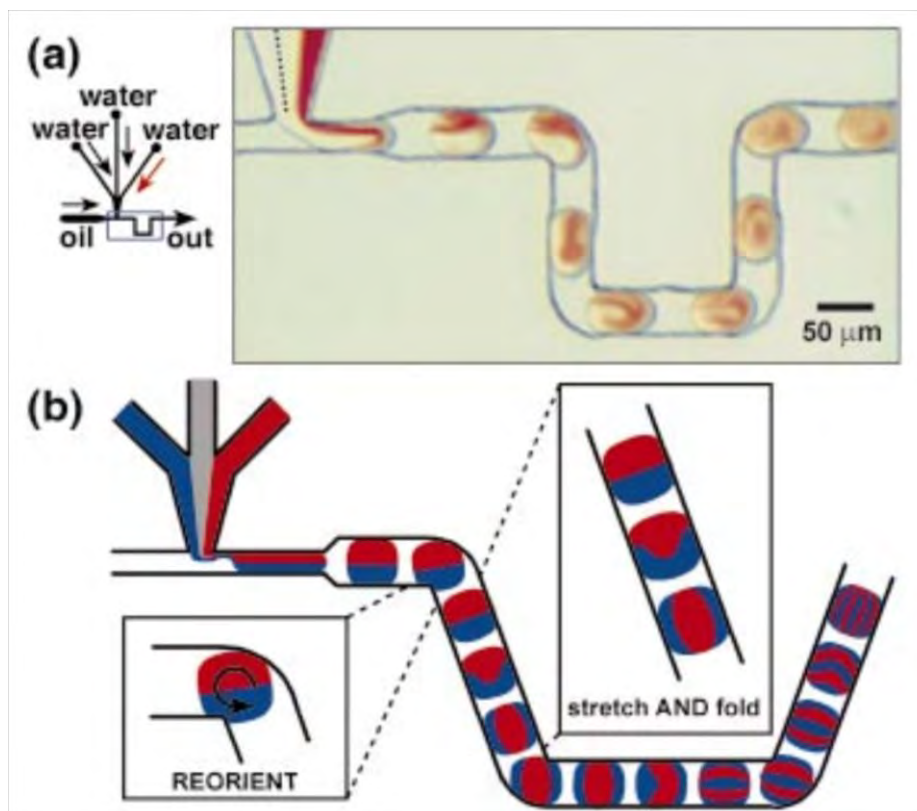
Początkowe badania nad technikami mikroprzepływowymi przyniosły rezultat w postaci podwalin pod całą dziedzinę nauki, takich jak szybkie prototypowanie układów mikroprzepływowych przy pomocy miękkiej fotolitografii<sup>17</sup>, zintegrowanych z kanałami mikrozaworów pneumatycznych<sup>18</sup>, czy urządzeń wykonujących podstawowe operacje chemii analitycznej, takie jak generacja liniowych gradientów stężenia<sup>19</sup>. Początkowo prezentowane układy mikroprzepływowe były oparte tylko na jednej fazie ciekłej. Jak wspomniano wcześniej, w układach mikroprzepływowych dominuje przepływ laminarny, tj. w prostym kanale ciecz układa się w warstwy o różnej prędkości przepływu w zależności od odległości warstwy od ścianki kanału. W ruchu laminarnym w prostym kanale nie zachodzi mieszanie pomiędzy warstwami inaczej niż na drodze dyfuzji, co



oznacza, że wymieszanie dwóch płynów dostarczonych do kanału jednofazowego układu mikroprzepływowego wymaga bardzo długiego kanału lub bardzo długiego czasu wspólnego przepływu tych dwóch płynów.

### 1.1.1. Techniki mikroprzepływowe oparte na kroplach

Prawdziwy przełom w rozwoju technik mikroprzepływowych stanowiło wprowadzenie wielofazowych urządzeń mikroprzepływowych. Takie układy wykorzystują dwie (lub więcej) niemieszające się fazy płynne: fazę ciągłą, która zwilża ścianki kanałów i fazę rozproszoną, która nie zwilża ścianek. Faza rozproszona występuje w takich układach w postaci kropeł zawieszonych w fazie ciągłej. Krople, przepływając przez kanał, doświadczają działania sił tarcia przy ściankach kanału zupełnie jak pojedyncza płynąca faza płynu. Różnica polega na tym, że kropla jest ograniczona z każdej strony przez granicę faz z fazą ciągłą. Warstwa płynu w kropli, znajdująca się najbliżej ścianki kanału, porusza się wolniej niż warstwa w środku kanału. Ograniczenie przestrzenne, wynikające z obecności granicy faz, sprawia że warstwa płynu z pobliza ścianki przemieszcza się do tyłu kropli i staje się warstwą środkową, szybko płynącą, zaś warstwa środkowa przemieszcza się do czoła kropli i rozlewa się w stronę ścianek kanału, stając się warstwą wolno płynącą. Ten fenomen zwany jest transformacją piekarza (ang. *baker's transformation*)<sup>20</sup> ze względu na podobieństwo następujących po sobie rozciąganiu i składaniu warstw płynu do czynności wykonywanych na cieście przed upieczeniem chleba (Ryc. 1). Transformacja piekarza sprawia, że mieszanie w kroplach zachodzi błyskawicznie (nawet milisekundy)<sup>21</sup> w porównaniu do mieszania w kanałach układów opartych na pojedynczej fazie. Mieszanie w kroplach może być jeszcze przyspieszone przez wykorzystanie różnego rodzaju geometrii kanałów zaburzających przepływ laminarny, czy nawet zwykłych zakrętów w kanałach<sup>21</sup>. Szybkie mieszanie w kroplach umożliwia znaczne zmniejszenie długości kanałów w układach i otwiera nowe możliwości wykorzystania technik mikroprzepływowych wykorzystujących krople.



Ryc. 1. Schemat mieszania w kroplach w układach mikroprzepływowch. a) Eksperymentalnie pokazane mieszanie. Water – woda, oil – olej, out – wylot. Generacja kropeł z połączonych strumieni czystej wody i wody z barwnikiem. b) Przedstawienie schematyczne mieszania. Reorient – reorientacja, stretch and fold – rozciągnąć i złożyć. Warstwy w kroplach wpierv ustawiają się równolegle wzdłuż osi długiej kanału. Następnie kropla jest reorientowana w zakręcie kanału, zaś warstwy zmieniają położenie jak na schemacie. Po kilku cyklach rozciągania i składania w kropli jest wiele cienkich warstw, między którymi mieszanie może zachodzić na drodze dyfuzji. Rycina pochodzi z artykułu Song *et al.*<sup>22</sup>

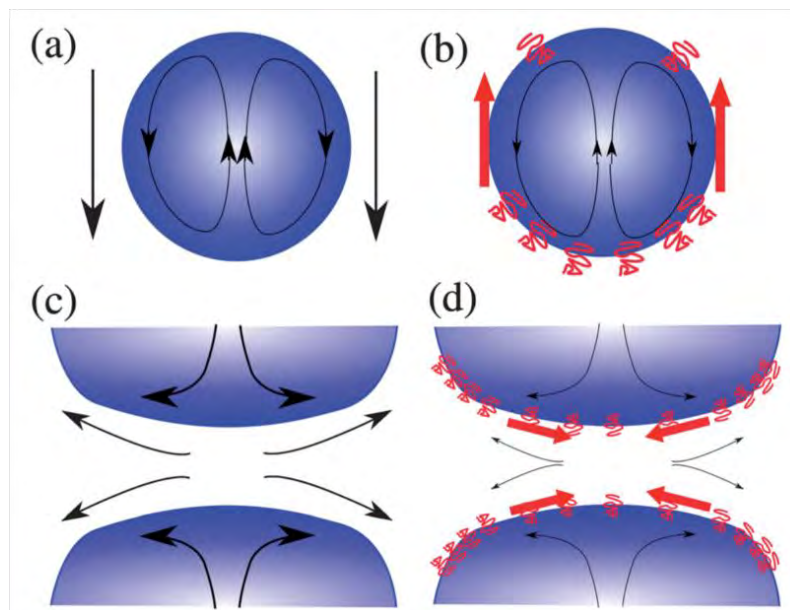
### 1.1.2. Transport masy w układach opartych na kroplach

Olbrzymią zaletą technik kroplowych jest też fakt, iż krople można traktować jako osobne reaktory chemiczne. Jeżeli kropla nie zwilża ścianek kanałów, to pomiędzy kroplą a ścianką zawsze powinien znajdować się film fazy ciągłej. Zastosowanie surfaktantów dodatkowo zapobiega osadzaniu się materiału z wnętrza kropli na ściankach kanałów i utrudnia koalescencję (zlewanie się) kropeł po ich zetknięciu<sup>23</sup>. Dobór surfaktantów jest kluczowy ze względu na planowane wykorzystanie reaktorów kroplowych. Przykładowo, jeżeli planowany eksperyment zakłada hodowlę organizmów żywych w kroplach, korzystnie jest wykorzystać surfaktant fluorowany, który nie będzie oddziaływał z mnożącymi się organizmami. Wybór fluorowanego surfaktantu pociąga za sobą konieczność użycia fluorowanego oleju jako fazy ciągłej, co niesie ze sobą dodatkową korzyść: oleje fluorowane cechują się bardzo wysoką rozpuszczalnością gazów, co

oznacza wysokie natlenowanie kropeł nawet podczas długiej inkubacji w podwyższonej temperaturze przy minimalnym ruchu kropeł stymulującym wymianę masy między kroplami a fazą ciągłą<sup>24,25</sup>. Odpowiednio wysoki poziom tlenu w kroplach jest wymagany w przypadku prac nad organizmami, które cechuje oddychanie tlenowe. Wykorzystanie olejów fluorowanych jako fazy ciągłej wymaga użycia specjalnych modyfikacji chemicznych ścianek kanałów, aby zapewnić odpowiednie zwilżanie tych ścianek przez fazy płynne lub wykorzystanie fluorowanych związków do konstrukcji układu<sup>26,27</sup>. Surfaktanty fluorowane nie są jedynymi cząstkami, umożliwiającymi skuteczne oddzielenie poszczególnych kropeł od środowiska: wykorzystywane są surfaktanty pozbawione fluoru lub też np. amfifilowe nanocząstki ciała stałego, osadzające się na powierzchni międzyfazowej, tworzące tzw. „*pickering emulsions*”<sup>28</sup>. Emulsje stabilizowane cząstkami stałymi cechują się ograniczonym transportem masy pomiędzy kroplami emulsji w porównaniu do surfaktantów.<sup>29</sup>

Mimo iż krople w układach mikroprzepływowych czy w emulsjach generowanych w takich układach są traktowane jako osobne reaktory chemiczne, nie są to układy całkowicie zamknięte. Wspomniano tu już o przepływie masy pomiędzy kroplami a fazą ciągłą na skutek dyfuzji gazu do kropeł, jednak nie jest to jedyna forma transportu międzyfazowego w wielofazowych układach mikroprzepływowych. Z punktu widzenia mikroprzepływów istotne procesy starzenia emulsji to koalescencja i dojrzewanie Ostwalda. Dojrzewanie Ostwalda polega na transporcie masy pomiędzy kroplami emulsji z kropeł mniejszych do większych, ze względu na energetycznie korzystny stosunek powierzchni do objętości dużych kropeł. Dojrzewaniu Ostwalda można skutecznie zapobiegać przez wykorzystanie surfaktantów do stabilizacji emulsji i przez generowanie monodispersyjnych emulsji, co nie jest trudne w przypadku technik mikroprzepływowych (więcej o emulsyfikacji w rozdziale 1.1.3.). Koalescencja kropeł także może być ograniczona użyciem odpowiedniego surfaktantu: w przypadku dwóch kropeł nieotoczonych surfaktantem nie ma przeszkód sterycznych przy zetknięciu kropeł, a im większa powierzchnia styku kropeł, tym większa szansa na ich koalescencję<sup>30,31</sup>. Ponadto, przed zetknięciem się dwóch kropeł z przestrzeni między tymi kroplami musi zostać usunięta faza ciągła, co jest utrudnione w przypadku obecności surfaktantu na powierzchni kropeł: płynące w swoim kierunku krople mają nierównomiernie rozłożony na powierzchni surfaktant (mniejsza liczba cząstek od czoła kropli), a powstały gradient

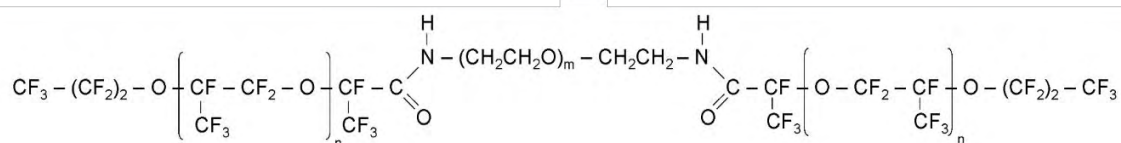
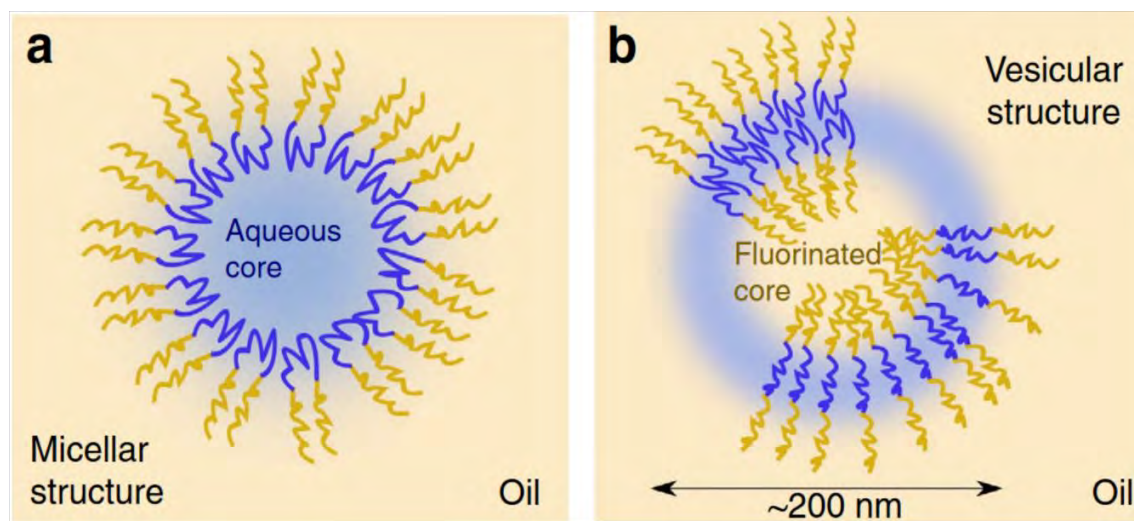
stężenia surfaktantu wywołuje efekt Marangoniego, utrudniający usunięcie filmu fazy ciągłej z pomiędzy kropli i wydłużający czas koalescencji (Ryc. 2)<sup>32</sup>.



Ryc. 2. Efekt Marangoniego i stabilizacja kropli przez surfaktant. a) Ruch płynów w kropli i otaczającym ją płynie jest wskazany przez czarne strzałki. b) W obecności surfaktantu przepływ płynu powoduje nierównomierne rozłożenie cząstek surfaktantu na powierzchni kropli, co pociąga za sobą opór wobec przepływu płynu wokół kropli (czerwone strzałki). c) W przypadku kolizji kropli następuje usunięcie fazy ciągłej pomiędzy kroplami. d) W obecności surfaktantów opór (czerwone strzałki) spowodowany przez gradient stężenia surfaktantu na powierzchni kropli wydłuża czas usuwania fazy ciągłej pomiędzy kroplami, co stabilizuje krople i utrudnia koalescencję. Rycina pochodzi z artykułu J. C. Baret<sup>23</sup>.

Nawet w przypadku zastosowania surfaktantu w monodispersyjnej emulsji kropli i przy minimalnych ruchach fazy ciągłej może zachodzić transport masy pomiędzy kroplami. Taki transport odbywa się poprzez mikroskopijne kropelki fazy rozproszonej (pęcherzyki) lub przez micelle, które odrywają się od większych kropli i są stabilizowane przez surfaktant (Ryc. 3)<sup>33</sup>. Wykazano, że transport masy przez kropelki może zachodzić także w kroplach emulsji podwójnych<sup>34</sup>, a także że emulsje stabilizowane cząstkami stałymi wykazują mniejszy transport przez kropelki, o czym wspomniano wyżej. Co ciekawe, transport między kroplami emulsji podwójnych może być skutecznie zahamowany, jeżeli zewnętrzna faza emulsji podwójnej (skorupa, ang. „shell”) ma mniejszą grubość niż średnica powstających micel<sup>34</sup>. Kropelki odrywają się od dużych kropli na skutek ruchu fazy ciągłej i mogą ze sobą przenosić cząstki hydrofilowe, takie jak antybiotyki, które mają małą rozpuszczalność w fazie ciągłej. Transport między kroplami poprzez kropelki lub micelle musi być uwzględniony na etapie planowania eksperymentów. Opisywane tu kropelki mają zbyt małe wymiary, by przenosić

najczęściej wykorzystywane w badaniach bakterie *E. coli*, zatem w eksperymentach opisanych w całej niniejszej pracy zakłada się, że transport bakterii między kroplami emulsji może zachodzić jedynie na skutek koalescencji kropeł.



Ryc. 3. Powyżej: Hipotetyczne struktury umożliwiające transport wody i cząstek hydrofilowych pomiędzy kroplami wody w emulsji. a) Micele. Micellar structure – struktura micelarna, aqueous core – wodny rdzeń, oil – olej. b) Pęcherzyki z fluorowanym rdzeniem i wodną osłonką. Woda jest przeniknięta na wylot przez cząstki surfaktantu lub surfaktant tworzy dwuwarstwę. Vesicular structure – struktura pęcherzykowa, fluorinated core – fluorowany rdzeń, oil – olej. Gdyby transport między kroplami zachodził przez micle, tempo transportu wody powinno zależeć od stężenia surfaktantu, co nie jest zgodne z obliczeniami na podstawie eksperymentów przeprowadzonych przez autorów badania. Rycina pochodzi z pracy Grunera i współpracowników<sup>33</sup>. Poniżej: wzór strukturalny surfaktantu używanego w pracy Grunera i współpracowników<sup>33</sup> i w niniejszej rozprawie, za: Holtze i współpracownicy<sup>35</sup>.

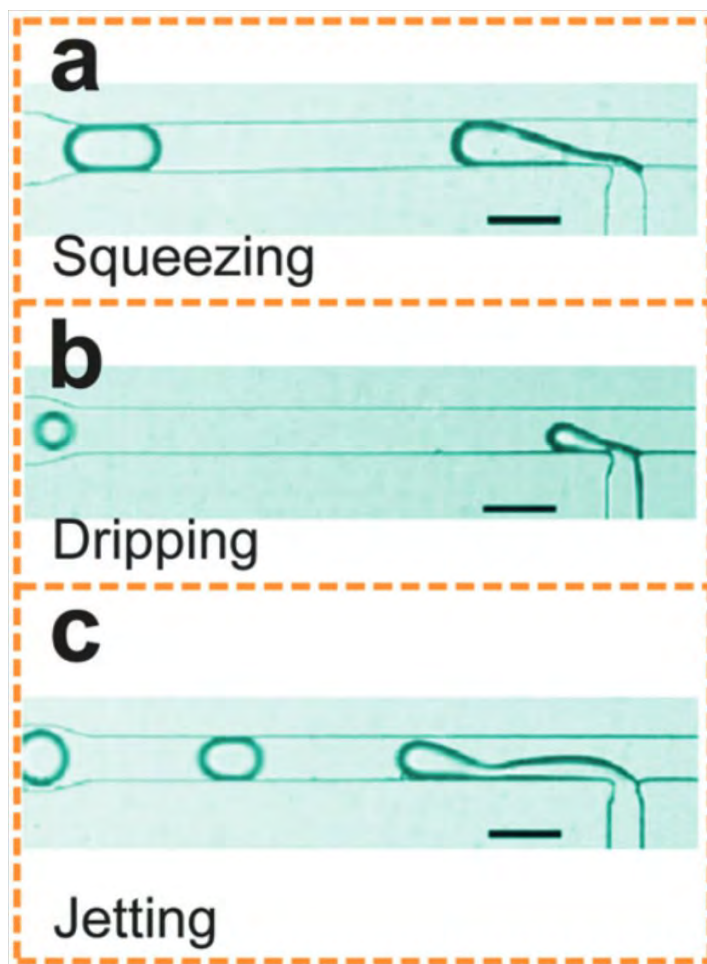
### 1.1.3. Generacja kropeł

Aby uzyskać możliwie powtarzalne warunki reakcji między reaktorami kroplowymi, ich objętość musi być możliwie zbliżona. Wysoka polidispersja (wysoki rozkład objętości kropeł emulsji) oznacza inne warunki mieszania w kroplach, inne warunki wymiany ciepła i masy (np. tlenu) między kroplami a fazą ciągłą, zmniejszenie stabilności emulsji (dojrzewanie Ostwalda), problemy z manipulacją kroplami (krople o różnych wymiarach będą się różnie zachowywać w kanałach i modułach mikroprzepływowych). Poza tym utrudnione staje się interpretacja eksperymentów tzw. „cyfrowej biologii”, w których w kroplach przechowuje się co najwyżej jedną cząstkę lub komórkę – wysoki rozkład



objętości kropeł emulsji nie gwarantuje rozkładu cząstek w emulsji zgodnego z rozkładem Poissona (więcej o cyfrowej biologii w rozdziale 1.3.1.).

Najczęściej do generacji kropeł korzysta się z technik pasywnych, tj. takich, w których oderwanie kropeł od głównej objętości fazy rozproszonej jest wymuszone przepływami płynów w specjalnie dobranych geometriach kanałów. Najprostszą geometrią do emulsyfikacji w mikroprzepływach jest złącze trójdzielne typu T (ang. T-junction). W takiej geometrii kanał doprowadzający fazę rozproszoną styka się prostopadle z kanałem doprowadzającym fazę ciągłą do złącza i odbierającym powstałe ze złącza krople. Złącze T zostało zademonstrowane w tej aplikacji przez Thorsena *et al.*<sup>36</sup> i opisane bardzo dokładnie z punktu widzenia mechaniki płynów<sup>37</sup>. Pokrótkie, mechanizm generacji kropeł w złączu T zależy od wartości liczby kapilarnej  $Ca$  w złączu. Ponieważ w danym układzie eksperymentalnym mamy zwykle do czynienia z konkretnym zestawem substancji (płynów i surfaktantów) oraz z konkretną geometrią, zmiany wartości liczby kapilarnej przy stałości wspomnianych czynników utożsamiane są często ze zmianą prędkości przepływu płynów w układzie. W przypadku niskich wartości liczby kapilarnej porcja fazy rozproszonej jest dostarczana do złącza, co owocuje zablokowaniem złącza dla płynącego bez przerwy oleju. Prowadzi to do zwiększenia ciśnienia po stronie kanału doprowadzającego olej, co skutkuje deformacją fazy rozproszonej (ściśnięciem, ang. *squeezing*) a w końcu oderwaniem kropli od głównej objętości fazy rozproszonej<sup>37</sup> (Ryc. 4a). Dla wyższych wartości liczby kapilarnej znaczące stają się siły ścinające, a krople fazy rozproszonej odrywane są przez fazę ciągłą jeszcze zanim zablokują złącze. Mamy wtedy do czynienia z tzw. kapaniem (ang. *dripping*) (Ryc. 4b). W przypadku wysokich wartości liczby kapilarnej siły ścinające są dominujące, faza rozproszona jest rozrywana nie w złączu, ale dopiero w kanale odprowadzającym (Ryc. 4c). Taki mechanizm generacji kropeł to odrywanie strumieniowe (ang. *jetting*). Krople uzyskane przez *squeezing* są większe niż średnica kanału i monodispersyjne, krople uzyskane przez *dripping* są mniejsze niż średnica kanału i monodispersyjne, krople uzyskane przez *jetting* są polidispersyjne<sup>38</sup>.



Ryc. 4. Mechanizmy generacji kropeł w geometrii złącza T (ang. *T-junction*). a) Ściskanie, ang. *squeezing* – przy małych wartościach liczby kapilarnej kropla wypełnia cały kanał. b) Kapanie, ang. *dripping* – przy pośrednich wartościach liczby kapilarnej kropla nie wypełnia całego kanału, jest wcześniej odrywana od reszty objętości fazy rozproszonej. c) Odrywanie strumieniowe, ang. *jetting* – przy dużych wartościach liczby kapilarnej faza rozproszona wchodzi do kanału i dopiero tam następuje odrywanie kropeł. Rycina pochodzi z pracy Zagnoniego *et al.*<sup>39</sup> po adaptacji przez Zhu i Wang<sup>38</sup>.

Poza złączem T istnieje wiele innych geometrii do pasywnej generacji kropeł. Poza modyfikacjami złącza T, takimi jak złącze Y<sup>40,41</sup>, są to geometrie koncentrujące przepływ fazy rozproszonej (ang. *flow focusing*)<sup>42–44</sup>, geometrie umożliwiające wspólny przepływ dwóch faz w tym samym kierunku (ang. *co-flow*)<sup>45,46</sup>, czy geometrie wymuszające emulsyfikację nawet bez dodatkowego przepływu fazy ciągłej oparte na kanałach mikroprzepływowych (ang. *microfluidic step emulsification, MSE*)<sup>47</sup> czy na porowatych membranach (ang. *membrane emulsification*)<sup>48</sup>.

#### 1.1.4. Emulsyfikacja wymuszona geometrią kanału

Wszystkie metody oparte na wspomnianych powyżej geometriach wymagają ruchu fazy ciągłej i rozproszonej. Wyjątkami są emulsyfikacja membranowa i MSE. W emulsyfikacji

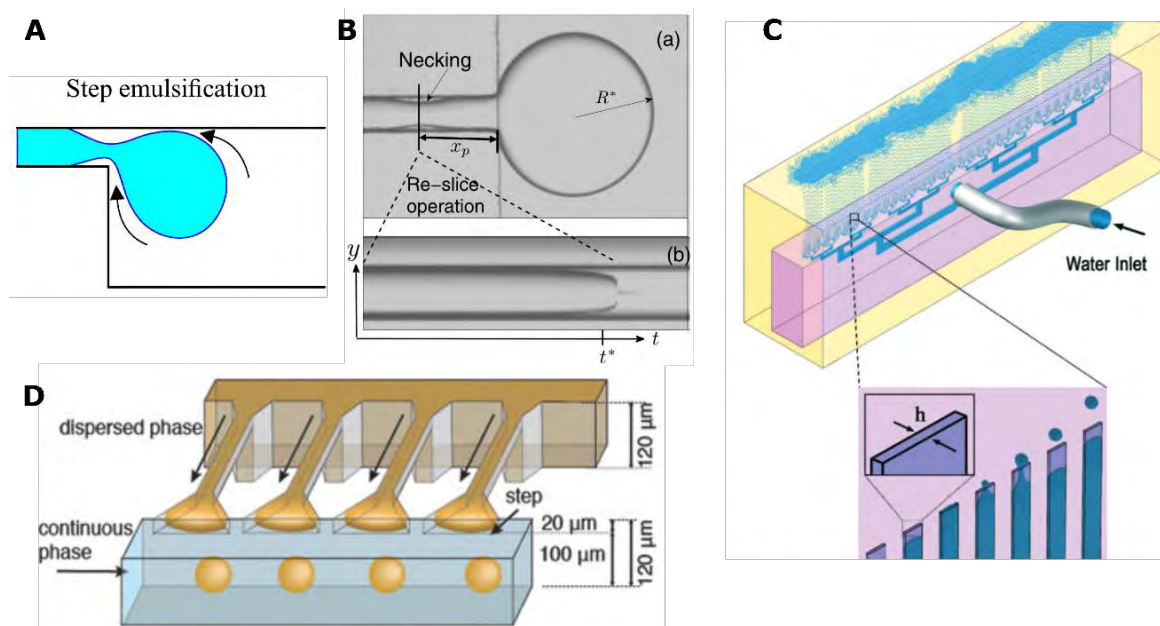


membranowej fazy rozproszona jest przepychana przez porowatą membranę. Krzywizna fazy rozproszonej zwiększa się w miarę przechodzenia tej fazy przez pory, aż do momentu w którym kropla odrywa się od reszty fazy rozproszonej<sup>49</sup>. W MSE mamy do czynienia z podobnym mechanizmem, w tym przypadku faza rozproszona przechodzi z płytkiego kanału mikroprzepływowego do głębokiego zbiornika<sup>49,50</sup>.

MSE nie jest nowym konceptem, a raczej odkryciem na nowo znanego z inżynierii chemicznej procesu barbotażu, tj. napowietrzania reaktora przy pomocy gazu wtłaczanego przez mały otwór zanurzony pod powierzchnią tego płynu. Półempiryczne modele, omawiające rozmiar oderwanego od otworu bąbla powietrza i częstotliwość powstawania bąbli, pojawiły się w literaturze już w latach 60. XX stulecia<sup>51,52</sup>, a być może jeszcze wcześniej. MSE jest jednak na tyle atrakcyjną metodą produkcji kropeł, iż istotne stało się dokładne opisanie tego procesu już po roku 2000<sup>49,50,53–55</sup>.

Pierwsze urządzenie mikroprzepływowe oparte na MSE zaproponowali Kawakatsu i współpracownicy<sup>47</sup>, niedługo po nich Sugiura i współpracownicy<sup>53</sup>.

W MSE przejście pomiędzy płytkim kanałem a głębokim zbiornikiem nazywane jest progim (ang. step). Część fazy rozproszonej, która przekracza próg w kierunku zbiornika, nazywana jest językiem (ang. tongue). Język, opuszczający płytki kanał i pokonujący próg, stopniowo powiększa się, co skutkuje zmniejszaniem krzywizny języka (Ryc. 5). Spadek krzywizny w języku powoduje wzrost krzywizny fazy rozproszonej w płytkim kanale, z którego dopływa faza rozproszona. Miejsce wzrostu krzywizny w fazie rozproszonej występuje blisko progu i jest nazywane przewężeniem (lub szyjką, ang. neck) (Ryc. 5), gdyż obserwowane z góry przypomina zwężenie pojawiające się w fazie rozproszonej doprowadzanej przez kanał<sup>50</sup>. Powstawanie przewężenia powoduje spadek ciśnienia fazy ciągłej wokół przewężenia, co powoduje ruch wsteczny płynu ze zbiornika do przewężenia, co napędza zwężanie się przewężenia.<sup>49</sup> Krzywizna fazy rozproszonej jest ograniczona, tj. promień krzywizny w kanale nie może być większy niż połowa wysokości lub szerokości tego kanału, co sprawia, że w trakcie ciągłego dostarczania fazy rozproszonej do progu w pewnym momencie ciśnienie Laplace'a w szyjce nie może być wyrównane przez spadające ciśnienie wewnątrz rosnącego balonu. W tym momencie faza rozproszona pęka w miejscu przewężenia, zaś balon w zbiorniku staje się osobną kroplą.



Ryc. 5. A) Schemat emulsyfikacji wymuszonej geometrią (ang. *microfluidic step emulsification*, MSE). Widok od boku. Faza rozproszona (niebieska) przechodzi nad progiem do szerokiego i głębokiego zbiornika wypełnionego fazą ciągłą. Faza rozproszona rozszerza się w komorze, zaś zwęża w kanale wlotowym. Zwężenie fazy rozproszonej powoduje spadek ciśnienia w kanale i przepływ wsteczny fazy ciągłej zaznaczony na schemacie strzałkami. Rycina pochodzi z pracy Pita i współpracowników<sup>56</sup>. B) a) zdjęcie fazy ciągłej wchodzącej do zbiornika. Zaznaczane jest miejsce formowania przewężenia (ang. *necking*). b) Kymograf przedstawiający linię zaznaczoną w (a), zmieniającą się w czasie. W momencie  $t^*$ , w którym formująca się kropla osiąga promień  $R^*$  następuje separacja fazy rozproszonej od ścianki kanału i formuje się przewężenie. Rycina pochodzi z pracy Mittala i współpracowników<sup>50</sup>. C) Schemat zwielokrotnionej dyszy do MSE z grawitacyjnym oczyszczaniem dysz z powstających kropelek. Widoczna wysoka gęstość upakowania powstającej emulsji. Za: Stolovicki i współpracownicy<sup>57</sup>. D) schemat urządzenia do MSE ze zwielokrotnioną dyszą. Dispersed phase – faza rozproszona, step – próg, continuous phase – faza ciągła. Za: Ofner i współpracownicy<sup>58</sup>.

Powyżej pewnej krytycznej wartości liczby kapilarnej ( $Ca$ ), reżim emulsyfikacji MSE przechodzi w reżim strumieniowy (ang. *jetting*), co oznacza zanik emulsyfikacji<sup>50</sup>. Wartość liczby kapilarnej rośnie wraz ze wzrostem prędkości przepływu, co sprawia, że cechą MSE jest niska częstotliwość generacji kropelek w porównaniu do innych metod emulsyfikacji, np. w porównaniu do modułów opartych na koncentracji przepływu (*flow focusing*). Z drugiej strony, moduły do MSE można stosunkowo łatwo paralelizować w celu zwiększenia całkowitej częstotliwości generacji kropelek przez urządzenie<sup>55</sup>. Techniki emulsyfikacji oparte na pasywnym mechanizmie MSE cieszyły się w ostatnich latach dużą popularnością wśród naukowców na całym świecie, co doprowadziło do znacznych postępów w tej dziedzinie.

Emulsje wygenerowane na progu cechują się większą monodispersją niż emulsje otrzymane przy pomocy np. złączy typu „T” czy koncentracji przepływu, co jest skutkiem niemal identycznych warunków fizycznych generowania kolejnych kropeł na progu<sup>55</sup>. Jednakże, jeżeli próg zostanie zablokowany przez powstającą emulsję, kolejne generowane krople wykażą większe zróżnicowanie w rozmiarach. Aby rozwiązać ten problem, zaproponowano szereg technik: przepływ fazy ciągłej w zbiorniku<sup>50</sup>, zbiornik o rosnącej głębokości, który wykorzystuje tendencję kropeł do zachowania sferycznego kształtu aby oddalić nowe krople od progu<sup>59</sup>, wykorzystanie siły wyporu do oddalenia kropeł od progu<sup>57</sup>, wykorzystanie siły wyporu w kombinacji z siłą odśrodkową<sup>60</sup>, przyciąganie magnetyczne rozproszonej fazy ferrofluidu ponad progiem<sup>61</sup>.

Najczęściej układy mikroprzepływowe są zorientowane poziomo, co sprawia, że są kompatybilne jedynie z metodami oczyszczania progu z kropeł powstałej emulsji opartych na (1) przepłukiwaniu zbiornika ruchem fazy ciągłej<sup>50</sup>, (2) zmiennej głębokości zbiornika<sup>59</sup>, i (3) usuwaniu kropeł ferrofluidu przy pomocy magnesu<sup>61</sup>. Ogólnie w technikach mikroprzepływowych pożądana jest jak największa redukcja ilości użytkowanego do pracy sprzętu, w tym kontekście zmienna głębokość zbiornika przewyższa zalety przepłukiwania (wymaga dodatkowego źródła ciśnienia) czy metod opartych na magnetyzmie. Niestety, systemy wykorzystujące zmienną głębokość zbiornika cechuje ograniczona prędkość przepływu i częstotliwość generacji kropeł, ponieważ samodzielna ucieczka kropeł z progu jest raczej powolna.

#### **1.1.5. Opływanie kropeł przez fazę ciągłą w kanałach o prostokątnym przekroju poprzecznym**

Rozważając proces generacji kropeł w układach mikroprzepływowych, należy wziąć pod uwagę podstawową cechę geometrii kanałów mikroprzepływowych, wynikającą z ograniczeń technicznych produkcji tych kanałów: kanały mikroprzepływowe mają z reguły przekrój poprzeczny prostokątny (najczęściej kwadratowy). Kanały formuje się na różne sposoby, najczęstszą metodą jest fotolitografia<sup>62</sup>, wykorzystuje się także innego rodzaju litografie (jonowa<sup>63</sup>, elektronowa<sup>64</sup>), poza tym używa się sterowanych komputerowo frezarek<sup>65</sup>. Techniki litograficzne pozwalają na otrzymanie kanału o płaskim dnie i zaokrąglonych krawędziach pomiędzy dnem a ściankami, zaś frezowanie skutkuje kanałami o niemal prostokątnym przekroju poprzecznym. Po użyciu

którejkolwiek ze wspomnianych technik produkcji kanałów, otrzymuje się trzy z czterech boków kanału: dno i dwie ścianki boczne. Zamknięcie kanału z góry płytką powoduje powstanie kątów prostych pomiędzy płytką a ściankami kanału. Można otrzymywać okrągłe w przekroju poprzecznym kanały np. odpowiednio frezując płytkę, jednak wiąże się to z koniecznością uciążliwego dopasowywania do siebie dwóch płytek z wyciętymi kanałami (co nie jest problemem w przypadku gdy kanały zamyka się płaską płytką bez wyciętych kanałów – taka płytka jest zasadniczo taka sama na całej powierzchni). Innym sposobem na pracę z okrągłymi kanałami jest wykorzystanie zestawu szklanych kapilar, jednak i w tym przypadku niezbędne jest precyzyjne dopasowanie do siebie wszystkich elementów układu<sup>66</sup>, w dodatku kapilary są mniej elastyczne jeżeli chodzi o zakres ich zastosowań – układy oparte na kapilarach służą głównie do produkcji kropeł, nie do manipulacji nimi. Aby otrzymać okrągłe kanały, można także wykorzystać przewody polimerowe jako kanały mikroprzepływowe, zaś moduły służące do generacji kropeł frezować w niewielkich kawałkach („kostkach”) sztywnego polimeru, tak by frez poruszał się tylko w osi pionowej podczas frezowania (tak by uzyskać okrągłe kanały w kostkach). Wykorzystanie przewodów do transportu płynów jest szybsze niż produkcja układu mikroprzepływowego, jednak wybór modułów mikroprzepływowych opartych na kostkach teflonowych kompatybilnych z tą techniką ograniczają się na razie do modułu produkującego duże krople<sup>25</sup> i zaworu<sup>27</sup>. Niemniej najpowszechniej występującym kształtem przekroju poprzecznego kanałów mikroprzepływowych jest prostokąt lub kształt do niego zbliżony.

Ze względu na napięcie powierzchniowe krople dążą do kształtu sferycznego. Jest to tym bardziej widoczne, im większy jest stosunek powierzchni do objętości kropli, a zatem gdy kropla ma małą średnicę, tak jak krople wykorzystywane w technikach mikroprzepływowych. Gdy kropla zostanie ściśnięta, np. w kanale mikroprzepływowym, także stara się zachować sferyczność i nie wypełnia całkowicie światła kanału<sup>67</sup>. W kanale o prostokątnym (najczęstszym) przekroju poprzecznym „kąty” tego kanału pozostają wypełnione fazą ciągłą i tworzą tzw. rynsztoki (ang. gutter). Obecność rynsztoków oznacza, że faza ciągła może opływać kroplę ściśniętą w kanale, co ma znaczące przełożenie na problemy techniczne związane z operacjami na kroplach, np. z pasywną generacją emulsji, gdzie przepływ oleju powoduje różny sposób działania dysz emulsyfikujących mających kontakt z dużym strumieniem przepływającego rynsztokiem oleju i dysz oddalonych od rynsztoków. Z drugiej strony przepływ fazy ciągłej przez

rynsztoki umożliwia zaprojektowanie pułapek hydrodynamicznych do chwytania kropeł, o czym niżej.

### 1.1.6. Szeregowe rozcieńczanie próbki

Przygotowanie szeregu rozcieńczeń próbki jest jedną z najczęściej wykonywanych i jedną z najważniejszych czynności laboratoryjnych w chemii analitycznej, biochemii i biologii eksperymentalnej. Przykładowo, oznaczenie minimalnego stężenia hamującego antybiotyku (MIC) wymaga szeregu, typowo dwukrotnego, rozcieńczeń tego antybiotyku<sup>68,69</sup>. Opisanie kinetyki enzymu czy jego inhibitora wymaga szeregu rozcieńczeń reagentów<sup>70</sup>. W zoptymalizowanej wersji cyfrowego PCR (dPCR), która wykorzystuje algorytmy do zredukowania liczby kompartmentów potrzebnych do oznaczeń zawartości DNA w próbce, niezbędna jest seria rozcieńczeń docelowego DNA w próbce<sup>71,72</sup>.

W wielu procedurach eksperymentów z zakresu biochemii czy chemii analitycznej istotne są precyzja i dokładność przygotowania szeregu rozcieńczeń. Precyzja pomiaru oznacza zgodność między wynikami kolejnych pomiarów, zaś dokładność pomiaru określa odchylenie wyników od prawdziwej wartości mierzonej. Pomiar dokładny, ale nieprecyzyjny należy powtórzyć wielokrotnie w celu uzyskania wiarygodnej informacji na temat wartości szukanej, natomiast pomiar precyzyjny, ale niedokładny zaowocuje nieprawdziwą wartością szukanego parametru. W przypadku szeregowego rozcieńczania próbek należy rozważyć propagację błędu pomiarowego przy każdym kolejnym rozcieńczeniu – błąd pomiaru akceptowalny przy pierwszym rozcieńczeniu może urosnąć do nieakceptowalnego poziomu przy kolejnych rozcieńczeniach z szeregu. Przykładowo, ocena parametrów kinetycznych enzymu zależy bezpośrednio od precyzji szeregu rozcieńczeń reagentów<sup>73</sup>.

#### 1.1.6.1. Rozcieńczanie w układach jednofazowych

Szeregi rozcieńczeń były już demonstrowane w jednofazowych układach mikroprzepływowych<sup>74</sup>. Jak wspomniano w podrozdziale 1.1., jedną z pierwszych aplikacji systemów mikroprzepływowych była generacja liniowego gradientu substancji<sup>19</sup>. Paegel *et al.*<sup>75</sup> opracowali system, w którym korzystano z pompowania perystaltycznego wokół pierścienia mieszającego, aby odmierzać i mieszać kolejne

porcje rozcieńczalnika. System ten pozwolił na przygotowanie teoretycznie nieskończonej liczby rozcieńczeń w szeregu z niemal doskonałą liniowością rozcieńczeń:  $R^2=0.999$ , gdzie  $R^2$  opisuje liniowość wykresu logarytmicznego intensywności fluorescencji w odniesieniu do numeru rozcieńczenia w szeregu. Jednakże w tym systemie wszystkie pośrednie rozcieńczenia z szeregu były niedostępne dla eksperymentatora, ponieważ zachowywana była tylko próbka w stężeniu przygotowanym w ostatnim kroku rozcieńczania. Współczynnik rozcieńczenia, definiowany jako stosunek stężeń dwóch kolejnych próbek, wynosił w tym układzie pomiędzy 5 a 25, w zależności od geometrii urządzenia. Ahrar *et al.*<sup>76</sup> zademonstrowali jednofazowy system mikroprzepływowy, który może rozcieńczać próbkę bardzo precyzyjnie i dokładnie dwukrotnie, zachowując przy tym pośrednie stężenia próbki z szeregu rozcieńczeń. Opisana liniowość rozcieńczeń wahała się pomiędzy  $R^2=0.995$  a  $R^2=0.997$  w trzech próbach. System opisany przez Ahrara *et al.* wymagał do pracy wielu miniaturowych zaworów: 26 zaworów pneumatycznych zostało wykorzystanych do przygotowania siedmiu powtórzeń rozcieńczenia w szeregu, zaś do przygotowania większej liczby powtórzeń należałoby wykorzystać więcej zaworów. Ponadto, zaprezentowany system nie pozwalał na łatwy transfer rozcieńczonych próbek poza układ mikroprzepływowy, co pozwoliłoby na wykonywanie dalszych operacji na płynach, np. na emulsyfikację próbek.

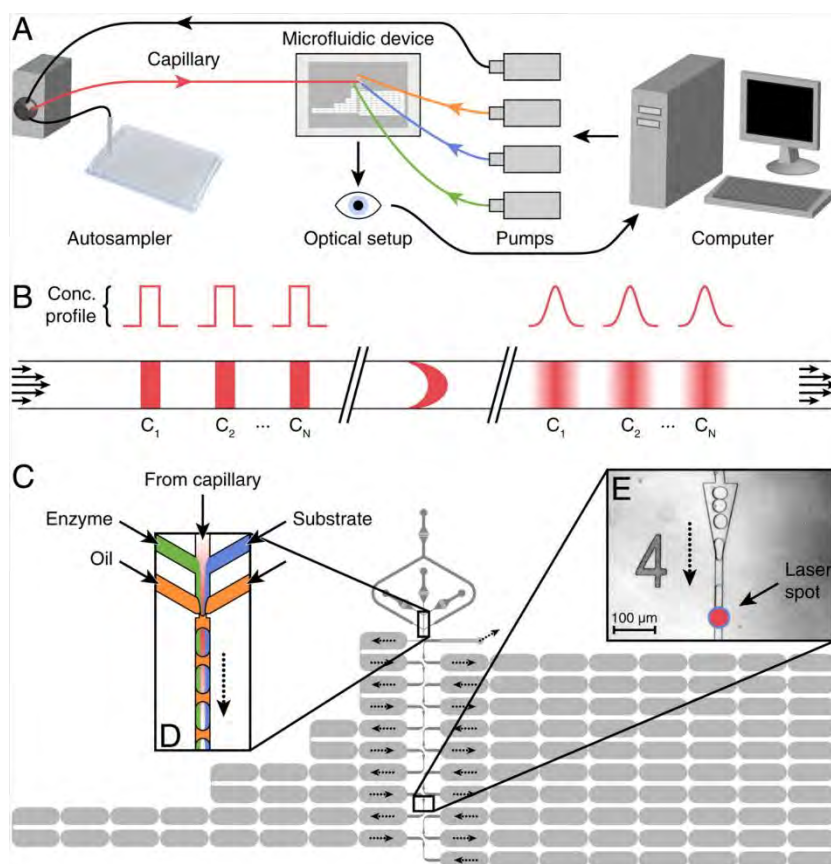
### 1.1.6.2. Rozcieńczanie w układach dwu- i wielofazowych

W przeciwieństwie do mikroprzepływowych układów jednofazowych, układy wielofazowe (kropłowe) pozwalają na manipulowanie bardzo małymi objętościami próbek z dużą dozą elastyczności (ruchem kropeł można skutecznie zarządzać)<sup>77</sup>. Ponadto, mikroprzepływowe układy wielofazowe umożliwiają stosunkowo prosty transfer kropeł z próbkami z układów do dalszych analiz. Te cechy zainicjowały rozwój wielu układów kropłowych, służących do generacji szeregów rozcieńczeń.

Można wyróżnić kilka podstawowych podejść do zagadnienia uzyskiwania rozcieńczeń w kropłach. Jednym z nich jest rozcieńczanie próbki opierające się na rozproszeniu Taylora-Arisa. Do długiej kropli płynącej przez główny kanał wstrzykiwana jest z dużą prędkością niewielka objętość próbki z bocznego kanału. W trakcie przepływu stężona miejscowo próbka ulega rozproszeniu w całej długości dużej kropli, tak, że gdyby sporządzić wykres stężenia próbki w osi podłużnej kropli, widoczny byłby rozkład zbliżony do normalnego. Emulsyfikacja takiej długiej kropli np. przy użyciu koncentracji

przepływu prowadzi do generacji dużej liczby kropeł o zmiennym stężeniu próbki, przykładowo 10 000 tysięcy kropeł przypadających na jedno oznaczenie inhibicji enzymatycznej zademonstrowanych przez Millera i współpracowników<sup>78</sup> (Ryc. 6). Inną metodą generowania szeregu rozcieńczeń jest kontrolowana zmiana objętości kropeł rozcieńczalnika i próbki, co zostało wykorzystane np. przez Churskiego *et al.*<sup>79</sup>. Możliwe jest także dodawanie małych i różnych objętości próbki do przepływających przez kanał kropeł<sup>80</sup> a także zaciąganie kropeł próbki o różnym stężeniu z płytki wielodołkowej – w tym przypadku trudno uzyskać krople mniejsze niż kilkaset nanolitów. Inną rozpowszechnioną metodą szeregowego rozcieńczania próbki oparta jest na unieruchomionej w pułapce hydrodynamicznej kropli z próbką, do której dostarczany jest szereg mniejszych kropeł rozcieńczalnika<sup>81–83</sup>. Małe krople kolejno łączą się z unieruchomioną kroplą przez koalescencję, następuje wymieszanie próbki, następnie ze względu na naturę pułapki objętość połączonej kropli, odpowiadająca objętością dostarczonej małej kropli, odrywa się od unieruchomionej kropli, a do unieruchomionej kropli dostarczana jest kolejna mała kropla.

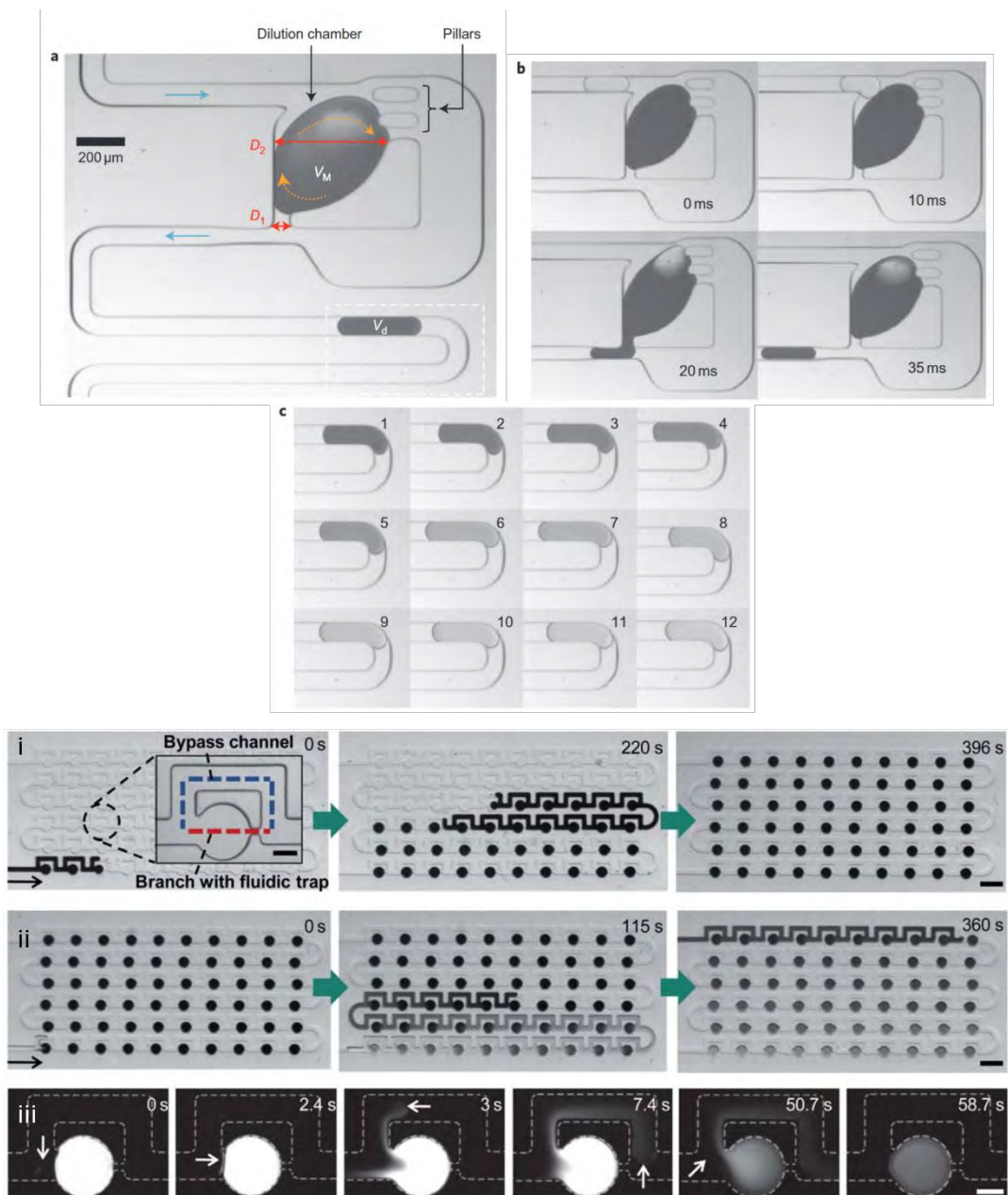




Ryc. 6. Schemat działania generatora gradientów stężeń w kroplach opartego o rozkład Taylora-Arisa. A) Schemat systemu. Autosampler – system pozycjonujący do pobierania próbek z płytek wielodołkowych, capillary – kapilara, microfluidic device – układ mikroprzepływowy, pumps – pompy, computer – komputer. Próbkę są pobierane przy pomocy autosamplera i przez kapilarę wtłaczane pompami do układu mikroprzepływowego, gdzie generowane są krople i zbierane są z nich sygnały optyczne. B) Rozkład Taylora-Arisa w kapilarze. Conc. profile – profil stężenia. Strzałki oznaczają ruch laminarny. Bezpośrednio po wstrzyknięciu badanej próbki do kapilary profil stężenia próbki wzdłuż osi długiej kapilary cechuje się nagłymi zmianami ze stężenia minimalnego do maksymalnego a następnie ze stężenia maksymalnego do minimalnego. Po przejściu przez kapilarę rozkład stężeń zaczyna przypominać krzywą Gaussa, stężenie gładko zmienia się z minimalnego do maksymalnego a potem z maksymalnego do minimalnego. C) Schemat całego układu mikroprzepływowego z zaznaczeniem miejsca generacji kropeł (D) i miejsc detekcji sygnałów z kropeł (E). Strzałki zaznaczają kierunek przepływu płynów, duże komory (szare) rozdzielone wąskimi przejściami to część służąca do inkubacji kropeł. D) Miejsce generacji kropeł. From capillary – z kapilary, enzyme – enzym, oil – olej, substrate – substrat. Gładkie profile stężeń potencjalnego inhibitora docierają do generatora kropeł, gdzie łączą się z enzymem i substratem. Wygenerowane krople mają stałe stężenie enzymu i substratu i zmienne stężenie badanej próbki. E) Przewężenie, w którym mieści się jednocześnie tylko jedna kropla, służy do detekcji sygnałów z kropeł. Rycina pochodzi z pracy Millera i współpracowników<sup>78</sup>.

### 1.1.6.3. Pułapki hydrodynamiczne i rozcieńczanie szeregowe

Powtarzającym się w wielu pracach rozwiązaniem, umożliwiającym prowadzenie rozcieńczeń szeregowych w układach mikroprzepływowych, jest wykorzystanie pułapek hydrodynamicznych<sup>81,82,84</sup>, tak jak wspomniano powyżej. Pułapki hydrodynamiczne oparte są na kanałach przetokowych (bypassach) i geometrii blokującej przepływ kropli, ale nie fazy ciągłej. Pułapki były wykorzystywane np. do łączenia kropeł<sup>85</sup> czy do unieruchamiania ich w zężającym się kanale<sup>84</sup>. Pierwsza pułapka na krople wykorzystana do szeregowego rozcieńczania próbki została pokazana przez Niu *et al.* w 2011 roku<sup>81</sup>. Składała się ona z przestrzeni na chwytaną kroplę otoczoną filarami zbudowanymi z tego samego materiału, co reszta układu. Za filarami znajdowała się przestrzeń tworząca bypass, przez który przepływała faza ciągła (Ryc. 7). W pułapkę łapana była „duża” kropla z próbką o rozmiarze 6 nl. Wyjście z pułapki było dużo węższe niż wejście do niej, co sprawiało, że schwykana kropla nie przechodziła przez wyjście ze względu na konieczność dużego zwiększenia swojej krzywizny w wąskim przejściu, co jest niekorzystne energetycznie. Faza ciągła nie przepychała kropli przez wyjście z pułapki ze względu na bypass, który sprawiał, że właściwie cały ruch fazy ciągłej był kierowany zamiast do popychania kropli w kierunku wyjścia z pułapki, to do bypassu o niskim oporze hydrodynamicznym. Następnie do pułapki kierowano mniejsze krople bez próbki o objętości 1 nl. Krople łączyły się ze sobą przez koalescencję. Stały ruch fazy ciągłej powodował stałe mieszanie wewnątrz połączonej kropli. Ponieważ objętość połączonej kropli przekroczyła objętość pułapki, kropla przedostawała się przez wąskie wyjście z pułapki mimo niekorzystnego energetycznie przejścia przez etap wysokiej krzywizny kropli. W efekcie część połączonej kropli znajdowała się w kanale za wyjściem z pułapki i obok wyjścia z bypassu. Faza ciągła z bypassu następnie odrywała objętość kropli znajdującej się za wyjściem z pułapki. Ta oderwana kropla zawierała rozcieńczoną próbkę, zaś jej objętość była zbliżona do objętości dostarczonej wcześniej do pułapki małej kropli bez próbki.



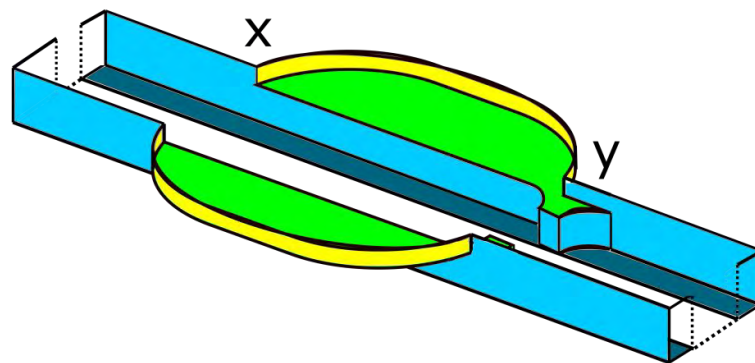
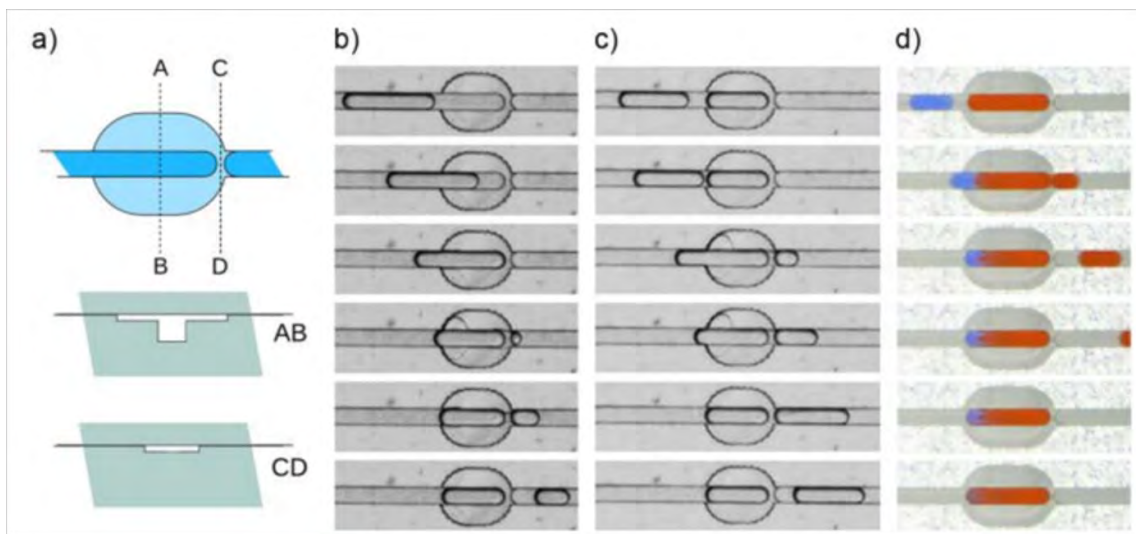
Ryc. 7. Powyżej: Rozcieńczalnik szeregowy oparty o pułapkę hydrodynamiczną. a) Schemat układu. Dilution chamber – komora rocieńczenia, pillars – kolumny. Kropla-matka ( $V_M$ ) z próbką jest chwyтана w pułapkę, która ma szeroki zbiornik ( $D_2$ ), ale wąskie wyjście ( $D_1$ ), które uniemożliwia kropli ucieczkę. Strzałki w kanale wskazują kierunek przepływu fazy ciągłej, strzałki w kropli-matce wskazują kierunek mieszania w tej kropli. Widoczna jest kropla-córka ( $V_d$ ) opuszczająca rozcieńczalnik. b) Operacja rozcieńczania. Mała kropla czystej wody zbliża się do kropli (0 ms), po czym krople się łączą (10 ms). Następuje mieszanie, zaś nadmiar objętości równy objętości kropli, która właśnie połączyła się z kroplą matką, opuszcza pułapkę przez wąskie wyjście (20 ms). Faza ciągła, płynąca przez bypass za kolumnami, odcina nadmiar kropli, który opuścił pułapkę (35 ms). c) Kolejne krople opuszczające rozcieńczalnik. Zdjęcia pochodzą z publikacji Niu *et al.*<sup>81</sup>. Poniżej: rozcieńczalnik ze statycznymi kroplami. Bypass channel – kanał przetokowy, Branch with fluidic trap – odnoga kanału z pułapką. I: Napełnianie szeregu pułapek próbką. Ii: Rozcieńczanie próbki przy pomocy jednej długiej kropli rozcieńczalnika. Iii: Dynamika rozcieńczania. Strzałki wskazują czoło kropli rozcieńczającej barwnik fluorescencyjny. Za: Sun i współpracownicy<sup>86</sup>.

Na tej podstawie powstał szereg podobnych rozwiązań, umożliwiających np. uzyskanie szeregu unieruchomionych kropeł o zmiennym stężeniu próbki<sup>87</sup> czy dużo bardziej kompaktową konstrukcję pułapek<sup>82</sup>. W systemach wykorzystujących takie pułapki precyzja rozcieńczeń jest limitowana przez niedoskonałe mieszanie w kropli powstałej z połączenia kropli próbki i kropli rozcieńczalnika. Problemem jest to, iż w większości opisywanych rozwiązań mieszanie takie trwa bardzo krótko, przez co nie jest powtarzalne. Ponadto, w systemach opisanych przez Sun *et al.*<sup>87</sup> i przez Derzsi *et al.*<sup>88</sup> krople z rozcieńczoną próbką były unieruchamiane w układach mikroprzepływowych bez możliwości ich transferu do dalszej analizy lub do wykorzystania w następnych operacjach na płynach, np. w emulsyfikacji. W dotychczas zademonstrowanych układach mikroprzepływowych, wykorzystujących pułapki hydrodynamiczne do uzyskania szeregu rozcieńczeń, uzyskanie powtarzalnego współczynnika rozcieńczeń wymaga istotnego nakładu pracy: współczynnik rozcieńczeń uzyskany po wymieszaniu kropli próbki z kroplą rozcieńczalnika w pułapce nie jest równy stosunkowi objętości kropeł próbki i rozcieńczalnika, co jest wynikiem niedoskonałego mieszania kropeł w pułapkach<sup>88</sup>. Współczynnik rozcieńczeń w takich systemach różni się również między różnymi pułapkami o tych samych założonych wymiarach, co jest efektem błędów w produkcji układów mikroprzepływowych: różne geometrie pułapek oznaczają różne warunki mieszania w łączonych kroplach, co pociąga za sobą różne współczynniki rozcieńczeń przy takich samych parametrach przepływu<sup>89</sup>. Precyzja w tych systemach była ograniczona do kilku procent (np. 5 % niepewność generacji objętości kropli rozcieńczalnika<sup>81</sup> nawet przy doskonałych warunkach mieszania) z powodu ograniczonej precyzji formowania kropeł w geometrii T-junction, lub z powodu bazowania na mechanizmie dyspersji Taylora-Arisa<sup>78</sup>.

W pracy Korczyka *et al.*<sup>82</sup> zaprezentowano dwa systemy służące do otrzymywania szeregowych rozcieńczeń próbki w kroplach. Obydwa te systemy były oparte na układach zawierających wiele pułapek hydrodynamicznych i pozwalały na łatwy transfer kropeł rozcieńczonej próbki z układów rozcieńczających do innych układów. Jeden z opisywanych systemów gwarantował mieszanie kropeł rozcieńczalnika i próbki jedynie w pułapce hydrodynamicznej, co skutkowało ograniczonym wymieszaniem zawartości kropeł. Drugi z omawianych systemów zapewniał dobre wymieszanie zawartości kropeł próbki i rozcieńczalnika w kanałach pomiędzy kolejnymi pułapkami, zwiększając precyzję rozcieńczeń. Mimo to wykorzystanie w obydwu systemach wielu pułapek (wielu



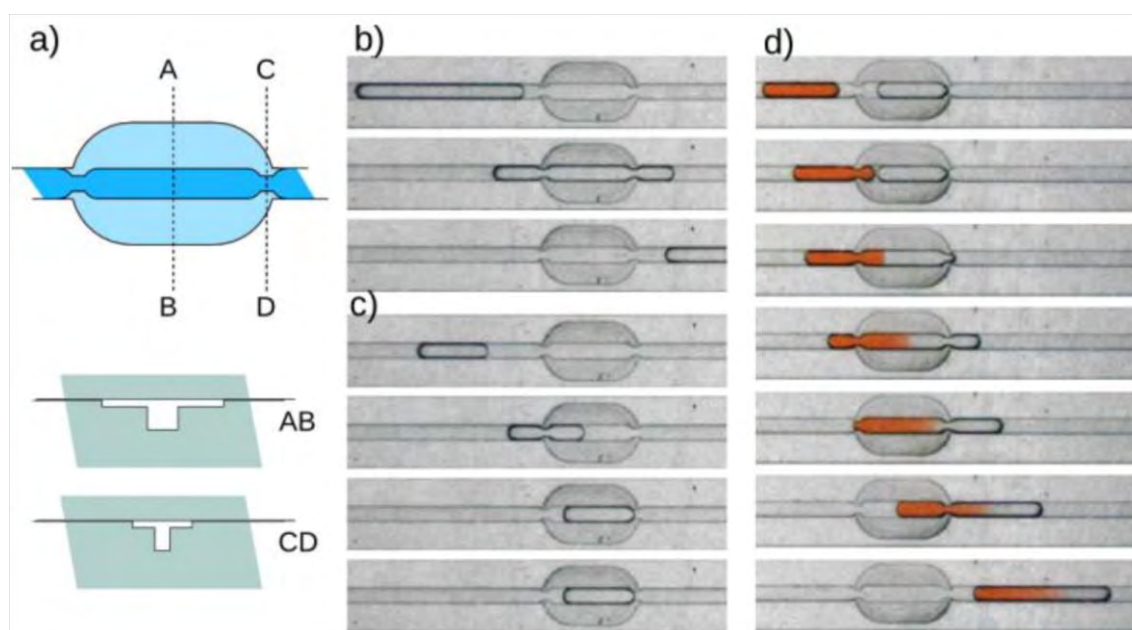
niedoskonałych kopii pułapki w pojedynczym układzie mikroprzepływowym) ograniczyło precyzję rozcieńczeń z uwagi na błędy w produkcji pułapek<sup>88</sup>. Pułapki Korczyka *et al.* to między innymi pułapki odmierzające (ang. *metering*) i łączące (ang. *merging*) krople. Pułapki te mają podobną konstrukcję: pułapki odmierzające składają się prostego kanału, w którym postawiona jest bariera znacznie zwężająca światło kanału (Ryc. 8). Przed barierą znajdują się dwa bypassy, tj. płytkie przestrzenie biegnące równoległe do długiego kanału i kończące się na barierze w głównym kanale. Pułapki łączące różnią się od pułapek odmierzających tym, że w barierze w głównym kanale pułapki łączącej znajduje się szpara (Ryc. 9).



Ryc. 8. a-d) Pułapka odmierzająca (ang. *metering trap*). a) schemat pułapki. Pułapka składa się z głębokiego kanału (niebieski) i płytkich bypassów (szary). Przekrój AB pokazuje ułożenie bypassów wokół pułapki, przekrój CD pokazuje lokalizację bariery do chwytania kropli. b) Kropla większa od pułapki wpływa do pułapki (przeptyw realizowany jest na zdjęciach z lewej do prawej). Gdy tylna część kropli zrówna się z początkiem bypassów, faza ciągła zaczyna płynąć bypassami, wraca do głównego kanału nad barierą, gdzie odcinany jest nadmiar objętości kropli. c-d) Schemat działania rozcieńczalnika. Kropla próbki łączy się z kroplą rozcieńczalnika w pułapce, następnie nadmiar kropli opuszcza pułapkę. Rycina pochodzi z pracy Korczyka i współpracowników<sup>82</sup>. Poniżej: rzut izometryczny na pułapkę

odmierzającą przekrojoną wzdłuż kanału. x – początek bypassów, y – koniec bypassów, bariera w kanale.

Pułapki odmierzające służą do precyzyjnego odcinania tylnej części kropli przepływającej przez te pułapki. Gdy przez pułapkę przepływa kropla większa niż objętość kanału pułapki pomiędzy początkiem bypassów a barierą, wpierw przepływa ona przez barierę bez zmian swojej objętości. Gdy tylna krawędź kropli zrówna się z początkiem bypassów, faza ciągła zaczyna płynąć przez bypassy zamiast popychać kroplę w dół kanału. Faza ciągła zwięza kroplę na barierze w kanale głównym i w końcu kropla pęka. W pułapce zostaje uwięziona kropla o objętości równej objętości pułapki, zaś nadmiar objętości kropli płynie dalej w dół kanału. Pułapka łącząca przepuszcza krople o objętościach większych niż objętość pułapki łączącej, zatrzymuje zaś krople o mniejszej objętości, co może zostać wykorzystane do zbliżenia do siebie dwóch kropli w kontrolowany sposób (Ryc. 9) i na przykład połączenia ich lub np. do uformowania dwuwarstwy lipidowej<sup>90</sup>.



Ryc. 9. Pułapka łącząca (ang. *merging trap*). a) schemat pułapki analogiczny do tego przedstawionego na ryc. 8. Na przekroju CD widać szparę w barierze. b) Kropla większa niż objętość pułapki przechodzi przez pułapkę. Przepływ płynów na zdjęciach realizowany od lewej do prawej. c) Kropla mniejsza od pułapki jest zatrzymywana w pułapce. d) Mała schwytna kropla czystej wody łączy się z małą kroplą barwnika. Uzyskana duża kropla opuszcza pułapkę, pułapka po tej operacji zostaje bez żadnej kropli. Rycina pochodzi z pracy Korczyka i współpracowników<sup>82</sup>.

## 1.2. Odporność na antybiotyki

Jak wspomniano we wstępie do niniejszej rozprawy, odporność na antybiotyki bakterii staje się coraz większym problemem w kontekście utrzymania zdrowia publicznego. Opracowanie nowego antybiotyku, który będzie skutecznie powstrzymywał wzrost bakterii i będzie bezpieczny dla pacjentów samo w sobie jest trudne, zaś fakt, iż już po kilku latach od wprowadzenia antybiotyku do praktyki klinicznej można znaleźć szczepy bakterii odporne na ten antybiotyk<sup>5</sup>, może być zgoła przygnębiający. Istnieje kilka definicji odporności na antybiotyk<sup>91</sup> w zależności od tego, czy uwzględnia się genotypowe czy fenotypowe cechy bakterii. Odporność może być różnicowana ze względu na jej pochodzenie (wrodzone czy nabyte) lub na jej rodzaj (wobec jednego antybiotyku, kilku antybiotyków lub odporność krzyżowa, czyli nabycie odporności na jeden antybiotyk po podaniu innego, podobnego antybiotyku)<sup>91</sup>. Na potrzeby niniejszej rozprawy autor przyjmuje definicję zakładającą odporność na co najmniej jeden antybiotyk, nabytą lub wrodzoną, przy identyfikacji jedynie fenotypu bakterii, tj. jeżeli antybiotyk w danym stężeniu nie zahamuje podziału bakterii, to znaczy że bakteria jest odporna na antybiotyk w tym stężeniu. Takie utylitarne podejście jest bliskie klinicznemu, tzn. bardziej istotny jest sam fakt odporności bakterii na antybiotyk niż źródło tej odporności. Ponadto, nie wnikanie w mechanizmy odporności współgra z charakterem badania przesiewowego metody, którą autor opracował podczas swoich badań i którą opisał w niniejszej rozprawie. Nie sposób jednak nie naświetlić tu choćby pobieżnie mechanizmów odporności na antybiotyki i dróg nabywania odporności przez bakterie.

Bakterie mogą się bronić przed antybiotykami na różne sposoby, a te różne sposoby mogą być skutkiem różnych, często pokrywających się, zmian genetycznych w danych bakteriach<sup>92,93</sup>. Antybiotyk oddziałujący na komórkę musi pokonać kilka etapów na drodze ze środowiska, w którym występuje komórka, do jej wnętrza. Wpierw cząstka antybiotyku musi dostać się do wnętrza komórki np. na drodze dyfuzji, co może być zablokowane przez zmianę w składzie chemicznym ściany czy błony komórkowej bakterii<sup>94</sup>. Ponadto, ściany komórkowe bakterii często zawierają pompy, które mogą wyrzucać na zewnątrz komórki cząstki antybiotyku, który już dostał się do wnętrza bakterii – na skutek zmian genetycznych liczba pomp na powierzchni komórki może się zmieniać, a co za tym idzie, może się zmieniać odporność na antybiotyk<sup>95</sup>. Jeżeli nawet antybiotyk dostanie się już do wnętrza komórki, może on zostać poddany obróbce (także



na zewnątrz komórki): cząstka antybiotyku może zostać zmodyfikowana lub zhydrolizowana przez enzymy bakteryjne<sup>96,97</sup>. Jeżeli nawet antybiotyk nie zostanie zmodyfikowany wewnątrz bakterii, modyfikacji może ulec cząstka docelowa tego antybiotyku<sup>98,99</sup>: sama cząstka może zostać zmieniona przez wymianę kluczowej grupy chemicznej, cząstka docelowa może zostać osłonięta przez dodatkową grupę chemiczną lub zmianie może ulec poziom ekspresji cząstki docelowej (tak w górę, jak w dół)<sup>100</sup>. W ostateczności komórka może uniknąć toksycznego dla niej efektu antybiotyku przez pominięcie reakcji chemicznej, w której wymagana jest cząstka zaatakowana przez antybiotyk lub przez zmianę metabolizmu i funkcjonowania komórki<sup>101</sup>.

Zmiany w kodzie genetycznym bakterii, powodujące uruchomienie opisanych powyżej mechanizmów odporności bakterii, mogą mieć różne rozmiary. Najmniejsze z tych zmian to mutacje punktowe *de novo*, które pojawiają się przed genami lub w samych genach<sup>94,96</sup>, mogą powodować zmiany w poziomie ekspresji genów lub zmiany strukturalne w kodowanych przez geny białka lub RNA. Zmiany na poziomie genomu obejmują przetasowania genów<sup>102</sup>, powodujące np. pojawienie się nisko ekspymowanego genu pod silnym promotorem (co zwiększa poziom ekspresji tego genu) czy zwielokrotnienie tego samego genu (co także zwiększa poziom ekspresji genu)<sup>98</sup>. Pozagenomowe zmiany obejmują składające się na horyzontalny transfer genów rekombinację genetyczną (nabycie genu i wbudowanie go w genom)<sup>98</sup> i nabycie plazmidów z genami kodującymi odporność (plazmidy nie są wbudowywane w genom)<sup>99</sup>. Wydaje się, że horyzontalny transfer genów jest najważniejszym rodzajem zmian genetycznych powodujących pojawianie się odpornych bakterii w środowisku naturalnym<sup>98,103</sup>.

### 1.2.1. Oznaczanie odporności na antybiotyk i efekt *inoculum*

Odporność na antybiotyki jest wartością mierzalną, którą opisuje parametr minimalnego stężenia hamującego antybiotyku (ang. *minimum inhibitory concentration*, MIC)<sup>68</sup>. Jest to najniższe stężenie antybiotyku, które powoduje zahamowanie wzrostu bakterii w próbce. MIC może być uszczegółowione przez oznaczenie zahamowania wzrostu np. 50 % (MIC<sub>50</sub>) czy 90 % (MIC<sub>90</sub>) bakterii z próbki<sup>104</sup>. W sposób klasyczny testy na oznaczenie wartości MIC wykonuje się przez zaszczepienie bakterii do serii rozcieńczonego w płynnej pożywce antybiotyku (ang. *broth dilution*) lub przez naniesienie papierowych krążków nasączonych danym stężeniem antybiotyku na płytkę z pożywką agarozową i zaszczepionymi bakteriami<sup>105</sup>. Źródłami różnic w pomiarach

MIC mogą być takie czynniki jak medium hodowlane użyte w teście, stężenie początkowe bakterii (inoculum), sposób przygotowania antybiotyków czy warunki prowadzenia inkubacji<sup>106</sup>.

Stężenie początkowe bakterii przy oznaczaniu wartości MIC nie powinno być problematyczne. Według metodologii oznaczania wartości MIC<sup>68</sup> do oznaczania MIC powinno się każdorazowo używać tego samego stężenia początkowego bakterii, równego  $5 \cdot 10^5$  CFU/ml dla metody *broth dilution*. Z punktu widzenia praktycznego nie zawsze jest to możliwe, wobec czego przyjmuje się tolerancję tego stężenia w zakresie od  $2 \cdot 10^5$  CFU/ml do  $8 \cdot 10^5$  CFU/ml<sup>6</sup>. Nawet w tym zakresie tolerowanych stężeń dla niektórych antybiotyków można zauważyć różnice w wartościach MIC w zależności od stężenia początkowego bakterii. Jeżeli sprawdzić wartości MIC niektórych antybiotyków dla dużego zakresu stężeń początkowych bakterii, można zauważyć prawidłowość: im większe stężenie początkowe bakterii (inoculum), tym większe MIC, a zatem do zahamowania wzrostu liczniejszej populacji bakterii potrzebne jest większe stężenie antybiotyku. Ta prawidłowość jest zwana *efektem inoculum*<sup>107</sup>. Początkowo efekt inoculum był przypisywany tylko antybiotekom z grupy beta-laktamów<sup>108–111</sup> tylko dla bakterii *Staphylococcus Aureus* i był traktowany jako artefakt: sugerowano, iż efekt inoculum jest skutkiem indukcji przez beta-laktamy wzrostu bakterii pod postacią filamentów przy jednoczesnym niskim działaniu bakteriobójczym tych antybiotyków. Indukcja wzrostu filamentarnego przez beta-laktamy była dobrze znana<sup>110,112</sup> i wnioskowano, że bakterie nie dzieliły się (a zatem nie były odporne), a wzrost gęstości optycznej, służącej do pomiaru wzrostu bakterii, był przypisywany wydłużaniu się komórek w filenty bez podziału komórkowego. Polecano, by personel medyczny został przeszkolony w zakresie tego „alternatywnego źródła wzrostu mętności”<sup>110</sup>. Później efekt inoculum zarejestrowano dla innych rodzajów bakterii<sup>113</sup> i dla innych grup antybiotyków<sup>113–117</sup>. Mechanizm, będący podstawą efektu inoculum nie jest znany. O ile w przypadku bakterii produkujących enzym, który degraduje antybiotyk, sprawa jest jasna (większa liczba komórek produkuje więcej enzymu, który z kolei degraduje więcej cząstek antybiotyku w danym czasie<sup>118,119</sup>), o tyle nie jest pewne, dlaczego efekt inoculum występuje dla antybiotyków niedegradowanych przez bakterie<sup>120</sup>. Jeżeli przyjąć, że przeżycie bakterii zależy tylko od ich liczby i że bakterie nie produkują do środowiska enzymów rozkładających antybiotyki, można uznać, że efekt inoculum jest skutkiem interakcji cząstek antybiotyku z materią wewnątrz komórek bakterii. Zaproponowany

został mechanizm, według którego antybiotyki wywołują efekt inoculum poprzez degradację rybosomów: jeżeli bakterii jest dużo, na każdą z nich przypadnie mało cząstek antybiotyku, wobec czego będzie mogła nastąpić akumulacja rybosomów i bakterie będą się dzielić; gdy bakterii jest mało, każda z nich przyjmie dużą dawkę antybiotyku, wobec czego akumulacja rybosomów nie będzie mogła się równać z ich degradacją i bakterie nie będą się dzielić<sup>121</sup>. Autorzy łączą reakcje bakterii i efekt inoculum przy antybiotykach degradujących rybosomy z mechanizmem szoku cieplnego (ang. *heat shock response*, HSR) i zastanawiają się, czy efekt inoculum wykazywany przez te antybiotyki można związać z działaniem bakteriobójczym (testowane antybiotyki, które były bakteriobójcze i powodowały HSR powodowały też efekt inoculum) i bakteriostatycznym (testowane antybiotyki, które były bakteriostatyczne i nie powodowały HSR nie powodowały efektu inoculum), jednak nie zostaje udzielona jednoznaczna odpowiedź<sup>121</sup>. Podsumowując, istnieje wyjaśnienie efektu inoculum dla bakterii rozkładających antybiotyki (np. degradujących beta-laktamy) i dla antybiotyków atakujących rybosomy, jednak brak całościowego opisu mechanizmu powodującego efekt inoculum.

Mimo iż niewyjaśniony całkowicie, efekt inoculum jest istotny z punktu widzenia praktyki klinicznej, ponieważ może on powodować przecenienie odporności na antybiotyki danego szczepu bakterii<sup>122</sup>, niedoszacowanie dawki antybiotyku<sup>123</sup> i przyspieszenie nabywania odporności przez bakterie<sup>124</sup>. Efekt inoculum ma swoje ekstremum, jest nim populacja bakterii składająca się z pojedynczej komórki. Mowa jest wtedy nie o MIC, a raczej o minimalnym stężeniu hamującym dla pojedynczej komórki (ang. *single cell minimum inhibitory concentration*, scMIC). Wykazano, iż w dużej populacji bakterii obecność antybiotyku na poziomie równym lub wyższym scMIC, ale mniejszym od MIC, występuje presja ewolucyjna w stronę szczepów odpornych na dany antybiotyk<sup>9</sup>.

### 1.3. Techniki mikroprzepływowe w mikrobiologii i biotechnologii

Wraz z rozwojem technik mikroprzepływowych stało się jasne, że można je wykorzystać do otwarcia nowych kierunków badań w różnych dziedzinach nauki. Jest to szczególnie dobrze widoczne dla biologii<sup>125,126</sup>, w której to techniki mikroprzepływowe pozwalają na np. manipulację pojedynczymi komórkami czy na monitorowanie przebiegu reakcji enzymatycznych na niespotykaną dotąd skalę – tak w sensie małych fizycznych rozmiarów reaktorów, jak i pod względem olbrzymiej liczby powtórzeń eksperymentów czy krótkich czasów prowadzenia reakcji. Wiele z eksperymentów biologicznych przeprowadzonych w ostatnich latach nie mogłoby mieć miejsca lub byłyby bardzo trudne do przeprowadzenia bez wykorzystania mikroprzepływów. Badania biologiczne, wykorzystujące mikroprzepływy, można podzielić w sposób sztuczny pod względem roli, jaką odgrywały w tych badaniach mikroprzepływy na (i) komory reakcyjne, w których za pomocą mikroprzepływów można kontrolować z wysoką precyzją warunki przebiegających reakcji, (ii) badania wysokoprzepustowe, gdzie mikroprzepływy umożliwiają paralelizację eksperymentów w liczbach powtórzeń niemal niemożliwych do osiągnięcia innymi niż mikroprzepływowymi metodami, (iii) systemy pozycjonujące, gdzie mikroprzepływy są kluczową techniką pozwalającą na lokalizację i obserwację pojedynczych komórek czy grup komórek. Z punktu widzenia niniejszej rozprawy najbardziej istotną ze wspomnianych kategorii jest ta zawierająca w sobie badania wysokoprzepustowe prowadzone za pomocą technik mikroprzepływowych.

Wielkoskalowa paralelizacja eksperymentów pozwala na uzyskanie doskonałych danych statystycznych, na badania przesiewowe na dużej liczbie odczynników, czy na szukanie rzadkich zdarzeń w dużych zbiorach cząstek czy organizmów żywych. Zwiększenie przepustowości w biologii odbywało się historycznie przy użyciu płytek wielodołkowych o coraz większej gęstości dołków. Postępujące prace nad integracją dołków z kanałami mikroprzepływowymi pozwoliły np. na konstrukcję urządzenia zawierającego 150 000 dołków o objętościach po 100 pl i o kontrolowanej zawartości<sup>127</sup>. Dołki czy komory próbuje się zastępować np. kropelkami o objętości pojedynczych pikolitrow nadrukowanymi na płytce z elektrodami<sup>128</sup>. Można także wykorzystać hybrydę kropelek i dołków, co zostało zademonstrowane w badaniu, w którym przeanalizowano 80 000 kombinacji antybiotyków i ich wpływ na bakterie. To badanie ujawniło wiele

synergistycznych interakcji między antybiotykami, mogących ułatwić dobór efektywnej terapii w celu zwalczania infekcji bakterii odpornych na antybiotyki<sup>129</sup>. Jednakże niewątpliwie najbardziej rozwiniętą gałęzią badań wysokoprzepustowych w mikroprzepływach są techniki oparte na kroplach<sup>125</sup>.

Krople mogą być generowane w olbrzymich liczbach przy bardzo dużych częstotliwościach, dochodzących nawet do miliardów kropeł na godzinę<sup>130</sup>, umożliwiając niespotykane wcześniej możliwości prowadzenia eksperymentów równoległe. Rezultaty reakcji prowadzonych w kroplach mogą być analizowane przy dość dużych częstotliwościach (niższych jednak niż możliwe obecnie częstotliwości generacji, co oznacza wąskie gardło przepustowości mikroprzepływów), a krople o pożądanym wyniku reakcji mogą być odsiewane od pozostałych. Zostało to wykorzystane np. w ukierunkowanej ewolucji enzymów – przez użycie aptamerów kwasów nukleinowych, które generują sygnał fluorescencyjny po napotkaniu analitu<sup>131</sup>, czy przez analizę absorbancji, która pozwoliła na przesianie milionów kropeł z przebiegającymi z różnymi prędkościami reakcjami enzymatycznymi<sup>132</sup>.

### 1.3.1. Cyfrowa biologia

Techniki kropłowe są bardzo przydatne w protokołach polegających na tzw. oznaczeniach cyfrowych – gdzie w kroplach zamknięta jest co najwyżej jedna cząstka szukana czy jedna komórka. Wtedy krople, które zawierają w sobie pojedynczą cząstkę szukaną traktowane są jako jedynki w kodzie binarnym, zaś krople bez cząstek szukanym uważane są za zera – stąd oznaczenia na kroplach „pełnych” (1) i „pustych” (0) nazywa się cyfrowymi. Rozważmy próbkę zawierającą skończoną liczbę cząstek szukanym. Rozcieńczanie tej próbki będzie owocowało zmniejszeniem stężenia cząstek, a także zwiększeniem średniego dystansu między cząstkami, jednak cząstki szukane nadal będą mogły ze sobą bezpośrednio oddziaływać, poza tym najprawdopodobniej nie będzie można rozróżnić sygnałów pochodzących od identycznych cząstek szukanym, jako że są one zamknięte w jednej objętości cieczy. Jeżeli jednak próbkę podzieli się na odpowiednio dużo kompartmentów (podobjętości), to znaczna większość tych partycji nie będzie zawierała cząstek szukanym (0), zaś pewna część będzie zawierać dokładnie jedną cząstkę (1). Jeżeli kompartmentów będzie dość dużo lub jeżeli próbka przed podziałem będzie odpowiednio rozcieńczona, to udział kropeł zawierających dwie (lub więcej) cząstki będzie znikomy. Rozkład liczby cząstek szukanym w populacji kropeł

można policzyć na podstawie rozkładu Poissona. Czytelne wyjaśnienie tego zagadnienia zostało zaprezentowane przez Amara Basu<sup>133</sup>:

Typowo, w oznaczeniach cyfrowych liczba szukanych obiektów ( $m$ ) jest o rząd mniejszości mniejsza niż liczba kropeł ( $n$ ). Średnia liczba szukanych obiektów przypadających na jedną kroplę ( $\lambda$ ) zależy od stężenia próbki ( $C$ ) i liczby kropeł ( $n$ ).

$$\lambda = \frac{m}{n} = C * V_d, \quad (4)$$

gdzie  $m$  to liczba obiektów szukanych w próbce, zaś  $V_d$  oznacza objętość pojedynczej kropli. Szansa na to, że kropla będzie zawierała  $k$  obiektów szukanych jest opisana przez rozkład dwumianowy, który przy dużej wartości  $n$  może być przybliżony rozkładem Poissona (typowo przy wykorzystaniu kropeł wartość  $n$  jest wysoka):

$$p(k) = \frac{\lambda^k * e^{-\lambda}}{k!} \quad (5)$$

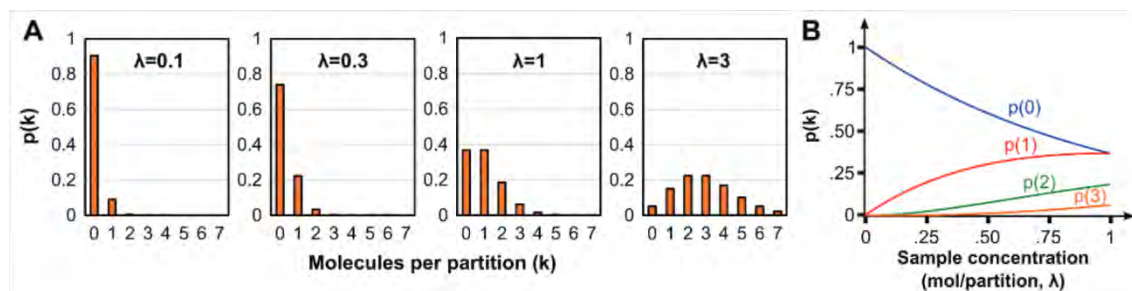
Średnia  $\mu$  i wariancja  $\sigma^2$  rozkładu Poissona są równe  $\mu = \sigma^2 = \lambda$ .<sup>134</sup> Prawdopodobieństwo wystąpienia kropli „pustej”, tj. bez obiektu szukanego, wynosi  $E = p(0) = e^{-\lambda}$ . Co za tym idzie, liczbę obiektów szukanych ( $m$ ) i stężenie próbki ( $C$ ) można obliczyć na podstawie udziału procentowego kropeł pustych w całej populacji kropeł<sup>135</sup>:

$$\lambda = -\ln(E) \quad (6)$$

$$C = \frac{\lambda}{V_d} = -\frac{\ln(E)}{V_d} \quad (7)$$

$$m = n\lambda = -n \ln(E) \quad (8)$$

Rys. 10 pokazuje rozkład liczby obiektów szukanych przypadających na kroplę dla różnych średnich liczb obiektów przypadających na kroplę ( $\lambda$ ).



Ryc. 10. A) Rozkład liczby obiektów szukanych przypadających na kroplę dla różnych średnich liczb obiektów szukanych przypadających na kroplę ( $\lambda$ ). Dla  $\lambda$  zbliżonych do 0,1 niemal wszystkie krople zawierające obiekty szukane zawierają jeden i tylko jeden obiekt szukany. B) Zmiana prawdopodobieństw wystąpienia 0, 1, 2, 3 lub 4 obiektów szukanych w kropli dla zmieniających się średnich liczb obiektów szukanych przypadających na kroplę ( $\lambda$ ). Rozkłady obliczone są na podstawie rozkładu Poissona. Rycina pochodzi z pracy Amara Basu<sup>133</sup>.

Wadą systemów oznaczania cyfrowego jest konieczność wydzielenia wielkiej liczby kompartmentów, jeżeli w eksperymencie potrzebny jest szeroki zakres dynamiczny oznaczenia lub jeżeli niezbędne są duże ilości danych do przeprowadzenia obliczeń statystycznych. Istnieje możliwość zwiększenia zakresu dynamicznego takiego oznaczenia przy zmniejszeniu liczby kompartmentów: metoda opiera się na przygotowaniu szeregu rozcieńczeń próbki i następującej po tym kompartmentalizacji<sup>72</sup>. Wadą tego rozwiązania jest jednak spadek precyzji oznaczenia. Ponieważ jednak techniki mikroprzepływowe oferują szybką produkcję kropeł i oznaczenia oparte o miliony kropeł jednocześnie, przeważnie do oznaczeń cyfrowych używa się rozkładu Poissona bez modyfikacji.

Metody oparte na cyfrowej biologii otwierają przed badaczami szereg nowych możliwości prowadzenia badań. Przykładowo w cyfrowej metodzie PCR opartej na kroplach (ang. droplet digital polymerase chain reaction, ddPCR, już skomercjalizowanej)<sup>136</sup>, cząstki poszukiwanego DNA są dystrybuowane pomiędzy krople, tak aby część populacji kropeł nie zawierała żadnej cząstki DNA (zera), a część kropeł zawierała co najwyżej jedną kopię DNA (jedynek). Po przeprowadzeniu PCR na takiej emulsji krople, które nie zawierały DNA pozostają ciemne po potraktowaniu światłem o odpowiedniej długości fali, zaś krople, które zawierały jedną cząstkę DNA, są widoczne ze względu na dużą liczbę kopii DNA w takich kroplach po PCR, co pociąga za sobą silny sygnał fluorescencyjny. Wystarczy policzyć krople emitujące sygnał fluorescencyjny, aby z absolutną dokładnością i bez krzywych kalibracyjnych dowiedzieć się, ile było cząstek DNA w próbce przed PCR. Możliwe jest połączenie ddPCR z innymi



systemami mikroprzepływowymi. Przykładowo Ozkumur *et al.* Zaprezentowali układ mikroprzepływowy, mogący przesiewać krążące komórki nowotworowe (ang. Circulating Tumor Cell, CTC) przy przepustowości dziesięciu milionów komórek na sekundę<sup>137</sup>. Ta technika została później połączona z opartym na kroplach RT-PCR (Reverse Transcription PCR) do diagnostyki nowotworowej<sup>138</sup>.

Tak jak wspomniano, możliwe jest także zamykanie pojedynczych komórek w osobnych kroplach. Otwiera to nowe ścieżki badań związane z heterogenicznością populacji bakterii czy eukariontów. Dwie pierwsze publikacje na ten temat w dziedzinie genomiki opublikowano jednocześnie<sup>139,140</sup>. Te prace już teraz uznawane za fundament wielkoskalowych badań genomicznych na pojedynczych komórkach. Pierwszy z artykułów opisuje badania transkryptomyczne komórek potencjalnych<sup>140</sup>, zaś drugi opisuje profilowanie ekspresji genów na poziomie pojedynczych komórek<sup>139</sup>. Obydwie publikacje prezentują nieco inne rozwiązania techniczne, jednak ewidentnie obie drogi dojścia do celu odniosły sukces. Elementy łączące obydwie prace (poza niektórymi autorami) to wykorzystanie kropeł o objętościach rzędu pikolitrow do zamknięcia pojedynczych komórek, a także wykorzystanie unikalnych sekwencji kwasów nukleinowych do oznaczenia (ang. barcoding) poszczególnych kropeł w celu późniejszego przypisania wyników sekwencjonowania RNA do konkretnej komórki. Techniki analizy RNA z pojedynczych komórek znane były już wcześniej, jednak wspomniane publikacje opisują takie badania na niepotykaną wcześniej skalę. Przynieszone tu prace nad oznaczeniami kwasów nukleinowych na poziomie pojedynczych komórek zaowocowały serią nowych badań, np. nad integracją systemów do wielkoskalowego badania pojedynczych komórek z platformami do sekwencjonowania RNA<sup>141</sup>, do perturbacji w ekspresji genów z wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas<sup>142</sup>, czy do wielkoskalowego (50 000 komórek na eksperyment) sekwencjonowania DNA bakterii<sup>143</sup>.

### **1.3.1.1. Techniki mikroprzepływowe do oznaczania odporności na antybiotyki**

Do pomiarów odporności na antybiotyki wielokrotnie wykorzystano techniki mikroprzepływowe. W sposób sztuczny można podzielić opracowane na przestrzeni lat rozwiązania w tej dziedzinie pod względem sposobu detekcji na te oparte na detekcji

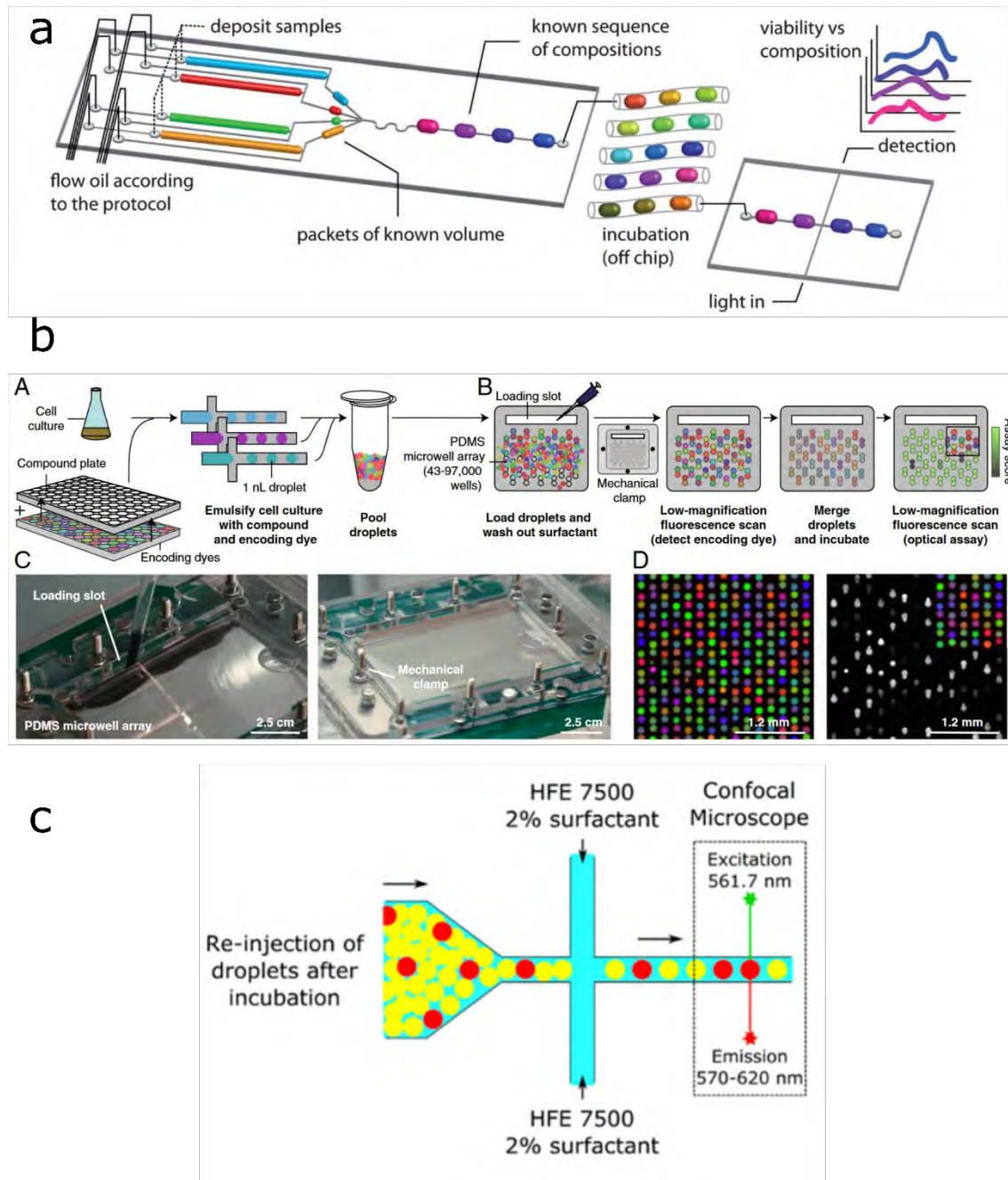
wzrostu po czasie co najmniej kilku godzin, np. oparte na fluorescencji, na te oparte na optycznej detekcji podziału pojedynczych komórek i na te oparte na detekcji zmian w bakteriach na poziomie molekularnym.

#### **1.3.1.1.1. Detekcja wzrostu po inkubacji**

Do tej grupy autor zaklasyfikował techniki, które wymagają wielogodzinnego wzrostu bakterii przed identyfikacją odporności lub braku odporności na antybiotyki. Jeżeli bakterie są odporne, nastąpi ich wzrost. Wzrost jest wymagany w celu wzmocnienia sygnału z próbek, zawierających odporne bakterie, wobec próbek bez żadnych bakterii lub z bakteriami wrażliwymi na antybiotyki. Przykładowymi metodami detekcji są tu odczyt fluorescencji<sup>79,88,144,145</sup> lub analiza wzrostu rozpraszania światła przechodzącego przez próbkę<sup>146</sup>. W tej kategorii technik mikroprzepływowych, służących do oznaczania odporności na antybiotyki, znalazły się niemal wszystkie metody oparte na kroplach. Omawiane tu metody mają ograniczone zastosowanie w diagnostyce medycznej, w której liczy się nie tylko analiza odporności na antybiotyki, ale także czas, w którym zostanie przeprowadzona analiza – powinien być jak najkrótszy. Niemniej opisane tu metody mają zastosowanie w badaniach odporności jako takiej, tj. np. mogą pomóc w wyszukaniu oddziaływań synergistycznych między różnymi antybiotykami, co może mieć przełożenie na praktykę kliniczną<sup>129</sup>.

Do badań odporności nierzadko wykorzystuje się krople o rozmiarze większym niż 100 nl. Przykładowo, opracowano system i jego iterację<sup>147,148</sup>, w którym autorzy mogli generować długie (ponad 1000 kropeł) szeregi kropeł objętości ok. 100 nl każda, zawierających pożywkę bakteryjną i antybiotyki w zmiennym między kroplami stężeniu. Znakowanie populacji nie było konieczne ze względu na znaną kolejność generacji kropeł o różnym składzie – znając kolejność kropli w szeregu, można przywołać zadane w niej warunki reakcji. System został wykorzystany do dokładnej analizy wartości MIC przy bardzo małych zmianach stężenia między antybiotykami<sup>147</sup>. System podobny do omawianego został wykorzystany do analizy zmienności fenotypów bakterii po okresie głodzenia bakterii. Zmienność fenotypowa była znacznie większa po przegłodzeniu komórek niż w populacjach kontrolnych, zaś mutacje powodujące powstawanie różnych fenotypów zostały zidentyfikowane przez sekwencjonowanie DNA komórek<sup>149</sup>. Innym przykładem wykorzystania dużych kropeł do analizy odporności na antybiotyki jest praca

Churskiego *et al.*<sup>79</sup>, w której generowano na żądanie<sup>150</sup> krople z różnymi reagentami o zmiennej objętości, które następnie łączono ze sobą (Ryc. 11).



Ryc. 11. Systemy oparte na detekcji wzrostu bakterii w kroplach po inkubacji. a) Schemat urządzenia do badania wpływu kombinacji antybiotyków na wzrost bakterii. Flow oil according to the protocol – przepływ oleju według protokołu, deposit samples – nakładanie próbek, packets of known volume – porcje o znanej objętości, known sequence of compositions – znana sekwencja składu kropli, incubation (off chip) – inkubacja poza układem, light in – wlot na światłowód, detection – detekcja, viability vs composition – żywotność bakterii w zależności od składu kropli. Na badane krople składały się zmienne stężenia antybiotyków i stałe stężenie bakterii. Schemat pochodzi z pracy Churskiego *et al.*<sup>79</sup> b) System do wysokoprzepustowego badania interakcji antybiotyków. A) Generacja kropli. Próbkami z płytki wielodołkowej z różnymi próbkami (compound plate) są łączone z unikalnymi dla każdej

próbki mieszaninami trzech barwników fluorescencyjnych (encoding dyes). Próbki wymieszane z barwnikami są łączone z komórkami (cell culture) i generowane są krople o objętości ok. 1 nl (emulsify cell culture with compound and encoding dye). Krople są następnie zbierane w jednym pojemniku (pool droplets). B) Load droplets and wash out surfactant: Krople są nakładane przez wlot (loading slot) do układu pułapek (PMDS microwell array), w których losowo łapane są po dwie krople, następnie spłukiwany jest surfaktant. Mechanical clamp: urządzenie jest zabezpieczane mechanicznie. Low-magnification fluorescence scan: skład poszczególnych kropeł jest identyfikowany przez unikalne mieszaniny barwników. Merge droplets and incubate: Połączenie sparowanych w pułapkach kropeł i inkubacja. Low-magnification fluorescence scan – skan fluorescencji w celu identyfikacji wzrostu lub braku wzrostu bakterii (odpowiedzi fenotypowej). C) Zdjęcia układu pułapek. D) Z lewej: krople z unikalnymi zestawami stężeń barwników. Z prawej: Fluorescencja z kropeł określająca odpowiedź fenotypową. Rycina pochodzi z pracy Kulesy i współpracowników<sup>129</sup>. c) Analiza fluorescencji z kropeł ze wzrastającymi bakteriami. Krople są wstrzykiwane do układu po inkubacji, która miała umożliwić bakteriom wzrost (Re-injection of droplets after incubation), następnie krople są rozcieńczane przez fazę ciągłą i przepuszczane przez zwężenie, w którym analizowane są jedna po drugiej przez mikroskop konfokalny. Za: Scheler i współpracownicy<sup>151</sup>. Taki system detekcji został wykorzystany w także w niniejszej pracy.

Łączna objętość kropeł wynosiła 1,4  $\mu\text{l}$ , z czego 100 nl przypadało każdorazowo na pożywkę z bakteriami (zatem miały one stałe stężenie w każdej kropli), zaś antybiotyki i rozcieńczalnik miały zmienne rozmiary, jednak zawsze łącznie miały 1,3  $\mu\text{l}$ . System został wykorzystany do analizy interakcji koktajli składających się z dwóch antybiotyków. Wadą systemu Churskiego i współpracowników był mały zakres dynamiczny metody: krople musiały mieć łącznie stałą objętość, zaś precyzja generacji rozmiarów kropeł była ograniczona. Owocowało to analizą w małym zakresie stężeń o małym skoku. Analiza interakcji antybiotyków została przeprowadzona później na znacznie większą skalę w systemie o innych założeniach eksperymentalnych. Wpierw przygotowano w płytce wielodołkowej próbki w dużej objętości, każda próbka zawierała inne stężenia różnych antybiotyków i każda próbka zawierała unikalną kombinację stężeń trzech barwników fluorescencyjnych, stanowiących marker do identyfikacji danej próbki (ang. *barcode*). Próbki były emulsyfikowane na 20 000 jednonanolitrowych kropeł każda, a następnie krople były losowo łapane w pułapki, mieszczące dwie krople (Ryc. 11). Powstałe losowe pary były identyfikowane na podstawie markerów (różnej intensywności fluorescencji w trzech kanałach pomiarowych), następnie łączone ze sobą przez zmienne pole elektryczne<sup>152</sup>. W ten sposób przeanalizowano 80 000 par antybiotyków w różnych stężeniach, w tym nowych potencjalnych leków i zidentyfikowano wiele nieznanymi wcześniej oddziaływań synergistycznych<sup>129</sup>.

Prostszy w obsłudze system zakładał wykorzystanie pułapek mikroprzepływowych i kontroli przepływu przy pomocy pipet automatycznych<sup>88</sup>. Inny system obsługiwany pipeta umożliwia analizę odporności na antybiotyk z próbek klinicznych w ciągu jednego dnia roboczego (8 godzin). Próbka była przepychana przez dwa filtry, które umożliwiały izolację bakterii z moczu przy akceptowalnej czystości. Potem oczyszczone bakterie były wprowadzane do prostego układu, zawierającego główny kanał i szereg komór. Komory były następnie rozdzielane porcją oleju<sup>153</sup>.

Systemy do analizy odporności na poziomie pojedynczych komórek wykorzystywały np. szereg rozdzielonych kropeł, których skład można było zidentyfikować po kolejności danej kropli w szeregu<sup>154</sup> czy, w odróżnieniu od wyżej opisanych systemów, analizę zmiany gęstości optycznej w kroplach powodowanej wzrostem bakterii<sup>146</sup>. Innym przykładem systemu do analizy odporności na antybiotyki dla szeregu stężeń próbki jest układ wykorzystujący kulki hydrożelu, które wiążą się w pułapkach<sup>144</sup>. Po uwięzieniu

kulek hydrożelowych przez układ przepływa kolejno zawiesina bakterii i antybiotyku rozcieńczony w sposób liniowy w sposób podobny do opisanego na początku rozwoju mikroprzepływów<sup>19</sup>.

Układy kropłowe były także wykorzystywane do długotrwałej analizy bakterii i nabywania przez nie odporności. Układ kontrolował do 200 kropeł o rozmiarze kilkuset nanolitrów każda, poruszając nimi w trakcie inkubacji w celu dostarczenia do nich tlenu<sup>25</sup>. Krople nasycone komórkami były dzielone, zaś usunięta część kropli była zastępowana świeżą pożywką o takim samym lub wyższym stężeniu antybiotyku. Autorzy zademonstrowali nabywanie odporności na zwiększające się stężenie antybiotyku w czasie wielu dni<sup>24</sup>.

Układy mikroprzepływowe można wykorzystywać także do analizy heteroodporności, tj. zjawiska, w którym w dużej populacji wrażliwych bakterii pojawia się pojedyncza zmutowana komórka o odporności znacznie przewyższającej odporność pozostałych komórek populacji. Wygenerowano ponad  $10^7$  kropeł, które zawierały łącznie  $10^6$  komórek bakterii *E. coli*, tzn. krople zawierały co najwyżej jedną komórkę (patrz rozdział 1.3.1.). Krople były inkubowane przez dwie godziny, co wystarczyło, by po dodaniu do każdej kropli z osobna<sup>80</sup> wskaźnika żywotności bakterii *Alamar Blue* zaobserwować różnicę między kroplami z bakteriami odpornymi a pozostałymi kroplami. Wyciek wskaźnika z kropli był ograniczony przez wykorzystanie nanocząstek amfifilowych do stabilizacji emulsji<sup>29,155,156</sup>. Całkowity czas badania wynosił 4 godziny, jednak był uzależniony od rodzaju badanych bakterii, zatem ta technika nie znajdzie łatwego przełożenia na praktykę kliniczną<sup>145</sup>.

#### **1.3.1.1.2. Detekcja podziału pojedynczych komórek**

W tej grupie znajdują się systemy mikroprzepływowe, w których prowadzi się obserwacje pojedynczych komórek. Gdy zauważy się, że komórka się dzieli, uznaje się ją za odporną, zaś gdy komórka nie dokonuje podziału, jest uznawana za wrażliwą na antybiotyk. Prowadzenie obserwacji w ten sposób drastycznie skraca czas badania, nawet do 30 minut<sup>157</sup>. Wadą technik projektowanych w ten sposób jest ich niska przepustowość w stosunku do technik opartych na kroplach. Wobec tego autor uznaje, że techniki oparte na detekcji podziału pojedynczych komórek lepiej nadają się do celów klinicznych niż



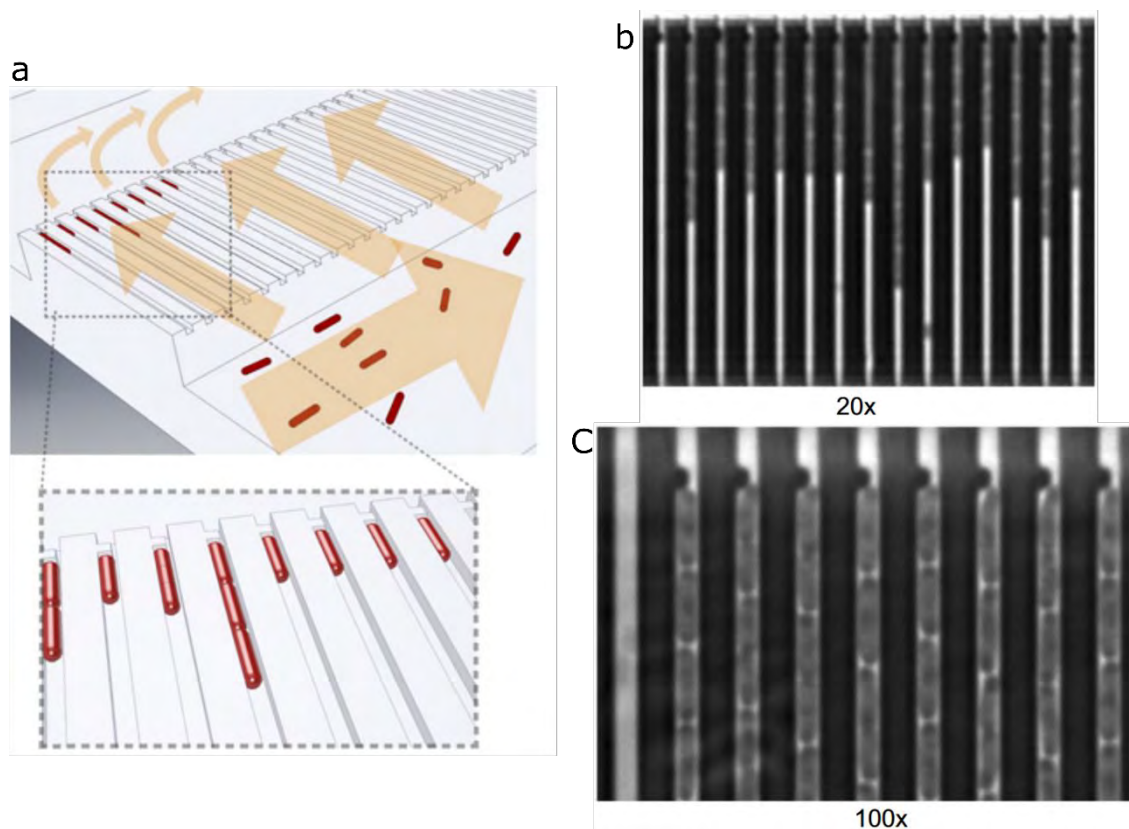
krople, jednak do badań przesiewowych czy badań heteroodporności lepiej nadają się systemy kroplowe.

Jedynym znanym autorowi przykładem hybrydy techniki kroplowej z detekcją podziału pojedynczych komórek jest technika oparta na obserwacji podziału pojedynczych bakterii w kroplach uwięzionych w pułapkach, co pozwala na oznaczenie odporności na antybiotyki w ciągu jednej godziny. Mocz i antybiotyk były ze sobą łączone w układzie mikroprzepływowym, a następnie krople były obserwowane pod mikroskopem. Test wykazał zróżnicowaną odporność na antybiotyk wśród bakterii obecnych w moczu<sup>158</sup>.

Inna metoda obserwacji podziału bakterii wykorzystuje specjalnie zmodyfikowane płytki wielodołkowe. Do kanału otaczającego zbiornik nakłada się pipetą bakterie zawieszone w agarozie. Następnie do zbiornika pipetą nakłada się roztwór antybiotyku. Antybiotyk rozchodzi się w żelu na drodze dyfuzji i hamuje (lub nie hamuje) wzrost bakterii<sup>159</sup>.

Kolejnym przykładem jest wykorzystanie nienowego konceptu tzw. *mother machine*. Polega on na chwytniu w wąskie kanaliki pojedynczych komórek bakterii. Z jednej strony kanalik jest otwarty (tędy do kanalika dostaje się pierwsza bakteria), z drugiej strony kanalik jest częściowo zamknięty, umożliwiając transport cząstek z kanału za zamknięciem do kanalika, przy okazji nie przepuszczając komórek bakterii. Komórka jest uwięziona w takim kanaliku, jednak może się dzielić. Nowe komórki powstają zawsze w tym samym kierunku, tj. tam, gdzie nie ma blokady w kanaliku. W ten sposób można precyzyjnie mierzyć tempo wzrostu setek pojedynczych bakterii, określając, czy są one odporne na antybiotyk, czy nie<sup>157</sup> (Ryc. 12).





Ryc. 12. Układ oparty na *mother machine* do oznaczania odporności na antybiotyki w 30 minut. a) Wprowadzanie pojedynczych bakterii z głównego przepływu do kanałków, do których bakterie mogą wpłynąć, ale nie mogą wypłynąć z drugiej strony. b) Zbliżenie na kanałki, w których bakterie dzielą się w różnym tempie. Na podstawie dystrybucji odległości „czoła” bakterii od końca kanałków można określić, czy bakterie są odporne na antybiotyki. c) Zbliżenie, pokazujące pojedyncze bakterie i blokady w kanałkach. Za: Baltekin i współpracownicy<sup>157</sup>.

### 1.3.1.1.3. Techniki molekularne

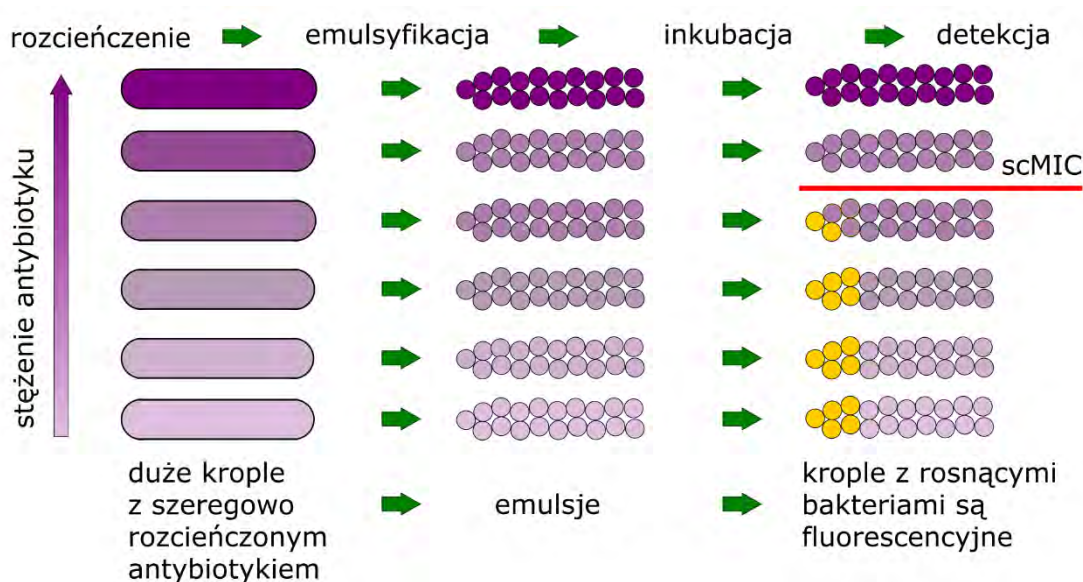
Osobnym podejściem jest wykorzystanie technik amplifikacji DNA w celu sprawdzenia zmiany zawartości bakteryjnego DNA w próbce. Hybrydowy test oparty na technikach molekularnych, a służący do sprawdzenia fenotypu (odporny lub nieodporny na antybiotyki) bez wnikania w podstawy genetyczne odporności został zaprezentowany w kroplach przy wykorzystaniu cyfrowej amplifikacji DNA. Cyfrowa amplifikacja DNA umożliwiła odróżnienie fenotypów dla różnych grup antybiotyków już po 15 minutach ekspozycji bakterii na antybiotyki, co nie było możliwe przy zastosowaniu ilościowej amplifikacji DNA bez komponentu cyfrowego<sup>160</sup>. Ta technika została później zastosowana w połączeniu z izotermalną metodą amplifikacji DNA do analizy odporności na antybiotyki szczepów bakterii z próbek klinicznych<sup>161</sup>.

## 1.4. Sformułowanie problemu

Tak jak wspomniano w dziale „Motywacja i cel badań”, przedmiotem tej rozprawy jest opracowanie systemu mikroprzepływowego do wysokoprzepustowego oznaczania odporności na antybiotyki na poziomie pojedynczych komórek. Aby przystąpić do pracy eksperymentalnej, niezbędna jest analiza procesu klasycznie wykonanego oznaczania odporności na antybiotyki. Do tego celu wybrano metodę opartą na szeregu rozcieńczeń antybiotyku, jako prezentującą dużo większe możliwości zwiększenia przepustowości (poprzez wykorzystanie kropeł w układach mikroprzepływowych) niż technika oparta na dyfuzji antybiotyków w pożywkach stałych. Zgodnie ze standardowymi protokołami<sup>68</sup>, w pierw przygotowuje się szereg dwukrotnych rozcieńczeń antybiotyku w pożywce. Następnie rozcieńczenia zaszczepia się bakteriami, tak by ich stężenie wynosiło  $5 \cdot 10^5$  cfu/ml (cfu – colony forming unit, jednostka tworząca kolonię). Następnie przygotowane mieszaniny inkubuje się przez 16 godzin, by umożliwić wzrost bakteriom, po czym analizuje się wzrost na podstawie pomiaru absorbancji. Można wobec tego zidentyfikować 3 kluczowe elementy omawianego procesu: szeregowe rozcieńczenie, inkubacja i detekcja. Aby oznaczyć wartość scMIC (single cell minimum inhibitory concentration, minimalne stężenie hamujące dla pojedynczej komórki), musimy stworzyć sytuację, w której komórki są od siebie odseparowane. Klasycznymi metodami mikrobiologii można to osiągnąć poprzez wykonanie szeregu rozcieńczeń komórek, w którym przyjmuje się, że ostatnie rozcieńczenie, w którym po inkubacji rozmnożą się bakterie, zawierało jedną komórkę<sup>9</sup>. Aby zbadać MIC, należy przebadać szereg rozcieńczeń antybiotyków, zatem aby przebadać scMIC klasycznymi metodami, należy przygotować jednocześnie szeregi rozcieńczeń komórek i antybiotyku, a wszystko w płytkach wielodołkowych – takie rozwiązanie jest bardzo wymagające pod względem nakładu czasu i pracy, w dodatku nie przynosi dużej ilości danych statystycznych, tj. aby przebadać kilkaset odseparowanych bakterii, należy przygotować kilka lub kilkanaście tysięcy dołków z rozcieńczeniami.

Wspomniano tu wcześniej (rozdział 1.3.1.) o metodach cyfrowej biologii, które umożliwiają zamykanie pojedynczych komórek w kroplach w układach mikroprzepływowych. Warunkiem powodzenia takiej operacji jest podział próbki zawierającej komórki na dużą liczbę partycji. W mikroprzepływach można to osiągnąć przez przygotowanie dużej liczby izolowanych komór lub, co bardziej praktyczne ze

względu na większą elastyczność w przygotowaniu eksperymentu, przygotowanie dużej liczby wodnych kropeł. Oznaczenie MIC wymagało wymienionych wcześniej trzech etapów krytycznych. Wydajne oznaczenie scMIC wymaga jednego dodatkowego etapu, z jego uwzględnieniem krytyczne etapy wydajnego procesu scMIC to: szeregowo rozcieńczenie antybiotyku z dodatkiem bakterii, emulsyfikacja szeregu rozcieńczeń, inkubacja szeregu emulsji, detekcja wzrostu bakterii (Ryc. 13). Niniejsza rozprawa opisuje rozwiązania umożliwiające efektywne wykonanie poszczególnych etapów niezbędnych do wydajnego oznaczenia scMIC, integrację poszczególnych części systemu i eksperymenty z użyciem skonstruowanego systemu: oznaczanie scMIC, wykazanie efektu inoculum, opis zmian morfologicznych w populacji bakterii pod wpływem pewnych antybiotyków, opis dystrybucji poziomej odporności na antybiotyk w identycznej genetycznie populacji bakterii.



Ryc. 13. Konceptualizacja operacji niezbędnych do wysokoprzepustowego oznaczenia scMIC (odporności na antybiotyk na poziomie pojedynczej komórki). Wpierw generowane są duże krople o zmieniającym się stężeniu antybiotyku, ale z takim samym stężeniem bakterii. Następnie szereg dużych kropeł jest emulsyfikowany, aby zgodnie z rozkładem Poissona w każdej kropli znalazła się co najwyżej jedna komórka bakterii. Następnie emulsje są inkubowane w celu wykrycia odpowiedzi fenotypowej bakterii (wzrost lub brak wzrostu). Następnie prowadzona jest detekcja sygnałów fluorescencyjnych oznaczających odpowiedź fenotypową, przy czym należy znać stężenie antybiotyku w danej emulsji. Emulsja o najniższym stężeniu antybiotyku, w której nie zarejestrowane zostaną sygnały fluorescencyjne oznaczające wzrost bakterii, zawiera stężenie antybiotyku równe scMIC. Rysunek za: Postek i współpracownicy<sup>162</sup>.

## 2. MATERIAŁY I METODY EKSPERYMENTALNE

## 2.1. Materiały

### 2.1.1. Odczynniki

W przeprowadzonych badaniach zastosowano następujące odczynniki:

#### I. Płyny

Olej Novec HFE 7500, 3M, USA

Pożywka bakteryjna Mueller-Hinton, Biocorp, Polska

#### II. Surfaktanty

Perfluoropolieter-poli(glikol etylenowy)-perfluoropolieter (PFPE-PEG-PFPE) otrzymany w syntezie opisanej w literaturze<sup>35</sup>, wzór strukturalny na ryc. 3.

#### III. Środki modyfikujące powierzchnie

tridekafluoro-1,1,2,2,-tetrahydrooktyl-1-trichlorosilan, United Chemical Technologies, USA

płyn Novec 1720, 3M, USA

#### IV. Antybiotyki i dodatki do hodowli bakteryjnych

Kanamycyna (Fisher Chemical, Wielka Brytania)

Piperacylina (Sigma-Aldrich, Niemcy)

Cefotaksym (Sigma-Aldrich, Niemcy)

Izopropyl- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozyd, IPTG (Fisher Chemical, Wielka Brytania)

#### V. Barwniki fluorescencyjne

Chlorek rodaminy 110 (Sigma-Aldrich, Niemcy)

Dekstran izotiocyanianu fluoresceiny, FITC (Sigma-Aldrich, Niemcy)

Dekstran izotiocyanianu rodaminy, RITC (Sigma-Aldrich, Niemcy)

### 2.1.2. Układy mikroprzepływowe

W prowadzonych badaniach wykorzystano następujące materiały do konstrukcji systemów mikroprzepływowych:

Poli(dimetylosiloksan), PDMS, Sylgard 184, Dow Corning, USA

Szkło o grubości 1 mm

Płytki poliwęglanu o grubości 5 mm

Płytki poli(metakrylanu metylu) o grubości 5 mm

Folia aluminiowa (Jan Niezbędný, Sarantis Polska S.A., Polska)

### **2.1.3. Bakterie**

Szczep *E. coli* DH5 $\alpha$  z plazmidem pBR322, zawierającym gen beta-laktamazy TEM-20, i z plazmidem pZS25O1, zawierającym gen białka żółtej fluorescencji (YFP)

### **2.1.4. Kontrola przepływu**

Pompy strzykawkowe NemeSys (Cetoni GmbH, Niemcy)

Strzykawki szklane (Hamilton, USA)

Przewód PTFE (politetrafluoroetylen) (Bola, Niemcy)

Przewód PE (polietylen), (Becton Dickinson, USA)

### **2.1.5. Obrazowanie układów**

Kamera uEye (IDS Imaging, Niemcy)

Kamera szybka Fastcam 1024 PCI (Photron, Japonia)

### **2.1.6. Detekcja sygnałów fluorescencyjnych**

Mikroskop konfokalny Nikon A1 (Nikon, Japonia)

## 2.2. Metody

### 2.2.1. Matryce układów mikroprzepływowych

W celu przygotowania matryc układów mikroprzepływowych, projekt sieci kanałów i specyficznych geometrii w tych kanałach został wprowadzony do programu Mastercam (CNC Software, USA). Następnie zaprojektowane elementy układu zostały wyfrezowane w płytce poliwęglanowej (ewentualnie w płytce PMMA) przy użyciu frezarki numerycznej (MSG4025, Ergwind, Polska), tworząc pozytywną matrycę poliwęglanową (PC). Płytkę poliwęglanową została następnie ułożona nacięciami do góry w jednorazowym naczyniu przygotowanym z grubej folii aluminiowej. Następnie płytkę poliwęglanową zalano PDMS i przełożono do eksykatora podłączonego do pompy próżniowej (Büchi, Niemcy) nastawionej na ciśnienie 100 mbar na 1 minutę w celu odpowietrzenia PDMS. Po odpowietrzeniu całość przełożono do pieca nastawionego na temperaturę 75°C na dwie godziny w celu przyspieszenia sieciowania polimeru PDMS. Z powstałego bloku PDMS wyciągnięto matrycę PC, zaś blok PDMS tworzył negatywną matrycę PDMS. W celu zabezpieczenia matrycy PDMS przed sieciowaniem z docelowym układem PDMS, matrycę PDMS pokryto związkem silanu (tridekafluoro-1,1,2,2,-tetrahydrooktyl-1-trichlorosilan). Aby to osiągnąć, w celu aktywacji powierzchni matrycy matryca PDMS została potraktowana plazmą powietrzną, otrzymaną przy użyciu generatora łuku elektrycznego (Corona Treater BD 20, Electro-Technic Products, USA) przez 20 sekund. Następnie aktywowana matryca PDMS została umieszczona w eksykatorze podłączonym do pompy próżniowej nastawionej na 15 mbar. W eksykatorze poza matrycą PDMS znajdowały się dwie próbki, w których znajdowało się po 15 µl roztworu tridekafluoro-1,1,2,2,-tetrahydrooktylu-1-trichlorosilanu.

### 2.2.2. Układy mikroprzepływowe PDMS

Przygotowaną wcześniej matrycę PDMS zalano świeżym niespolimeryzowanym PDMS, następnie umieszczono ją w piecu nastawionym na 75°C na dwie godziny. Następnie, po wychłodzeniu całego bloku PDMS do temperatury pokojowej, nacinano świeżo spolimeryzowaną warstwę PDMS skalpelem tak, aby wyciąć kontury docelowego układu. Następnie oddzielano docelowy pozytywny układ PDMS od negatywnej matrycy PDMS. W miejscach, w których znaleźć się miały wloty i wyloty układu, w pozytywnym układzie PDMS wycięto otwory przy użyciu zaostrej igły o średnicy zewnętrznej 0,8



mm lub większej, w zależności od pożądanej średnicy wlotu. Następnie układ PDMS oraz płytkę szklaną dokładnie oczyszczono wodą z detergentem, następnie alkoholem izopropylowym, następnie wysuszono przy użyciu sprężonego powietrza.

### **2.2.3. Zamykanie układów mikroprzepływowych PDMS płytkami szklanymi**

Upřednio oczyszczone układ PDMS i płytka szklana zostały umieszczone w generatorze plazmy (Harrick Plasma, USA). Generator plazmy został wypełniony tlenem, następnie przez 30 sekund odpompowywano gaz z generatora. Następnie urządzenie zostało włączone na ustawienie „high”, co spowodowało generację plazmy. Po 30 sekundach urządzenie zostało wyłączone, a układ PDMS i płytka szklana zostały do siebie delikatnie przyłożone, co spowodowało ich trwałe związanie.

### **2.2.4. Ruch płynów**

Ruch płynów w układach mikroprzepływowych był wymuszany przez precyzyjne pompy strzykawkowe NemeSys (Cetoni GmbH, Niemcy). Pompy były wyposażone w szklane strzykawki (Hamilton, USA) – szklane strzykawki gwarantują mniejsze objętości martwe w przepływie niż strzykawki plastikowe. Pompy były kontrolowane przez oprogramowanie Qmix Elements, dostarczone przez producenta pomp. Płyny były dostarczane ze strzykawk do układów przewodami wykonanymi z PTFE, które są sztywne, co oznacza mniejsze objętości martwe przepływu niż w przypadku przewodów elastycznych. Płyny były wyprowadzane z układów przewodami PTFE lub PE. Przewody PE były wykorzystane w systemie do oznaczania scMIC.

### **2.2.5. Wymuszanie koalescencji w polu elektrycznym**

Pole elektryczne było generowane w układzie przez przyłożenie do niego dwóch elektrod stalowych w odległości nie większej niż 4 mm pomiędzy końcami elektrod, tak by końce elektrod znajdowały się w płaszczyźnie kanałów mikroprzepływowych, a między końcami elektrod znajdowała się pułapka hydrodynamiczna. Przyłożony prąd był zmienny przy częstotliwości 200 Hz i napięciu 1,5 kV.

### 2.2.6. Pomiar objętości kropeł

Rozmiar kropeł unieruchomionych w pułapkach hydrodynamicznych był ustalany na podstawie znanego z góry przekroju poprzecznego kanału. W celu ustalenia objętości schwytej kropli mierzona była jej długość w kanale. Na podstawie uzyskanych rozmiarów przybliżoną objętość kropli ustalano z wzoru na objętość graniastosłupa. Pomiar objętości kropeł generowanych emulsji był prowadzony przy użyciu szybkiej kamery Fastcam 1024 PCI (Photron, Japonia). Mierzona była powierzchnia rzutu kropeł w pikselach kwadratowych i przy wykorzystaniu elementu układu mikroprzepływowego o znanych rozmiarach wyznaczany był promień kropli. Na podstawie promienia kropli wyznaczana była jej objętość. Analizy obrazu dokonywano za pomocą programów ImageJ i Automated Droplet Measurement (ADM)<sup>163</sup>. W przypadku wykorzystania ImageJ uzyskane dane liczbowe opracowywano przy użyciu programów napisanych specjalnie do tych potrzeb w środowiskach MSEXcel, Scilab.

### **2.2.7. Oznaczanie współczynnika rozcieńczeń**

Aby oznaczyć współczynnik rozcieńczeń między dwoma kroplami, zastosowano metodę podobną do prezentowanych wcześniej<sup>75,76,164</sup>. Przeprowadzono szeregowe rozcieńczenie barwnika fluorescencyjnego rodaminy 110 (Sigma-Aldrich, Niemcy). Mierzono średnią intensywność fluorescencji każdej kropli, przy czym mierzono centralny fragment kropli, a każdy obszar mierzony był tej samej wielkości dla każdej kropli. Płaszczyzna ogniskowania znajdowała się w połowie wysokości kropli. Po wykonaniu pomiaru ustalano stosunek intensywności fluorescencji kropel (kropel o większym przewidywanym stężeniu do kropel o mniejszym przewidywanym stężeniu barwnika) i ten stosunek zdefiniowano jako współczynnik rozcieńczeń. W pomiarach kolejnych par kropel ustalano czułość detektora w mikroskopie tak, by intensywność fluorescencji kropli o większej intensywności fluorescencji w przybliżeniu wynosiła 3000 jednostek arbitralnych w oprogramowaniu mikroskopu (przy wysyceniu na poziomie 4095 jednostek). Dokładność rozcieńczenia została zdefiniowana jako stosunek uzyskanego średniego współczynnika rozcieńczeń do pożądanego współczynnika rozcieńczeń, równego 2 (dla czynnika dodawanego niezależnie pożądanym współczynnikiem rozcieńczeń wynosił 1). Precyzja rozcieńczeń została zdefiniowana jako współczynnik wariancji (CV) uzyskanych współczynników rozcieńczeń. Liniowość rozcieńczeń była wyznaczana jako współczynnik determinacji równania regresji liniowej logarytmu dziesiętnego intensywności fluorescencji w odniesieniu do numeru rozcieńczenia w szeregu.

### **2.2.8. Pomiar częstotliwości generacji kropel emulsji**

Aby wyznaczyć częstotliwość generacji kropel emulsji, nagrywano miejsce emulsyfikacji przy pomocy szybkiej kamery. Następnie sprawdzano, co ile klatek na nagraniu generowana była kropla. Na podstawie uzyskanego wyniku i informacji na temat liczby klatek na sekundę nagrania wyznaczano częstotliwość generacji kropel.

### **2.2.9. Przygotowanie bakterii**

Bakterie inkubowano przez 16 godzin w 37°C w płynnej pożywce MH (Biocorp, Polska) z dodatkiem 50 µg/ml kanamycyny i 50 µg/ml piperacyliny (te antybiotyki służyły do selekcji plazmidu) i z dodatkiem 100 mM IPTG w celu indukcji produkcji białka żółtej fluorescencji YFP. Następnie przygotowano pięć rozcieńczeń bakterii podzielono na 10

części. Te części wymieszano z cefotaksymem tak, by uzyskać szereg dziewięciu dwukrotnych rozcieńczeń cefotaksymu i jednego zerowego stężenia (pozytywnej kontroli wzrostu bakterii) tego antybiotyku dla pięciu stężeń bakterii. Stężenia cefotaksymu w próbkach mieściły się w zakresie od 0,25  $\mu\text{g/ml}$  do 1024  $\mu\text{g/ml}$ . Następnie umieszczono mieszaniny w oddzielnych dołkach na płytce wielodołkowej i użyto pomp strzykawkowych w połączeniu z systemem pozycjonującym Rotaxys (Cetoni GmbH, Niemcy) do zaciągnięcia szeregu kropeł próbek z dołków, rozdzielając krople wodne olejem fluorowanym Novec 7500. Spodziewając się efektu inokulum, użyto różnych zakresów stężeń cefotaksymu dla różnych stężeń początkowych bakterii: dla trzech najniższych stężeń bakterii użyto zakresu stężeń cefotaksymu od 0,25  $\mu\text{g/ml}$  do 64  $\mu\text{g/ml}$ , dla drugiego najwyższego stężenia bakterii użyto stężeń cefotaksymu od 1  $\mu\text{g/ml}$  do 256  $\mu\text{g/ml}$ , dla najwyższego stężenia bakterii użyto stężeń cefotaksymu od 4  $\mu\text{g/ml}$  do 1024  $\mu\text{g/ml}$ .

### 3. REZULTATY

### 3.1. Precyzyjne i dokładne rozcieńczanie substancji w kroplach o objętości rzędu jednego mikrolitra

#### 3.1.1. Wprowadzenie

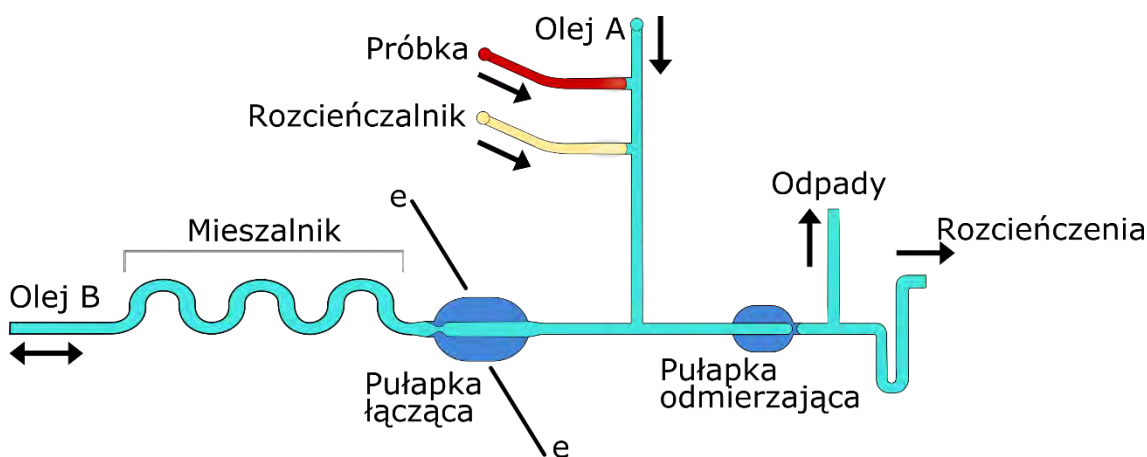
Urządzenie, które miałyby służyć do analizy odporności bakterii na antybiotyki, powinno zawierać moduł rozcieńczający, tak, by można było przeprowadzić szeregowe rozcieńczenie antybiotyku, najlepiej za każdym razem dwukrotne, aby zachować spójność ze standardowym protokołem badań<sup>1</sup>. Do tej pory opracowano wiele rozwiązań mikroprzepływowych, służących do szeregowego rozcieńczania próbki<sup>2–8</sup>, jednakże precyzja i dokładność rozcieńczeń nie były w opisywanych rozwiązaniach wysokie. Mała precyzja i dokładność pojedynczego rozcieńczenia może przełożyć się na bardzo duży błąd w określeniu stężenia próbki po przeprowadzeniu np. dziesięciu czy dwudziestu rozcieńczeń, ponieważ błąd rozcieńczenia będzie się akumulował wraz z kolejnymi rozcieńczeniami<sup>9,10</sup>. Ponadto układ mikroprzepływowy do badania odporności na antybiotyki powinien zawierać moduł, który do każdego rozcieńczenia z szeregu będzie dozował taką samą liczbę bakterii. Różna liczba bakterii w różnych stężeniach antybiotyku uniemożliwi rzetelne wyznaczenie minimalnego stężenia hamującego (ang. minimal inhibitory concentration, MIC), a to ze względu na efekt inoculum<sup>11–13</sup>. Zaprezentowane rozwiązanie tego problemu gwarantuje szeregowe rozcieńczenie antybiotyku i dozowanie jednego stężenia bakterii do każdej kropli z rozcieńczonym antybiotykiem<sup>7</sup>, jednakże wadą tego rozwiązania jest duży rozmiar kropeł (setki nanolitów) i niemożność ewakuacji badanych kropeł z układu mikroprzepływowego, co uniemożliwia ich emulsyfikację. Emulsyfikacja zaś jest niezbędna do uzyskania kropeł, w których zamknięte i izolowane byłyby pojedyncze komórki bakterii, co z kolei jest konieczne do wyznaczenia scMIC.

Celem tej części rozprawy było uzyskanie szeregowego dwukrotnego rozcieńczenia próbki w kroplach z wysoką precyzją rozcieńczeń, z możliwością uniezależnienia współczynnika rozcieńczeń od jakości wykonania układu mikroprzepływowego, z możliwością transferu uzyskanych kropeł rozcieńczonej próbki do innych modułów mikroprzepływowych, umożliwiających np. emulsyfikację, z możliwością utrzymania stężenia jednej substancji w szeregu rozcieńczeń w szeregu rozcieńczeń drugiej substancji bez konieczności uprzedniego wymieszania tych substancji.

### 3.1.2. System do generacji szeregu dokładnie dwukrotnych rozcieńczeń

#### 3.1.2.1. Architektura układu

Układ mikroprzepływowy, którego schemat znajduje się na ryc. 14, składał się z wlotów dla próbki (na schemacie oznaczenie „próbka”), dla rozcieńczalnika („rozcieńczalnik”), dwóch wylotów („odpady” i „rozcieńczenia”), dwóch wlotów dla fazy ciągłej: jednego, który dostarcza fazę ciągłą do układu („olej A”) i drugiego, który służy do mieszania kropeł próbki („olej B”), pułapki hydrodynamicznej, elektrod stalowych („e”) po dwóch stronach pułapki łączącej. Objętość pułapki to 900 nL, zaś jej wymiary to: pułapka odmierzająca: przekrój poprzeczny kanału głównego 580x580  $\mu\text{m}$ ; głębokość bypassów 190  $\mu\text{m}$ ; długość pułapki 2670  $\mu\text{m}$ ; pułapka łącząca: przekrój poprzeczny kanału głównego 870x870  $\mu\text{m}$ ; głębokość bypassów 280  $\mu\text{m}$ , szerokość przerwy w barierze 240  $\mu\text{m}$ ; długość pułapki 1850  $\mu\text{m}$ . Otwarcie i zamknięcie wylotów jest kontrolowane przez zewnętrzne zawory zintegrowane z pompami strzykawkowymi.



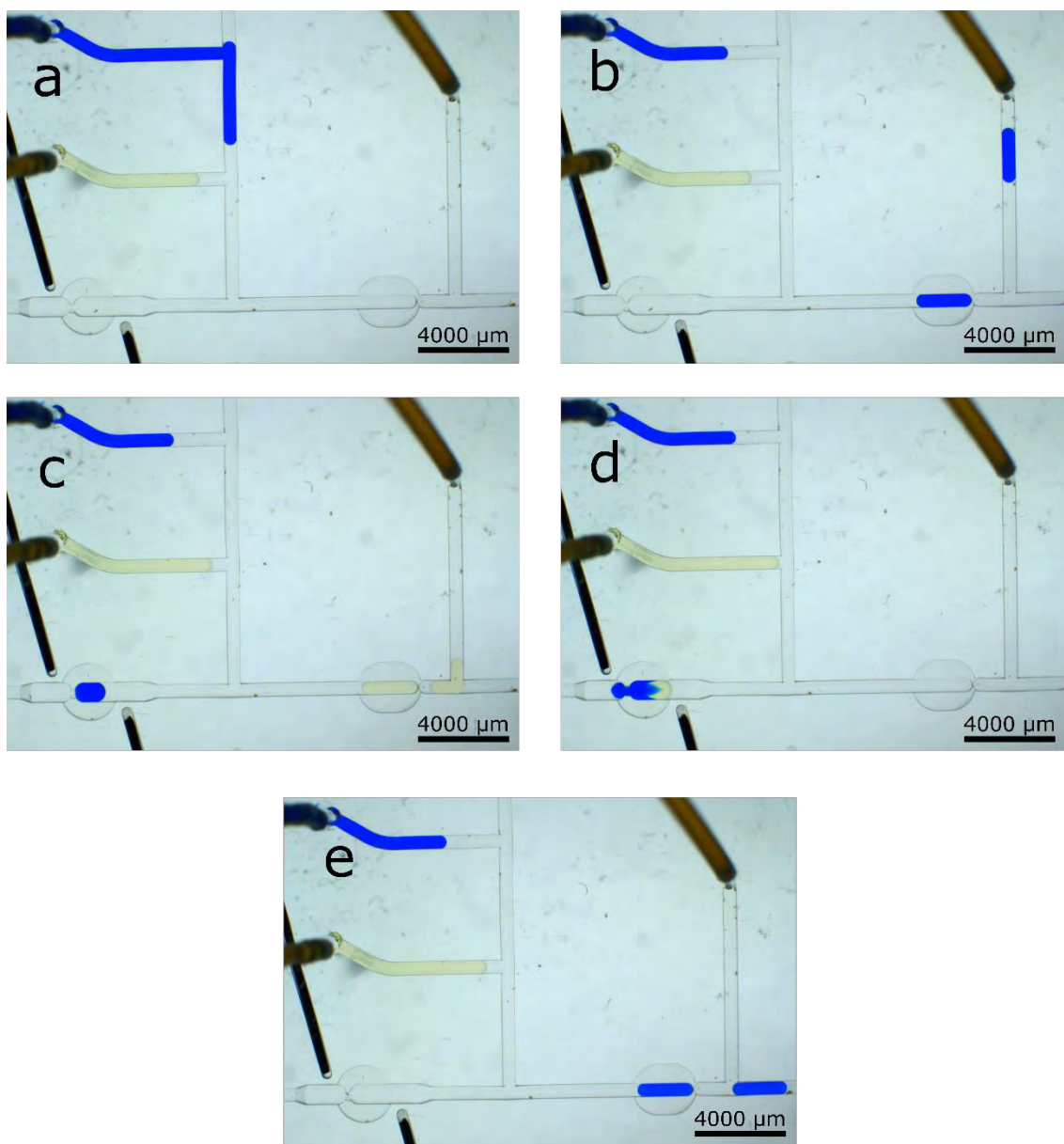
Ryc. 14. Schemat układu mikroprzepływowego do precyzyjnego i dokładnego rozcieńczania próbki. Strzałki oznaczają kierunek ruchu płynów przez dany wlot lub wylot z układu. e – elektrody stalowe.

#### 3.1.2.2. Operacje na płynach

Protokół przygotowania szeregu rozcieńczeń próbki zaczyna się generacją kropli z próbki. Porcja próbki o objętości około dwukrotnie większej niż objętość pułapki była wtłaczana do systemu, a następnie była odcinana na złączu T (Ryc. 15a). Uzyskana kropla próbki była kierowana przez przepływ fazy ciągłej do pułapki hydrodynamicznej odmierzającej. Pułapka odmierzająca unieruchamia porcję fazy rozproszonej o objętości zbliżonej do objętości pułapki, zaś nadmiar objętości jest odcinany na wyjściu z pułapki.



Nadmiar kropli próbki był kierowany do wyjścia na odpady (Ryc. 15b). Kropla, która docierała do wyjścia na odpady opuszczała system przez przewód polimerowy połączony z wylotem z układu mikroprzepłowego.



Ryc. 15. Operacje w protokole rozcieńczeń. a) Na złączu T odmierzana jest kropla próbki (niebieska). Kropla jest kierowana do pułapki odmierzającej. b) Kropla próbki jest odmierzana w pułapce, zaś nadmiar objętości kropli jest usuwany z układu. c) Odmierzona kropla próbki jest umieszczana w pułapce łączącej, zaś w pułapce odmierzającej odmierzana jest kropla rozcieńczalnika. d) Krople próbki i rozcieńczalnika łączą się w pułapce łączącej i przechodzą do kanału mieszającego. e) Wymieszana kropla dzielona jest dokładnie na pół w pułapce odmierzającej. Część zablokowana w pułapce służy do kolejnych rozcieńczeń, zaś część opuszczająca pułapkę jest kierowana do analizy lub do innego układu mikroprzepływowego.

Kropla z nadmiarową objętością była wpychana w przewód wychodzący z układu na tyle daleko, że odwrócenie przepływu w kolejnej operacji nie powodowało powrotu tej niepożądanego kropli do systemu. Faza ciągła, która wypełniała przewód na odpady była następnie zaciągana do układu przez wylot „olej B”. Tak wygenerowany ruch płynów kierował odmierzoną kroplę próbki z pułapki odmierzającej do pułapki łączącej, gdzie odmierzona kropla próbki była chwyтана bez zmiany objętości tej kropli. W następnym kroku porcja rozcieńczalnika była odmierzana w pułapce odmierzającej w ten sam sposób, w który poprzednio odmierzono kroplę próbki. Następnie odmierzona kropla rozcieńczalnika była kierowana do pułapki łączącej w taki sam sposób jak odmierzona kropla próbki (Ryc. 15c).

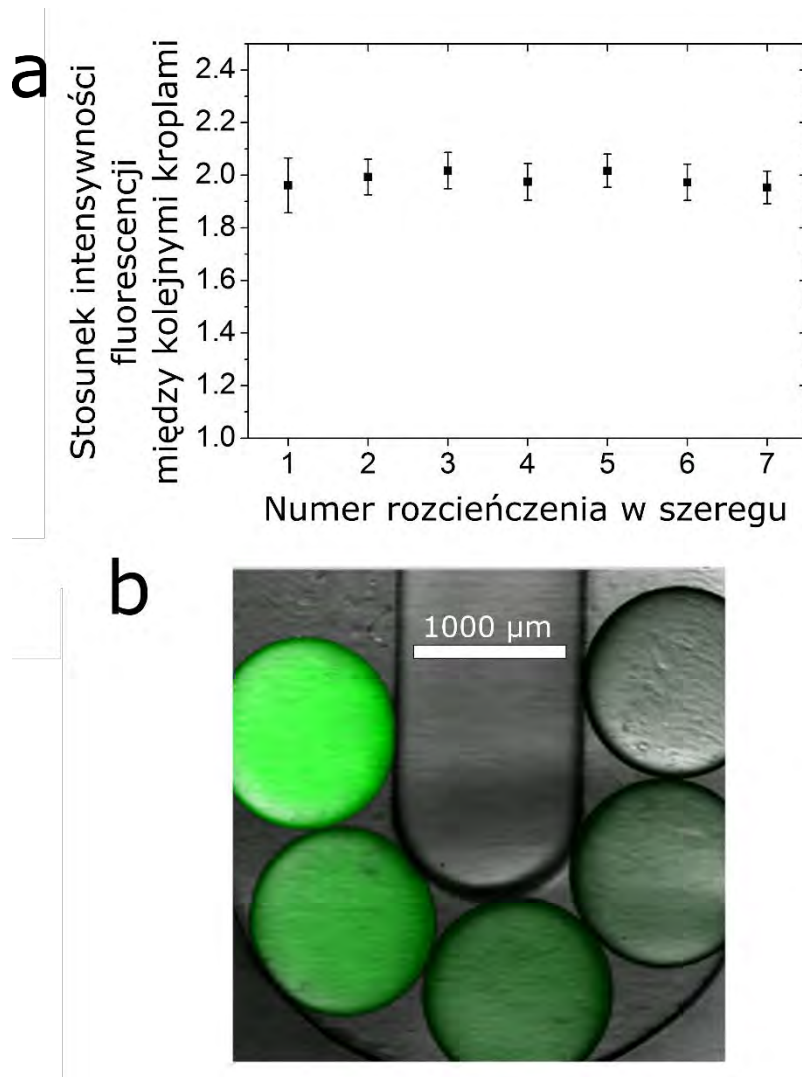
Dwie odmierzone krople (próbki i rozcieńczalnika) łączyły się w pułapce łączącej przez elektrokoalescencję. Połączona kropla była większa niż pułapka łącząca, zatem mogła opuścić pułapkę i zostać przekierowana do wijącego się kanału mieszającego (Ryc. 15d). Kiedy połączona kropla docierała do końca kanału mieszającego, zamykano wylot na odpady i otwierano wylot na pobrane próbki. Następnie, faza ciągła była włączana do systemu przez wlot „olej B”, aby przepchnąć połączoną kroplę do pułapki odmierzającej. Pułapka odmierzająca dzieliła połączoną i wymieszaną kroplę na pół (Ryc. 15e). Kropla z nadmiarową objętością, która nie została unieruchomiona w pułapce odmierzającej, opuszcza układ przez wylot na pobrane próbki i jest pierwszym rozcieńczeniem w szeregu. Druga kropla, która została unieruchomiona w pułapce odmierzającej służyła jako kropla próbki do rozcieńczenia w następnej rundzie protokołu rozcieńczenia.

### 3.1.2.3. Uzyskany współczynnik rozcieńczeń

Wpierw wyznaczono eksperymentalnie zakres stężeń rodaminy 110, który w kroplach o rozmiarze ok. 1 mikrolitra dawał liniową zależność intensywności sygnału od stężenia. Wykorzystano do tego rozcieńczenia wykonane przy użyciu pipety automatycznej. W ten sposób ustalono, że początkowe stężenie rodaminy w eksperymentach będzie wynosiło 50  $\mu\text{M}$ . Takie stężenie powinno pozwolić na co najmniej 10 rozcieńczeń dwukrotnych przy liniowej odpowiedzi intensywności fluorescencji w zależności od stężenia próbki. Tak duże stężenie początkowe rodaminy wymagało dodatku 0,1 % wagowego metanolu do próbki. W kolejnych rozcieńczeniach stężenie metanolu malało, ponieważ rozcieńczalnikiem była czysta woda. Więcej dwukrotnych rozcieńczeń wybranego stężenia początkowego rodaminy owocowało nieliniową zmianą intensywności sygnału

w najbardziej rozcieńczonych kroplach. Podobnie rozpoczęcie rozcieńczeń od stężenia rodaminy równego 100  $\mu\text{M}$  lub wyższym powodowało nieliniową zmianę intensywności sygnału w pierwszych rozcieńczonych kroplach.

Wykonanie protokołu w opisany sposób trwało ok. 20 sekund na jedną rundę rozcieńczenia. Średni uzyskany współczynnik rozcieńczeń dla sprawdzonych 49 rozcieńczeń (7 niezależnych serii po 7 rozcieńczeń każda) wynosił 1,98 , gdzie 2 jest doskonałym dwukrotnym rozcieńczeniem. Zatem dokładność uzyskanych rozcieńczeń wynosiła 1,0 % z precyzją (współczynnikiem zmienności rozcieńczeń, CV) równym 3,6 %. (Ryc. 16)

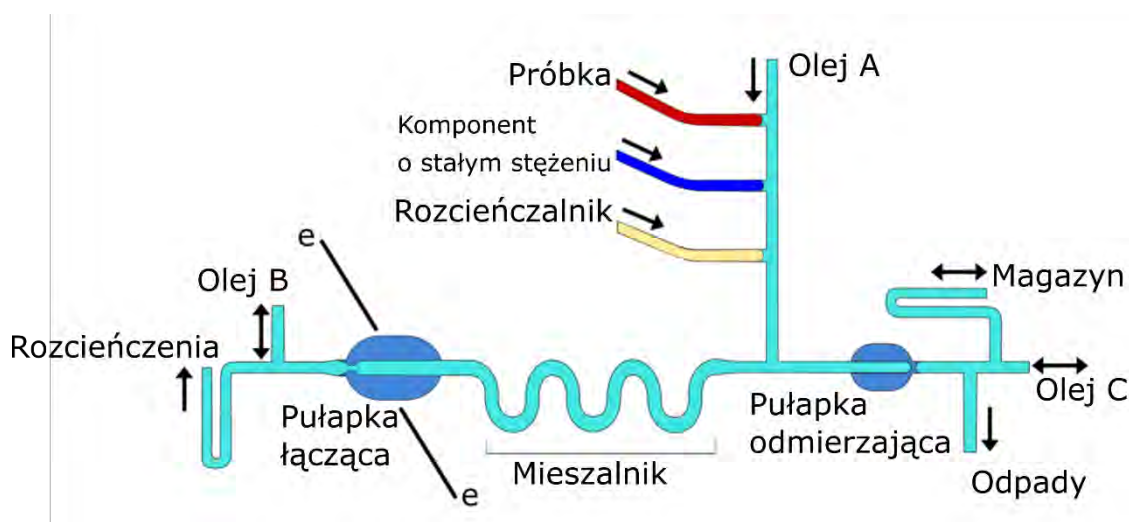


Ryc. 16. Współczynniki rozcieńczeń szeregowych otrzymanych w opracowanym urządzeniu. a) Współczynnik rozcieńczeń (stosunek intensywności fluorescencji między dwiema kolejnymi kroplami) wynosił w przybliżeniu 2 dla wszystkich mierzonych rozcieńczeń. Słupki błędów oznaczają odchylenia standardowe od średniego zmierzonego współczynnika rozcieńczeń z siedmiu niezależnych szeregów rozcieńczeń. b) Przykładowe krople zebrane w kanale po szeregowym rozcieńczeniu. Widoczny jest stopniowy spadek intensywności fluorescencji w kolejnych kroplach.

### 3.1.3. System do generacji szeregu dokładnie dwukrotnych rozcieńczeń z niezależnym dodawaniem drugiej próbki do każdego z rozcieńczeń w szeregu

#### 3.1.3.1 Architektura układu

Użyty układ był podobny do tego opisanego w punkcie 3.1.2.1. z kilkoma modyfikacjami (Ryc. 17): Objętość pułapki odmierzającej w układzie zmodyfikowanym była mniejsza o 40%; dodany został dodatkowy kanał i wlot dla czynnika dodawanego niezależnie; pułapka łącząca została umieszczona za kanałem mieszalnika (nie przed kanałem jak w układzie opisanym w punkcie 3.1.2.1.); za pułapką łączącą znalazły się dwa wyloty: jeden na krople z kolejnymi rozcieńczeniami w szeregu („rozcieńczenia”), jeden dostarczający fazę ciągłą („olej B”); za pułapką odmierzającą znalazł się wylot na odpady, wlot na fazę ciągłą („olej C”), kanał magazynujący.



Ryc. 17. Schemat układu mikroprzepływowego do precyzyjnego i dokładnego rozcieńczania próbki i niezależnego dodawania stałego stężenia innej próbki do generowanych kropli szeregu rozcieńczeń. Strzałki oznaczają kierunek ruchu płynów przez dany wlot lub wylot z układu. e – elektrody stalowe.

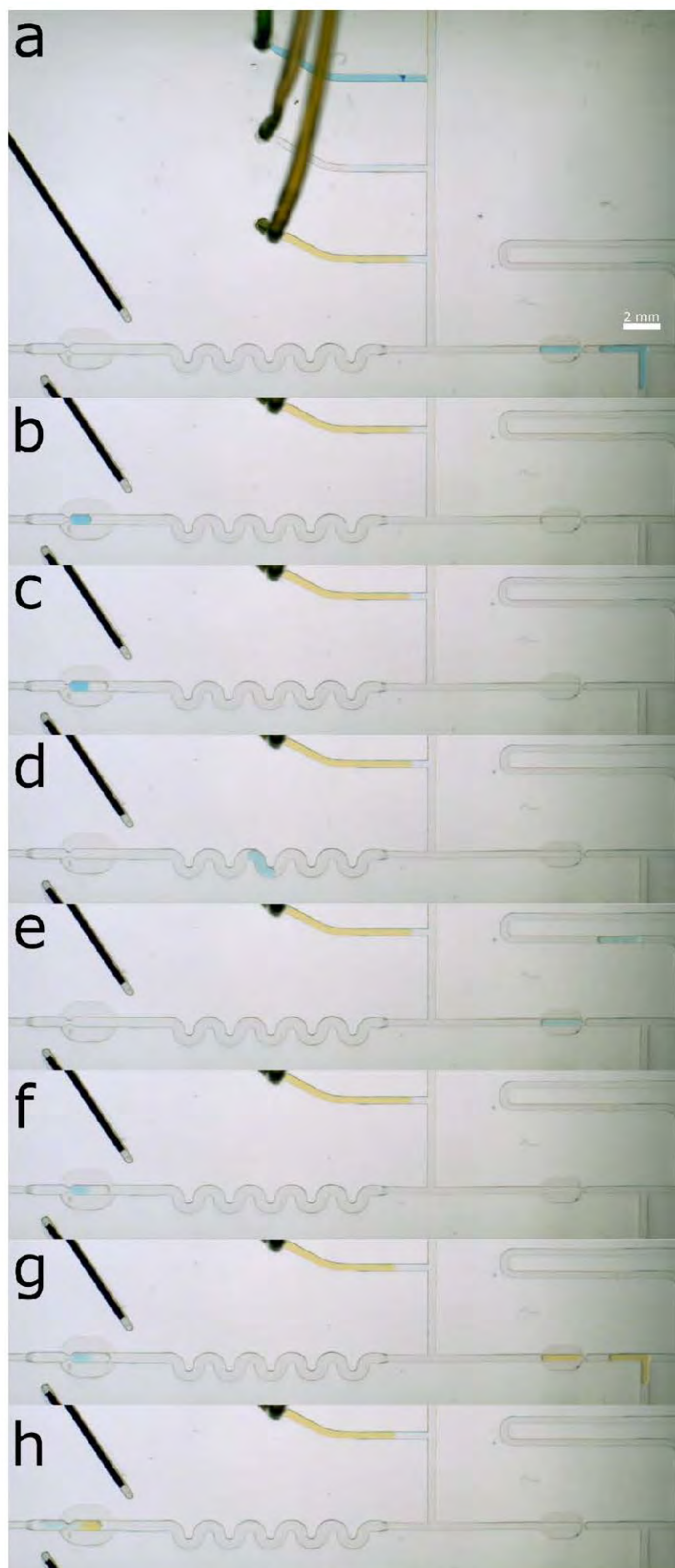
Wymiary użytych pułapek to: pułapka odmierzająca: przekrój poprzeczny kanału głównego 400x400  $\mu\text{m}$ ; głębokość bypassów 150  $\mu\text{m}$ ; długość pułapki 2320  $\mu\text{m}$ ; pułapka łącząca: przekrój poprzeczny kanału głównego 600x600  $\mu\text{m}$ ; głębokość bypassów 190  $\mu\text{m}$ , szerokość przerwy w barierze 240  $\mu\text{m}$ ; długość pułapki 2540  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.3.2. Operacje na płynach

Kropla próbki o objętości większej niż objętość pułapki odmierzającej była generowana na złączu T. Faza ciągła wpływająca z wlotu „olej A” kierowała tę kroplę do pułapki odmierzającej, gdzie odmierzana była objętość kropli próbki zdefiniowana geometrią pułapki, zaś nadmiarowa objętość próbki była kierowana do kanału na odpady (Ryc. 18a). Inaczej niż w systemie opisanym w punkcie 3.1.2. faza ciągła nie była cofana do układu z kanału na odpady – zamiast tego faza ciągła była wtłaczana strzykawką do układu przez wlot „olej C” i zaciągana strzykawką z układu przez wylot „olej B” z taką samą prędkością. Skoordynowane wtłaczanie i zaciąganie płynów kierowało odmierzoną kroplę próbki do pułapki łączącej, która unieruchamiała tę kroplę (Ryc. 18b). Ta odmierzona kropla próbki służyła za podstawę dla pierwszej rundy rozcieńczenia. Opisane tu kroki były powtórzone dla kropli rozcieńczalnika. Odmierzone krople próbki i rozcieńczalnika zetknęły się zatem w pułapce łączącej, gdzie zachodziła elektrokoalescencja kropeł (Ryc. 18c). Następnie zamykany był zawór za wyjściem na odpady i otwierany był zawór za kanałem magazynującym. Następnie, faza ciągła była wtłaczana do układu przez wlot „olej B”, podczas gdy strzykawka zaciągała płyn przez wylot „olej C” z taką samą prędkością. Wygenerowany tak przepływ przepychał połączoną kroplę przez kanał mieszalnika (Ryc. 18d). Następnie, płyny były wtłaczane i zaciągane przez strzykawki i wloty „olej B” i „olej C” tak, by wywołać jeszcze dwukrotne przejście połączonej kropli przez kanał mieszalnika. Następnie, połączona kropla była kierowana do pułapki odmierzającej przez płyn wtłaczany przez wlot „olej B”. Pułapka odmierzająca dzieliła kroplę na dwie połowy. Kropla, która stanowiła nadmiar wobec objętości pułapki odmierzającej, była kierowana do kanału magazynującego (Ryc. 18e). Następnie, zawór za kanałem magazynującym był zamykany, a zawór za wylotem na odpady był otwierany. Następnie, synchronizowany ruch tłoków strzykawek za wlotami „olej A” i „olej B” był użyty do przemieszczenia kropli z pułapki odmierzającej do pułapki łączącej. Następnie, kropla rozcieńczalnika była odmierzana w pułapce odmierzającej. Ta odmierzona kropla rozcieńczalnika była kierowana do pułapki łączącej (Ryc. 18f). W następnym kroku, kropla z czynnikiem dodawanym niezależnie była odmierzana na pułapce odmierzającej (Ryc. 18g) a następnie kierowana do pułapki łączącej. Gdy wszystkie krople złączyły się ze sobą, objętość powstałej kropli przekraczała objętość pułapki łączącej, co umożliwiała połączonej kropli wydostanie się z pułapki łączącej (Ryc. 18h). Wtedy zawór za kanałem na odpady był zamykany, a zawór

za kanałem do poboru rozcieńczeń był otwierany. Połączona kropla opuszczała system przez kanał do poboru rozcieńczeń jako pierwsze rozcieńczenie. Następnie, zawór za kanałem do poboru rozcieńczeń był zamykany, zaś zawór za kanałem magazynującym był otwierany. Wtedy zaciągnięcie płynu przez wylot „olej B” skutkowało przemieszczeniem wcześniej zmagazynowanej kropli rozcieńczonej próbki z kanału magazynującego do pułapki odmierzającej. Ta kropla służyła następnie jako podstawa do kolejnej rundy rozcieńczenia.



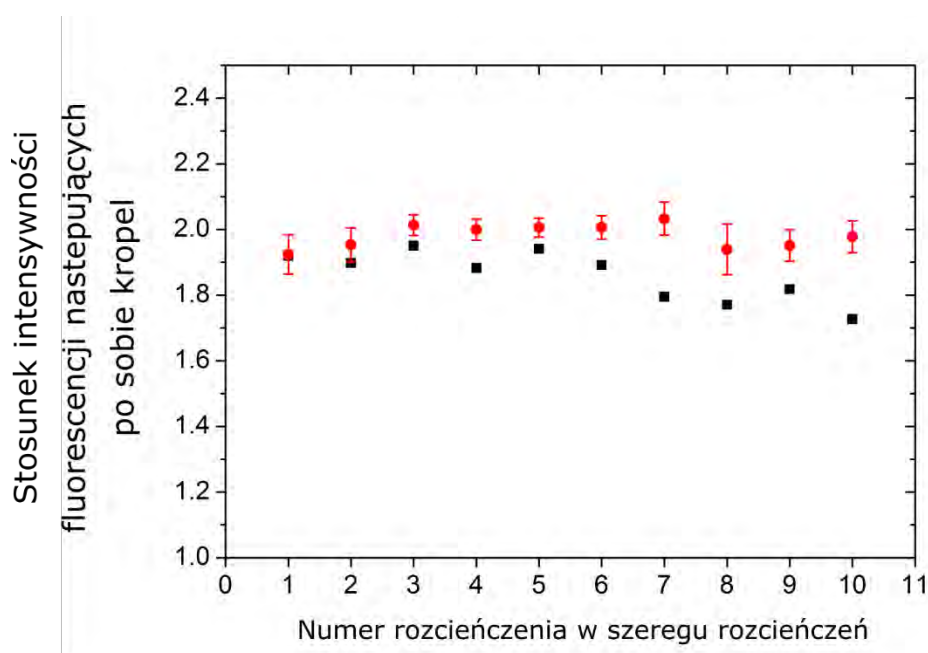


Na poprzedniej stronie: Ryc. 18. Działanie system do rozcieńczania szeregowego próbki i niezależnego dodawania drugiej próbki do kropel z szeregu rozcieńczeń. a) Fotografia układu opisanego na ryc. 17. Próbka rozcieńczana: niebieska, rozcieńczalnik: przezroczysty, próbka dodawana niezależnie: żółta. Kropla próbki jest odmierzana w pułapce odmierzającej, nadmiar objętości próbki trafia do kanału na odpady. Omierzona kropla próbki jest następnie kierowana do pułapki łączącej. b) Odmierzona kropla próbki jest w pułapce łączącej. W pułapce odmierzającej odmierzana jest kropla rozcieńczalnika. Kropla rozcieńczalnika kierowana jest następnie do pułapki łączącej. c) Kropla rozcieńczalnika łączy się z wcześniej odmierzoną kroplą próbki w pułapce łączącej. Objętość nowej kropli jest zbyt mała, żeby nowa kropla wydostała się z pułapki łączącej. d) Nowa kropla z rozcieńczoną próbką jest przepychana przez kanał mieszalnika zadaną liczbę razy, po czym jest kierowana do pułapki odmierzającej. e) Kropla rozcieńczonej próbki jest dzielona dokładnie na pół w pułapce odmierzającej. Jedna połowa pozostaje w pułapce, druga połowa trafia do kanału magazynującego. Kropla z pułapki odmierzającej jest kierowana do pułapki łączącej. f) Odmierzana jest kropla rozcieńczalnika, która następnie jest łączona z rozcieńczoną kroplą próbki. g) Odmierzana jest kropla próbki dodawanej niezależnie. h) Kropla próbki dodawanej niezależnie jest kierowana do pułapki łączącej, gdzie łączy się z kroplą rozcieńczonej próbki. Objętość nowej kropli po połączeniu jest na tyle duża, że kropla z rozcieńczoną próbką i niezależnie dodaną drugą próbką opuszcza system. Kropla z kanału magazynującego jest przesyłana do pułapki łączącej, co daje sytuację analogiczną do tej przedstawionej na zdjęciu (b), z tym że nowa kropla jest dwukrotnie rozcieńczona względem kropli ze zdjęcia (b).

### 3.1.3.3. Uzyskane współczynniki rozcieńczeń

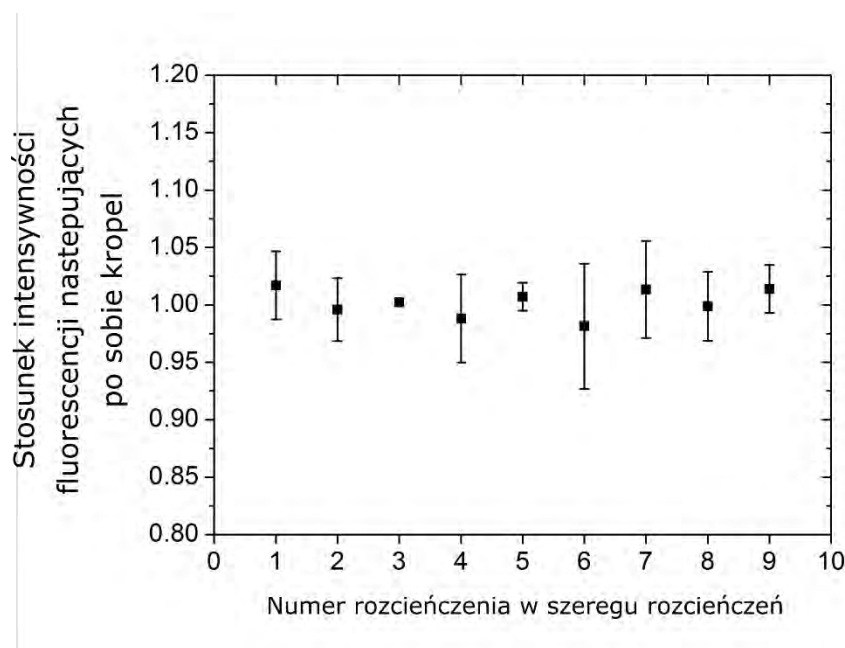
Krople otrzymane po rozcieńczeniach miały objętość ok. 1200 nl. Rozcieńczenie w stosunku do stężenia początkowego próbki wynosiło  $3 \cdot 2^n$ , gdzie  $n$  oznacza numer kropli w szeregu rozcieńczeń, który opuszcza system. Wykonanie protokołu trwało około 120 sekund na jedną rundę rozcieńczenia.

Przeprowadzono eksperymenty, mające na celu ustalenie, czy liczba przejść kropli przez kanał mieszalnika wpłynie na jakość rozcieńczeń. W tym celu zmierzono współczynniki rozcieńczeń dla kropli, które przechodziły przez kanał mieszalnika i) jeden raz lub ii) trzy razy. W przypadku pojedynczego przejścia kropli przez kanał mieszalnika, przeciętny współczynnik rozcieńczeń dla 10 rozcieńczeń wynosił 1,86 (dokładność 7,0 %) przy precyzji (CV) równej 4,1 % (Ryc. 19). Współczynnik rozcieńczeń malał z kolejnymi rozcieńczeniami, jednak nie jest to rezultat znaczący statystycznie. W przypadku kropli, które przechodziły przez kanał mieszalnika trzy razy, przeciętny współczynnik rozcieńczeń dla 50 rozcieńczeń (5 szeregów po 10 rozcieńczeń) wynosił 1,98 (dokładność 1,0 %) przy precyzji 2,8 % (Ryc. 19).



Ryc. 19. Współczynniki rozcieńczeń próbki uzyskane w eksperymentach przy różnej liczbie przejść połączonej kropli próbki i rozcieńczalnika przez kanał mieszający. Czarne kwadraty: jedno przejście; czerwone koła: trzy przejścia. Dla jednego przejścia przeprowadzono jeden eksperyment z 10 rozcieńczeniami, dla trzech przejść przeprowadzono pięć eksperymentów po 10 rozcieńczeń, słupki błędów dla eksperymentu z trzema przejściami oznaczają odchylenie standardowe z pięciu eksperymentów.

Do ustalenia, czy czynnik dodawany niezależnie do każdego rozcieńczenia próbki zachowuje swoje stężenie w każdej z kropli szeregu rozcieńczeń, przeprowadzono eksperyment, w którym barwnik fluorescencyjny znajdował się w fazie wodnej wtłaczanej do systemu przez wlot na czynnik niezależny, zaś przez wlot na próbkę i przez wlot na rozcieńczalnik wtłaczana była do układu czysta woda. Przeciętny współczynnik rozcieńczeń dla 27 rozcieńczeń (3 szeregi po 9 rozcieńczeń) wynosił 1,002 (dokładność 0,2 %) z precyzją równą 2,9 %. (Ryc. 20)



Ryc. 20. Współczynniki rozcieńczeń próbki dodawanej niezależnie do szeregu rozcieńczeń drugiej próbki. Słupki błędów oznaczają odchylenie standardowe z trzech eksperymentów.

Aby sprawdzić, czy opisywany system do rozcieńczania szeregowego jest kompatybilny z mediami do hodowania bakterii i by sprawdzić, czy współczynniki rozcieńczeń zmieniają się w zależności od parametrów fazy rozproszonej, przeprowadzono eksperymenty z pożywką bakteryjną MH jako fazą rozproszoną. Pożywka MH zawiera skrobię, hydrolizat kazeiny i wywar z wołowiny (białka), co oznacza że lepkość i napięcie powierzchniowe pożywki MH są najprawdopodobniej inne niż czystej wody. Pożywka MH jest często wykorzystywana do oznaczania odporności na antybiotyki w bakteriach. Po wykonaniu jednego szeregu rozcieńczeń w pożywce MH współczynnik rozcieńczeń wynosił 1,99 (dokładność 0,5 %) przy precyzji równej 2,6 %.

## 3.2. Pasywna emulsyfikacja szeregu mikrolitrowych kropeł

### 3.2.1. Wprowadzenie

Metody emulsyfikacji szeregu dużych kropeł są znane<sup>41–46,136,165</sup>, aczkolwiek dotychczas opisane techniki mają dwie zasadnicze wady: wymagają dodatkowego źródła przepływu fazy ciągłej do emulsyfikacji fazy rozproszonej, poza tym uzyskane emulsje są luźno upakowane – stosunek objętości fazy rozproszonej do fazy ciągłej waha się między kilkoma a kilkunastoma procentami. Luźne upakowanie emulsji może nastręczyć problemów w przypadku wielu emulsji, bowiem szereg takich emulsji zajmowałby niepotrzebnie dużo miejsca. W badaniach nad mikroprzepływami można w ostatnich latach zaobserwować tendencję do konstrukcji urządzeń, które wykonywałyby operacje na kroplach w sposób pasywny, zakodowany w geometrię układu. Dzięki takiemu podejściu można zredukować ilość sprzętu niezbędnego do prowadzenia eksperymentów, a co za tym idzie, umożliwić rozpowszechnienie urządzeń mikroprzepływowych w niewyspecjalizowanych laboratoriach. W przypadku generacji kropeł wysiłki zostały skierowane w stronę emulsyfikacji wymuszonej geometrią kanału (ang. microfluidic step emulsification, MSE). Odrywanie kropeł w MSE jest bardzo powtarzalne<sup>166</sup>, o ile powstająca emulsja nie blokuje przepływu płynów w przewężeniu, w którym generowane są krople. Istnieje wiele metod oczyszczania przewężenia z generowanej emulsji, takich jak dodatkowa dysza z przepływającym płynem<sup>50,55,167</sup>, wykorzystanie grawitacji i różnicy gęstości fazy rozproszonej i ciągłej<sup>57,168</sup>, wykorzystanie siły odśrodkowej i różnicy gęstości faz<sup>169</sup>, wykorzystanie pola magnetycznego do generacji kropli ferrofluidu<sup>61</sup>. Metody grawitacyjne i oparte na sile odśrodkowej nie mogą być wykorzystane w zorientowanym poziomo układzie (a tak najczęściej są zorientowane układy mikroprzepływowe), co ogranicza ich użyteczność. Krople ferrofluidu nie są zaś odpowiednie do prowadzenia eksperymentów biologicznych. Cytowane powyżej prace, traktujące o MSE, dotyczą emulsyfikacji fazy wodnej w oleju, przy czym żadna z prac nie odnosi się do zagadnienia emulsyfikacji kropli – jedynie emulsyfikacji „niekończącej się” fazy wodnej. Jeżeli faza wodna się nie kończy, warunki emulsyfikacji są faktycznie bliskie do identycznych w dowolnym momencie emulsyfikacji, zatem monodispersja otrzymanej tak emulsji będzie niemal doskonała. Jednak analiza rozkładu objętości kropeł uzyskanych przez emulsyfikację szeregu kropeł przy użyciu koncentracji

przepływu (flow focusing) pozwala stwierdzić, że rozmiary otrzymywanych kropeł są różne, gdy otrzymane są z początkowej części kropli, z jej środka lub z jej końca<sup>44</sup>. Zwłaszcza istotne wydaje się zagadnienie emulsyfikacji tylnej części kropli, ponieważ rozmiar kropeł wygenerowanych w z tej części kropli najbardziej odbiega od przeciętnego rozmiaru kropeł uzyskanej emulsji. Dla konstrukcji systemu do oznaczania scMIC istotne jest opracowanie modułu, który produkowałby emulsje z szeregu dużych kropeł w procesie MSE, ponieważ oznaczałoby to duży stopień upakowania emulsji. Upakowane w szeregu emulsje zajmowałyby krótszy odcinek przewodu zbiorczego, poza tym analiza takiego szeregu byłaby szybsza niż szeregu luźno upakowanych emulsji.

Moduł emulsyfikujący opisany w tej części rozprawy miał umożliwić następujące operacje i rozwiązać następujące problemy: (1) emulsyfikacja szeregu dużych kropeł i uzyskanie monodispersyjnych emulsji; (2) usuwanie powstającej emulsji z progu emulsyfikującego bez użycia dodatkowych źródeł ciśnienia, takich jak pompy strzykawkowe, przy układzie z kanałami zorientowanymi poziomo lub pionowo; (3) prowadzenie złożonych operacji na dużych kroplach w głębokich i szerokich kanałach przed emulsyfikacją w tym samym urządzeniu mikroprzepływowym.

### **3.2.2. Ogólna architektura układów**

Moduł emulsyfikujący miał za zadanie w sposób pasywny wygenerować emulsje z szeregu dużych kropeł. Duże krople przed emulsyfikacją powinny być umieszczone w kanale o dużym przekroju poprzecznym, aby długość dużych kropeł w szeregu była najwyżej kilkukrotnie większa niż głębokość lub szerokość kanału, tak by usprawnić mieszanie wewnątrz kropeł i by zmniejszyć całkowitą długość kanałów w układzie. Wykazano, iż emulsyfikacja na progu generuje krople o średnicach zwiększających się liniowo wraz ze wzrastającą głębokością szczeliny przed progiem<sup>169–171</sup>. Celem tej części projektu było zatem wyprodukowanie małych kropeł ze zbioru dużych kropeł poprzez emulsyfikację na progu w kanale o dużym przekroju poprzecznym. Wobec tego zmniejszono głębokość kanału bezpośrednio przed progiem emulsyfikującym, by średnice generowanych kropeł były małe przy zachowaniu dużych rozmiarów kanałów przed zwężeniem.

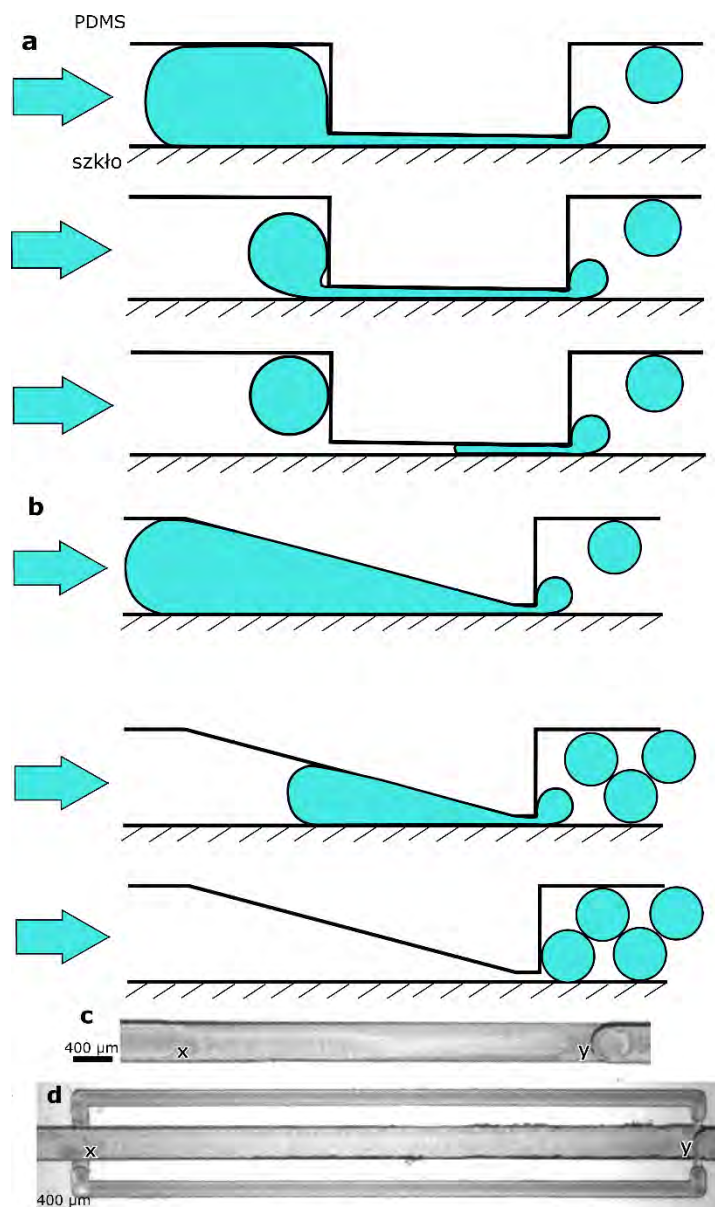
Problem pojawiał się w miejscu, w którym głęboki kanał stawał się płytki. Zaobserwowano, że dla nagłej zmiany głębokości kanału z 400  $\mu\text{m}$  do 70  $\mu\text{m}$  przy



prędkości przepływu  $0,25 \text{ ml h}^{-1}$  i przy stężeniu surfaktantu PFPE-PEG-PFPE równym 0,1 % wagowych w fazie ciągłej (w oleju Novec 7500) tylna część dużej kropli nie wchodziła do zwężenia, wobec czego nie można jej było emulsyfikować na progu. (Ryc. 21a)

Aby rozwiązać problem części dużej kropli nie wchodzącej do zwężenia przed progiem, zaprojektowano zwężenie polegające na łagodnym stałym spadku głębokości kanału do momentu, w którym kanał osiągnie zaplanowaną przed progiem głębokość. Utworzona została zatem pochylnia prowadząca do przewężenia przed progiem. Pochylnia zapobiega nagłemu powstawaniu dużych krzywizn w dużej kropli przed wejściem tej kropli do przewężenia (Ryc. 21b). Bez nagłych zmian w krzywiznie kropli, duża kropla powinna być mniej podatna na podzielenie się przed przewężeniem. Zmiana głębokości za przewężeniem jest nagła, co umożliwia emulsyfikację w tym pożądanym miejscu. W dodatkowo zmodyfikowanym module emulsyfikatora umieszczono dwa płytkie kanały, biegnące równoległe do kanału głównego z pochylnią. Wloty do tych kanałów (bypassów) znajdowały się tuż przed początkiem pochylni, zaś wyloty z tych kanałów znajdowały się bezpośrednio za progiem emulsyfikatora. Wloty do bypassów są wąskie i płytkie, tak że duże krople, płynące głównym kanałem, nie wchodzi do bypassów ze względu na niekorzystnie duże ciśnienie Laplace'a, które krople musiałyby pokonać przy wchodzeniu do bypassów. Wymiary: Przekrój poprzeczny kanału głównego  $400 \times 400 \text{ }\mu\text{m}$ , wysokość kanału bezpośrednio przed progiem emulsyfikującym  $70 \text{ }\mu\text{m}$ , przekrój poprzeczny kanału w dół progu  $400 \times 400 \text{ }\mu\text{m}$ , przekrój poprzeczny bypassów:  $220$  (szerokość)  $\times$   $200$  (głębokość)  $\mu\text{m}$ , przekrój poprzeczny wlotów do bypassów:  $220$  (szerokość)  $\times$   $50$  (głębokość)  $\mu\text{m}$ .





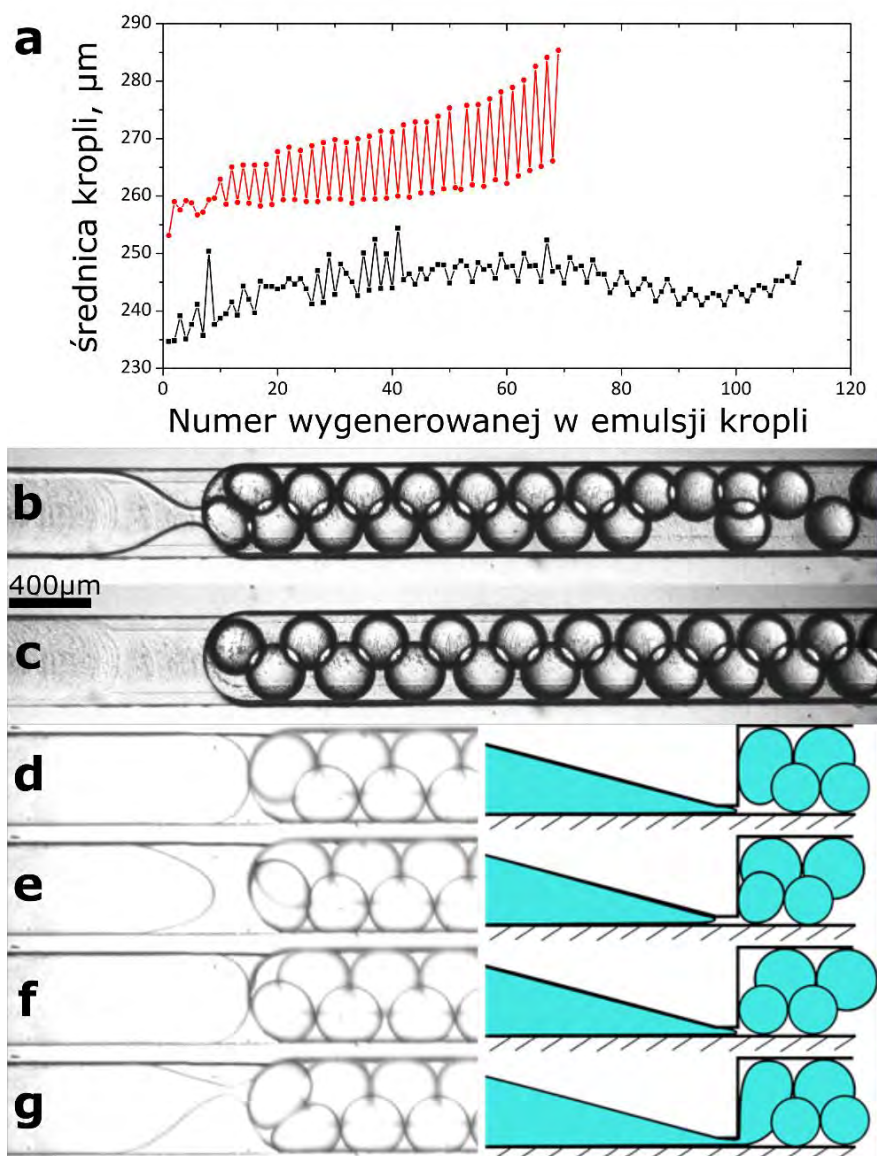
Ryc. 21. Moduł do pasywnej emulsyfikacji w kanale mikroprzepływowym. Strzałki oznaczają kierunek przepływu płynów. a-b) Schemat przekroju podłużnego modułów. Zwężenie w kanale prowadzi do nagłego przejścia do głębokiego kanału, gdzie na progu odrywają się krople. a) Nagłe przejście pomiędzy głębokim kanałem a zwężeniem powoduje pozostanie tylnej części kropli przed przewężeniem jako objętości martwej. b) Łagodne spadek głębokości kanałów (pochylnia) umożliwia całkowite przejście kropli przez przewężenie, bez pozostawiania objętości martwych. c) Zdjęcie modułu wykonane z góry. x – początek pochylni, y – nagła zmiana głębokości; próg, na którym generowane są krople. d) Zdjęcie modułu z bypassami (patrz: rozdział 3.2.4.). x i y jak w (c), z tym że w x dodatkowo zaczynają się bypassy na fazę ciągłą, zaś w y bypassy wpadają z powrotem do kanału głównego zaraz za progiem.

### 3.2.3. Pochylnia prowadząca do progu emulsyfikującego

Aby zmniejszyć krzywizny powstające w dużej kropli podczas zbliżania się do przewężenia przed progiem do emulsyfikacji, należało przetestować różne kąty nachylenia pochylni prowadzącej do przewężenia. Dla kąta nachylenia równego  $10^\circ$ , przy prędkości przepływu  $0,25 \text{ ml h}^{-1}$  dla stężeń wagowych surfaktantu równych  $0,1 \%$  i  $0,5 \%$ , na pochylni przed przewężeniem o głębokości  $70 \mu\text{m}$  pozostawała kropla o objętości ok.  $10 - 15 \text{ nL}$ , podczas gdy przednia część dużej kropli przechodziła przez przewężenie i była emulsyfikowana. Zablockowana kropla nie przechodziła przez przewężenie przez co najmniej  $30$  sekund ciągłego przepływu fazy ciągłej w kanale. Dla kąta nachylenia równego  $2,5^\circ$  cała duża kropla wchodziła do przewężenia – działo się tak dla obydwu testowanych stężeń surfaktantu ( $0,1 \%$  i  $0,5 \%$  wagowych) przy prędkości przepływu równej  $0,25 \text{ ml h}^{-1}$ .

Uznano zatem kąt nachylenia pochylni równy  $2,5^\circ$  za kąt odpowiedni dla dalszych eksperymentów. Zwiększanie prędkości przepływu powodowało przejście całej objętości dużej kropli przez przewężenie w każdym z opisanych do tej pory warunków, jednak takie przejście powodowało obniżenie monodispersyjności powstających emulsji.

W podstawowej, opisanej w tym rozdziale geometrii modułu emulsyfikującego (pochylnia prowadząca do przewężenia, brak bypassów), nowopowstające krople emulsji nie były efektywnie usuwane z pobliża progu. Krople, które zostawały blisko progu hamowały formowanie następnych kropli (Ryc. 22b-g). Powstające w ten sposób krople są okresowo większe i mniejsze (Ryc. 22). Ten efekt jest szczególnie widoczny dla modułu z pochylnią o kącie nachylenia  $2,5^\circ$ , gdzie krople tworzą dwie populacje średnic (Ryc. 22a). Krople generowane początkowo tworzą jedną populację rozmiarów, dopiero później tworzą się populacje kropeł. Kolejne krople generowane na pochylni o kącie nachylenia  $2,5^\circ$  mają także coraz większą średnicę. Rysunek 22d-g prezentuje schemat generacji kropeł w takiej geometrii i wyjaśnia powstawanie dwóch populacji kropeł.

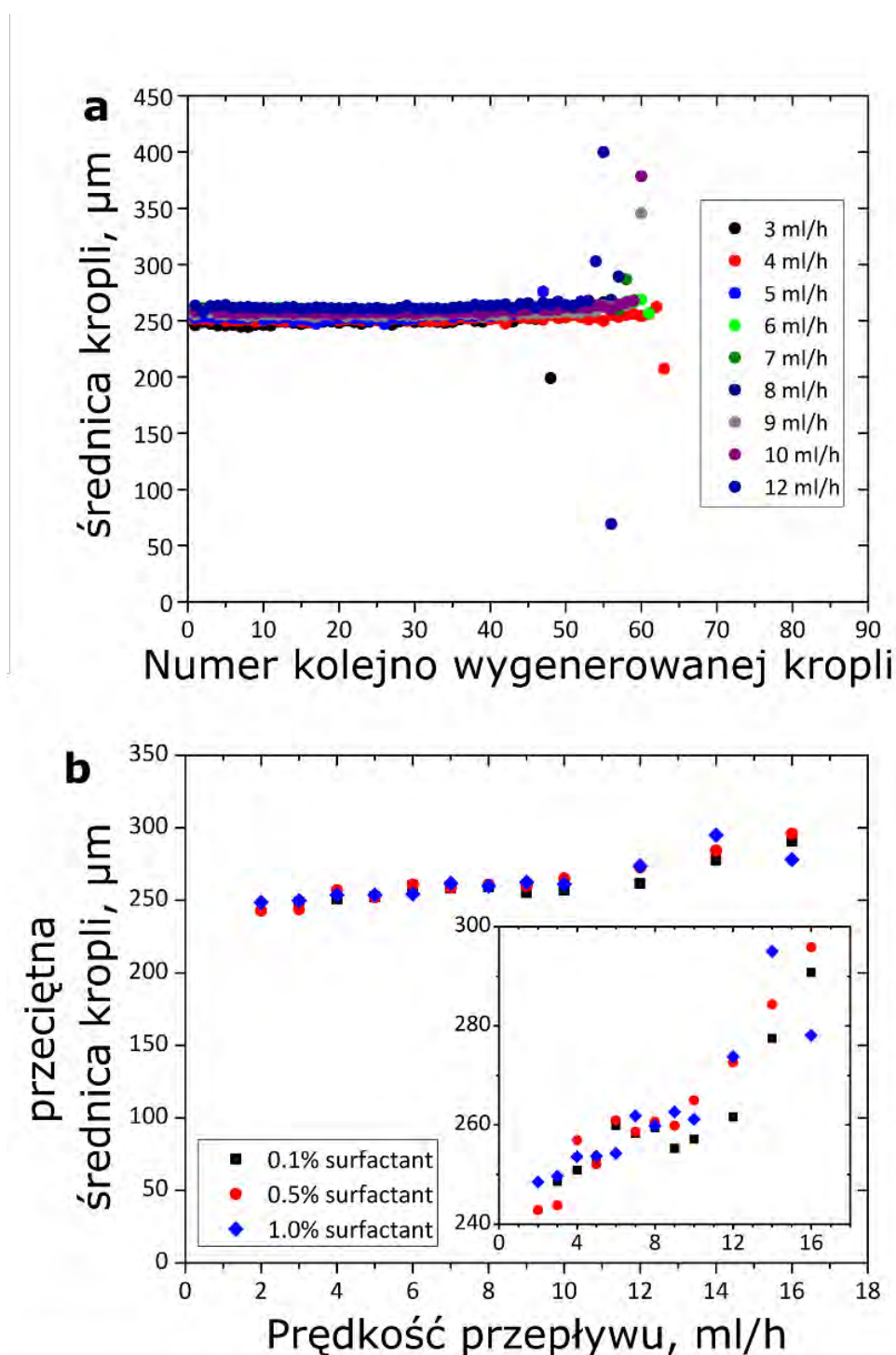


Ryc. 22. Pochylnia prowadząca do progu emulsyfikującego. a) Rozmiar kolejnych kropli generowanych w układach z pochylniami o kątach nachylenia  $2,5^\circ$  (czerwony kolor) i  $10^\circ$  (czarny kolor). Kropla nr „1” to kropla, która oderwała się od dużej kropli jako pierwsza. Punkty są połączone aby podkreślić periodyczność w rozmiarze formowanych kropli. b-c) Generacja kropli widziana od góry. Przepływ realizowany od lewej do prawej (na zdjęciach). Widoczne jest przewężenie w fazie wodnej w przy generacji kropli na progu (b), a także widoczne jest, że po generacji całej emulsji (c), krople na zdjęciu ułożone na dole są większe niż te ułożone na zdjęciu na górze. d-g) Generacja populacji kropli. Przepływ realizowany od lewej do prawej (na zdjęciach). Po lewej: zdjęcia z góry, po prawej: schematy z widokiem z boku. d) Duża kropla usadowiona jest nad progiem w jego bezpośrednim sąsiedztwie. e) Nowa porcja wody wypełnia wolną przestrzeń w pobliżu progu, stając się matłą kroplą. f) Mała kropla pozostawia więcej miejsca na fazę wodną bezpośrednio przy progu. g) Faza wodna wypełnia wolne miejsce w bezpośrednim sąsiedztwie progu, stając się dużą kroplą.

### **3.2.4. Pochylnia prowadząca do progu emulsyfikującego wyposażona w bypassy**

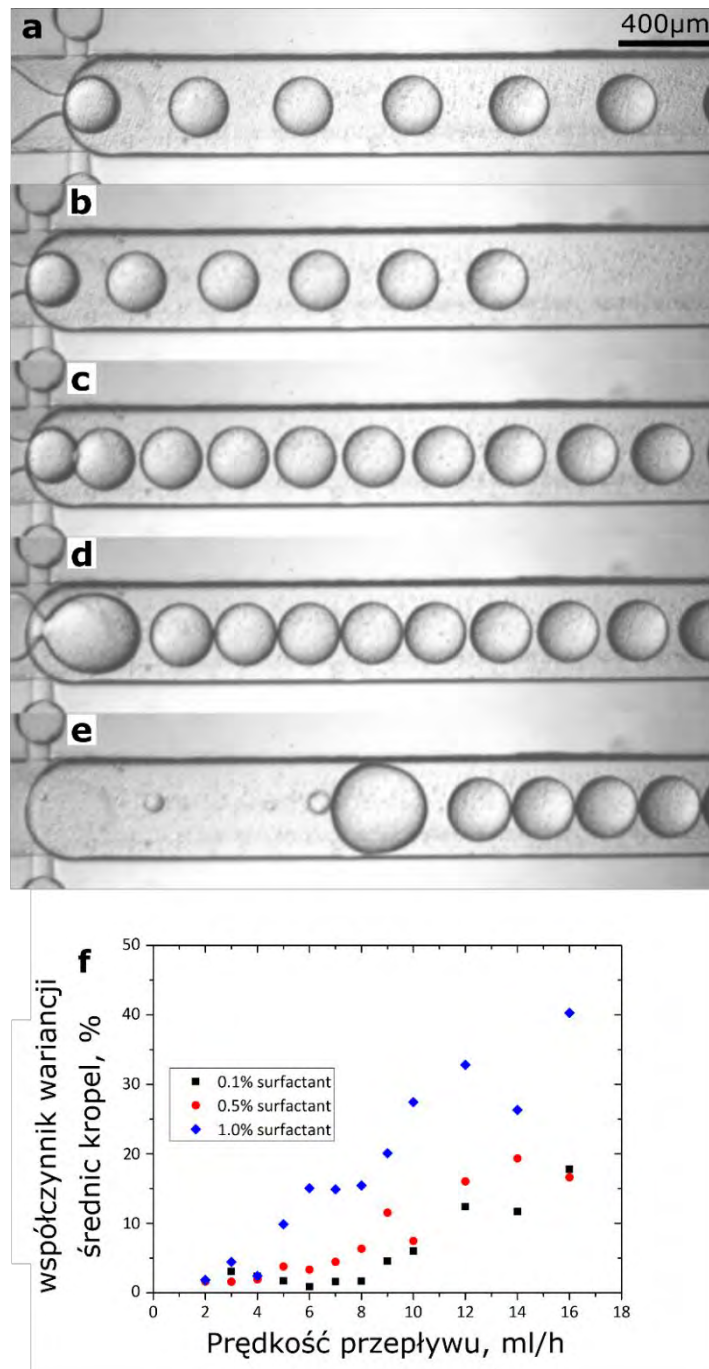
Aby rozwiązać problem kropeł emulsji, gromadzących się w pobliżu progu przy poziomo zorientowanym układzie, wprowadzono płytki kanały (bypassy) biegnące wzdłuż pochylni przed przewężeniem i progiem. Wlot do bypassów znajdował się przed pochylnią, zaś wylot z bypassów znajdował się bezpośrednio za progiem emulsyfikującym. (Ryc. 21d) Gdy duża kropla wpływa na pochylnie, opór hydrauliczny w głównym kanale wzrasta, zaś część fazy ciągłej opływa kanał główny przez bypassy. Faza ciągła wraca z bypassów do kanału głównego bezpośrednio za progiem do emulsyfikacji, odpychając powstające krople emulsji od progu.

Wygenerowano emulsje kropeł w module z pochylnią o kącie nachylenia  $2,5^\circ$  z dodanymi bypassami w zakresie prędkości przepływów od 2 do 16  $\text{ml h}^{-1}$ . (Ryc 23) Współczynnik zmienności (CV) średnic generowanych kropeł był mniejszy niż 3 % dla prędkości przepływu od 3  $\text{ml h}^{-1}$  do 8  $\text{ml h}^{-1}$  przy stężeniu wagowym surfaktantu równym 0,1 %. (Ryc 23a). Przeciętna średnica generowanych kropeł wzrastała nieco wraz ze wzrostem prędkości przepływu płynów w układzie. Zwiększenie prędkości przepływu o 300 % (z 3  $\text{ml h}^{-1}$  do 12  $\text{ml h}^{-1}$ ) spowodowało wzrost przeciętnej średnicy generowanych kropeł o 5 % przy stężeniu wagowym surfaktantu równym 0,1 %. (Ryc 23b) Stężenie surfaktantu zdawało się nie wpływać na średnią średnicę generowanych kropeł (Ryc 23b). Generowane krople były natychmiast odpychane od progu przez fazę ciągłą przepływającą bypassami wokół emulsyfikowanej kropli (Ryc. 23c).



Ryc. 23. Emulsje generowane w układzie z pochylnią i bypassami. a) Rozmiar każdej kropli z emulsji generowanych w jednym powtórzeniu w zakresie prędkości od 3 ml h<sup>-1</sup> do 8 ml h<sup>-1</sup>. Widoczne krople o rozmiarach odstających od pozostałych kropeł z emulsji powstawały zawsze na końcu emulsji. b) Średni rozmiar kropeł emulsji generowanych przy danej prędkości przepływu i danym stężeniu surfaktantu. Rozmiar kropeł zdaje się wzrastać liniowo wraz ze wzrostem prędkości przepływu aż do prędkości 12 ml h<sup>-1</sup>, powyżej to której prędkości przepływu średnica kropeł wzrasta nieliniowo wraz z prędkością przepływu. Stężenie surfaktantu w fazie ciągłej zdaje się nie wpływać w testowanym zakresie na rozmiar generowanych kropeł.



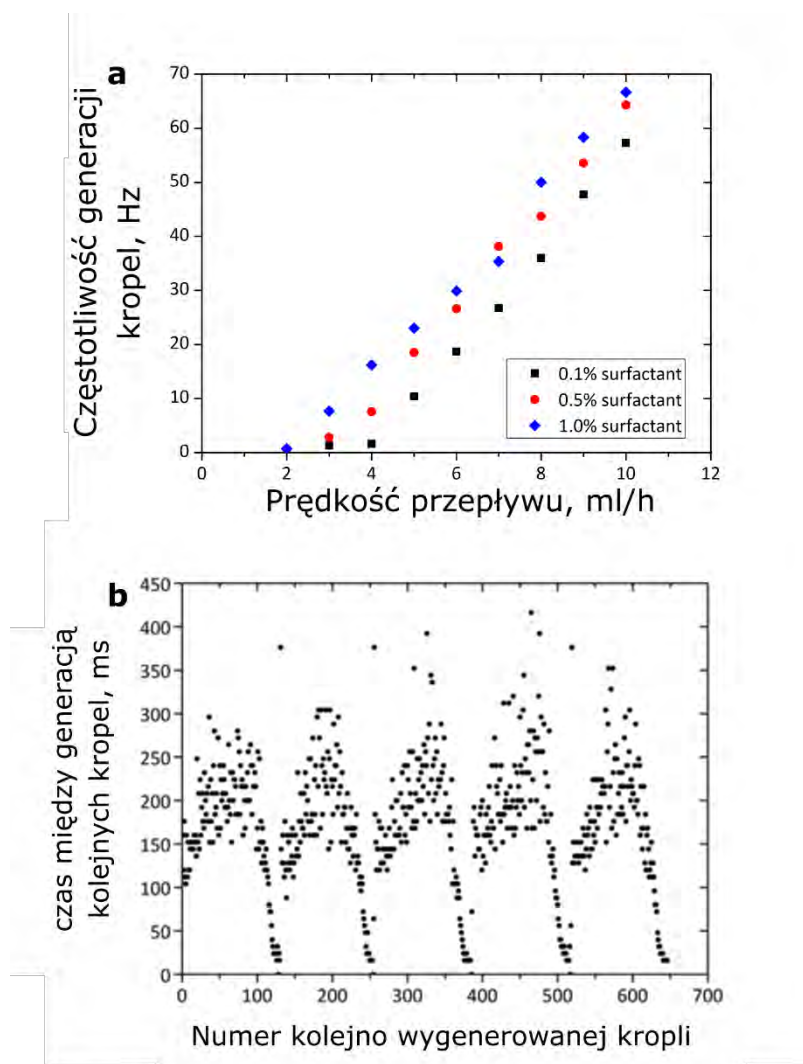


Ryc. 24. Polidispersja kropeł generowanych w układzie z bypassami. a) Emulsyfikacja kropli w układzie z bypassami. Przepływ realizowany z lewej do prawej (na zdjęciu). Krople generowane są na progu, faza ciągła z bypassów odpycha nowe krople. Przed progiem widoczne zwężenie w fazie rozproszonej, w którym to zwężeniu nastąpi oderwanie małej kropli od reszty fazy rozproszonej. b-e) Kolejne etapy emulsyfikacji dużej kropli przy wysokim stężeniu surfaktantu i polidispersja emulsji. b) Generacja kropeł emulsji z początkowej części dużej kropli. c) W miarę jak duża kropla staje się krótsza (z powodu jej emulsyfikacji), nowe krople generowane są częściej. W końcu krople generowane są tak często, że nowe krople nie nadążają z ucieczką z progu i stanowią opór dla nowych kropeł, co widać na zdjęciu na progu. d) Gdy opór będzie dość duży, zwężenie w fazie rozproszonej nie pęknie, zatem zostanie wygenerowana kropla większa od pozostałych. e) Za większą od pozostałych kroplą, powstają z końcowej części dużej kropli, płynie kilka kropełek dużo mniejszych od pozostałych w populacji kropeł. Te ostatnie krople są źródłem obserwowanej polidispersji emulsji.

CV średnic generowanych kropeł było większe dla wyższych prędkości przepływu i wyższych stężeń surfaktantu (Ryc. 24f). CV średnic pierwszych 20 wygenerowanych kropeł wynosił poniżej 1 % dla wszystkich testowanych stężeń wagowych surfaktantu (0,1 %, 0,5 %, 1,0 %) dla prędkości przepływu pomiędzy 2 ml h<sup>-1</sup> a 12 ml h<sup>-1</sup>. Ostatnie z generowanych kropeł emulsji (pochodzące z tylnej części dużej emulsyfikowanej kropli) były widocznie większe lub mniejsze niż pozostałe krople z wygenerowanych emulsji (Ryc. 23a, ryc. 24a-e). Zwiększanie prędkości przepływu i zwiększanie stężenia surfaktantu w fazie ciągłej powodowało generację emulsji o większym stopniu polidispersji. (Ryc. 24f)

Dla najwyższego testowanego stężenia surfaktantu (1,0 % wagowych) duża kropla nie mogła dopłynąć do przewężenia przy prędkości przepływu 1 ml h<sup>-1</sup>, emulsyfikacja zachodziła dopiero przy następnej testowanej wartości prędkości przepływu, tj. 2 ml h<sup>-1</sup>. Dla niższych testowanych stężeń surfaktantu (0,1 % i 0,5 % wagowych) duża kropla nie mogła dopłynąć do przewężenia przy prędkościach przepływu 1 ml h<sup>-1</sup> i 2 ml h<sup>-1</sup>, emulsyfikacja zachodziła dopiero przy następnej testowanej wartości prędkości przepływu, tj. 3 ml h<sup>-1</sup>. Częstotliwość generacji kropeł na progu wzrastała liniowo z prędkością przepływu do najwyższej przetestowanej wartości prędkości przepływu (10 ml h<sup>-1</sup>) dla wszystkich testowanych stężeń surfaktantu. Częstotliwość generacji kropeł była wyższa dla wyższych stężeń surfaktantu. Ponadto, częstotliwość generacji kropeł nie była stała w obrębie jednej biblioteki kropeł (emulsji generowanej z pojedynczej dużej kropli). (Ryc. 25)



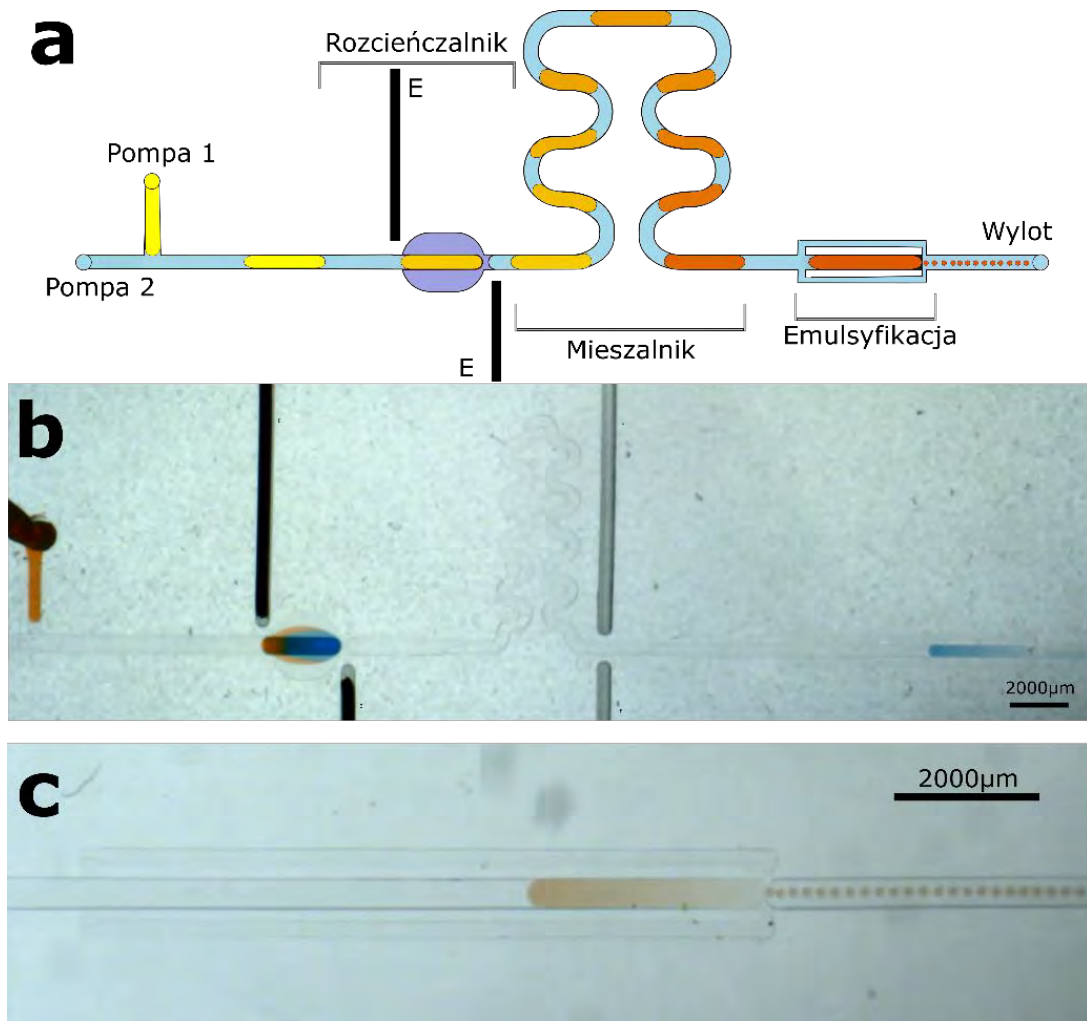


Ryc. 25. Częstotliwość generacji kropli w geometrii z bypassami. a) Średnia częstotliwość generacji kropli rośnie liniowo wraz z prędkością przepływu. Średnia częstotliwość generacji kropli rośnie wraz ze stężeniem surfaktantu w fazie ciągłej. b) Czas między generacją kolejnych kropli zmierzony dla 5 dużych emulsyfikowanych kropli, odstępy pomiędzy kolejnymi dużymi kroplami pominięte. Częstotliwość generacji kropli emulsji nie jest stała dla danej emulsyfikowanej kropli.

### 3.2.5. Pochylnia z bypassami zintegrowana z prostym szeregowym rozcieńczalnikiem

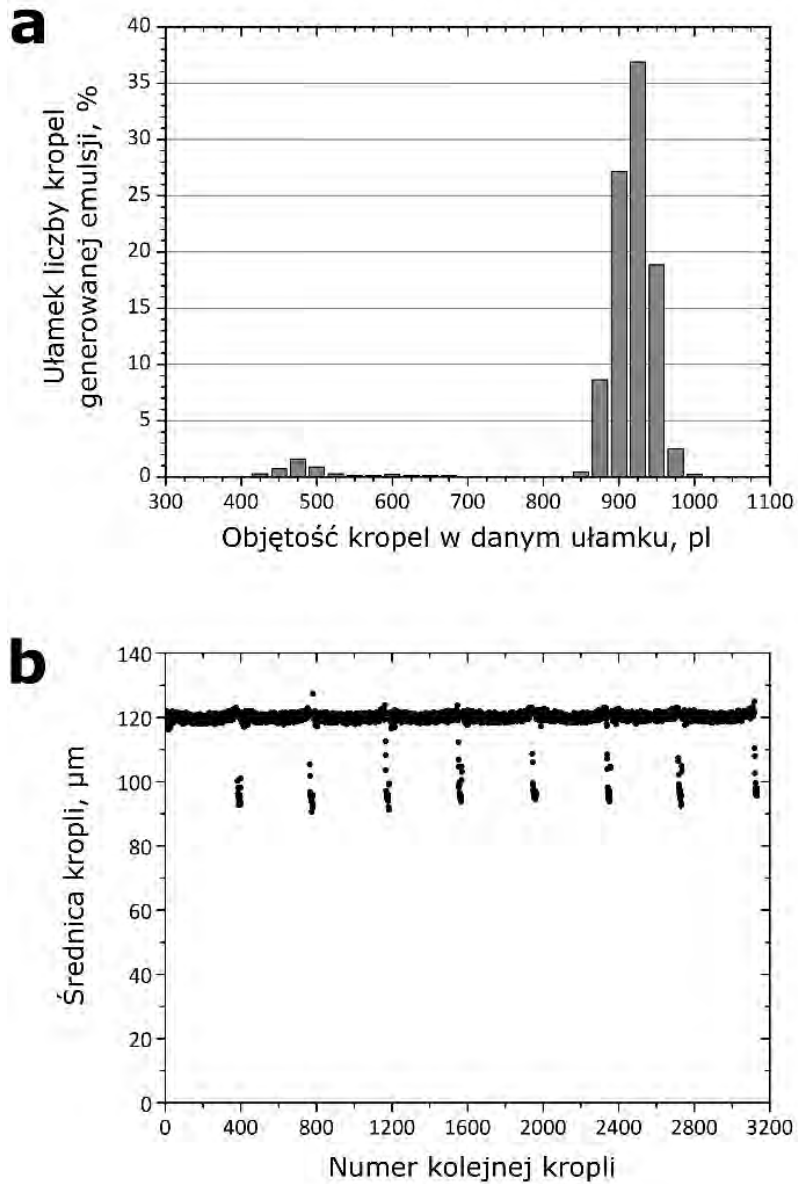
Aby sprawdzić możliwość wykorzystania opracowanego modułu emulsyfikującego do produkcji monodispersyjnych emulsji w układzie zorientowanym poziomo z wykorzystaniem pułapek hydrodynamicznych do szeregowego rozcieńczania próbki w dużych kroplach, skonstruowano układ mikroprzepływowy, który składał się ze złącza T, pułapki hydrodynamicznej, krętego kanału mieszalnika i opisanego w punkcie 3.2.4. modułu emulsyfikującego (Ryc. 26a). Przewężenie przed progiem emulsyfikatora w opisywanym tutaj układzie miało głębokość 30  $\mu\text{m}$ .

Pułapka wykorzystana tutaj do przygotowania szeregu rozcieńczeń próbki jest podobna do opisanych wcześniej w niniejszej rozprawie pułapek odmierzających. Wymiary użytej tu pułapki: długość pułapki 2400  $\mu\text{m}$ , przekrój poprzeczny kanału głównego 600 (szerokość) x 400 (głębokość)  $\mu\text{m}$ , głębokość bypassów 200  $\mu\text{m}$ . W pułapce odmierzono najpierw kroplę rodaminy 110 o stężeniu 25  $\mu\text{M}$ . Następnie obydwie pompy zostały nastawione na stałe prędkości przepływu (0,9  $\text{ml h}^{-1}$  dla fazy ciągłej i 0,03  $\text{ml h}^{-1}$  dla fazy rozproszonej z rozcieńczalnikiem), co powodowało periodyczne odrywanie się kropli wody na złączu T. Kropla ta uderzała w uwieczoną w pułapce kroplę rodaminy, łączyła się z nią przez elektrokoalescencję, zaś nadmiar objętości (ponad objętość pułapki) był odmierzany i kierowany do emulsyfikacji w module do emulsyfikacji z bypassami (Ryc. 26b-c). Otrzymany współczynnik rozcieńczeń z 20 rozcieńczeń wynosił 1,37 z precyzją równą 6,1 %.



Ryc. 26. a) Schemat prostego szeregowego rozcieńczalnika opartego o krople, połączonego z geometrią do emulsyfikacji wyposażoną w pochylnię i bypassy. E – elektrody stalowe do wymuszania elektrokoalescencji kropeł. b) Zdjęcie układu przedstawionego schematycznie w (a). W pułapce rozcieńczalnika mieszają się krople próbki i rozcieńczalnika, równocześnie w module do emulsyfikacji zachodzi emulsyfikacja kropli próbki. Puste kanały między mieszalnikiem a geometrią do emulsyfikacji miały służyć jako „fosa Faradaya”<sup>172</sup>, chroniąca emulsję przed koalescencją, jednak okazały się niepotrzebne i nie były wykorzystywane. c) Zbliżenie modułu do emulsyfikacji. Kolor emulsyfikowanej kropli zmienia się w zależności od odległości od progu emulsyfikującego, co jest konsekwencją zmiennej drogi optycznej, mającej źródło w zmiennej głębokości kanału.

Do zbadania emulsyfikacji w zintegrowanym układzie wygenerowano 8 dużych kropele o objętości ok. 400 nl każda. Krople te po wykonaniu szeregowego rozcieńczenia barwnika emulsyfikowano w opracowanym module z bypassami. Otrzymano 8 emulsji kropele, na które składały się średnio  $392 \pm 9$  krople o przeciętnej średnicy  $120 \mu\text{m}$ , co przekłada się na przeciętną objętość kropele równą ok. 900 pl. Współczynnik zmienności (CV) średnic wszystkich 3134 wygenerowanych kropele wynosił ok. 4 % (Ryc. 27a). Zdefiniowano odstające objętością krople jako te o średnicy mniejszej niż  $115 \mu\text{m}$  (ok. 800 pl objętości). Odstające krople były generowane zawsze jako ostatnie krople w każdej bibliotece (Ryc. 27b). Jeżeli nie liczyć odstających kropele z każdej z bibliotek, współczynnik zmienności średnic wygenerowanych kropele był mniejszy niż 1 % dla wszystkich bibliotek. 5 % kropele z każdej biblioteki ( $18 \pm 2$  na bibliotekę) było odstające. Przeciętna średnica odstających kropele wynosiła  $98 \mu\text{m}$  (ok. 490 pl) przy współczynniku zmienności średnic 4,4 %. Większość odstających kropele miało średnice zawierające się w przedziale 92-98  $\mu\text{m}$ .



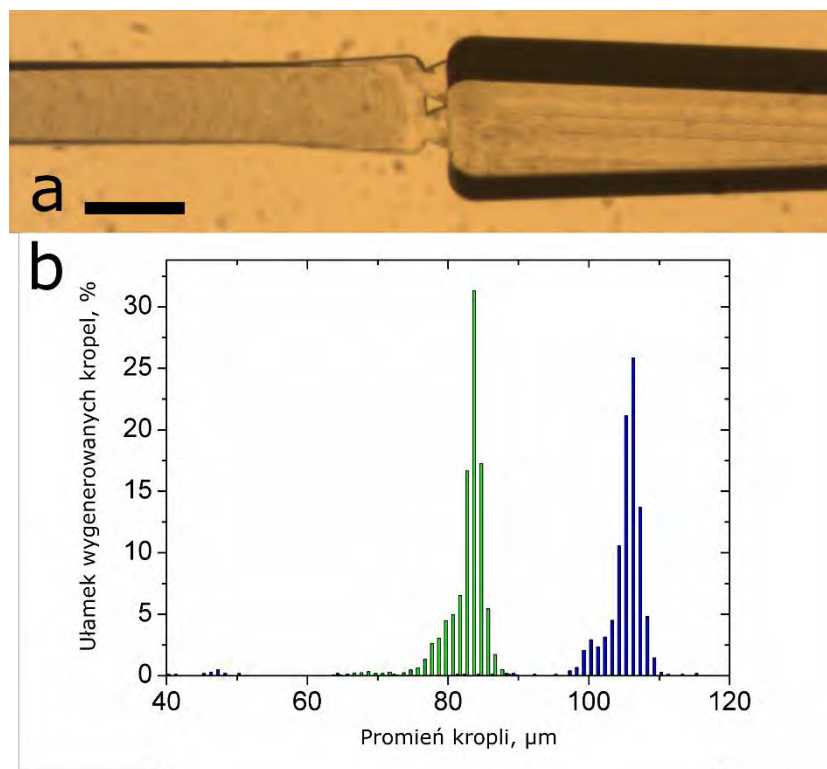
Ryc. 27. a) Rozkład objętości kropeł w generowanych emulsjach w układzie ze zintegrowanym modułem do emulsyfikacji i rozcieńczalnikiem. b) Rozmiary kolejnych kropeł emulsji uzyskanych z 8 dużych kropeł. Krople mniejsze od reszty populacji pochodzą z końcowej części każdej emulsyfikowanej kropli.

### 3.2.6. Zwiększenie przepustowości modułu emulsyfikującego – podwójna dysza dla szeregu emulsji o wysokim stopniu upakowania

Z punktu widzenia celu niniejszej pracy, a zwłaszcza opracowania metody separacji emulsji w układzie mikroprzepływowym (opisanej dokładnie w rozdziale 3.3.), istotne było aby generowana emulsja była możliwie mocno upakowana, tj. by stosunek objętości kropeł wody do sumy objętości kropeł wody i fazy ciągłej był możliwie najwyższy. Opisana w rozdziale 3.2.5. pochylnia z bypassami nie gwarantuje wysokiego upakowania kropeł. W literaturze opisano emulsje o wysokim stopniu upakowania generowane na progu przy wykorzystaniu grawitacji<sup>57</sup> lub siły odśrodkowej<sup>169</sup>. Aby uzyskać emulsje o wysokim stopniu upakowania, zaprojektowano i wykorzystano urządzenia do generacji emulsji w wertykalnie zorientowanych układach mikroprzepływowych, w których emulsyfikacja odbywa się na progu bez dodatku bypassów. Ucieczka generowanych kropeł emulsji jest w takim układzie powodowana siłą wyporu. Istnieją także rozwiązania, zwiększające gęstość upakowania emulsji otrzymanej przez *flow focusing*, jednak ich wadą jest dodatkowa komplikacja systemu<sup>173,174</sup>.

Aby zmniejszyć szybkość przemieszczania się czoła kropli ponad progiem do emulsyfikacji i aby zwiększyć częstotliwość generacji kropeł (tym samym skracając czas emulsyfikacji), podzielono próg na dwie dysze. Uczyniono to przez umieszczenie trójkątnego elementu geometrii w kanale tuż przed progiem (Ryc. 28a). Użyty kształt dyszy był wcześniej określony jako optymalny jeżeli chodzi o monodispersję uzyskiwanej emulsji<sup>55,175</sup>.

Zaobserwowano, iż w układach z progiem podzielonym na dwie dysze uzyskane krople są mniejsze: objętość kropeł generowanych w układzie bez trójkątnego elementu wynosiła  $4,81 \pm 0,76$  nl, zaś w układzie z progiem podzielonym na dwie dysze objętość kropeł wynosiła  $2,36 \pm 0,28$  nl (dla wysokości kanału przed progiem  $40 \mu\text{m}$ ) (Ryc. 28b). Oznacza to także spadek współczynnika zmienności objętości kropeł generowanych emulsji z 16 % do 12 %.

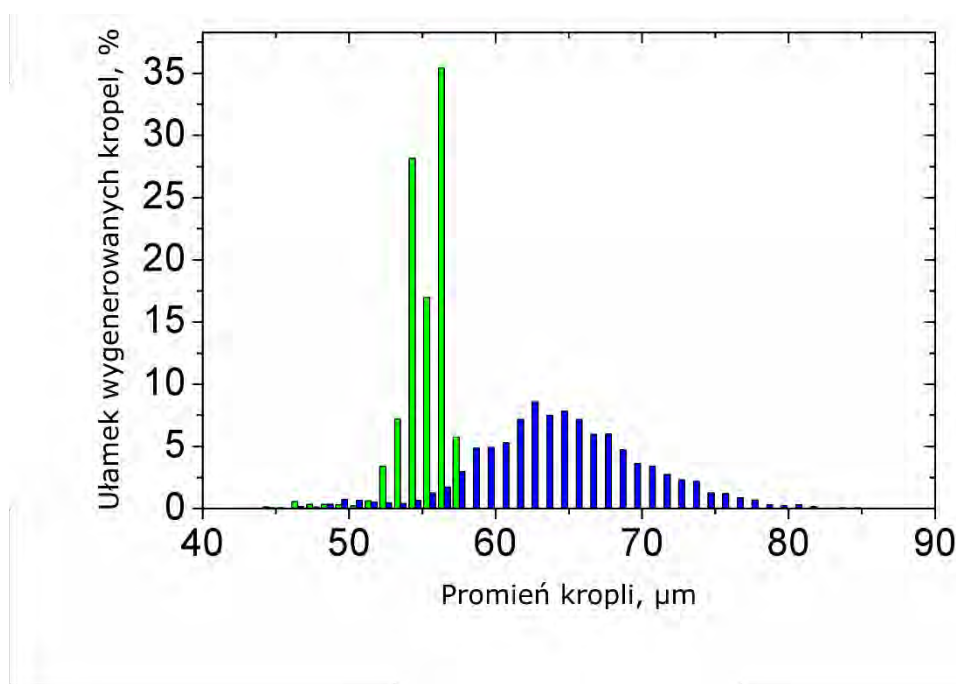


Ryc. 28. a) Fotografia izometryczna geometrii do emulsyfikacji z trójkątnym elementem w dyszy. Pochylnia prowadzi na zdjęciu od lewej do dysz emulsyfikujących, za którymi znajduje się głęboka komora zbiorcza. Przepływ odbywa się od lewej do prawej (na zdjęciu). Krople uformowane w dwóch dyszach są usuwane z pobliża dysz przez siłę wyporu, ponieważ urządzenie ustawione jest pionowo podczas generacji kropeł. Głębokość dysz wynosi 30  $\mu\text{m}$ , głębokość komory to 400  $\mu\text{m}$ , szerokość dyszy bezpośrednio nad progiem to 200  $\mu\text{m}$ , wloty do dysz mają po 100  $\mu\text{m}$ , podstawa trójkąta ma 100  $\mu\text{m}$ , wysokość trójkąta (wzdłuż osi długiej kanału) to 140  $\mu\text{m}$ . Pasek skali: 400  $\mu\text{m}$ . b) Różnica w rozmiarach kropeł generowanych w układzie bez trójkątnego elementu rozdzielającego dysze (niebieski) i z trójkątnym elementem (zielony), głębokość dysz: 40  $\mu\text{m}$ . Stężenie wagowe surfaktantu w fazie ciągłej: 2 %.

Wygenerowano emulsje w układzie podobnym do opisanego w punkcie 3.2.3. (z pochylnią prowadzącą do progu bez dodatku bypassów), z wysokością kanału przed progiem równą 30  $\mu\text{m}$ , ustawionym pionowo. Otrzymana emulsja była wysoce polidispersyjna: współczynnik zmienności objętości kropeł wynosił ok. 27 % przy częstotliwości generacji równej 75 Hz, objętość kropeł wynosiła  $1,14 \pm 0,31$  nl. W układzie z progiem podzielonym na dwie dysze i z wysokością kanału przed progiem równą 30  $\mu\text{m}$  wygenerowano emulsje wodnych kropeł o objętościach  $0,71 \pm 0,06$  nl dla częstotliwości generacji równej 75 Hz, co oznacza współczynnik zmienności objętości równy ok. 8,4 %. (Ryc. 29) W układzie z dwiema dyszami wygenerowano także emulsję kropeł pożywki hodowlanej MH z dodatkiem bakterii, objętość kropeł otrzymanej emulsji wynosiła  $0,74 \pm 0,07$  nl. Emulsje generowane w układach z progiem podzielonym



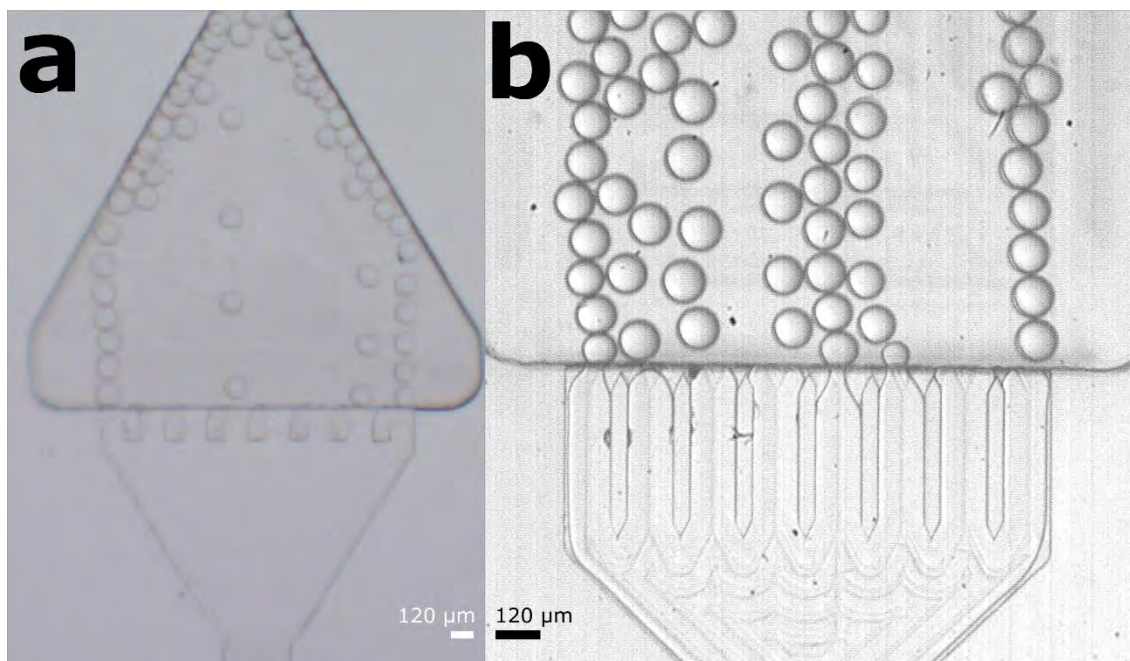
na dwie dysze dzieliły się na dwie populacje objętości (Ryc. 29). Prędkość przepływu wynosiła  $0,2 \text{ ml h}^{-1}$ .



Ryc. 29. Rozmiary kropli generowanych przy wysokim stężeniu wagowym surfaktantu w fazie ciągłej (2 %) dla geometrii emulsyfikującej z pochylnią i bez bypassów (niebieski) i dla geometrii z pochylnią, bez bypassów i z trójkątnym elementem rozdzielającym dysze (zielony). Ucieczka kropli z pobliża progu była zapewniona przez siłę wyporu.

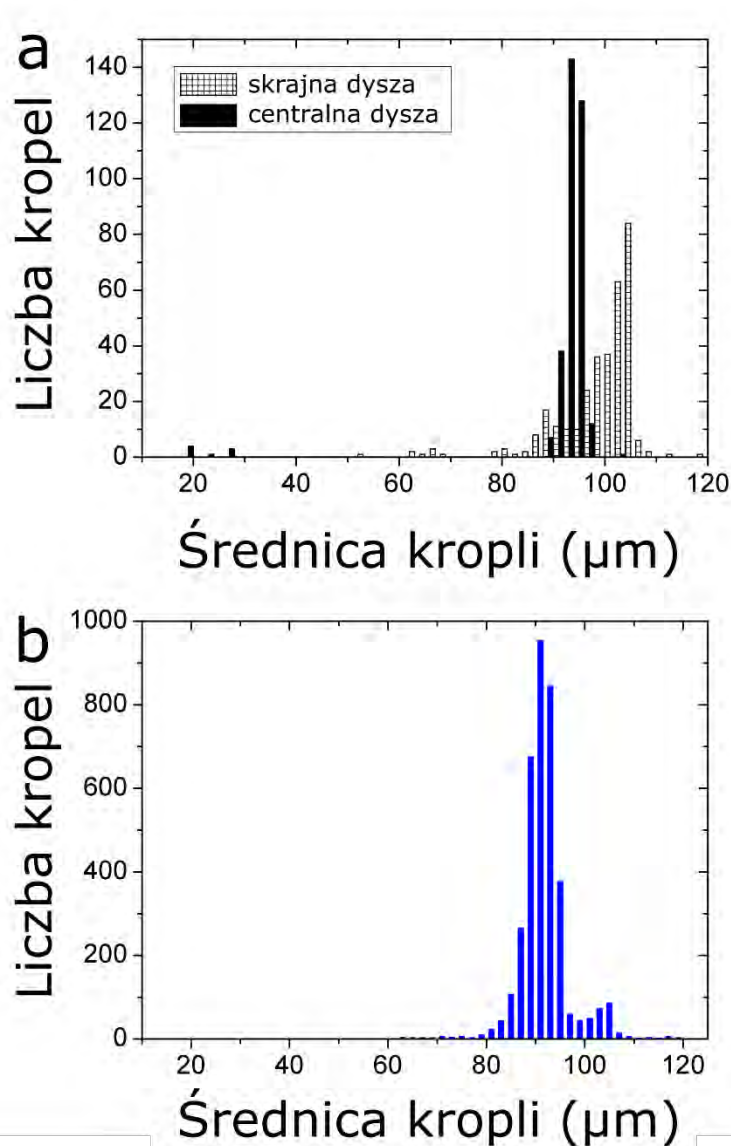
### 3.2.7. Zwiększenie przepustowości modułu emulsyfikującego – dysza wielokrotna dla szeregu emulsji o wysokim stopniu upakowania

W celu dalszego zwiększania przepustowości generacji ciasno upakowanych emulsji, zaprojektowano układy mikroprzepływowe o wielu, tj. 8 lub 12, dyszach. Istnieje wiele rozwiązań, wykorzystujących nawet tysiące dysz do emulsyfikacji MSE, jednak żadne z nich nie traktuje o emulsyfikacji szeregu dużych kropli, co jest kluczowe z punktu widzenia celu niniejszej rozprawy. Proste poszerzenie kanału przed progiem i dodanie trójkątnych elementów, takich jak w punkcie 3.2.6., nie przyniosło pożądanego efektu, ponieważ część dysz nie pracowała (nie generowała kropli). (Ryc. 30a)



Ryc. 30. Fotografie układów do pasywnej generacji kropeł przy zwiększonej przepustowości. a) Układ wynikający z prostego przeskalowania układu opisanego w 3.2.6. Pracują prawie wyłącznie skrajne dysze. b) Wydłużenie struktur rozgraniczających dysze usprawniło urządzenie, jednak nadal nie wszystkie dysze pracowały, zaś otrzymane emulsje były polidyspersyjne.

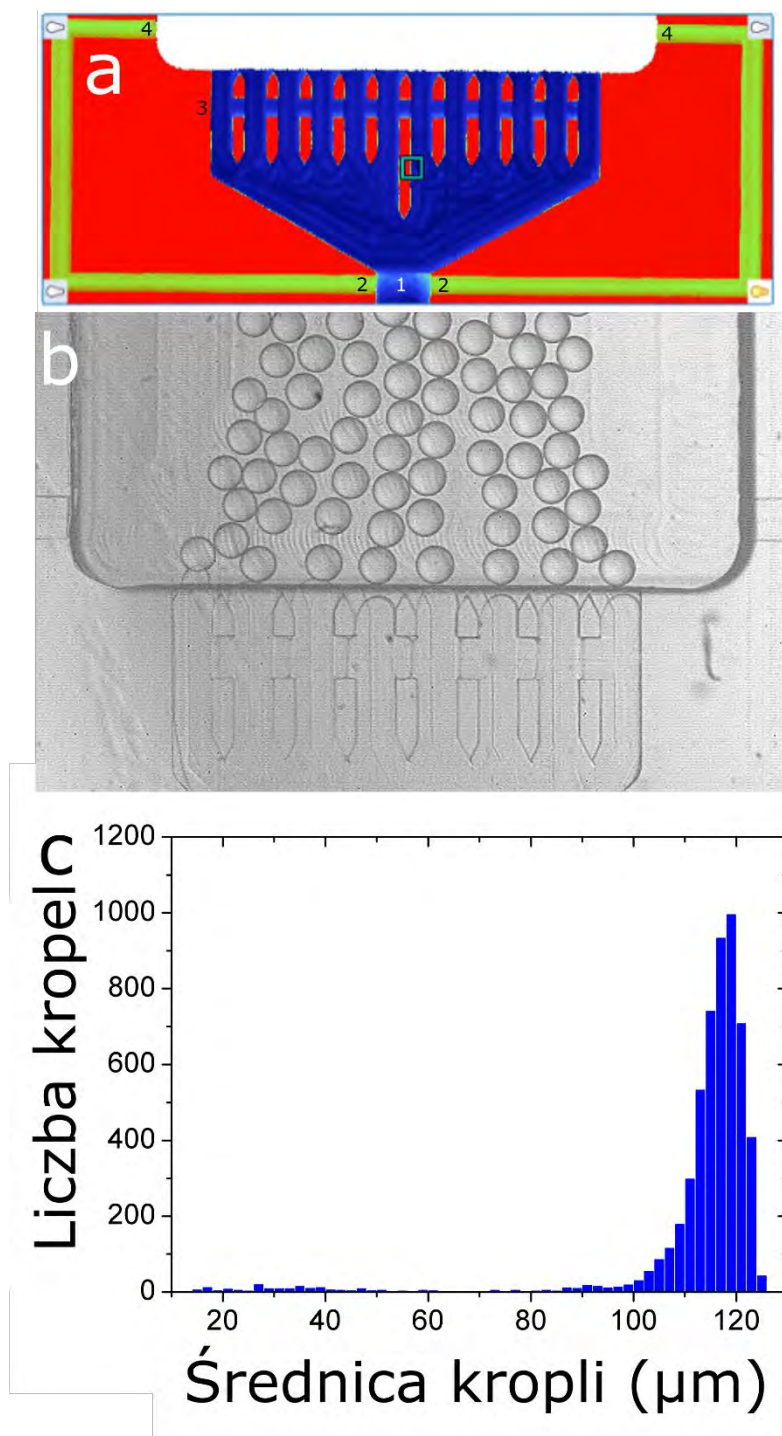
Wydłużenie elementów separujących dysze nie rozwiązało tego problemu (Ryc. 30b). Dopiero wykorzystanie długich elementów separujących dysze, w których to elementach znajdowały się przerwy do wyrównywania ciśnienia między dyszami, sprawiło, że wszystkie dysze w urządzeniu zaczęły pracować. Skrajnie ulokowane dysze generowały krople z częstotliwościami większymi o co najmniej 50 % niż pozostałe dysze i krople generowane przez skrajne dysze były ok. 40 % większe objętościowo niż krople generowane przez wewnętrzne dysze (Ryc. 31a). Emulsyfikacja tylnej części każdej kropli prowadziła do powstania dużej liczby małych kropelek (Ryc. 36c). Te małe kropelki (mniejsze niż 100 pI) stanowiły ok. 0,1 % całkowitej objętości generowanych emulsji. Bez tych małych kropelek współczynnik zmienności, CV, średnic generowanych kropeł wynosił 4,7 %. Całkowita częstotliwość generacji kropeł w 8 dyszach przy  $2 \text{ ml h}^{-1}$  wynosiła 470 Hz. Jednakże skrajnie zewnętrzne dysze produkowały oddzielną populację kropeł większych niż krople pochodzące z innych dysz (Ryc. 31b). Dwie populacje rozmiarów nie są pożądane z punktu widzenia oznaczeń cyfrowej biologii, zatem należało rozwiązać ten problem.



Ryc. 31. Rozmiary kropeł w układzie z pochylnią, 8 dyszami, kanałami do wyrównywania ciśnienia i bez bypassów. a) Skrajnie położone dysze generowały krople większe niż dysze położone centralnie, w dodatku z większym rozrzutem rozmiarów niż centralne dysze. b) Emulsje wygenerowane w takim układzie dzieliły się na populacje rozmiarów kropeł.

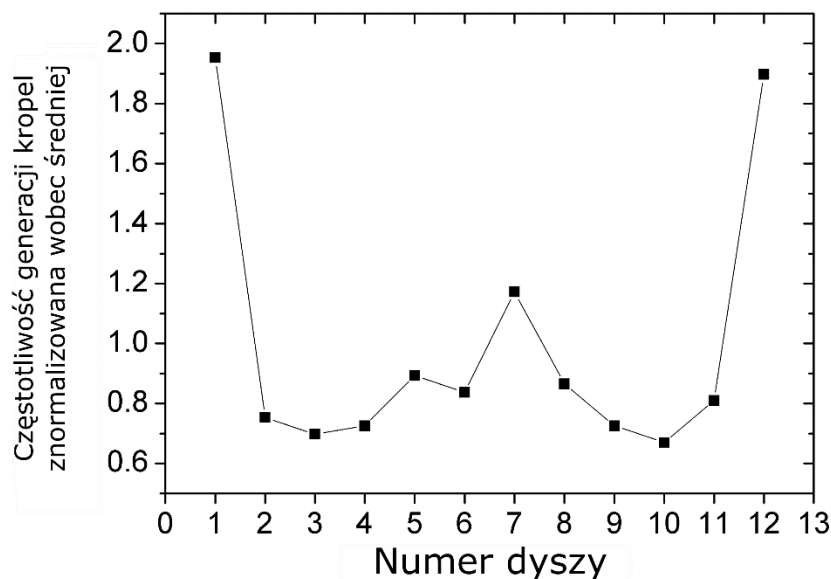
Dodanie bypassów wokół dysz (Ryc. 32a) zmniejszyło efekt generacji większych kropeł przez skrajne dysze. Bypassy to płytkie kanały, podobne do tych opisanych w rozdziale 3.2.4. W omawianym tu przypadku bypassy zaczynają swój bieg z głównego kanału już w dole pochylni, gdy kanał główny jest płytki, zaś bieg kończą już w komorze zbiorczej (Ryc. 32b). Krople wygenerowane w układzie z pochylnią, 8 dyszami i bypassami generowały emulsje o CV średnic kropeł równym 5,1 % przy  $2 \text{ ml h}^{-1}$ , jednak w tym przypadku nie było widać dwóch oddzielnych populacji rozmiarów kropeł (Ryc 32c). Dodatek bypassów zmniejszył częstotliwość generacji kropeł do 320 Hz przy  $2 \text{ ml h}^{-1}$ , zaś krople generowane w układzie z bypassami były większe (średnio 600 pl) niż w

przypadku generacji w układzie bez bypassów. Zwiększenie prędkości przepływu do 4 ml h<sup>-1</sup> powodowało generację widocznie większych kropeł przez skrajne dysze, zaś przy 5 ml h<sup>-1</sup> skrajne dysze nie generowały kropeł w mechanizmie MSE.



Ryc. 32. a) Schemat urządzenia do MSE z pochylnią, 8 dyszami, kanałem do wyrównywania ciśnienia między dyszami i bypassami. 1) koniec pochylni prowadzącej do rozległego obszaru o głębokości 35 μm. 2) wloty do płytek bypassów. 3) na tej wysokości na schemacie znajdują się kanały pomiędzy dyszami, służące do wyrównywania ciśnienia. 4) wylot z bypassów do komory zbiorczej. b) Emulsyfikacja w układzie przedstawionym w (a). c) Rozkład średnic kropeł wygenerowanych w układzie.

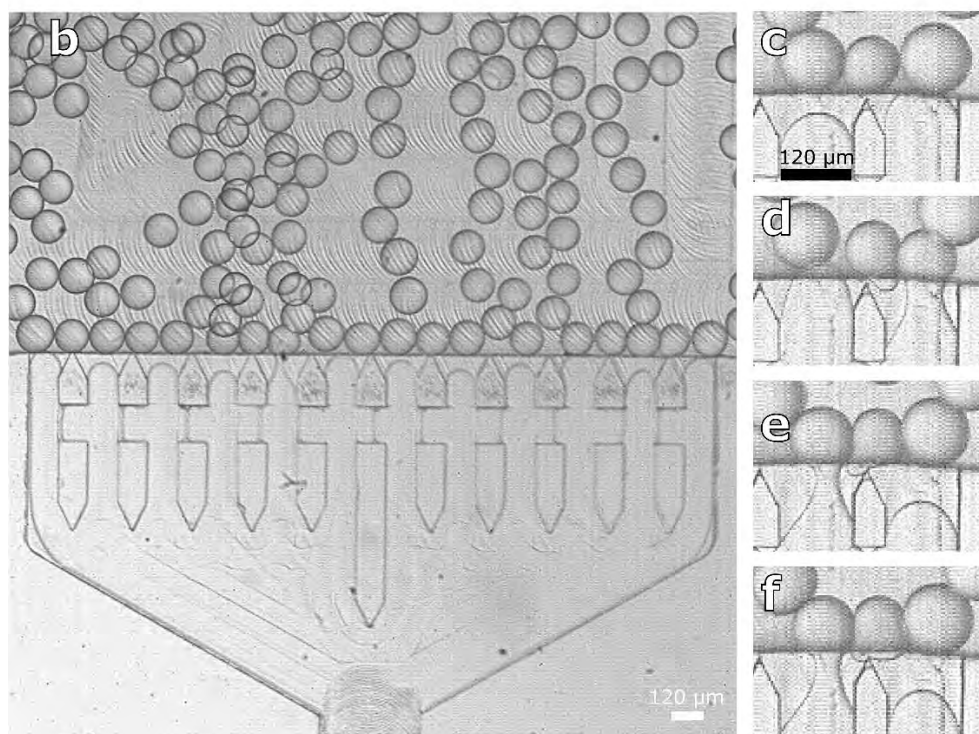
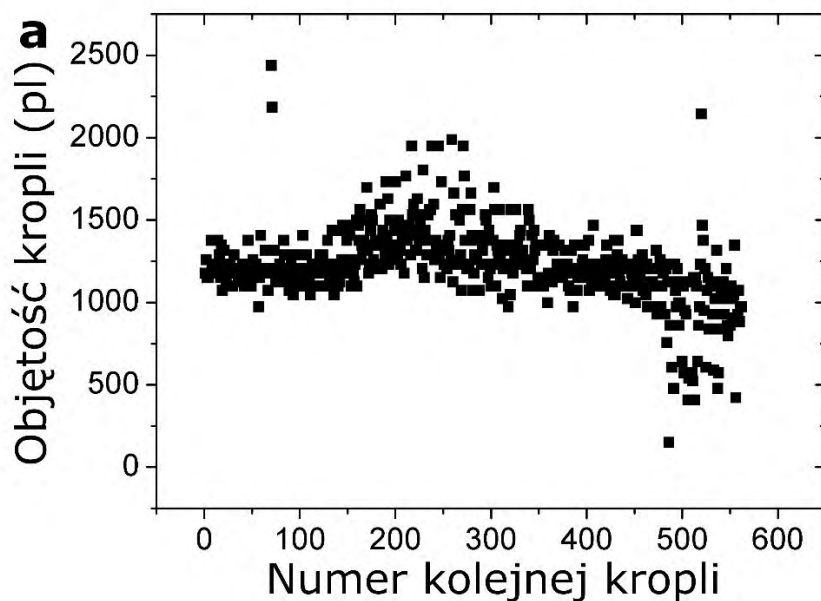
Aby zwiększyć przepustowość modułu do emulsyfikacji, zaprojektowano i wykonano układ mikroprzepływowy z 12 dyszami. Ten układ generował krople z częstotliwością 430 Hz przy  $2 \text{ ml h}^{-1}$ , przy czym częstotliwość generacji jest nieco większa niż średnia w centralnych dyszach (Ryc. 33) i dużo większa niż średnia w skrajnych dyszach: skrajne dysze generowały krople z częstotliwością 70 Hz, czyli 90 % większa niż średnia częstotliwość dla wszystkich 12 dysz (36 Hz).



Ryc. 33. Częstotliwość generacji kropli w układzie z 12 dyszami i bypassami, znormalizowana wobec średniej dla wszystkich dysz częstotliwości generacji kropli. Dysze nr „1” i „12” są skrajne, dysze nr „6” i „7” są centralne.

Przy  $2 \text{ ml h}^{-1}$  podczas emulsyfikacji pojedyncze krople były blokowane pomiędzy dyszami, w ten sposób blokując te dysze. Dla 12 dysz wszystkie dysze były blokowane, zaś dla 8 dysz tylko jedna dysza została zablokowana przy prędkości przepływu równej  $2 \text{ ml h}^{-1}$ . Zaobserwowano, że gdy dysze były blokowane, wzrastała polidispersja generowanych emulsji i rozmiar generowanych kropli (Ryc. 34a). Gdy przepływ był zatrzymywany, krople blokujące dysze uwalniały się i odpływały od dysz na skutek siły wyporu. Po odblokowaniu dysz krople generowały się tak jak przed zablokowaniem dysz (34a). Obserwacja przy użyciu szybkiej kamery wykazała, że dysze są blokowane przez krople (Ryc. 34b), które są zasysane do dysz przez podciśnienie powstające w dyszach podczas powstawania przewężenia podczas MSE i podczas cofania się czoła fazy rozproszonej po oderwaniu kropli w MSE. (Ryc. 34d-g)

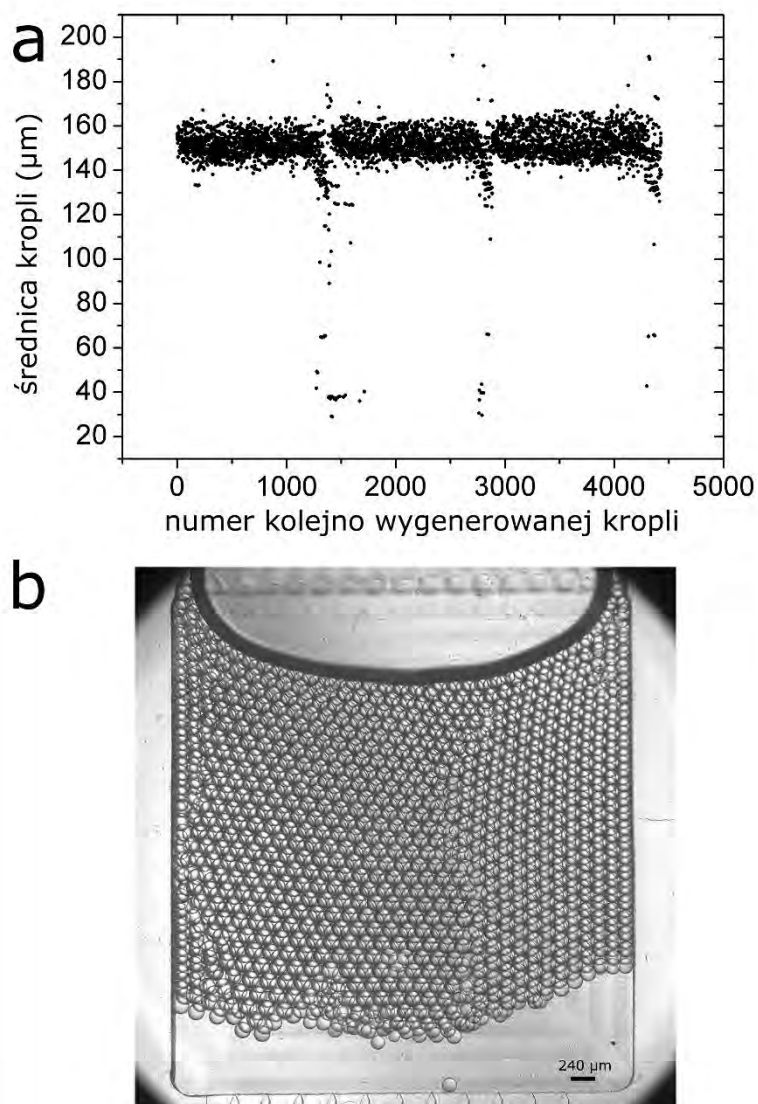




Ryc. 34. a) Wpływ blokowania dysz na rozmiar generowanych kropeł. Od ok. 150. z kolei wygenerowanej kropli dysze zostały zablokowane (b-f), co łączyło się ze zwiększeniem rozmiarów generowanych kropeł i zwiększoną polidispersją generowanej emulsji. Po wygenerowaniu ok. 300 kropeł przepływ został wstrzymany na kilka sekund, po czym wznowiono przepływ. Po wstrzymaniu przepływu wszystkie krople opuściły sąsiedztwo dysz, po ponownym włączeniu przepływu krople generowały się w sposób podobny do tego sprzed zablokowania dysz. b) Wszystkie dysze zablokowane przez krople. c-f) Blokowanie dysz jest skutkiem przepływu wstecznego płynów podczas MSE. Pojedyncza kropla, blokująca dwie dysze (c) jest wciągana do dysz podczas formowania się w dyszach przewężenia (d-e) lub podczas gdy czoło fazy rozproszonej cofa się po uformowaniu nowej kropli (f). Pasek skali z (c) obowiązuje dla d-f.

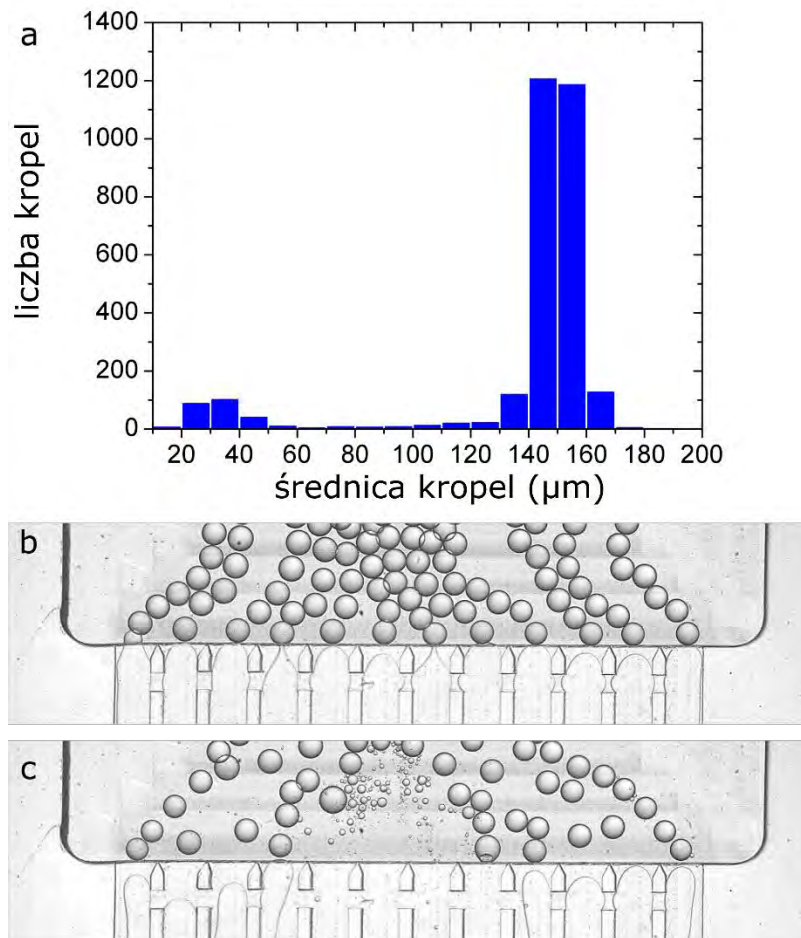


Aby zwalczyć blokowanie dysz przez krople, zwiększono szerokość każdej pojedynczej dyszy ze 120  $\mu\text{m}$  do 240  $\mu\text{m}$ . Ta zmiana sprawiła, że dysze nie były blokowane przez krople. Użycie szerszych dysz spowodowało generację większych kropelek:  $1820 \pm 240$  pl (nie licząc drobnych kropelek powstających z końca emulsyfikowanej kropli). Krople w tym układzie generowały się w reżimie MSE do prędkości przepływu równej 5  $\text{ml h}^{-1}$ . Przy 6  $\text{ml h}^{-1}$  zaobserwowano formowanie się kropelek dużo większych niż pozostałe krople powstającej emulsji. Drobne kropelki, powstające z tylnej części emulsyfikowanej kropli, stanowił mniej niż 1 % liczby kropelek emulsji generowanych przy prędkości przepływu równej 5  $\text{ml h}^{-1}$ , zaś objętość tych kropelek nie przekraczała 0,03 % całkowitej objętości generowanych emulsji. CV średnic generowanych kropelek (bez drobnych kropelek z końca emulsyfikowanej kropli) wynosił 4,5 %. (Ryc. 35a-b). Częstotliwość generacji kropelek przy prędkości przepływu równej 5  $\text{ml h}^{-1}$  wynosiła 400 Hz. Nawet mimo braku bypassów nie zaobserwowano populacji kropelek o różnej objętości.



Ryc. 35. a) Rozmiary wodnych kropli generowanych w układzie z pochylnią, bypassami i 12 szerokimi dyszami przy prędkości przepływu równej  $5 \text{ ml h}^{-1}$  z trzech dużych kropli. b) Krople wygenerowane z jednej dużej kropli jak w (a), widoczne ok. 1500 kropli.

Aby sprawdzić, czy wykonany układ mikroprzepływowy nadaje się do produkcji kropli do hodowli bakterii, wykonano emulsyfikację trzech kropli pożywki bakteryjnej MH. Nie wliczając drobnych krolepek z końcowej części emulsyfikowanych kropli, CV średnic generowanych kropli wynosił 5,6 %, zaś średnia objętość tych kropli wynosiła  $1760 \pm 260 \text{ pl}$ . (Ryc. 36a) Krople pożywki były generowane bez blokowania dysz przy  $5 \text{ ml h}^{-1}$  (Ryc. 36b). Drobne krolepki z końcowej części emulsyfikowanej kropli stanowiły 0,17 % całkowitej objętości generowanych emulsji, zatem ok. 6 razy więcej niż w przypadku emulsji kropli wody otrzymanych w tym samym urządzeniu (Ryc. 36c).



Ryc. 36. a) Rozkład średnic kropeł pożywki bakteryjnej Mh wygenerowanych w układzie z pochylnią, bypassami i 12 szerokimi dyszami. Liczba drobnych kropelek uformowanych z tylnej części dużej kropli jest duża, jednak ich objętość to ok. 0,2 % całkowitej objętości kropeł emulsji. b) Emulsyfikacja pożywki bakteryjnej MH. Brak blokowania dysz przy prędkości przepływu równej 5 ml h<sup>-1</sup>. c) Emulsyfikacja tylnej części kropli pożywki MH, widoczne liczne drobne kropelki.

### 3.3. Separacja emulsji, ich inkubacja i detekcja wzrostu bakterii

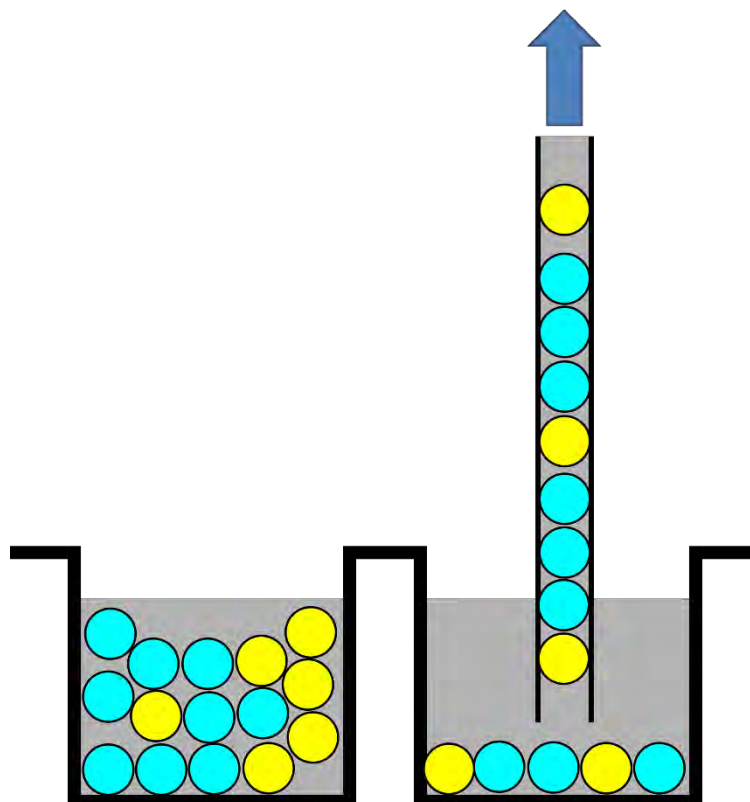
#### 3.3.1. Wprowadzenie

Celem tej części rozprawy było opracowanie metody generacji szeregu emulsji nanolitrowych kropeł pożywki bakteryjnej z bakteriami i z różnym stężeniem antybiotyku, rozdzielania tych emulsji bez usuwania ich z urządzenia mikroprzepływowego, inkubacji tych emulsji w podwyższonej temperaturze, i detekcji sygnału fluorescencyjnego z inkubowanych kropeł.

Bez rozróżnienia stężeń antybiotyku niemożliwe byłoby wyznaczenie MIC, co staje się problematyczne przy użyciu tysięcy kropeł. Istnieją możliwości identyfikacji nawet pojedynczych kropeł przy użyciu markerów DNA<sup>139,140,143</sup> lub kombinacji kilku barwników w różnych stężeniach<sup>151,176,177</sup>, jednak markery DNA wymagają sekwencjonowania DNA próbek po badaniu, zaś kombinacje barwników wymagają jednoczesnej detekcji sygnałów fluorescencyjnych o wielu różnych długościach fali – tym więcej długości fali detekcji, im więcej zakodowanych jest emulsji.

Inną metodą, którą można by wykorzystać do separacji i identyfikacji emulsji, jest oddzielenie emulsji w różnych dołkach na płytce wielodołkowej. Jest to wygodne i nie wymaga znakowania chemicznego, jednak detekcja sygnałów z takiej płytki będzie nieefektywna: nie można odczytać fluorescencji bezpośrednio z emulsji w dołku, ponieważ krople nachodziłyby na siebie w promieniu lasera – nie można by było określić, ile kropli zawiera wzrastające bakterie. Można emulsję przenieść z dołka do przewodu a następnie do układu mikroprzepływowego do wysokoprzepustowej detekcji sygnałów z kropeł, jednak z pewnością nie udałoby się wydostać z dołka wszystkich kropeł emulsji, co prowadziłoby do utraty informacji (Ryc. 37). Należy zatem opracować system mikroprzepływowy umożliwiający separację emulsji bez konieczności zdeponowania emulsji poza układem mikroprzepływowym, co z kolei zapobiegłoby wspomnianej utracie informacji. Inkubacja emulsji przez 16 godzin przy temperaturze 37°C wymaga użycia surfaktantów, inaczej krople emulsji będą łączyć się poprzez koalescencję. Dodatkowo, inkubacja powinna być umożliwiona w taki sposób, aby nie zdeponować emulsji poza układem mikroprzepływowym. Detekcja wzrostu bakterii musi zaś zostać zastosowana

wobec każdej kropli z każdej emulsji, w innym wypadku dojdzie do straty informacji z eksperymentu.



Ryc. 37. Ilustracja problemów z fizyczną separacją emulsji kropeł o innym składzie w dołkach na płytce wielodołkowej. Szary: olej, niebieski: krople bez wzrostu bakterii, żółty: krople ze wzrastającymi bakteriami. Dołek z lewej przedstawia emulsję, w której w części kropeł rosną bakterie. Analiza fluorescencji bezpośrednio z dołka jest bezcelowa, ponieważ nie wiadomo, czy sygnał zbierany z góry czy z dołu pochodzi od jednej kropli czy od większej liczby – alternatywą jest monowarstwa kropeł, jednak takie podejście jest niepraktyczne w dużej skali. Dołek z prawej przedstawia ewakuację emulsji z dołka po inkubacji, w celu analizy fluorescencji z każdej kropli po kolei, jak na ryc. 11c. Niestety, takie ewakuacja nie będzie doskonała, co zaowocuje utratą informacji z eksperymentu – znaczna część emulsji pozostanie na dnie dołka.

W skonstruowanym i opisanym poniżej urządzeniu wykorzystano metodę separacji emulsji w szeregu w przewodzie polietylenowym przy użyciu trzeciej fazy ciekłej, która nie mieszała się z pozostałymi fazami w układzie. Podobne metody oddzielania emulsji sugerowano wcześniej, jednak w dużo mniejszej skali<sup>154</sup> i w dużo mniej upakowanej, a zatem mniej praktycznej, emulsji<sup>44</sup> – szereg mało upakowanych emulsji o dużej liczbie kropeł będzie długi w przewodzie, co rodzi trudności techniczne, związane np. ze wzrastającym oporem hydraulicznym w coraz dłuższym przewodzie. Opracowana przez autora tej dysertacji metoda opisana poniżej pozwoliła na identyfikację wysoce upakowanych monodispersyjnych emulsji, składających się z ok. 2000 kropeł każda, bez

konieczności ich chemicznego znakowania. Inkubacja odbywała się w przewodzie polietylenowym, który można było odłączać od modułu generującego emulsje. Detekcja sygnału fluorescencyjnego z każdej kropli była prowadzona przy użyciu mikroskopu konfokalnego w sposób podobny do opisanych wcześniej<sup>151</sup> (ryc. 11c).

### 3.3.2. Separacja emulsji – cysterny mikroprzepływowe

W tej części rozprawy opisana jest metoda produkcji gęsto upakowanych monodispersyjnych emulsji, oddzielonych od siebie nawzajem trzecią, niemieszającą się fazą w kanale mikroprzepływowym i w przewodzie polietylenowym. Każda z odseparowanych emulsji, które nazywane są tu „cysternami”, zawiera tysiące kropeł o objętości poniżej 1 nl. Cysterny pozwalają na identyfikację emulsji bez znakowania chemicznego i bez straty informacji z części kropeł. Ruch każdej z cystern jest łatwo kontrolowany przez pompy strzykawkowe. Każda cysterna jest adresowalna w przestrzeni na podstawie jej pozycji w szeregu emulsji. Cysterny można przechowywać w przewodzie polietylenowym, który można inkubować w podwyższonej temperaturze, umożliwiającej wzrost bakterii. Cysterny można przenieść do układu mikroprzepływowego, w którym przeprowadza się jakościową detekcję sygnałów fluorescencyjnych z każdej kropli z każdej emulsji, jedna po drugiej. Cysterny mikroprzepływowe można wykorzystać do eksperymentów, w których potrzebne jest kilka lub kilkanaście różnych warunków reakcji w kilku tysiącach powtórzeń dla każdego zestawu warunków.

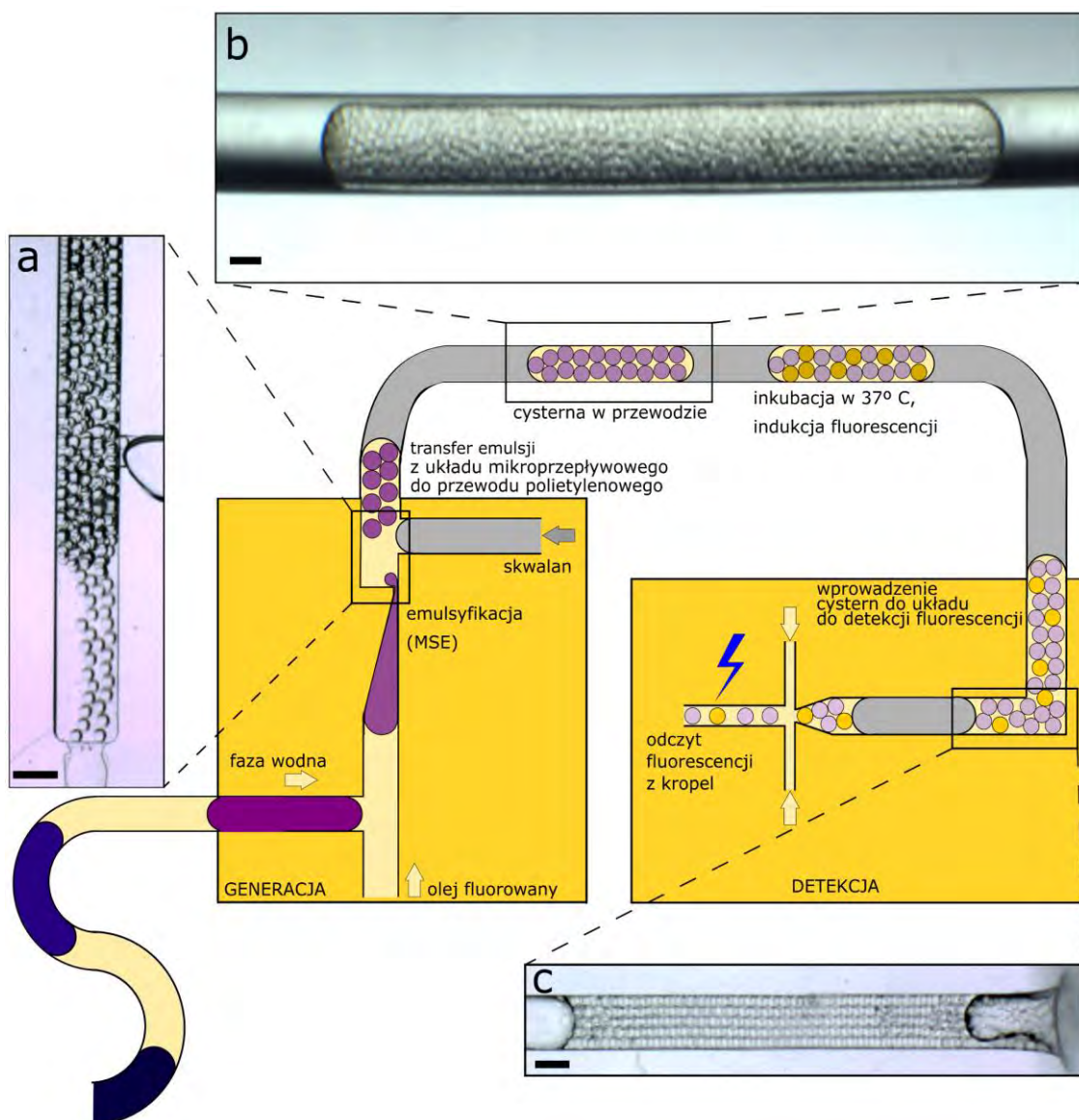
Separacja emulsji w kolejnych dołkach na płycie wielodołkowej powoduje utratę informacji z kropeł ze względu na niedoskonałe zaciąganie emulsji z dołków do przewodów, o czym była mowa wcześniej. Aby uniknąć tego problemu, należy oddzielić od siebie emulsje jeszcze w układzie mikroprzepływowym. Można wykorzystać do tego oddzielne komory, jednak takie rozwiązanie jest mało elastyczne, nie pozwalałoby na łatwe przenoszenie emulsji do kolejnych urządzeń. Wobec tego zdecydowano się tu na separację emulsji za pomocą niemieszającej się z innymi fazy płynnej. Wybrano do tego skwalan, olej węglowodorowy, który nie miesza się ani z wodą, ani z olejami fluorowanymi. Zamiast skwalanu można także wykorzystać olej mineralny, jednak olej mineralny jest znany ze swoich właściwości napęczniania PDMS, czyli polimeru, z którego zbudowane są używane tu układy mikroprzepływowe. Podobne rozwiązanie, polegające na identyfikacji kropeł w szeregu na podstawie ich pozycji w szeregu, było

prezentowane wcześniej<sup>154</sup>, jednak nigdy nie separowano w ten sposób emulsji tysięcy kropeł.

Aby uzyskać serię kropeł o różnym składzie chemicznym, przygotowano serię próbek wodnych w dołkach płytki 96-dołkowej. Krople z kolejnych dołków były zaciągane do przewodu PTFE przy użyciu pompy strzykawkowej i robota pozycjonującego. Na zmianę zaciągane były 1,8  $\mu$ l próbki i 1,8  $\mu$ l oleju fluorowanego HFE 7500. Następnie wężyk z tak przygotowaną serią dużych kropeł był podłączany do układu do generacji emulsji.

Generacja cystern (Ryc. 38) polega na wtłaczaniu do układu kolejnych dużych kropeł próbki i poddawaniu ich emulsyfikacji (Ryc. 38a). Po każdej emulsyfikacji do układu wtłaczana jest porcja skwalanu, która oddziela powstałą emulsję od wcześniej generowanych emulsji i od nadciągających kolejnych kropeł próbki. Każda kolejna emulsja oddzielona skwalanem jest kierowana do przewodu polietylenowego na zewnątrz urządzenia mikroprzepływowego (Ryc. 38b). Po docelowej inkubacji cysterny przenosi się z przewodu polietylenowego do układu mikroprzepływowego do detekcji fluorescencji, podobnego do opisanych wcześniej<sup>151</sup>, gdzie krople są rozcieńczane fazą fluorowaną i przesyłane przez zwężenie w kanale, przez które może przejść tylko jedna kropla naraz. To umożliwia skanowanie sygnałów fluorescencyjnych z każdej kropli jedna po drugiej.

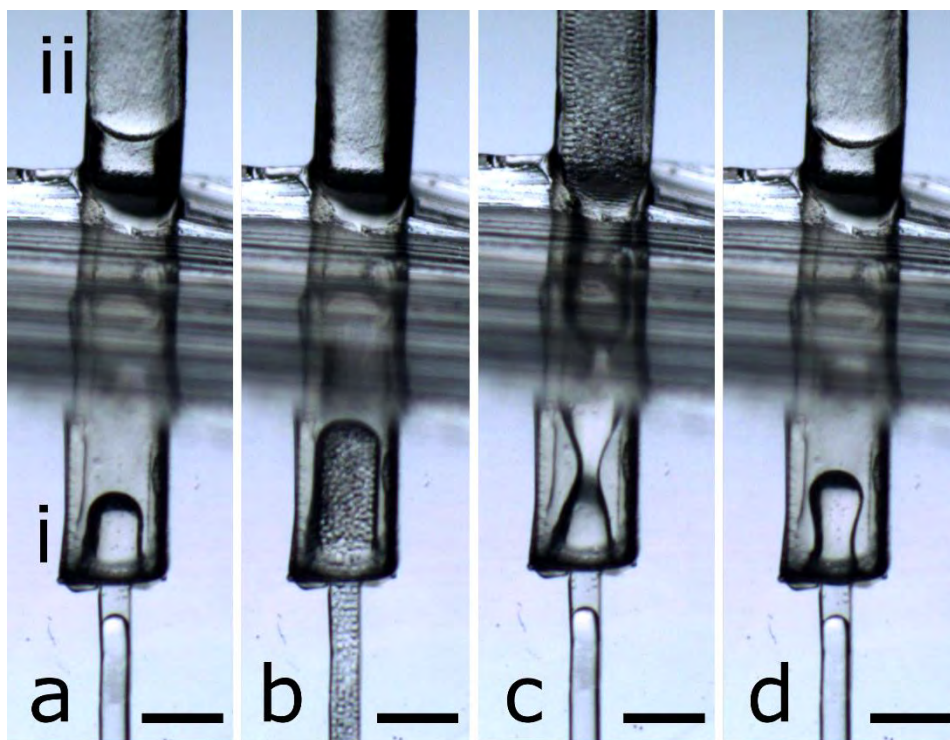




Ryc. 38. Schemat systemu do generacji emulsji, ich separacji, inkubacji i detekcji sygnałów fluorescencyjnych z kropek. Do układu do generacji kropek (GENERACJA) włączana jest seria dużych kropek o objętości ok. 2  $\mu$ l. Każda z kropek może zawierać inne odczynniki lub odczynniki w innych stężeniach. Wlot na olej fluorowany do układu do detekcji był wykorzystywany do oczyszczania układu mikroprzepływowego po eksperymentach. Duże krople były przepuszczane przez moduł do emulsyfikacji (MSE) wyposażony w dwie dysze rozdzielone trójkątnym elementem. Duże krople były emulsyfikowane, zaś cieczka kropek z sąsiedztwa dysz była możliwa dzięki sile wyporu (a). Po emulsyfikacji danej dużej kropli, do systemu włączana była porcja skwalanu, oleju węglowodorowego nie mieszającego się z pozostałymi fazami w układzie. Skwalan przepychał emulsję z układu mikroprzepływowego do przewodu polietylenowego, gdzie emulsja formowała cysternę mikroprzepływową – emulsję wodnych kropek w oleju fluorowanym, oddzieloną od innych emulsji przez zewnętrzną fazę, tworzoną przez olej węglowodorowy (b). Po zaplanowanej inkubacji w podwyższonej temperaturze cysterny były przenoszone na układ do detekcji (DETEKCJA) (c), gdzie krople były rozcieńczane przez olej fluorowany, tak aby możliwa była detekcja fluorescencji z każdej kropli z cysterny po kolei w zwężonym kanale.

Układ do generacji emulsji jest ustawiony pionowo, tak by krople były ewakuowane z sąsiedztwa dysz przez siłę wyporu i by otrzymane emulsje były możliwie gęste. Za dyszami do generacji kropeł znajduje się komora zbiorcza, zaś za komorą znajduje się zwężenie, do którego doprowadzany jest skwalan. Rozmiar komory został dobrany tak, by powstała z jednej dużej kropli emulsja wypełniła ją w całości. Użycie zbyt dużej komory powoduje konieczność użycia większej porcji oleju fluorowanego do przepchnięcia emulsji za komorę, a zatem powoduje produkcję mniej upakowanych emulsji. Użycie zbyt małej komory powoduje zablokowanie dysz przez powstającą emulsję w trakcie generowania kropeł, co prowadzi do wysokiej polidispersji emulsji a ostatecznie do ustania generacji kropeł.

W momencie, w którym emulsja wpływa do przewodu polietylenowego, następuje odwrócenie faz olejowych, tj. olej fluorowany, który w układzie mikroprzepływowym zwilżał ścianki kanału, w przewodzie staje się fazą rozproszoną, zaś skwalan, który w układzie mikroprzepływowym był fazą rozproszoną, zwilża przewód (Ryc. 39). Wpierw, porcja oleju fluorowanego wpływa do przewodu, formując „kieszęń” (Rys 39a). Następnie, napływająca emulsja wodnych kropeł wypełnia kieszeń i rozszerza ją (Ryc. 39b). Następnie, nadciągająca porcja skwalanu, która ma odseparować od siebie kolejne emulsje, przerywa kieszeń (Ryc. 39c), ponieważ skwalan lepiej zwilża ścianki przewodu niż olej fluorowany. Emulsja wodnych kropeł zawieszonych w oleju fluorowanym z kieszeni formuje cysternę mikroprzepływową (Ryc. 39d), zaś porcja oleju fluorowanego blisko wlotu do przewodu formuje nową pustą kieszeń. Później, gdy cysterna jest wprowadzana do innego układu mikroprzepływowego, skwalan formuje kieszeń we fluorofilowym układzie mikroprzepływowym (Rys 38c).



Ryc. 39. Transfer cystern z układu mikroprzepływowego (dolna część zdjęć) do przewodu polietylenowego (górna część zdjęć). Pasek skali ma 1 mm długości. a) Olej fluorowany formuje „kieszęń” w przewodzie polietylenowym, którego ścianki zwilża skwalan (i). W kanale układu widać kroplę skwalanu. poprzednio uformowana cysterna płynie przez przewód (ii). Na zdjęciach obszar pomiędzy (i) a (ii) jest niewidoczny ze względu na obecność ściany układu mikroprzepływowego, wykonanego z PDMS, ustawionej ukośnie do obiektywu kamery. b) Kieszęń oleju fluorowanego łączy się z napływającą emulsją i rozszerza się. c) Nadciągająca porcja skwalanu rozrywa kieszęń w przewodzie polietylenowym, formując w ten sposób cysternę. d) We wlocie do przewodu zostaje nowa pusta kieszęń oleju fluorowanego. Wygenerowana cysterna opuszcza system przez przewód polietylenowy.

Generowane emulsje są zawieszane w oleju fluorowanym, który zwilża kanały układu mikroprzepływowego lepiej niż krople wody czy skwalan. W przewodzie polietylenowym warunki zwilżania są inne, wobec czego skwalan zwilża ścianki przewodu lepiej niż inne obecne fazy. W konsekwencji cysterna mikroprzepływowa w przewodzie polietylenowym może być traktowana jak pojedyncza duża kropla fazy rozproszonej (Ryc. 38b), co oznacza także łatwość w kontrolowaniu ruchu cysterny. Cysterny są od siebie odseparowane i od ścianek przewodu przez skwalan, czyli fazę ciągłą.

Do generacji emulsji wykorzystano dwudyszową geometrię do emulsyfikacji, taką jak opisana w punkcie 3.2.6. niniejszej rozprawy. Wygenerowano 16 cystern mikroprzepływowych odseparowanych skwalanem. W opisywanym tu przypadku przewodu o średnicy wewnętrznej 0,76 mm pojedyncza cysterna miała 5 mm długości,

zaś separator skwalanu miał długość ok. 10 mm. W eksperymencie, w którym oznaczano odporność na antybiotyki (rozdział 3.4.), każda cysterna zawierała ok. 1900 kropeł wodnego medium hodowlanego, zaś średnia objętość kropeł emulsji wynosiła 740 pL.

Emulsje w generowanych cysternach cechują się wysokim stopniem upakowania, tak jak w innych układach MSE bazujących na grawitacji i sile wyporu<sup>57,169</sup>. Przeciętnie, stosunek objętości fazy rozproszonej (wody) do ciągłej (oleju fluorowanego) wynosi 50 %, co wynika z równych objętości oleju i wody użytych do generacji cystern.

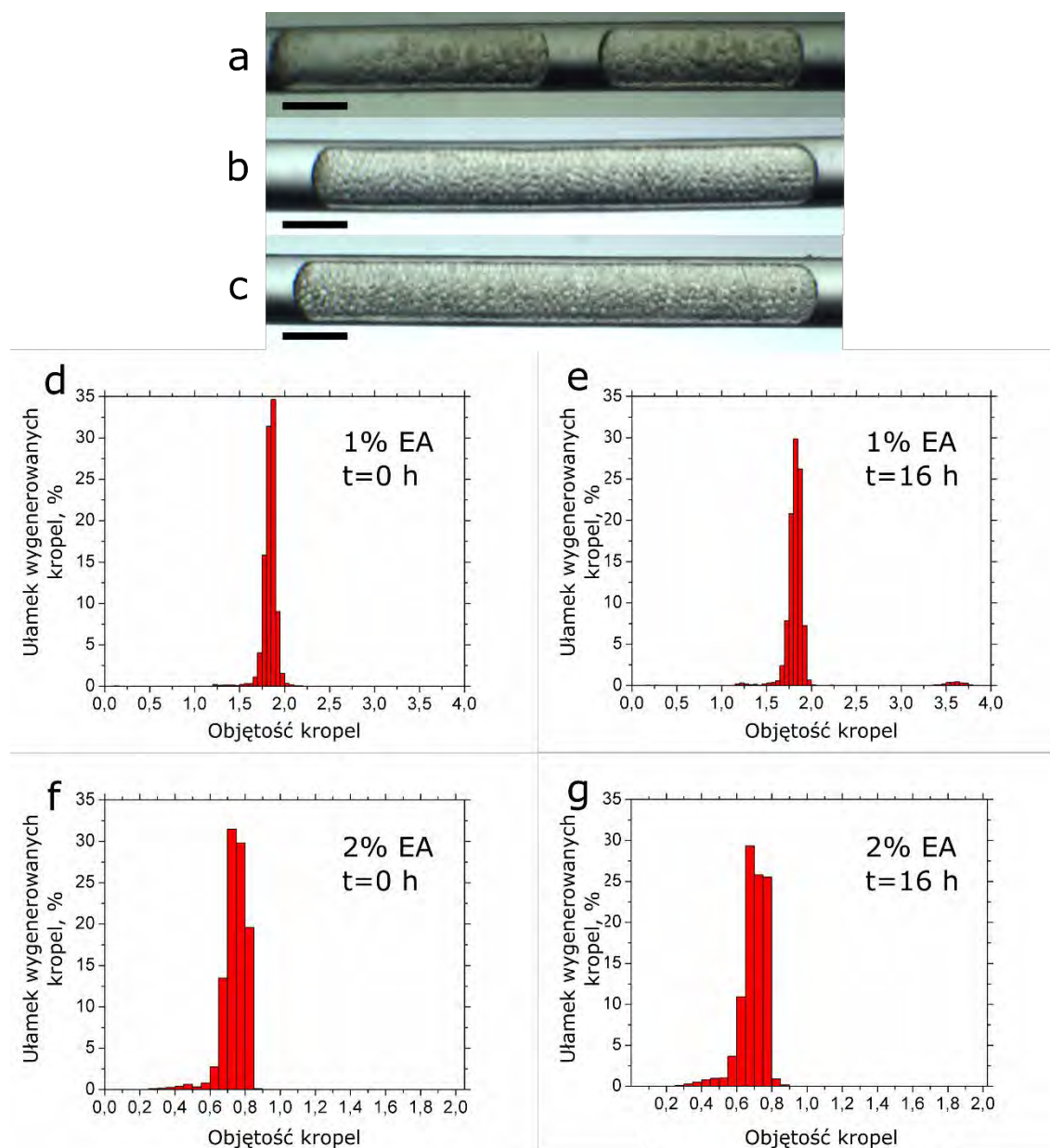
### 3.3.3. Inkubacja emulsji

Aby inkubować emulsje, postępowano w następujący sposób: Zatykano przewód ze strony dalszej od układu, w którym wygenerowano wcześniej emulsje. Następnie wyciągano przewód z układu do generacji i zatykano przewód z tej strony. Zatkany z dwóch stron przewód umieszczano w piecu nastawionym na 37°C, tj. temperaturę optymalną dla wzrostu bakterii *E. coli*. Emulsje w przewodzie były dość odporne na wstrząsy, upuszczenie przewodu z wysokości blatu laboratoryjnego nie powodowało rozerwania cystern. Rozerwanie cystern było powodowane wyciągnięciem zatkanej z jednej strony przewodu z cysternami z układu do generacji cystern (przez skok ciśnienia), wobec czego przed zatkaniem dalszego końca przewodu należało częściowo wyciągnąć przewód z układu, aby zmniejszyć skok ciśnienia i zapobiec rozerwaniu cystern. Aby sprawdzić stabilność emulsji podczas inkubacji w sposób ilościowy, przeprowadzono eksperymenty.

Wpierw podjęto próbę jakościowego oznaczenia stabilności cystern podczas inkubacji. Wygenerowano cysterny przy różnych stężeniach surfaktantu w fazie ciągłej i przechowano uzyskane cysterny przez 16 godzin w temperaturze pokojowej, następnie sprawdzono cysterny pod mikroskopem optycznym. W przypadku użycia 0,5 % wagowych surfaktantu w fazie ciągłej widoczna była koalescencja kropeł (Ryc. 40a), jednak w przypadku 1,0 % i 2,0 % wagowych surfaktantu nie było jasne, czy emulsje są stabilne (Ryc. 40b-c). Aby sprawdzić stabilność emulsji w sposób ilościowy, wygenerowano 10 cystern, zawierających duże krople (przeciętnie ok. 1,8 nL) przy niższym stężeniu surfaktantu w fazie ciągłej, tj. 1 % (w/w) (Ryc. 40d). Obniżenie zawartości surfaktantu i zwiększenie rozmiaru kropeł powoduje zwiększenie prawdopodobieństwa łączenia się ze sobą kropeł, podobnie jak podwyższenie



temperatury. Wpierw zmierzono rozmiary kropeł w 5 cysternach, następnie pozostałe 5 cystern inkubowano w 37°C przez 16 godzin. Taką samą procedurę wykonano dla kropeł o średniej objętości 740 pl i zawartości surfaktantu 2 % (w/w) (Ryc. 40f) (parametry



Ryc. 40. Stabilność emulsji. a-c) Jakościowa ocena stabilności emulsji po 16 godzinach w temperaturze pokojowej dla stężenia surfaktantu w fazie ciągłej emulsji: a) 0,5 % w/w; b) 1,0 % w/w; c) 2,0 % w/w. d-g) Ilościowa ocena stabilności emulsji. d-e) Duże (średnio 1,8 nl) krople wody zostały wygenerowane w obecności 1,0 % w/w surfaktantu i inkubowane przez 16 godzin w temperaturze pokojowej. Po 16 godzinach (e) widoczna jest nowa populacja kropeł dwukrotnie większych niż przeciętny rozmiar kropeł przed inkubacją, co wskazuje na koalescencję. W ten sposób sprawdzono, że możliwy jest ilościowy pomiar koalescencji. f-g) Stabilność emulsji mniejszych (średnio 740 pl) kropeł wygenerowanych przy 2,0 % w/w surfaktantu. Po 16 godzinach inkubacji w 37°C nie zaobserwowano nowych populacji kropeł.

wykorzystane później w eksperymentach z bakteriami, patrz: rozdział 3.4.). Po inkubacji zbadano rozmiary kropeł w pozostałych cysternach. W cysternach z większymi kroplami i mniejszym stężeniem surfaktantu zaobserwowano pojawienie się małej populacji kropeł o objętościach ok. 2 razy większych niż główna populacja, co sugeruje koalescencję kropeł (Rys. 39e). W przypadku mniejszych kropeł i większego stężenia surfaktantu nie zaobserwowano nowej populacji kropeł (Rys. 39g), zatem w dalszych eksperymentach przyjęto, że wykorzystywane emulsje są stabilne w 37°C przez co najmniej 16 godzin.

#### **3.3.4. Detekcja sygnałów i przemieszczanie się kropeł między cysternami**

W eksperymentach z bakteriami (rozdział 4) planowano wykorzystanie produkcji białka żółtej fluorescencji (YFP) przez żywe bakterie do określenia, czy bakterie w danej kropli rozmnażają się (wysoka intensywność sygnału fluorescencyjnego), czy też nie (niska intensywność sygnału). Wobec tego do detekcji wykorzystano wcześniej opisany system<sup>151</sup>. Cysterny mikroprzepływowe były wprowadzane do układu do detekcji (Ryc. 38c), w którym szeroki i głęboki kanał stopniowo stawał się bardzo wąski i bardzo płytki, tak aby w kanale krople musiały ustawiać się jedna za drugą. Dodatkowo doprowadzono dwa kanały z olejem fluorowanym, które oddalały od siebie krople w płytkim i wąskim kanale, co ułatwiało detekcję sygnałów z pojedynczych kropeł. Do detekcji sygnałów fluorescencyjnych wykorzystano mikroskop konfokalny.

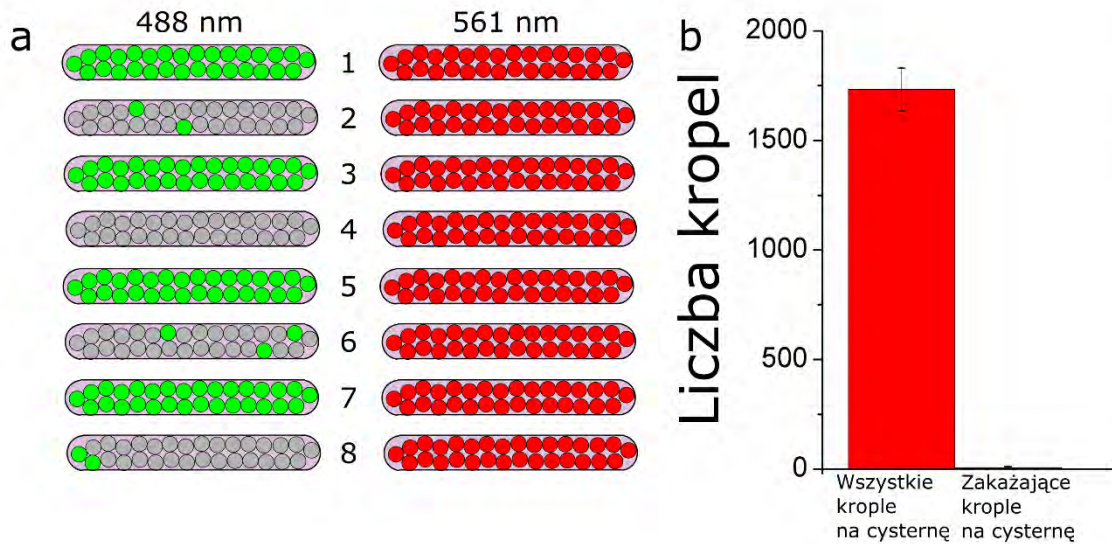
Głębokość i szerokość kanału, który doprowadzał emulsje w układzie do detekcji do przewężenia, w którym zachodziła detekcja, była ustalona eksperymentalnie na 600 μm głębokości i 600 μm szerokości. Użycie wymiarów 800x800 μm owocowało zakażeniem między emulsjami: część kropeł emulsji zostawała w gutterach (rynsztokach) w kątach kanału i przekroju kwadratowym. Kropla skwalanu przepychająca emulsje w dużym kanale pozostawiała guttery na tyle duże, by zostawały w nich krople emulsji. Użycie mniejszego kanału zniwelowało ten efekt. Przez obserwację pod mikroskopem wlotu do układu do detekcji ustalono, że w tym miejscu nie zachodzi żadna kontaminacja, tj. krople kolejnych emulsji nie mieszają się ze sobą. Obserwacja wylotu z układu do generacji kropeł (tym samym wejścia do przewodu polietylenowego) wykazała, iż w tym miejscu pojawia się kontaminacja: część kropeł emulsji nie wpływała do przewodu polietylenowego, zamiast tego była blokowana na ścianie przewodu polietylenowego.

Aby sprawdzić jak duży jest niepożądany transfer kropeł między emulsjami, wykonano dwa eksperymenty. W pierwszym eksperymencie wygenerowano 4 serie cystern po 11 cystern każda. Co druga generowana cysterna zawierała krople czystej wody, zaś pozostałe zawierały zielony barwnik fluorescencyjny (koniugat dekstranu i izotiocyjanianu fluoresceiny, w skrócie FITC-dekstran). Wszystkie krople ze wszystkich wygenerowanych cystern zbadano jedna po drugiej pod kątem intensywności fluorescencji w układzie do detekcji. Ponieważ wiadomo było, w jakiej kolejności generowano cysterny z barwnikiem lub bez niego, wiadomo też było, która kolejno cysterna powinna zawierać wyłącznie fluorescencyjne krople, a która wyłącznie krople o słabej fluorescencji. Jeżeli w cysternie, w której powinny znajdować się wyłącznie wodne krople, zarejestrowano krople z barwnikiem, taką kroplę uznawano za kontaminację. Jednocześnie zliczono wszystkie krople z cystern, które powinny były zawierać wyłącznie krople barwnika i na tej podstawie określono średnią liczbę kropeł na cysternę. Łącznie przebadano 44 cysterny: 22 cysterny z czystą wodą i 22 cysterny z barwnikiem.

Drugi eksperyment mający na celu analizę kontaminacji między cysternami przeprowadzono w następujący sposób. Wygenerowano szereg cystern, w których każda kropla w każdej cysternie zawierała czerwony barwnik fluorescencyjny (koniugat izotiocyjanianu rodamininy i dekstranu, w skrócie RITC-dekstran), zaś co wszystkie krople co drugiej generowanej cysterny zawierały zielony barwnik, FITC-dekstran (Ryc. 41a). Każda kropla każdej cysterny była w tym eksperymencie widoczna na obrazach generowanych przez mikroskop w kanale czerwonym (wzbudzenie 561 nm, odczyt 570-620 nm), zaś kontaminacja była badana w kanale zielonym (wzbudzenie 488 nm, odczyt 500-550 nm) mikroskopu. Zliczono wszystkie czerwone krople w celu ustalenia średniej liczby kropeł na cysternę, zaś wszystkie zielone krople zliczone w cysternach, w których nie powinno być zielonych kropeł, uznano za kontaminację. Łącznie przebadano tak serię 13 cystern: z 13 cystern zliczono średnią liczbę kropeł na cysternę, zaś z 6 cystern z tej serii zmierzono kontaminację.

Łącznie z dwóch eksperymentów opisanych powyżej wynikało, iż średnia kontaminacja to  $8 \pm 7$  kropeł na cysternę (dane z 28 cystern, w tym 22 z pierwszego eksperymentu i 6 z drugiego), zaś średnia liczba kropeł na cysternę to  $1691 \pm 99$  (obliczono na podstawie 35 cystern, w tym 22 z pierwszego eksperymentu i 13 z drugiego) (Ryc. 41b).





Ryc. 41. Zakażenia kroplami wodnymi pomiędzy cysternami. a) Schemat pomiaru zakażeń: każdy numerowany rząd oznacza jedną cysternę z szeregu cystern (tu: ośmiu), widzianą przy ekscytacji światłem o długości fali 488 nm (zielona fluorescencja z FITC-dekstranu) lub 561 nm (czerwona fluorescencja RITC-dekstranu). Każda kropla każdej cysterny zawiera RITC-dektran, zaś każda kropla co drugiej cysterny (tu:nieparzyste) zawiera FITC-dektran. Każda kropla z zieloną fluorescencją zarejestrowana w cysternie o parzystym numerze w szeregu oznacza zakażenie w postaci przeniesienia całej kropli z cysterny nieparzystej do parzystej. b) Przeciętna zmierzona liczba kropeł na cysternę i przeciętna liczba kropeł zakażających na cysternę. Słupki błędów to odchylenia standardowe pomiarów, dla wszystkich kropeł z 35 cystern, dla kropeł zakażających z 28 cystern (patrz: tekst główny).

## 3.4. Badanie odporności na antybiotyki z uwzględnieniem efektu inoculum do poziomu populacji składających się z jednej komórki

### 3.4.1. Wprowadzenie

Badania odporności na antybiotyki na poziomie pojedynczych izolowanych komórek są możliwe, jednak prowadzone metodami klasycznymi są żmudne i mało wydajne<sup>9</sup>. W układach mikroprzepływowych zaprojektowanych do badania odporności na antybiotyki pojedynczych komórek nie jest możliwe badanie setek czy tysięcy populacji w jednym eksperymencie<sup>154</sup> lub badanie nie zapewnia przeprowadzenia np. szeregu rozcieńczeń, co oznacza konieczność wielokrotnego powtarzania eksperymentu dla różnych stężeń antybiotyku<sup>145,158</sup>.

W tym rozdziale Czytelnik znajdzie opis integracji systemów opisanych wcześniej w tej rozprawie i wynik tej integracji. Zrealizowano opisane w rozdziale 1.4. etapy: rozcieńczenie antybiotyku w szeregu, emulsyfikację rozcieńczonych próbek, separację i inkubację emulsji, a na końcu detekcję sygnałów, oznaczających wzrost bakterii.

Celem konstrukcji systemu zintegrowanego na podstawie opisanych w tej rozprawie podzespołów jest wydajne oznaczanie scMIC. Kluczowa jest zatem analiza, które dokładnie podzespoły powinny wchodzić w skład zintegrowanego systemu i czy opracowane rozwiązania faktycznie są korzystne dla końcowego systemu. Po analizie podzespołów należy dokonać ich faktycznej integracji a następnie sprawdzić, czy w końcowym systemie możliwe jest oznaczanie scMIC. Należy także sprawdzić, czy wartości scMIC uzyskane w zintegrowanym systemie są zbliżone do wartości literaturowych, a zatem należy dokonać walidacji systemu. Finalnie, aby uwypuklić przydatność opisanego systemu do dalszych badań biologicznych, należy przeprowadzić dodatkowe eksperymenty, które byłyby uciążliwe lub nietrywialne w przypadku niewykorzystania tego systemu mikroprzepływowego.

W eksperymentach opisanych tutaj wykorzystano podwójną dyszę do emulsyfikacji na progu (MSE) wspomaganej grawitacyjnie (opisaną w punkcie 3.2.6.) i technikę generacji

cystern mikroprzepływowych opisaną w rozdziale 3.3. Stężenie surfaktantu w oleju fluorowanym wynosiło 2 % (w/w).

### **3.4.2. Ilościowe oznaczanie odporności na antybiotyki na poziomie pojedynczych komórek**

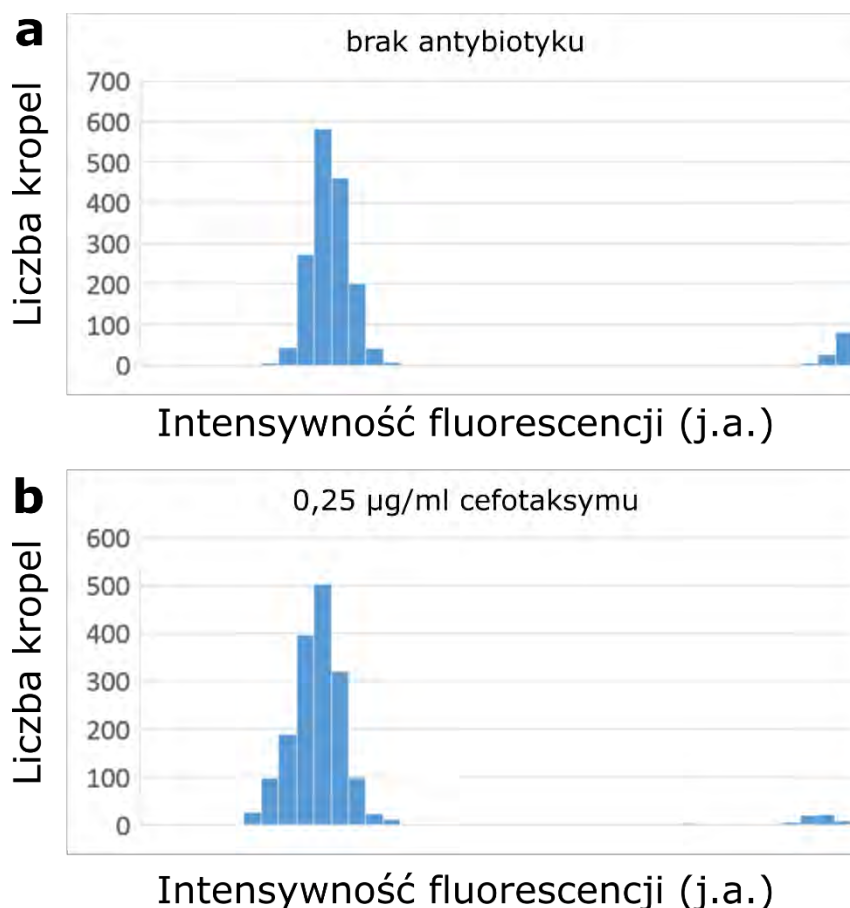
Aby wyznaczyć w sposób ilościowy wartość minimalnego stężenia antybiotyku hamującego wzrost bakterii na poziomie pojedynczych komórek (scMIC), przygotowane wcześniej i rozcieńczone 10 000 razy po 16-godzinnej hodowli bakterie wymieszano z różnymi stężeniami antybiotyku (cefotaksymu). Bakterie były wcześniej hodowane z IPTG, który indukował ekspresję fluorescencyjnego białka YFP. Szereg rozcieńczeń cefotaksymu był dwukrotny i mieścił się w zakresie od 0,25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  do 64  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Jedną z próbek nie zawierała cefotaksymu i stanowiła kontrolę pozytywną. Wszystkich próbek (różnych stężeń antybiotyku, w tym zerowym) było 10. Kolejne próbki o objętości 350  $\mu\text{l}$  każda z przygotowanego tak szeregu rozcieńczeń antybiotyku (ze stałym stężeniem bakterii) umieszczono w kolejnych dołkach na płytce wielodołkowej o 96 dołkach. Następnie użyto pomp strzykawkowych (Nemesys, Cetoni, Niemcy) wspomaganym systemem pozycjonującym przewód połączony ze strzykawką (Rotaxys, Cetoni, Niemcy), by zaciągnąć do przewodu równe objętości kolejnych próbek (1,8  $\mu\text{l}$ ) na zmianę z takimi samymi objętościami (1,8  $\mu\text{l}$ ) oleju fluorowanego. W ten sposób wygenerowano szereg oddzielonych od siebie olejem fluorowanym wodnych kropeł z różnymi stężeniami antybiotyku, z których to kropeł następnie wygenerowano emulsje a następnie uformowano cysterny w układzie takim jak ten opisany w punkcie 3.3.1. Wygenerowane cysterny mikroprzepływowe zebrano w przewodzie polietylenowym i inkubowano przez 16 godzin w temperaturze 37°C, tak jak opisano w punkcie 3.3.2. Następnie cysterny przeniesiono do układu do detekcji fluorescencji i analizowano intensywność fluorescencji z każdej kropli z każdej emulsji, tak jak opisano w punkcie 3.3.3. w sposób podobny do opisanych wcześniej<sup>151</sup>. W trakcie przechodzenia kropeł po kolei przez układ do detekcji, mierzono fluorescencję w zielonym (wzbudzenie 488 nm, odczyt 500-550 nm) kanale mikroskopu konfokalnego.

W każdej badanej pod kątem fluorescencji cysternie widać wyraźnie dwie populacje kropeł o różnych intensywnościach fluorescencji (Ryc. 42). Krople o niskiej fluorescencji („negatywne”) to krople, w których nie zaszedł wzrost bakterii, zaś krople o wysokiej

---

fluorescencji („pozytywne”) to krople, w których bakterie wzrastały i mogły produkować fluorescencyjne białko YFP.

Aby wyznaczyć żywotność bakterii w szeregu rozcieńczeń antybiotyku, w pierwszej kolejności zliczono wszystkie krople w emulsji, która nie zawierała cefotaksymu (w emulsji kontrolnej). Następnie zliczono wszystkie krople pozytywne w tej emulsji (Ryc. 42a). Obliczono stosunek liczby kropeł pozytywnych do liczby wszystkich kropeł w cysternie kontrolnej. Ten stosunek był uznany za maksymalny możliwy stosunek liczby kropeł pozytywnych do wszystkich w danym eksperymencie – wraz ze wzrostem stężenia cefotaksymu spodziewano się bowiem spadku liczebności kropeł pozytywnych względem wszystkich kropeł danej emulsji (Ryc. 42b). Następnie obliczano stosunek kropeł pozytywnych do wszystkich kropeł danej emulsji dla wszystkich emulsji badanych w danym eksperymencie, zaś uzyskany stosunek normalizowano względem omawianego stosunku z emulsji kontrolnej.

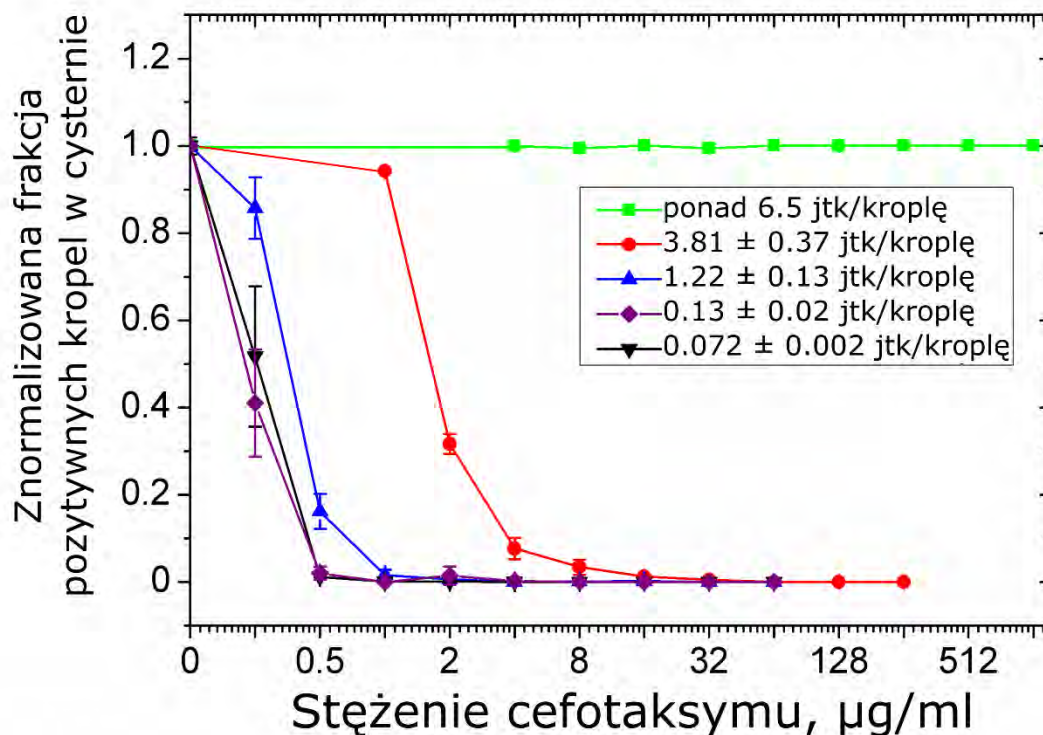


Ryc. 42. Przykładowe pomiary intensywności fluorescencji w kroplach cystern i schemat obliczeń żywotności bakterii. Grupy kropeł o niższej fluorescencji nie zawierały rosnących bakterii (były „puste”), zaś grupy kropeł o wyższej fluorescencji zawierały rosnące bakterie (były „pełne”). j.a. – jednostka arbitralna. a) Dla próby kontrolnej liczba kropeł pełnych była największa. W przedstawionym przykładzie frakcja pełnych do pustych kropeł to 6,88 %. Z rozkładu Poissona obliczono, że 93,12 % kropeł jest pustych, 6,64 % kropeł zawierało tylko i wyłącznie jedną komórkę, zaś 0,24 % kropeł zawierało więcej niż jedną komórkę. Zdefiniowano frakcję pustych do pełnych kropeł (6,88 %) jako 100 % żywotności bakterii. b) Wobec liczby kropeł pełnych z próby kontrolnej normalizowano następnie liczby kropeł pełnych z cystern zawierających cefotaksym. W przedstawionym przykładzie w obecności 0,25 µg/ml cefotaksymu stosunek pełnych do pustych kropeł wynosił 3,62 %. Po znormalizowaniu wobec próby kontrolnej oznacza to żywotność bakterii na poziomie 53 % (3,62/6,88). Takie obliczenia wykonane dla wszystkich analizowanych cystern posłużyły do wykonania ryc. 43.

Aby upewnić się, że w kroplach na początku eksperymentu (przed rozpoczęciem inkubacji) znajdowała się co najwyżej jedna komórka bakterii na kroplę, przeprowadzono obliczenia z wykorzystaniem rozkładu Poissona, jak opisano wcześniej<sup>133</sup>. W ten sposób na podstawie stosunku liczby kropli pozytywnych do wszystkich kropli w emulsji kontrolnej wyznaczano frakcję kropeł zawierających przed inkubacją dokładnie jedną komórkę, a także frakcję kropeł zawierających przed inkubacją dwie lub więcej komórek.

Wygenerowano i przeanalizowano dwukrotnie (w dwóch sesjach eksperymentów) 3 szeregi po 10 cystern (razem 60 cystern). Średnio w emulsjach wykorzystanych w oznaczaniu odporności na antybiotyki (w tym rozdziale i w rozdziale 3.4.2.) znajdowało się  $1859 \pm 263$  krople (obliczone z łącznie 150 cystern – dla 5 szeregów po 10 cystern w 3 powtórzeniach – 60 cystern pochodziło z eksperymentu opisanego w tym rozdziale, 90 pozostałych cystern z eksperymentu opisanego w rozdziale 3.4.2.). Obliczono przy użyciu rozkładu Poissona, że w emulsjach z pierwszej sesji eksperymentalnej (3 szeregi po 10 cystern) znajdowało się średnio  $0,13 \pm 0,02$  komórek na kroplę, zaś w drugiej sesji  $0,072 \pm 0,002$  komórek na kroplę. W pierwszym przypadku kropeł „pustych”, tj. bez żadnej komórki na początku inkubacji było 87,8 %, kropeł z dokładnie jedną komórką było 11,4 %, zaś kropeł z dwiema lub więcej komórkami było 0,78 %. W drugiej sesji eksperymentalnej te wartości procentowe to odpowiednio 93 %, 6,8 %, 0,2 %. Oznacza to, że w każdej emulsji z badanych 6 szeregów cystern znajdowało się średnio 178 kropeł zawierających dokładnie jedną komórkę bakteryjną przed rozpoczęciem inkubacji. Dla każdego badanego stężenia cefotaksymu zbadano zatem  $6 \cdot 178 = 1068$  pojedynczych komórek odsperawanych od innych komórek. Zdefiniowano scMIC (w punkcie 3.4.2. ta definicja dotyczy MIC) jako to stężenie cefotaksymu, w którym frakcja pozytywnych kropli do wszystkich kropli wynosi mniej niż 1 % takiej frakcji dla emulsji kontrolnej, zatem można powiedzieć, że mierzono scMIC<sub>99</sub>. Według tej definicji scMIC wyniósł  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ . (Ryc. 43).





Ryc. 43. Wyniki wysokoprzepustowego pomiaru scMIC i efektu inoculum. Frakcja pozytywnych kropelek w cysternie znormalizowana wobec próby kontrolnej (jak opisano pod ryc. 42) oznacza żywotność bakterii w danym stężeniu cefotaksymu. Każda krzywa reprezentuje jeden szereg cystern (w trzech powtórzeniach) z szeregowo rozcieńczonym antybiotykiem. Każda krzywa oznacza inne stężenie początkowe bakterii w kroplach, wyrażone w jtk (jednostkach tworzących kolonię) na pojedynczą kroplę cysterny. Przyjęto, że dla danej krzywej każda cysterna zawierała początkowo tyle samo bakterii, zaś ich liczba została obliczona z rozkładu Poissona na podstawie próby kontrolnej (jak opisano pod ryc. 42). Dwie krzywe (0.072 jtk/kroplę i 0.13 jtk/kroplę) reprezentują cysterny z kroplami zawierającymi początkowo prawie wyłącznie krople „puste”, bez bakterii, i krople z tylko i wyłącznie jedną komórką bakterii – z tych dwóch krzywych wyznaczono scMIC dla średnio 178 pojedynczych i izolowanych bakterii na cysternę. Pozostałe krzywe obrazują efekt inoculum, tzn. wzrost wartości MIC wraz ze wzrostem początkowego stężenia bakterii w próbce. Dla izogenicznych izolowanych pojedynczych komórek w stężeniu cefotaksymu równym 0,25  $\mu\text{g/ml}$  ok. 50 % komórek przeżywa i dzieli się, zaś ok. 50 % komórek nie dzieli się. Dla wysokiego stężenia początkowego bakterii nie zanotowano spadku liczby fluorescencyjnych kropelek w całym zakresie testowanych stężeń cefotaksymu.

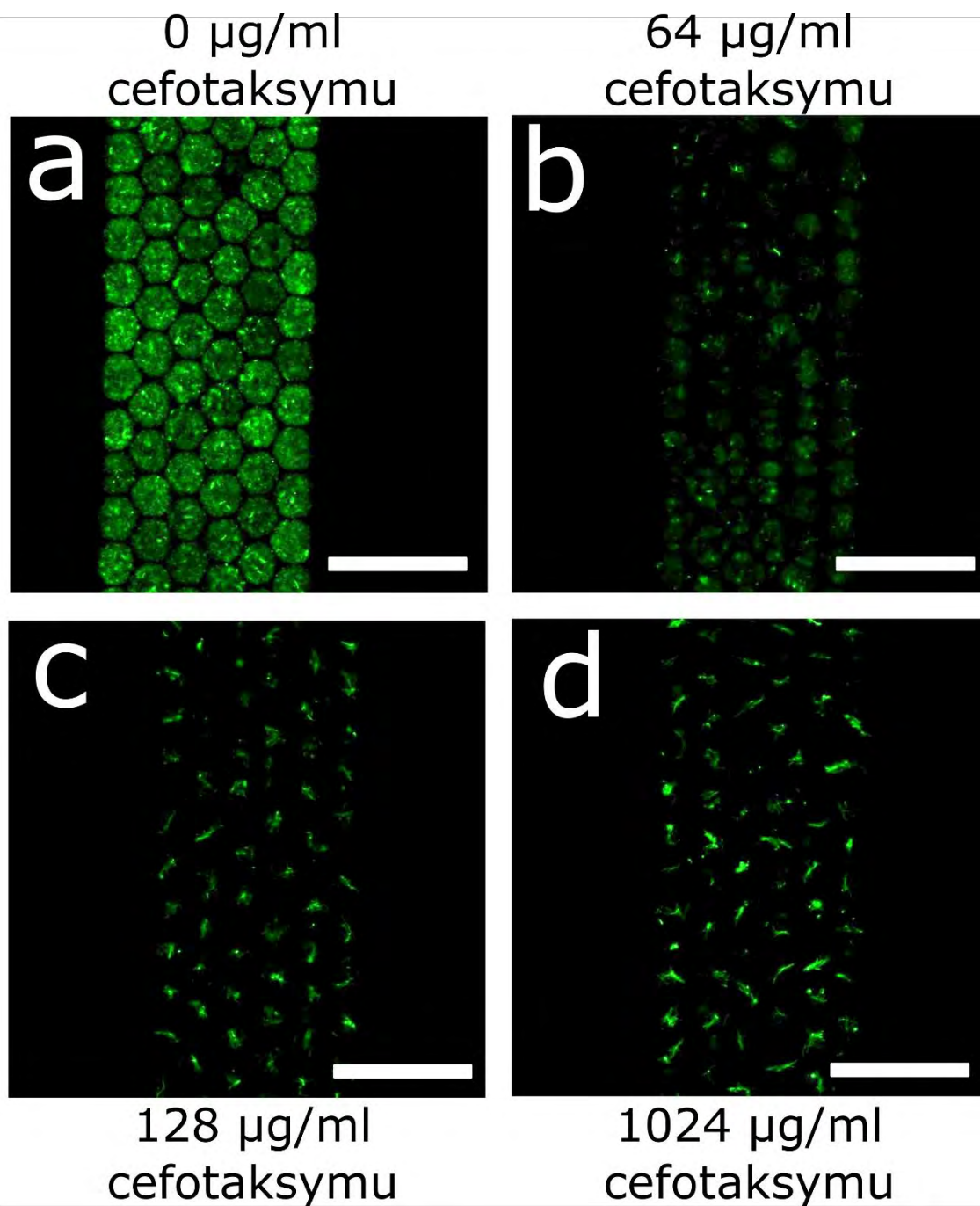
### 3.4.3. Ilościowe oznaczanie efektu inoculum

Aby zbadać efekt inoculum w cysternach mikroprzepływowych, przeprowadzono eksperymenty tak jak w punkcie 3.4.1. z tą różnicą, iż generowano cysterny z próbek o mniej rozcieńczonych bakteriach. Przygotowano trzy różne stężenia początkowe bakterii. Z każdego stężenia początkowego bakterii przygotowano trzy szeregi po 10 cystern, w tym po jednej cysternie kontrolnej (bez cefotaksymu). Obliczenia (jak w punkcie 3.4.1.) wykazały, iż w kroplach emulsji przygotowanych z trzech różnych stężeń początkowych bakterii znajdowało się średnio  $1,22 \pm 0,13$  bakterii na kroplę,  $3,81 \pm 0,37$  bakterii na kroplę, i co najmniej 6,5 bakterii na kroplę dla najwyższego badanego stężenia bakterii. W tym ostatnim przypadku jedna z kontrolnych emulsji zawierała 100 % pozytywnych kropeł, a zatem w tym przypadku nie dało się ustalić precyzyjnie średniej liczby komórek na kroplę z użyciem rozkładu Poissona. Wartość 6,5 jest obliczona na podstawie dwóch pozostałych emulsji kontrolnych (z dwóch innych szeregów cystern przygotowanych z tego stężenia początkowego bakterii), w których mniej niż 100 % kropeł było pozytywne. Spodziewając się efektu inoculum, dla różnych stężeń początkowych bakterii przygotowano różne zakresy stężeń cefotaksymu: dla najwyższego testowanego stężenia bakterii zakres stężeń cefotaksymu obejmował stężenia od  $4 \mu\text{g ml}^{-1}$  do  $1024 \mu\text{g ml}^{-1}$ , dla drugiego najwyższego stężenia bakterii stężenia od  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  do  $256 \mu\text{g ml}^{-1}$ , dla pozostałych stężeń bakterii od  $0,25 \mu\text{g ml}^{-1}$  do  $64 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Zgodnie przyjętą wcześniej definicją scMIC i MIC (1% pozytywnych kropeł w emulsji w porównaniu do emulsji kontrolnej), uzyskane wartości MIC (MIC<sub>99</sub>) wyniosły:  $32 \mu\text{g ml}^{-1}$  dla 3,81 bakterii na kroplę,  $2 \mu\text{g ml}^{-1}$  dla 1,22 bakterii na kroplę. Dla najwyższego stężenia bakterii nie udało się wyznaczyć MIC, tj. nawet dla stężenia cefotaksymu równego  $1024 \mu\text{g ml}^{-1}$  żywotność bakterii w kroplach wynosiła ok. 100 % (Ryc. 43). Zaobserwowano pojedyncze krople (mniej niż 4 krople na cysternę) w emulsjach o nominalnie wyższym stężeniu cefotaksymu niż opisane tu wartości MIC. W eksperymencie z pomiarem scMIC dotyczyło to nawet jednej pozytywnej kropli odnotowanej w stężeniu cefotaksymu równym  $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ , czyli ośmiokrotności zmierzonego scMIC.

### 3.4.4. Wpływ cefotaksymu na morfologię populacji bakterii

Dla najwyższego testowanego stężenia początkowego bakterii (co najmniej 6,5 bakterii na kroplę, patrz: punkt 3.4.2.), nie udało się ustalić wartości MIC. Postanowiono przyjrzeć się morfologii populacji bakterii przy tym stężeniu cefotaksymu. Aby to

osiągnąć, cysterne wpuszczano do układu do detekcji, zatrzymywano ją jednak w szerokim i głębokim kanale poprzedzającym przewężenie, w którym dokonywano wcześniej pomiarów ilościowych MIC i scMIC. Następnie wykonywano zdjęcia mikroskopem konfokalnym dla różnych stężeń antybiotyku w kroplach. Zaobserwowano wpływ stężenia antybiotyku na morfologię populacji bakterii w kroplach. Bez dodatku cefotaksymu bakterie zdawały się być rozproszone w całej objętości kropli z małą agregacją (Ryc. 44a), zaś dla rosnących stężeń cefotaksymu morfologia populacji ulegała zmianie: bakterie były mniej równomiernie rozproszone w kroplach, widoczna była zmiana od mało agregujących do rosnących tylko w agregatach bakterii (Ryc. 44b-d).



Ryc. 44. Morfologia populacji bakterii w kroplach dla różnego stężenia początkowego cefotaksymu dla stężenia początkowego bakterii przekraczającego  $6,5$  jtk/kroplę. Zdjęcia kropeł z bakteriami po inkubacji wykonane pod mikroskopem konfokalnym. a) W próbie kontrolnej bakterie są rozproszone w kroplach z pewną ograniczoną agregacją. b-c) W wyższych stężeniach antybiotyku widoczne jest przejście z bardziej rozproszonych populacji do populacji bardziej zagregowanych. W najwyższym testowanym stężeniu antybiotyku bakterie rosną w kroplach niemal wyłącznie jako agregaty. Wydaje się też, że w wysokich stężeniach antybiotyku (c-d) bakterie przyjmują kształt długich nitok, podczas gdy bez dodatku antybiotyku rosną jako pałeczki. Paski skali oznaczają po  $400$   $\mu\text{m}$ .

## 4. DYSKUSJA

#### 4.1. Precyzyjne i dokładne rozcieńczanie substancji w kroplach o objętości rzędu jednego mikrolitra

Stosunek rozcieńczeń w opisanych w tej pracy systemach mikroprzepływowych (w punktach 3.1.2. i 3.1.3.) jest wbudowany w użyty w nich protokół operacji na płynach. Ponieważ wszystkie krople użyte w rozcieńczeniach są odmierzone w tej samej pułapce hydrodynamicznej, stosunek rozcieńczeń jest ustalony na wartość „2”. Ustalenie wartości współczynnika rozcieńczeń na konkretną wartość jest udoskonaleniem w porównaniu do wcześniej opisywanych systemów kroplowych do szeregowego rozcieńczania próbki, w których współczynnik rozcieńczeń zależy od prędkości przepływu kropli łączących się ze sobą w pułapkach hydrodynamicznych i od objętości tych kropli<sup>81,87,89</sup>. Dotychczas, ustalona i niezależna lub mało zależna od prędkości przepływu wartość współczynnika rozcieńczeń była domeną mikroprzepływów jednofazowych<sup>19,75,76</sup>, jednak nie kroplowych – wyjątkiem była praca Korczyka i współpracowników, jednak w opisanym tam systemie problemem była niedoskonała produkcja wielu kopii nominalnie identycznych pułapek do odmierzenia kropli<sup>82</sup>. Ponieważ w opracowanych przez autora tej rozprawy i opisanych w niej systemach do rozcieńczania połączona w pułapce porcja próbki i rozcieńczalnika jest przepuszczana przez wijący się kanał mieszający przed podzieleniem tej porcji na pół w pułapce, czas mieszania w takiej połączonej kropli jest na tyle długi, by uzyskać dokładne wymieszanie substancji w takiej kropli. To dokładne wymieszanie gwarantuje bardzo wysoką dokładność rozcieńczeń w opisanych tu systemach, niespotykaną do tej pory dla tak małych objętości płynu. Precyzja rozcieńczeń (ok. 3,5 %) jest porównywalna z precyzją odmierzenia kropli, opisaną dla podobnych pułapek hydrodynamicznych przez Korczyka i współpracowników<sup>82</sup>. W porównaniu do systemów Korczyka *et al.* opisany tu rozcieńczalnik cechuje się większą precyzją rozcieńczeń, a to ze względu na wykorzystanie tylko jednej pułapki odmierzającej do przeprowadzenia wszystkich operacji odmierzenia kropli, co niweluje możliwe błędy fabrykacji układu – w opisanym tu systemie błąd fabrykacji pułapki może spowodować generację kropli o innej objętości końcowej, jednak współczynnik rozcieńczeń pozostanie ten sam i równy „2”. Dokładność rozcieńczeń jest zaś wyższa (ok. 1 %) niż w pracy Korczyka *et al.* ze względu na to, że współczynnik rozcieńczeń może być losowo wyższy lub niższy ze względu na niedoskonałe odmierzenie kropli, jednak wartość współczynnika rozcieńczeń dla wielu rozcieńczeń uśrednia się do wartości „2” z dużą dokładnością.

Wpływ niedoskonałego wymieszania w połączonych porcjach próbki i rozcieńczalnika widoczny jest w systemie opisanym w punkcie 3.1.2., w którym współczynnik rozcieńczeń stopniowo spada dla serii rozcieńczeń przygotowanej z pojedynczym przejściem połączonej kropli przez kanał mieszający. Dwa dodatkowe przejścia kropli przez ten kanał pozwoliły na uzyskanie stabilnego współczynnika rozcieńczeń. Mieszanie w połączonych kroplach było lepsze dla systemu opisanego w punkcie 3.1.2. niż w tym opisanym w 3.1.3., ponieważ rozmiary kanałów (głębokość i szerokość) w tym pierwszym systemie były większe niż w drugim, a co za tym idzie kropla o danej objętości w kanale mieszającym pierwszego systemu jest krótsza niż w kanale mieszającym drugiego systemu. Krótsze krople cechuje krótszy czas mieszania<sup>178</sup>.

Współczynnik rozcieńczeń jest taki sam w obydwu opisanych systemach, mimo iż objętość odmierzonej kropli pułapki hydrodynamicznej w pierwszym systemie (3.1.2.) była niemal 2,5-krotnie większa niż w drugim systemie (3.1.3.). Współczynnik rozcieńczeń był taki sam dla kropeł pożywki bakteryjnej MH, jak i dla dejonizowanej wody. Pożywka MH zawiera wyciąg z wołowiny, hydrolizat kazeiny i skrobię. Dodatek skrobi do wodnego roztworu zwiększa lepkość tego roztworu, zaś dodatek pozostałych składników mógł mieć wpływ na napięcie powierzchniowe kropeł. Wcześniej wykazano<sup>82</sup>, iż objętości kropeł odmierzonych w pułapce są różne dla różnych wartości prędkości przepływu płynów w kanałach, jednak seria kropeł odmierzonych w danej prędkości przepływu jest wysoce jednorodna pod względem objętości. Jest możliwe, że współczynnik rozcieńczeń w obydwu opisanych systemach nie zmienia się znacznie wraz ze zmianą wartości liczby kapilarnej w pewnym zakresie jej wartości, ponieważ pomimo iż objętości odmierzonych w pułapce kropeł zmieniają się wraz ze zmianą wartości liczby kapilarnej, kolejne krople są odmierzane przy niemal takich samych wartościach liczby kapilarnej i są niemal identyczne pod względem objętości.

Pierwsza runda rozcieńczeń w systemie z punktu 3.1.3. generuje kroplę o stężeniu próbki równym  $\frac{1}{6}$  początkowego stężenia próbki, zaś każda następna kropla zawiera próbkę o stężeniu dwukrotnie mniejszym niż poprzedzająca ją kropla. Aby zminimalizować czas niezbędny do wykonania protokołu, pułapka łącząca została zaprojektowana tak, aby blokować krople o objętości równej dwóm objętościom pułapki odmierzającej, lecz aby przepuszczać krople o objętości równej trzem objętościom pułapki odmierzającej. Ten projekt determinuje stężenie kropli otrzymanej po pierwszej rundzie rozcieńczenia:



stężenie musi wynosić  $\frac{2}{3} * \frac{1}{4}$  lub  $\frac{2}{3} * \frac{3}{4}$  początkowego stężenia próbki. Aby w omawianym systemie wygenerować pierwszą kroplę o stężeniu równym  $\frac{2}{3} * \frac{1}{2}$  stężenia początkowego próbki pułapka łącząca musiałaby mieć geometrię, która blokowałaby krople o objętości równej trzem objętościom pułapki odmierzającej i przepuszczającą krople o objętości równej czterem objętościom pułapki odmierzającej. Taka zmiana geometrii wymusiłaby zmianę protokołu rozcieńczenia i wydłużyłaby czas jego wykonania o 12-20 s, ze 120 s do 135-140 s.

Wadą opracowanych przez autora i opisanych w tej rozprawie systemów do szeregowego rozcieńczenia próbki jest niska przepustowość systemów i duża objętość uzyskanych kropeł w stosunku do mikroprzepływowych systemów rozcieńczających zaprezentowanych do tej pory. Z drugiej strony, precyzja i dokładność rozcieńczeń uzyskanych w opisanych tu systemach jest wyższa niż ta opisana w literaturze. Niska przepustowość systemów do rozcieńczenia nie powinna jednak stanowić problemu w aplikacjach takich jak cyfrowa amplifikacja DNA (ponieważ reakcja jest uruchamiana przez ustalenie np. wyższej niż pokojowa temperatury w kroplach) czy ustalenie MIC antybiotyku, ponieważ np. czas duplikacji bakterii *E. coli* w temperaturze pokojowej jest ok. 2 rzędy wielkości większy<sup>179</sup> niż czas potrzebny na wykonanie jednej rundy rozcieńczeń w systemie opisanym w punkcie 3.1.3.

Opisane tu systemy do szeregowego rozcieńczenia próbek były zaprojektowane do pracy na kroplach o objętościach wahających się od setek nanolitrów do pojedynczych mikrolitrów. Prezentowane były pułapki hydrodynamiczne wykonane przez frezowanie (tak jak wykorzystane przez autora tej rozprawy pułapki), odmierzające krople o objętościach nawet 10 nanolitrów<sup>89</sup>, przy przepływach kontrolowanych systemem „Droplet on Demand”<sup>150</sup>, wykorzystującym zawory elektromagnetyczne. Aby uzyskać pułapki o objętościach mniejszych niż 10 nl, potrzebne byłyby inne niż komputerowo sterowane frezowanie, np. wielowarstwowa miękka fotolitografia<sup>180</sup>. Jednak w przypadku tak małych objętości dużym ograniczeniem byłoby precyzyjne dozowanie płynów. Pompy strzykawkowe cechują się precyzją dozowania w zakresie pojedynczych nanolitrów. Alternatywnie, ruch płynów wymuszony ciśnieniem mógłby zostać wykorzystany do generowania mniejszych kropeł: Jakiela *et al.* zaprezentowali system mikroprzepływowy wyposażony w zawór piezoelektryczny, który mógł na żądanie

generować krople nawet o objętości 0,9 nl<sup>181</sup>. Do generacji mniejszych kropeł można także użyć zintegrowanych z układem mikroprzepływowym zaworów z elastomeru: np. Jeong *et al.* opisali system do kontrolowanej generacji kropeł o objętości 141 pl<sup>86</sup>. Wydaje się zatem możliwe przeskalowanie opisanych tutaj systemów do pracy na mniejszych objętościach kropeł, które mogłyby zostać później bezpośrednio wykorzystane do eksperymentów wykorzystujących cyfrowe oznaczenia biologiczne.

Innym sposobem na wykorzystanie opisanych tu systemów do rozcieńczania w eksperymentach opartych na cyfrowej biologii jest emulsyfikacja kropeł otrzymanych w wyniku rozcieńczeń. Emulsyfikacja dużych kropeł może być prowadzona w np. złączach T<sup>165</sup>, w modułach skupiających przepływ<sup>42,44,182</sup> lub w urządzeniach bazujących na emulsyfikacji wymuszonej geometrią (MSE)<sup>168</sup> – o emulsyfikacji dużych kropeł przy użyciu MSE traktują rozdziały 3.2. i 4.2. niniejszej rozprawy. Prowadzenie w pierwszej operacji na dużych kroplach i ich następujące dzielenie na małe krople emulsji ma dużą zaletę wobec prowadzenia skomplikowanych operacji na tysiącach małych kropeł: manipulacja nielicznymi dużymi kroplami wymaga prostszych układów mikroprzepływowych niż operowanie na małych kroplach w dużej liczbie. Uzyskanie w pierwszej szeregu precyzyjnie i dokładnie ustalonych rozcieńczeń, a następnie jego emulsyfikacja pozwala na uzyskanie setek lub tysięcy powtórzeń warunków reakcji w pojedynczym stężeniu próbki. Precyzja i dokładność rozcieńczenia zaś są kluczowe np. w oznaczeniach opartych na cyfrowym PCR<sup>71,72</sup>. Teoretycznie liczba rund rozcieńczeń możliwych do przeprowadzenia w opracowanych przez mnie systemach jest nieskończona. Dla pokazania możliwości systemu użyto 11 kropeł w jednym szeregu rozcieńczeń, jako że więcej wygenerowanych rozcieńczeń powodowałoby uzyskanie kropeł o stężeniach barwnika fluorescencyjnego emitujących sygnał fluorescencyjny niemożliwy do odróżnienia od tła. Zastosowanie wyższego początkowego stężenia barwnika fluorescencyjnego (aby ostatnie rozcieńczenia były odróżnialne od tła) powodowało zaś nieliniowo zmieniającą się wraz ze stężeniem barwnika intensywność fluorescencji w otrzymanych kroplach o najwyższym stężeniu barwnika. Zatem liniowa zależność intensywności sygnału fluorescencyjnego od stężenia tego barwnika w kropli jest możliwa tylko w wąskim zakresie stężeń tego barwnika, przy zaznaczeniu, że warunki chemiczne w kroplach, nie licząc stężenia barwnika i stężenia metanolu, były identyczne. Metanol miał stężenie 1 % wagowych w pierwotnej próbce, w pierwszym

rozcieńczeniu 0,5 %, w drugim 0,25 % itd. Dla 11 kropeł z dwukrotnym rozcieńczeniem zakres dynamiczny wyniósł  $2^{11}$ , zatem trzy rzędy wielkości.

Możliwe jest połączenie opisanych systemów do szeregowego rozcieńczania z modułami do emulsyfikacji, takimi jak opisane tutaj w rozdziałach 3.2. i 4.2., jednak istotnym problemem w wykorzystaniu omawianych systemów do oznaczeń scMIC jest po pierwsze czas generacji rozcieńczeń: w przypadku systemu z niezależnym dozowaniem bakterii do szeregu rozcieńczeń antybiotyku (takim jak w punkcie 3.1.2.) to dwie minuty na jedno rozcieńczenie, a także konieczność użycia pięciu pomp strzykawkowych i dwóch zaworów zewnętrznych do pracy takiego precyzyjnego rozcieńczalnika szeregowego dozującego dodatkowo bakterie. Dodatkowym problemem technicznym byłaby synchronizacja ruchu kropeł w protokole rozcieńczenia z ruchem kropeł przez moduł do emulsyfikacji. W związku z tymi ograniczeniami omawiane precyzyjne rozcieńczalniki nie zostały wykorzystane do oznaczania scMIC. Systemy te same w sobie stanowią jednak nową jakość w oznaczeniach analitycznych prowadzonych w mikroskopijnych kroplach ze względu na wysoką precyzję i dokładność generowanych rozcieńczeń.

## 4.2. Pasywna emulsyfikacja szeregu mikrolitrowych kropeł

Parametry emulsji otrzymywanych w module do emulsyfikacji poprzedzonym pochylnią zależą od geometrii kanałów. Wysoki kąt nachylenia pochylni powstrzymuje tylną część emulsyfikowanej kropli przed przejściem przez próg emulsyfikujący w podobny sposób do mechanizmu pułapki hydrodynamicznej opisaną wcześniej<sup>84</sup>. Mała zablokowana na pochylni kropla zostawia więcej miejsca na fazę ciągłą, która opływa kroplę gutterami, w porównaniu do dużej, wydłużonej kropli na pochylni. Faza ciągła przepływa gutterami, nie przemieszczając kropli dalej w stronę przewężenia i progu, ale nie umożliwiając jej też oddalenia się od niego. Różnice w zachowaniu tylnej części emulsyfikowanej kropli na pochylniach o różnych kątach nachylenia są powodowane bardziej kulistym kształtem kropli na pochylni o wysokim kącie nachylenia niż na pochylni o niskim kącie nachylenia. Dla kropli bardziej energetycznie niekorzystne jest przejście przez zwężenie poprzedzone stromą pochylnią niż łagodnym podejściem.

W eksperymentach autor rozprawy zademonstrował, że krople generowane na progu poprzedzonym pochylnią bez bypassów tworzą dwie populacje rozmiarów. Jest to spowodowane wygenerowanymi wcześniej kroplami, które blokują formowanie kolejnych kropeł, przy czym dwie populacje powstają ze względu na asymetryczność geometrii do emulsyfikacji: przewężenie nie znajduje się w środku kanału, a w jego dolnej części. To oznacza, że wpięrw wygenerowana większa kropla blokuje możliwość powstania kolejnej kropli, w wyniku czego powstaje mniejsza kropla. Powstała mniejsza kropla blokuje kanał w mniejszym stopniu niż większa kropla, wobec czego po generacji mniejszej kropli powstaje znowu mniejsza kropla itd. Periodyczność w generowaniu kropeł o różnych rozmiarach jest mniej widoczna dla pochylni o wyższym kącie nachylenia. Może to być spowodowane tym, iż oderwanie małej kropli na progu od dużej kropli na pochylni może zabierać więcej czasu dla pochylni o większym kącie nachylenia ze względu na różnice w ciśnieniu Laplace'a wewnątrz kropli na pochylniach o różnych kątach nachylenia. Podczas dłuższego procesu odrywania pojedynczej kropli, większa objętość fazy ciągłej może przedostać się wokół kropli i przez próg. Taka większa objętość fazy ciągłej mogłaby popchnąć oderwaną wreszcie kroplę dalej od progu niż w przypadku pochylni o łagodnym podejściu, w ten sposób redukując obstrukcję w generacji nowych kropeł przez już oderwane krople.

Dodatek kanałów przetokowych (bypassów) wokół pochylni w głównym kanale pozwolił na efektywne usuwanie świeżo wygenerowanych kropeł z pobliza progu do emulsyfikacji. Usuwanie tych kropeł z okolic progu zapewniło brak obstrukcji nowo generowanych na progu kropeł, a co za tym idzie zapewniło otrzymywanie wysoce monodispersyjnych emulsji w takim układzie. Zdjęcia procesu generacji kropeł w urządzeniu z bypassami ukazują przewężenie formujące się w wodnej kropli przed progiem, do tego profil dystrybucji objętości kropeł w emulsji w porównaniu do takiego profilu uzyskanego w geometrii do ogniskowania przepływu zademonstrowanej przez Kamińskiego *et al.*<sup>44</sup> sugeruje, iż mechanizm odrywania kropeł na progu to w istocie MSE, tj. emulsyfikacja wymuszona geometrią, nie ogniskowanie przepływu. Krople są generowane na progu, a następnie faza ciągła, opływająca kroplę na pochylni przez bypassy, wraca do kanału głównego w pobliżu progu i odpycha krople z pobliza progu.

Przeciętna średnica kropeł generowanych w geometrii z bypassami zmieniała się w niewielkim stopniu wraz ze zmianą prędkości przepływu. Może to być spowodowane częściowo tym, iż część fazy ciągłej płynęła przez bypassy, zatem ta część nie przyczyniała się do zwiększania prędkości kropli wody na progu do emulsyfikacji. Zwiększanie prędkości kropli na progu prowadzi zaś do zwiększania się objętości generowanych kropeł. Geometria wyposażona w pochylnię i bypassy wymagała większej prędkości przepływu płynów przez układ do poprawnego działania w porównaniu do geometrii bez bypassów. Dodatkowo, geometria z bypassami i mniejszym światłem kanału tuż przed progiem wymagała większej prędkości przepływu w kanale niż geometria z bypassami i większym światłem kanału przed progiem. Jest to rezultatem zwiększonego oporu hydraulicznego w głównym kanale z przewężeniem o mniejszym świetle, co prowadzi do zwiększenia przepływu fazy ciągłej przez bypassy, a także jest to rezultatem zwiększonego ciśnienia Laplace'a w kropli pokonującej przesłwit o mniejszym świetle – podobny mechanizm był opisany wcześniej w literaturze<sup>84</sup>. Przeciętne średnice generowanych kropeł zdawały się nie zależeć (albo zależeć w małym stopniu) od stężenia surfaktantu w fazie ciągłej.

Użycie wyższych stężeń surfaktantu w fazie ciągłej umożliwiło emulsyfikację przy niższych prędkościach przepływu i zwiększyło częstotliwość generacji kropeł przy danej prędkości przepływu. Może to być związane z ciśnieniem Laplace'a w kropli na pochylni. Duża kropla była wpychana do stopniowo zwężającego się kanału, co sprawiało, że

krzywizna kropli stopniowo rosła. Zwiększona krzywizna kropli oznacza zwiększone ciśnienie Laplace'a, które wypycha kroplę z przewężenia z powrotem w stronę szerokiego i głębokiego kanału. W pewnym momencie, w którym ciśnienie generowane przez pompy strzykawkowe na kroplę jest równoważne ciśnieniu Laplace'a w przedniej (bardziej ściśniętej) części kropli na pochylni, kropla jest blokowana na pochylni<sup>84</sup>. Zwiększanie stężenia surfaktantu powoduje spadek napięcia powierzchniowego, a zatem zmniejszenie ciśnienia Laplace'a w kropli. Przy mniejszym ciśnieniu Laplace'a skierowanym przeciwnie do kierunku przepływu płynów generowanego w pompach strzykawkowych kropla pokonywała pochylnię i docierała do progu przy mniejszej zadanej prędkości przepływu (przy niższym ciśnieniu skierowanym w stronę progu do emulsyfikacji). Zwiększona częstotliwość generacji kropeł przy zwiększonym stężeniu surfaktantu w fazie ciągłej jest w zgodzie z teoretycznymi przewidywaniami i innymi eksperymentami<sup>54,61</sup>. Liniowa zależność częstotliwości generacji kropeł od prędkości przepływu także jest w zgodzie z wcześniejszymi rozważaniami teoretycznymi i eksperymentami opisanymi w literaturze<sup>50,54,169,183</sup>.

Jak każdy moduł do emulsyfikacji oparty na MSE, opracowana i opisana przez autora niniejszej rozprawy geometria przewężenia poprzedzonego pochylnią przestaje poprawnie emulsyfikować przy wysokiej wartościach liczby kapilarnej w układzie. Przykładowo w amplifikacji DNA przy pomocy PCR mieszaniny reagentów zamknięte w krople w układach mikroprzepływowych mają dużo niższe napięcie powierzchniowe niż w dowolnych testowanych tutaj warunkach. Modyfikacja opisywanych tu geometrii, która w sposób powtarzalny emulsyfikowałaby taką mieszaninę reagentów otworzyłaby drogę do wykorzystania tych geometrii w cyfrowym PCR w kroplach (ddPCR)<sup>136,169,184-186</sup>. Być może zwiększenie kąta nachylenia pochylni połączone ze zwiększeniem pola przekroju poprzecznego bypassów pomogłoby w emulsyfikowaniu kropeł o omawianych, problematycznych parametrach, ponieważ te zmiany w geometrii owocowałyby zmniejszeniem prędkości kropli na progu, a co za tym idzie – zmniejszeniem wartości liczby kapilarnej w miejscu emulsyfikacji.

Geometrie mikroprzepływowe do emulsyfikacji, które tu opisano, zostały pokazane jako możliwe do wykorzystania w oznaczeniach analitycznych: przeprowadzono szeregowe rozcieńczenie próbki, a następnie emulsyfikację szeregu próbek w celu uzyskania setek powtórzeń danych warunków reakcji. Te geometrie mogą być także aplikowane np. w

syntezie chemicznej czy inżynierii materiałowej, ponieważ opisane tu systemy pozwalają na uzyskanie wysoce monodispersyjnych emulsji o zadanym rozmiarze kropeł nawet przy mało precyzyjnej kontroli przepływu. Przykładowo, jedną z obiecujących dróg wykorzystania mikroprzepływów opartych na kroplach jest synteza nano- czy mikrocząstek<sup>187-190</sup>. Użyte w niniejszej pracy układy mikroprzepływowe były wykonane z PDMS, który nie jest materiałem odpowiednim dla wielu rozpuszczalników organicznych wykorzystywanych w syntezie chemicznej<sup>191</sup>. Wydaje się jednak możliwe wykonanie tych samych geometrii w bardziej odpornych chemicznie materiałach, takich jak Teflon<sup>26,192,193</sup> czy poliwęglan o powierzchniach pokrytych modyfikacją kompatybilną z olejami fluorowanymi a jednocześnie odpornymi na najczęściej używane rozpuszczalniki organiczne<sup>194</sup>, ew. w szkło, chociaż to zadanie wydaje się trudniejsze technicznie.

Opisane tu geometrie mogłyby zostać nieco zminiaturyzowane. W systemie z modułem do emulsyfikacji z bypassami zintegrowanym z rozcieńczalnikiem szeregowym pochylnia miała ok. 8 mm długości przy kącie nachylenia 2,5 stopnia. Być może krótsza pochylnia o kącie nachylenia np. 10 stopni zmieniającym się na 2,5 stopnia tuż przed progiem do emulsyfikacji działałaby podobnie do geometrii opisanych tutaj.

Umieszczenie trójkątnego elementu w centralnym miejscu kanału przed progiem emulsyfikującym (a za pochylnią do niego prowadzącą) utworzyło dwudyszowy generator emulsji oparty na MSE. Wykorzystanie trójkątnej geometrii dysz poprawiło monodispersję powstających emulsji – wcześniej w literaturze wykazano, że dla wykorzystanych przez nas warunków przepływu użyty tutaj kąt rozszerzania się dyszy jest optymalny z punktu widzenia monodispersji emulsji<sup>55</sup>. Otrzymane emulsje tworzą dwie populacje rozmiarów, co jest efektem drobnych różnic w geometrii dwóch dysz, wynikających z błędów fabrykacji urządzeń mikroprzepływowych. Użycie dwóch dysz zaowocowało zmniejszeniem kropeł w stosunku do geometrii bez trójkątnego elementu rozdzielającego dyszę na dwie części, co jest efektem zwiększonej krzywizny kropeł w dyszy na progu emulsyfikującym. Dwudyszowa geometria umożliwiła emulsyfikację próbek pożywki bakteryjnej przy wysokim stężeniu surfaktantu, niezbędnym do zachowania stabilności emulsji w trakcie ich inkubacji w celu rozmnożenia bakterii zamkniętych w kroplach emulsji. Emulsyfikacja odbywała się z niewielką prędkością przepływu 0,2 ml h<sup>-1</sup>, ponieważ w omawianej geometrii nie były użyte bypassy, a zatem



do emulsyfikacji nie trzeba było używać dużych prędkości przepływu. Ewakuacja kropeł nowej emulsji z okolic dyszy emulsyfikującej była wymuszona przez siłę wyporu – generowane krople zbierały się w górnej części komory zbiorczej i tworzyły gęsto upakowaną emulsję.

Zwiększenie przepustowości generatora kropeł opartego o MSE zostało osiągnięte przez paralelizację trójkątnych elementów bezpośrednio przed progiem do emulsyfikacji. W ten sposób otrzymano układy 8-dyszowe i 12-dyszowe. Istotne było wprowadzenie płytkich kanałów pomiędzy dyszami, co doprowadziło do wyrównania ciśnienia między dyszami i umożliwiło pracę wszystkich dysz jednocześnie. Zastosowanie wielu dysz spowodowało zwiększenie liczby kropeł dużo mniejszych od średniej objętości kropeł w emulsji. Wszystkie te odstające krople przypadały na końcową część emulsyfikowanej dużej kropli, gdy dynamicznie zmieniają się warunki prędkości przepływu nad progiem i objętość gutterów. Co ważne, objętość tych odstających kropełek nie przekracza 0,2 % objętości całej fazy wodnej powstałej emulsji, mimo iż liczba odstających kropeł to około 5 % całej liczby kropeł w emulsji w eksperymencie z emulsyfikacją pożywki bakteryjnej MH. Odstające krople są bardzo małe, co znaczy, że prawdopodobieństwo zamknięcia w takiej kropli pojedynczej komórki w oznaczeniu cyfrowej biologii jest dużo mniejsze niż w przypadku kropli o przeciętnej dla danej emulsji objętości, zatem emulsja uzyskana w urządzeniu o 8 lub 12 dyszach nie jest zdyskwalifikowane z eksperymentów związanych z np. oznaczaniem wartości scMIC.

Zaobserwowano, iż częstotliwość generacji kropeł jest dużo większa w skrajnych dyszach niż w dyszach wewnętrznych, co jest spowodowane najprawdopodobniej obecnością przepływu fazy ciągłej wokół emulsyfikowanej dużej kropli w gutterach. Przepływająca w skrajnych dyszach faza ciągłą na skutek tarcia prawdopodobnie pociąga za sobą fazę rozproszoną ze skrajnych dysz, co powoduje wzrost prędkości czoła fazy rozproszonej w skrajnych dyszach, a co za tym idzie, zwiększoną częstotliwość generacji kropeł. Zostało to pośrednio potwierdzone przez zmianę rozkładu objętości kropeł generowanych w dyszach po dodaniu bypassów wokół modułu do emulsyfikacji – część fazy ciągłej zamiast gutterami wokół emulsyfikowanej kropli płynęło przez bypassy, co doprowadziło do zmniejszenia różnicy w prędkości przepływu między dyszami skrajnymi a wewnętrznymi, co doprowadziło do zmiany rozkładu częstotliwości

generacji kropeł między dyszami skrajnymi a centralnymi, a jednocześnie do zmiany rozkładu objętości kropeł.

Zaobserwowano także blokowanie kropeł pomiędzy dyszami podczas emulsyfikacji. Zatrzymanie przepływu powoduje odblokowanie dysz, co oznacza, że przyczyną blokowania nie jest zwilżanie dysz przez krople. Bliższa obserwacja wykazała, że krople są unieruchamiane przy dyszach przez przepływ wsteczny, powstający podczas formowania się przewężenia w fazie wodnej w dyszy i podczas cofania się czoła fazy wodnej po oderwaniu kropli w dyszy. Ten przepływ wsteczny był przewidziany teoretycznie<sup>49</sup> i wykorzystany do stabilizacji objętości kropeł względem prędkości przepływu<sup>168,195</sup>, jednak nie był on do tej pory zarejestrowany w bezpośredni sposób.

Blokowanie dysz zwalczono poprzez poszerzenie dysz, generujących krople. Poszerzenie dysz spowodowało oddalenie punktów formowania kropeł, co mogło zmniejszyć prędkość przepływu wstecznego odczuwaną przez krople, które mogłyby blokować dysze. Ponadto, poszerzenie dysz spowodowało powstawanie większych kropeł niż w węższych dyszach. Prawdopodobnie węższe dysze wymuszały formację kropeł z mniejszej porcji fazy rozproszonej niż preferowana przez układ podobny do geometrii EDGE<sup>167</sup>: wykazano, iż w geometrii składającej się jedynie z szerokiego płytkiego kanału wpadającego do głębokiej komory zbiorczej krople powstają zawsze w tych samych miejscach, generując krople zawsze z tego samego odcinka progu do emulsyfikacji<sup>196</sup>. Użycie dysz węższych niż szerokość formowania kropeł preferowana w układzie bez dysz prawdopodobnie wymusza formowanie kropeł mniejszych niż by to miało miejsce w układzie bez dysz. Prawdopodobnie większe krople generowane w układzie z szerszymi dyszami są mniej podatne na przepływ wsteczny niż mniejsze krople z układu z węższymi dyszami ze względu na swój rozmiar.

W geometrii z 12 szerokimi dyszami nie zaobserwowano formowania się dwóch populacji kropeł mimo braku wykorzystania bypassów. Prawdopodobnie stosunek szerokości gutterów do skrajnych dysz był mniejszy w przypadku szerokich dysz niż wąskich dysz, co mogło ograniczyć spowodowane tarciami przyspieszenie prędkości przepływu w skrajnych dyszach, a zatem zniwelować formowanie populacji kropeł w emulsji.

### 4.3. Separacja emulsji, ich inkubacja i detekcja wzrostu bakterii

Tak jak opisano to wcześniej w tej pracy (rozdziały 1.4.2., 3.2.6.), z punktu widzenia eksperymentów na szeregach emulsji ważnym jest, aby te emulsje miały możliwie wysoki stopień upakowania – pozwala to na skrócenie szeregu emulsji i uniknięcie problemów technicznych związanych z wysokim oporem hydraulicznym w kanale wylotowym układu mikroprzepływowego, w którym trzeba by gromadzić długie szeregi emulsji. W literaturze opisano układy emulsyfikacji oparte na MSE, które generowały emulsje o wysokim stopniu upakowania<sup>57,169,186</sup>. W niniejszej pracy do generacji wysoce upakowanych emulsji wykorzystano geometrię dwudyszową do MSE poprzedzoną pochylnią i zorientowaną pionowo. Pionowe ustawienie układu umożliwiło ewakuację nowo generowanych kropelek z pobliża progu w sposób całkowicie pasywny, przy wykorzystaniu siły wyporu: woda, której krople generowano, ma mniejszą gęstość niż olej fluorowany, w którym była zawieszona. Jak pokazano wcześniej w tej pracy, usuwanie nowych kropelek z okolicy progu emulsyfikującego ma kluczowe znaczenie do uzyskania monodispersyjnej emulsji z użyciem MSE. Do dalszych eksperymentów z oznaczaniem wartości scMIC wykorzystano dwudyszową geometrię do MSE.

Separacja emulsji odbyła się poprzez wtłoczenie do układu mikroprzepływowego porcji skwalanu, czyli oleju niemieszającego się ani z wodą, którą emulsyfikowano, ani z olejem fluorowanym, w którym krople wody były zawieszane. Układ mikroprzepływowy był fluorofilowy, co sprawiło, że skwalan w kanałach układu był fazą rozproszoną. Z tego punktu widzenia istotne było dobranie szerokości i głębokości kanałów, przez które przepychane były rozdzielone skwalanem emulsje: w większych kanałach guttery wokół wydłużonej kropli fazy rozproszonej są większe. Użycie kanałów o zbyt dużym świetle skutkowałoby niepełnym przepychaniem małych kropelek wody przez duże krople skwalanu: Krople wody w takim zbyt dużym kanale zostawały w dużych gutterach okalających dużą kroplę skwalanu. Emulsje, które były później separowane od siebie i które tworzyły cysterny mikroprzepływowe, zawierały średnio po ok. 1900 kropelek o objętości ok. 0,74 nl każda. Generacja cystern o mniejszych kroplach jest możliwa, przy czym istotne byłoby zmniejszenie światła kanałów, przez które przechodziłyby takie emulsje przepchane skwalanem: mniejsze krople wody byłyby bardziej narażone na pozostawanie w dużych gutterach wokół dużych kropelek skwalanu. Jest możliwe generowanie cystern o większej liczbie kropelek. Aby to osiągnąć, należy odpowiednio

zwiększyć komorę na zbieranie emulsji po generacji, tak by powstająca emulsja nie wypełniała całej objętości komory, co prowadziłoby do pogorszenia jakości emulsji ze względu na blokowanie progu emulsyfikującego podczas formowania nowych kropeł emulsji. Emulsje w generowanych cysternach cechują się wysokim stopniem upakowania, tak jak w innych układach MSE bazujących na grawitacji. Przeciętnie, stosunek objętości fazy rozproszonej (wody) do ciągłej (oleju fluorowanego) wynosi 50 %, co wynika z równych objętości oleju fluorowanego i wody użytych do generacji cystern. Prawdopodobnie byłoby możliwe uzyskanie bardziej upakowanych emulsji gdyby wykorzystać system do wymuszania ruchu płynów sprzężony z układem optycznym, tak by dozować skwalan w odpowiednim momencie. Możliwe byłoby także zwiększenie stopnia upakowania emulsji w cysternach mikroprzepływowych przez odciąganie fazy ciągłej z emulsji przed transferem emulsji do przewodu<sup>173,174</sup>.

W przewodzie polietylenowym, w którym zbierane były odseparowane od siebie nawzajem emulsje, warunki zwilżania były inne, wobec czego skwalan stał się w przewodzie fazą ciągłą. To zaowocowało skuteczniejszym odseparowaniem emulsji: aby kropla wody mogła przedostać się z jednej emulsji do drugiej, musiałaby wpierw pokonać barierę między olejem fluorowanym a węglowodorowym, w efekcie tworząc podwójną emulsję: kropla wody musiałaby pokonywać separujący odcinek skwalanu otoczona porcją oleju fluorowanego jako podwójna emulsja, co wydaje się niekorzystne energetycznie.

Jak opisano powyżej, transfer kropeł między odseparowanymi skwalanem emulsjami w przewodzie polietylenowym wydaje się być mało prawdopodobny. Zaobserwowano jednak krople w emulsjach, w których te krople nie powinny się być znaleźć – na poziomie ok. 0,4 % liczebności populacji kropeł w emulsjach. Najprawdopodobniej ta kontaminacja (transfer kropeł między emulsjami) zachodzi przy transferze emulsji do przewodu polietylenowego: część kropeł nie wpływała do przewodu, zamiast tego zostając na jego ściankach w momencie przejścia z szerokiego i głębokiego kanału mikroprzepływowego do przewodu PE o mniejszej średnicy – innymi słowy krople zostawały na przewężeniu i były następnie porywane przez kolejną napływającą emulsję. Taki mechanizm kontaminacji emulsji przez pojedyncze krople oznacza, że pojedyncze krople kontaminują całe emulsje tylko w jednym kierunku: krople z wcześniej generowanych cystern mogą kontaminować później wygenerowane cysterny, ale nie na

odwrót. Zostało to uwzględnione w planowaniu eksperymentów do oznaczenia scMIC, o czym więcej w rozdziale 4.4. Możliwe byłoby całkowite wyeliminowanie zanieczyszczeń tego rodzaju, gdyby kanał wyprowadzający emulsje z układu do przewodu miał otwór wylotowy w całości pokryty przez światło przewodu, aby krople nie mogły zostawać na ściankach przewodu. Takie rozwiązanie wymagałoby jednak innych metod fabrykacji urządzeń, np. frezowania układów w różnych płaszczyznach, aby wylot z układu był kolisty w przekroju i miał różne średnice w różnych miejscach. Jest to technicznie wykonalne, co pokazali koledzy z zespołu autora niniejszej rozprawy<sup>25</sup>, aczkolwiek w ten sposób wykonywano mniej skomplikowane układy niż potrzebne tutaj. Dodatkowo nie można byłoby produkować takich układów w PDMS, niezbędne byłyby układy wykonane z termoplastiku lub z PTFE. Takie rozwiązanie pozostaje jednak otwartym problemem technicznym, którego rozwiązanie przyniosłoby natychmiastową korzyść w postaci likwidacji zanieczyszczających emulsje kropeł. Niemniej, zanieczyszczające krople stanowiły mniej niż 0,4 % populacji, zatem nie podważają one założeń opisanej tutaj metody separacji emulsji w szeregu. Osobną kwestią jest transfer masy pomiędzy kroplami tej samej cysterny – ten temat ma swoje rozwinięcie w rozdziale 4.4.

Emulsje w formie cystern mikroprzepływowych, zamknięte w przewodzie polietylenowym, nie ulegały koalescencji przez 16 godzin inkubacji w temperaturze 37°C, co umożliwiło przeprowadzenie eksperymentów biologicznych opisanych w punkcie 4.4. 16 godzin to czas, po którym rozpoczyna się faza śmierci populacji bakterii w kroplach o rozmiarze zbliżonym do tego użytego w badaniach opisanych w niniejszej rozprawie<sup>158</sup>. Bakterie zużywają wszystkie składniki odżywcze zamknięte razem z nimi w kropli, po czym zaczynają umierać. Dłuższe badania komórek bakteryjnych i całych populacji bakterii są możliwe<sup>24,25</sup>, jednak wymagałyby znacznych zmian w opisywanej tutaj metodzie.

#### 4.4. Badanie odporności na antybiotyki z uwzględnieniem efektu inoculum do poziomu populacji składających się z jednej komórki

Przy użyciu metody opisanej w rozdziale 4.3., wykorzystującej cysterny mikroprzepływowe, zbadano odporność na antybiotyk tak na poziomie pojedynczej komórki, jak i większych populacji. Umieszczenie pojedynczych komórek bakterii w osobnych kroplach zagwarantowało izolację komórek, a zatem zmierzone wartości scMIC faktycznie odpowiadają odporności na antybiotyk pojedynczej bakterii, bez interakcji z innymi bakteriami. W eksperymentach opisanych w rozdziale 4.3. wskazano, że najprawdopodobniej nie występuje transfer kropeł pomiędzy emulsjami podczas inkubacji, a na pewno występuje podczas transferu emulsji z układu do generacji kropeł do przewodu polietylenowego. Generowanie emulsji zaczynało się od emulsji najniższym stężeniu antybiotyku (emulsji kontrolnych), a następnie emulsji o coraz większym stężeniu antybiotyku. To znaczy, że krople przy wadliwym transferze z układu do przewodu mogły się przenosić w sposób niepożądany tylko z emulsji o niższym stężeniu antybiotyku do emulsji o wyższym stężeniu antybiotyku. To oznaczało generowanie błędów w postaci wyników fałszywie pozytywnych, które według EUCAST są w oznaczaniu odporności na antybiotyki mniej niepożądane niż wyniki fałszywie negatywne: pacjentowi lepiej jest podać za nieco za dużą dawkę antybiotyku niż nieco za małą.

Należy rozważyć także transport masy pomiędzy kroplami pojedynczej emulsji. Wykazano wcześniej<sup>33</sup>, że transport w emulsjach z surfaktantem odbywa się poprzez transfer pęcherzyków lub powiększonych miceli od jednej kropli do drugiej. Pęcherzyk składa się z olejowego rdzenia i dwuwarstwy surfaktantu, tworząc strukturę przypominającą liposom. Woda w takim pęcherzyku znajduje się wewnątrz dwuwarstwy. Baret i współpracownicy<sup>33</sup> skłaniają się ku wyjaśnieniu transportu między kroplami poprzez pęcherzyki, zaś Etienne i współpracownicy<sup>34</sup> tłumaczą transport cząstek powiększonymi micelami (dalej: kropelkami). Pęcherzyki czy kropelki w użytej tutaj konfiguracji oleju i surfaktantu mają średnicę ok. 200 nm<sup>33</sup>, co oznacza, że cały pęcherzyk czy kropelka jest wielokrotnie mniejszy czy mniejsza od pojedynczej komórki bakterii (ok. 2000x1000x1000 nm), do tego taka bakteria musiałaby się ulokować pomiędzy warstwami surfaktantu w przypadku pęcherzyka, co zdaje się mało prawdopodobne. Wyniki obserwowane przez nas (wartość mierzonego scMIC, frakcje pozytywnych

kropel w emulsjach) zdają się sugerować, że transfer bakterii między kroplami emulsji nie zachodzi – np. frakcja pozytywnych kropel w emulsji bez antybiotyku prawdopodobnie osiągałaby wartości zbliżone do 100 % po wielogodzinnej inkubacji. Inną kwestią jest transfer mniejszych cząstek między kroplami emulsji – w przypadku omawianych eksperymentów kluczowe są cząstki antybiotyku. Jest bardzo prawdopodobne, że antybiotyk jest transportowany pęcherzykami pomiędzy kroplami emulsji. Istnieją metody ograniczania transportu cząstek między kroplami emulsji, np. używanie odpowiednich olejów<sup>197</sup>, obniżanie stężenia surfaktantu<sup>33,198</sup>, wykorzystywanie nanocząstek do stabilizacji emulsji<sup>29</sup>, czy wykorzystywanie w kroplach cząstek, które sprawdzono eksperymentalnie jako transportowane w ograniczonym stopniu między kroplami emulsji<sup>151</sup>. Wobec tego bardzo korzystny jest projekt przeprowadzonych przez autora niniejszej rozprawy eksperymentów: dana cysterna mikroprzepływowa zawierała krople o wyłącznie jednym stężeniu antybiotyku, zatem transport antybiotyku między kroplami danej emulsji można było zaniedbać. Wymieszanie kropel emulsji o różnych stężeniach antybiotyku prawdopodobnie nie dałoby wiarygodnych wyników analizy odporności bakterii. Kwestia transferu cząstek antybiotyku pomiędzy odseparowanymi emulsjami w przewodzie nie została tu zbadana, jednak można przewidywać, że taki transfer jest ograniczony: rozpuszczalny w wodzie antybiotyk musiałby wpierw przejść z kropli wody do oleju fluorowanego, następnie przejść do oleju węglowodorowego, pokonać odległość co najmniej 10 mm w jednym kierunku, przejść do oleju fluorowanego w innej emulsji, a następnie „zakazić” krople tej emulsji. Dodatkowo taki transfer zachodziłby jedynie pomiędzy sąsiadującymi emulsjami o zbliżonym stężeniu antybiotyku. Pośrednim dowodem na skuteczność opracowanej przeze mnie metody jest uzyskanie wartości scMIC zgodnymi z wartościami uzyskanymi metodami klasycznymi, o czym więcej poniżej. Wydaje się zatem, że transfer antybiotyku między kroplami jednej emulsji jest ważniejszy w opisywanej metodzie niż transfer antybiotyku między emulsjami – w tym drugim przypadku dużo większe znaczenie może mieć niepożądane przenoszenie całych wodnych kropel o objętości ok. 740 pL między emulsjami, co faktycznie ma miejsce w opisywanej metodzie, choć w ograniczonym stopniu: przeciętnie 0,4 % populacji kropel to krople „zakazające”, lecz tylko z emulsji o niższym stężeniu antybiotyku, co wynika z protokołu przygotowania szeregu cystern. Te zakazające emulsje nie dostarczają zatem dodatkowych cząstek antybiotyku do rozdystrybuowania pomiędzy pozostałe krople zakazanej emulsji – raczej same obniżają nieznacznie stężenie antybiotyku w pozostałych kroplach zakazanej emulsji, dostarczając



być może większej liczby fałszywie pozytywnych sygnałów oznaczających wzrost bakterii w zaniżonym w stosunku do planowanego stężenia antybiotyku. Można też zaproponować eksperyment, w którym w co drugiej generowanej emulsji nie będzie antybiotyku, a w co drugiej emulsji będą krople o zmieniającym się stężeniu antybiotyku. Być może po inkubacji w emulsjach sąsiadujących z emulsjami o najwyższym stężeniu antybiotyku zostałby zahamowany wzrost bakterii.

W każdej badanej cysternie mikroprzepływowej znajdowało się średnio ok. 1900 kropeł. W badaniach nad scMIC przeciętnie w każdej cysternie ok. 180 kropeł zawierało pojedyncze izolowane komórki bakteryjne. W eksperymentach użyto po 10 cystern na jedno oznaczenie scMIC, zatem w jednym eksperymencie badano łącznie ok. 1800 izolowanych pojedynczych komórek bakteryjnych, co jest znaczącym usprawnieniem w stosunku do metod klasycznych<sup>9</sup>. Aby osiągnąć 1800 izolowanych pojedynczych bakterii w płytkach wielodołkowych, należałoby nie tylko wykorzystać 1800 dołków (19 płytek po 96 dołków), ale także przeprowadzić szeregowe rozcieńczenia bakterii w dołkach: ostatnie rozcieńczenie bakterii, w którym rejestruje się wzrost, jest uznawane za stężenie zawierające pojedynczą bakterię. Zatem powtórzenie oznaczania scMIC dla 1800 komórek wymagałoby metodami klasycznymi dziesiątek albo i setek płytek wielodołkowych. Istnieje możliwość oznaczania MIC pojedynczych komórek na inne sposoby, takie jak izolacja komórek w przestrzeni w żelu<sup>159</sup> lub wykorzystanie tzw. „mother machine”<sup>157</sup>, jednak te systemy nie gwarantują faktycznej izolacji bakterii od siebie nawzajem. Zademonstrowano system do badania odporności na antybiotyki na poziomie pojedynczych komórek zamkniętych w osobnych kroplach<sup>145</sup> (w tym samym roku ukazała się praca traktująca o opisywanej tu metodzie)<sup>162</sup>. Metoda opisana przez Lyu i współpracowników<sup>145</sup> pozwala na analizę ogromnej liczby kropeł (ok. miliona), co zostało wykorzystane do wyszukiwania pojedynczych odpornych komórek w ogromnych populacjach nieodpornych bakterii, jednak ta metoda nie pozwala na łatwe testowanie szeregu stężeń antybiotyków. Metoda przedstawiona tutaj jest skalowalna, tzn. możliwe jest zwiększenie tak liczby cystern w eksperymencie (liczby testowanych stężeń antybiotyku) a także liczby kropeł w każdej cysternie (liczby powtórzeń eksperymentu). By tego dokonać, przydatna byłaby automatyzacja opisywanej metody, np. przez sprzężenie obrazu uzyskiwanego z kamery monitorującej ruch kropeł przed emulsyfikacją z działaniem pomp strzykawkowych wymuszających przepływ płynu. W obecnej wersji metody problemem są duże rozmiary kropeł przed emulsyfikacją,

ponieważ na takie krople niezaniechany wpływ ma grawitacja, zwłaszcza że układ do emulsyfikacji jest ustawiony pionowo. Sprzężenie monitorowania ruchu kropeł z kontrolą ich ruchu umożliwiłby prostą generację dziesiątek cystern w jednym eksperymencie. Prawdopodobnie dziesiątki cystern stawiałyby niepomijalny opór hydrauliczny w przewodzie połączonym z wylotem z układu do emulsyfikacji, wobec czego zastosowanie przewodu o większej niż tutaj średnicy byłoby zasadne.

#### 4.4.1. Oznaczanie wartości scMIC

Jak wspomniano wcześniej, wartość scMIC ( $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) uzyskana przy użyciu cystern mikroprzepływowych z kroplami o objętości 740 pl jest porównywalna z wartościami scMIC uzyskanymi przy pomocy innych metod dla tego samego szczepu bakterii i tego samego testowanego antybiotyku:  $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  z wykorzystaniem dołków w płytce wielodołkowej do hodowli bakterii i  $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  z wykorzystaniem emulsji znakowanych chemicznie kropeł o objętości 2 nl<sup>199</sup>. Nieduża różnica w otrzymanych wartościach może być wynikiem innej definicji scMIC w każdym z przypadków (w tej pracy scMIC to przypadek, gdy 99 % kropeł zawierających bakterie nie wykazuje wzrostu bakterii, zaś w pracy z użyciem dołków definicja jest inna ze względu na mniejszą liczbę powtórzeń eksperymentu), innej objętości badanej próbki czy innej pożywki bakteryjnej (MH w tej pracy, LB w pozostałych dwóch pracach). Różnica w otrzymanych wartościach scMIC jest jednak niewielka, co znaczy że opisana tutaj metoda oznaczania scMIC daje wiarygodne rezultaty.

#### 4.4.2. Zmienność fenotypowa

Dla eksperymentów z pojedynczymi bakteriami w kroplach w stężeniach poniżej scMIC zaobserwowano wzrost bakterii w części kropeł (przy  $0,25 \mu\text{g ml}^{-1}$  w średnio około 50 % kropeł). Bakterie powinny mieć taki sam genom, ponieważ pochodziły z jednej kolonii bakteryjnej, zaś aby doświadczyć mutacji zmieniającej fenotyp (odporność) izolowane w kroplach bakterie miały tylko jedno pokolenie (ok. 20 minut) – jeżeli w tym czasie bakteria nie utraciłaby odporności, podzieliłaby się i wraz z bakterią-córką rozmnażałyby się dalej (antybiotyk później nie zadziałałby ze względu na efekt inoculum, dwie bakterie są „bardziej odporne”), zaś gdyby bakteria z początku nie była odporna i nie uzyskała odporności w 20 minut, nie podzieliłaby się. Najbardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem obserwowanej różnicy w fenotypach pojedynczych bakterii

heterogeniczność fenotypowa populacji – bakterie obdarzone tym samym genotypem prezentują inny fenotyp (tu: dzieli się lub nie dzieli się w obecności antybiotyku). Najczęściej zmienność fenotypową tłumaczy się stochastycznością w ekspresji genów<sup>200–202</sup>. Innym możliwym wytłumaczeniem takiego rozkładu w odporności na antybiotyk jest rozkład liczby plazmidów z genem uodparniającym bakterie na cefotaksym w populacji bakterii<sup>203,204</sup>. Większa liczba plazmidów w komórce powodowałaby większą ekspresję beta-laktamazy, a co za tym idzie większą odporność na użyty antybiotyk. Wykorzystany w opisanych tu eksperymentach plazmid z genem odporności jest niskokopijny, jednak może cechować się rozkładem liczby kopii na komórkę w populacji.

#### 4.4.3. Efekt inoculum

Przy użyciu cystern mikroprzepływowych zaobserwowaliśmy efekt inoculum. Obecność większej liczby bakterii w kroplach powodowała przesunięcie wartości MIC w stronę wyższych stężeń antybiotyku. Jest to efekt spodziewany, ponieważ wykorzystano bakterie i antybiotyk, o których wiadomo było wcześniej, że wykazują efekt inoculum<sup>9</sup>. Warto zwrócić uwagę na fakt, iż dla oznaczeń o wyższych stężeniach początkowych bakterii występują mniejsze błędy oznaczenia. Prawdopodobnie jest to spowodowane tym, że gdy w każdej kropli znajdowało się więcej bakterii, wzrastały szanse na to, że któraś z bakterii zdoła się podzielić. W przypadku pojedynczych bakterii w kroplach szanse na to były mniejsze, stąd widoczny większy błąd oznaczenia żywotności bakterii w kroplach zawierających jedną komórkę w porównaniu do kropel z wieloma bakteriami.

#### 4.4.4. Morfologia

Dla najwyższego użytego stężenia bakterii nie zaobserwowano wartości MIC w szerokim zakresie stężeń antybiotyku. Zaobserwowano jednak emitujące sygnał fluorescencyjny agregaty bakterii, w dodatku bakterie zdawały się formować filenty. Agregacja bakterii w obecności antybiotyków była wcześniej opisywana dla większych niż używane tutaj objętości eksperymentów dla kultur złożonych z jednego szczepu bakterii<sup>205</sup>, więcej niż jednego szczepu bakterii<sup>206</sup>, a także dla bakterii jednego szczepu hodowanych w kroplach o objętości 2 nl<sup>199</sup>. Formowanie agregatów przez bakterie jest uważane za sposób na zwiększenie odporności populacji bakterii na antybiotyk<sup>207</sup>, przypominający działanie biofilmów. Wzrost bakterii w formie filamentów był opisany zarówno dla Gram-dodatkich jak i Gram-ujemnych bakterii, rosnących w pożywkach z dodatkiem

antybiotyku z grupy beta-laktamów (do tej grupy zaliczany jest użyty w przeprowadzonych przez autora tej rozprawy eksperymentach cefotaksym), i jest uważany za mechanizm obronny bakterii przeciwko tej klasie antybiotyków<sup>159,208,209</sup>. Wzrost bakterii w formie filamentów był także zaobserwowany w kroplach<sup>158</sup>. Wykorzystanie cystern mikroprzepływowych pozwala na analizę większej o co najmniej jeden rząd wielkości liczby kropeł niż w przypadku tego systemu<sup>158</sup>, zawierających bakteryjne agregaty czy filamenty, w zależności od stężenia antybiotyku w kroplach.

## 5. WNIOSKI

### 5.1. Precyzyjne i dokładne rozcieńczanie w kroplach

W niniejszej rozprawie zademonstrowano systemy mikroprzepływowe, które umożliwiają precyzyjne i dokładnie dwukrotne rozcieńczanie szeregowo próbki. Opisano także system, w którym dokładnie odmierzone porcje jednej próbki są dodawane o szeregu rozcieńczeń innej próbki już po wygenerowaniu tego szeregu. Przedstawione tu systemy zapewniają stabilne dwukrotne rozcieńczenie próbki dla fazy wodnej o różnych składzie (np. czysta woda lub pożywka bakteryjna), pod warunkiem że skład jest niezmienny w szeregu rozcieńczeń próbki. Dwukrotny stosunek rozcieńczeń jest stabilny dla różnych rozmiarów pułapki odmierzającej, ponieważ wszystkie krople odmierzone w protokole rozcieńczenia są odmierzone w tej samej pułapce odmierzającej. Otrzymane przy użyciu omawianych systemów precyzja i dokładność rozcieńczenia do tej pory nie były osiągalne dla tak małych objętości próbek poza mikroprzepływami jednofazowymi<sup>210</sup>.

Krople otrzymane w kolejnych rundach rozcieńczeń mają około 1  $\mu\text{l}$  objętości. Otrzymane krople mogą być łatwo usunięte z systemów mikroprzepływowych i być wysłane do innych układów mikroprzepływowych w celu dalszych manipulacji tymi kroplami lub analizą tych kropeł. Krople z szeregami rozcieńczeń mogą być wykorzystane np. w ddPCR<sup>71,72</sup> lub w oznaczeniach odporności na antybiotyki<sup>88</sup>. Krople mogą być także emulsyfikowane w celu uzyskania bibliotek kropeł o różnym stężeniu<sup>44,162</sup>. Systemy tu opisane mogą być także wykorzystane w innych oznaczeniach biochemicznych, wymagających precyzji i dokładności w przygotowaniu kolejnych stężeń próbki.

### 5.2. Pasywna emulsyfikacja szeregu kropeł

Opisane zostały geometrie układów mikroprzepływowych, umożliwiające pasywne generowanie emulsji kropeł przy wykorzystaniu tylko jednego źródła ciśnienia i gwarantujące emulsyfikację całych kropeł próbki, bez objętości martwych zatrzymanych przed modułem do emulsyfikacji. Pokazano także generację emulsji monodispersyjnych kropeł bez dodatkowych źródeł ciśnienia dedykowanych do oczyszczania geometrii do

emulsyfikacji z gromadzących się kropeł emulsji i bez wykorzystania grawitacji – do oczyszczania geometrii do emulsyfikacji wykorzystano specjalnie zaprojektowane do tego kanały przekierowujące olej w sposób pasywny. Pokazano modularny charakter tych geometrii i zintegrowano je z prostym szeregowym rozcieńczalnikiem mikroprzepływowym. Przygotowano szereg rozcieńczeń w kroplach, a następnie zemulsyfikowano te krople – dokonano tego przy użyciu zaledwie dwóch pomp strzykawkowych zadających stale płyny z niezmienną prędkością przepływu<sup>211</sup>.

Opisane tu geometrie mogą być interesujące dla osób chcących zredukować liczbę pomp strzykawkowych w swoich systemach mikroprzepływowych lub dla osób wykorzystujących mało precyzyjne pompy strzykawkowe, ponieważ objętość kropeł generowanych w omawianych geometriach w małym stopniu zależy od prędkości przepływu. Pasywna generacja szeregu emulsji o zróżnicowanym pomiędzy emulsjami składzie chemicznym kropeł może zostać wykorzystane w analizie opartej o schematy cyfrowe, np. w tzw. cyfrowej biologii. Usprawnienie geometrii pod kątem emulsyfikacji próbek o niskim napięciu powierzchniowym i wysokiej lepkości umożliwiłoby wykorzystanie tych geometrii do cyfrowych oznaczeń DNA, tj. w ddPCR.

Zaprezentowano także dwudyszową geometrię do emulsyfikacji przy użyciu MSE. Geometria dwudyszowa pozwoliła na szybszą generację mniejszych kropeł niż geometria jednodyszowa. Dzięki wykorzystaniu dwóch dysz, oddziaływania związane z przepływem fazy ciągłej w gutterach były symetryczne w obu dyszach, co pozwoliło na uzyskanie dobrej monodispersji emulsji. Dzięki ewakuacji nowych kropeł emulsji z otoczenia dysz przy pomocy siły wyporu, możliwe było uzyskanie wysoce upakowanych emulsji.

Opisano także 8-dyszowe i 12-dyszowe geometrie do pasywnej emulsyfikacji szeregu dużych kropeł. Wykorzystanie wielu dysz uwypukliło wpływ przepływu fazy ciągłej przez guttery na emulsyfikację przy pomocy MSE. Zastosowanie bypassów lub szerokich dysz osłabiło ten wpływ, umożliwiając otrzymanie bardziej monodispersyjnych emulsji. Zarejestrowano także po raz pierwszy bezpośrednio przepływ wsteczny, pojawiający się na skutek spadku ciśnienia w dyszy podczas odrywania się kropli w MSE. Zaprezentowano geometrię, redukującą blokowanie kropeł przy dyszach przez przepływ wsteczny i w ten sposób uzyskano lepszą jakość generowanych emulsji. Układy

wielodyszowe generowały krople pożywki przy wysokim stężeniu surfaktantu w fazie ciągłej z akceptowalną monodispersją 10 do 25 razy szybciej niż geometria dwudyszowa (w zależności od pożądanego rozmiarów kropeł emulsji – dla kropeł o objętości 600 pL było to 10 razy szybciej, zaś dla kropeł o objętości 1800 pL – 25 razy szybciej), wykorzystana w opisanych w niniejszej rozprawie eksperymentach związanych z odpornością na antybiotyki pojedynczych komórek. Wykorzystanie takiej udoskonalonej przepustowości w dalszych badaniach biologicznych nasuwa się samo.

### **5.3. Separacja emulsji, ich inkubacja i detekcja wzrostu bakterii**

W niniejszej rozprawie opisano system produkujący szereg emulsji oddzielonych od siebie niemieszającą się fazą płynu i tworzących szereg cystern mikroprzepływowych. Ruch cystern jest łatwo kontrolowany przez pompy strzykawkowe, zaś emulsje w cysternach są stabilne mimo podwyższonej temperatury i mnożenia się bakterii w kroplach emulsji. Zakażenie kroplami pomiędzy cysternami jest na bardzo małym poziomie i odbywa się tylko podczas transportu emulsji z układu generującego emulsje do przewodu, w którym inkubowane są cysterny. Przewód można swobodnie odłączać od układu i inkubować jedynie ten przewód bez konieczności inkubowania całego układu mikroprzepływowego z cysternami. Wygenerowano do 16 cystern po ok. 1900 kropeł, zatem można było zapewnić 1900 powtórzeń w 16 różnych warunkach reakcji podczas jednego eksperymentu.

Opracowana metoda pozwala na wykonywanie różnych eksperymentów z zakresu biologii czy chemii. Ogólnie, metoda umożliwi prowadzenie kilkunastu różnych reakcji w tysiącach powtórzeń, co otwiera drogę do wielu nowych eksperymentów. Zwiększenie przepustowości generowania emulsji, np. przy wykorzystaniu opisanych w niniejszej rozprawie wielodyszowych geometrii do emulsyfikacji, pozwoli na badanie kilkudziesięciu cystern mikroprzepływowych zawierających po kilka tysięcy kropeł – np. wykorzystanie 50 cystern po 2000 kropeł umożliwi badanie ok. 10 000 pojedynczych komórek w pojedynczym eksperymencie. Zwiększenie przepustowości umożliwi także badanie np. wpływu kombinacji antybiotyków na wzrost pojedynczych komórek – przy niskiej przepustowości metody takie badania będą nadal wymagały dużego nakładu pracy, jednak przy przepustowościach opisanych dla np. 12-dyszowej geometrii opisywana w niniejszej rozprawie metoda może stać się rutynowa dla



wysokoprzepustowych oznaczeń odporności pojedynczych komórek na koktajle antybiotyków.

#### **5.4. Badanie wpływu antybiotyku na bakterie przy użyciu opracowanego systemu**

Wykorzystując opracowaną i opisaną w tej rozprawie metodę generacji cystern mikroprzepływowych, zbadano poziom odporności na antybiotyki przez wygenerowanie 10 cystern po 1900 kropeł każda. Każda cysterna zawierała krople emulsji o tym samym początkowym stężeniu bakterii i zmiennym stężeniu badanego antybiotyku. Przeprowadzono pomiary dla pięciu różnych początkowych stężeń bakterii, włącznie z badaniem stężeń, które pozwoliły na uzyskanie kropeł zawierających dokładnie jedną komórkę bakteryjną. Opisana tu metoda pozwala na testowanie odporności na antybiotyki na poziomie pojedynczych izolowanych od siebie nawzajem komórek w setkach powtórzeń w szeregu stężeń antybiotyku podczas jednego eksperymentu. Zwiększenie liczby kropeł w pojedynczej cysternie nie powinno być trudne, wymagałoby jedynie korekty geometrii układu do generacji cystern, aby generować mniejsze krople z tej samej objętości próbki, lub zmiany początkowej objętości próbki i zwiększenie komory zbierającej generowane emulsje przed podziałem na cysterny. Przedstawiona tu metoda pozwala na oznaczanie odporności pojedynczych izolowanych komórek na antybiotyki (oznaczanie scMIC) z dużo większą efektywnością niż przy użyciu dotąd przedstawionych w literaturze metod, a także na ilościowe oznaczanie efektu inoculum, do tej pory badane przy użyciu płytek wielodołkowych z ograniczoną przepustowością. Metoda może być niemal natychmiast wykorzystana do ilościowego oznaczania zmienności fenotypowej populacji, do badania interakcji antybiotyków na poziomie pojedynczych komórek czy badania wpływu efektu inoculum na te interakcje. Takie badania mogłyby zaowocować bardzo interesującymi informacjami na temat zmienności poziomu odporności na koktajle antybiotyków o różnych drogach działania, na temat nabywania odporności przez bakterie, czy na temat efektu inoculum. Ciekawym kierunkiem badań przy użyciu opisanej tu metody byłaby agregacja bakterii i ich wzrost w postaci filamentów, np. czy obserwowane zachowanie zależy od początkowego stężenia bakterii i czy to zachowanie to agregacja, wzrost w postaci filamentów, czy obydwie te zjawiska jednocześnie.

Wydaje się istotne, by ustalić, czy pokazane w niniejszej rozprawie zróżnicowanie odporności na antybiotyki w populacji bakterii jest spowodowane zmiennością fenotypową czy zróżnicowaniem liczby kopii plazmidu kodującego gen beta-laktamazy. Niektóre plazmidy charakteryzują się tym, że w komórce znajduje się dokładnie jedna kopia takiego plazmidu – być może wykorzystanie takiego plazmidu pozwoliłoby ustalić, który z mechanizmów jest przyczyną zróżnicowanej odporności na antybiotyki w badanych populacjach bakterii, tj. wykluczyć możliwość rozkładu liczby plazmidów przypadających na jedną komórkę w populacji. Innym eksperymentem, który można by wykonać, jest wykorzystanie niskiego stężenia antybiotyku chloramfenikolu w pożywce bakteryjnej przy badaniu cefotaksymu. Niskie stężenie chloramfenikolu powoduje zwiększenie liczby kopii plazmidu pBR322, który w wykonanych tu eksperymentach koduje beta-laktamazę TEM-20, odpowiedzialną za odporność na cefotaksym w przeprowadzonych badaniach. Chloramfenikol hamuje syntezę nowych białek, jednak plazmidy wymagają do replikacji białek, które są obecne w komórce cały czas, zatem plazmidy mogą się replikować w obecności chloramfenikolu. Być może na poziomie pojedynczych komórek taki eksperyment nic by nie wykazał: pojedyncza komórka ze zwiększoną odpornością na cefotaksym (przez zwiększoną liczbę plazmidów z genem beta-laktamazy) i tak nie może się podzielić ze względu na obecność chloramfenikolu. Być może taki eksperyment byłby wartościowy dla populacji składających się z kilku bakterii, o ile występuje rozkład odporności na chloramfenikol: jedna bakteria nie może się dzielić ze względu na chloramfenikol, ale w zamian produkuje więcej beta-laktamazy, która rozkłada cefotaksym i przez to umożliwia wzrost pozostałym bakteriom w populacji. Jeszcze innym eksperymentem, który prawdopodobnie przyniósłby odpowiedź na pytanie o przyczynę zróżnicowanej odporności na antybiotyki w populacji, jest sekwencjonowanie RNA na poziomie pojedynczych komórek<sup>139,140</sup> w celu ustalenia poziomu ekspresji białek.

Proponowane powyżej eksperymenty z udziałem dwóch antybiotyków i zmiennego stężenia początkowego bakterii można rozszerzyć na inne grupy antybiotyków lub inne rodzaje czy szczepy bakterii. Bardzo ciekawa wydaje się możliwość obserwacji, czy rodzaj i intensywność interakcji między antybiotykami zależy od liczebności populacji bakterii, wraz z populacjami składającymi się z pojedynczej komórki. Ciekawe byłoby tu wykorzystanie antybiotyków, które powodują efekt inoculum i tych, które tego efekty nie powodują.

Bardzo interesujące byłoby sprawdzenie, czy zaobserwowane tu zróżnicowanie odporności w populacji jest w istocie rozkładem poziomów odporności, przypominającym np. rozkład normalny. Bardzo prostym eksperymentem byłoby wykorzystanie kropeł z pojedynczymi komórkami w wielu stężeniach antybiotyku skupionych wokół wartości scMIC. Gdyby wynikiem był rozkład odporności, padłyby pytania o przyczynę (o czym mowa wyżej: zmienność fenotypowa czy rozkład liczby kopii plazmidów) i o potencjalne zmiany kształtów tych rozkładów po dodaniu innych antybiotyków lub adjuwantów, co mogłoby przynieść wiele odpowiedzi na temat mechanizmów odporności na antybiotyki w przypadku obecności tylko pojedynczej bakterii.

Ciekawym pytaniem, na które można by odpowiedzieć w powiązaniu z opisanymi w tej rozprawie badaniami, jest to czy bakterie, które rozmnażają się mimo obecności antybiotyku, mogą się rozmnażać dzięki temu, że zdegradowały cały obecny w kropli antybiotyk i dopiero po tej degradacji nastąpił pierwszy podział komórkowy. Ten kierunek badań wydaje się bardzo ciekawy, ponieważ pomógłby ustalić faktyczny mechanizm wpływu antybiotyku na pojedynczą komórkę – zaś metoda opisana tutaj i wyniki dzięki niej uzyskane mają charakter badania przesiewowego, bez wnikania w mechanizmy biologiczne. W opisywanych tutaj cysternach mikroprzepływowych może zachodzić transport antybiotyków pomiędzy kroplami danej cysterny, co utrudnia proponowane tu badania. Być może skutecznym rozwiązaniem problemu transportu masy byłaby generacja kropeł z pojedynczymi komórkami, tak jak opisano tutaj, następnie sortowanie wysokoprzepustowe kropeł jeszcze przed inkubacją, tak, aby otrzymać populację kropeł zawierających tylko i wyłącznie pojedynczą komórkę bakterii. Następnie z takiej populacji można by odizolować od siebie pojedyncze krople, np. nadrukowując je w dużej odległości od siebie na płytce<sup>128</sup>. Alternatywnie można by wygenerować cysterny tak jak opisano tutaj, jednak przy użyciu nanocząstek amfifilowych do stabilizowania emulsji, co ograniczyłoby transport masy między kroplami<sup>29</sup>. Inną możliwością jest hodowanie pojedynczych komórek przez krótki czas i po tym czasie dodanie do kropeł kolejnych bakterii, tym razem nieodpornych na antybiotyk: jeżeli antybiotyk byłby rozłożony w całości, te nowe bakterie mogłyby się rozmnażać, w przeciwnym razie nie zaszłyby wzrost. Proponowane rozwiązanie z dodawaniem bakterii do już wygenerowanych kropeł ociera się o chemostat oparty na cysternach mikroprzepływowych, tj. o urządzenie, w którym można utrzymywać takie

same warunki reakcji przez długi czas np. przez odbiór części zużytej pożywki i dodanie porcji świeżej pożywki<sup>24</sup>. Chemostat kropelkowy oparty o emulsje dałby możliwość udzielenia odpowiedzi na pytania o ewolucję odporności na antybiotyki na poziomie pojedynczych bakterii. Na razie pozostaje to fascynującym możliwym kierunkiem badań, które przyniosłyby odpowiedzi na pytania o mechanizmy odporności pojedynczych komórek na antybiotyki.

Można także pokusić się o pytanie, czy wartość scMIC jest zależna od objętości kropeł, w których hodowane są bakterie. Gdyby wartość scMIC rosła wraz z objętością kropeł, można byłoby wyznaczyć parametr scMIA zamiast scMIC, przy czym scMIA oznaczałoby „single cell minimum inhibitory amount”, czyli liczbę cząstek antybiotyku hamująca wzrost bakterii (zamiast stężenia antybiotyku, scMIC). Gdyby wartość scMIC nie zmieniała się wraz ze zmianą objętości kropeł, byłoby to ułatwienie techniczne dla opisywanej metody, ponieważ monodispersyjność uzyskiwanych emulsji nie byłaby kluczowa dla wyniku badania – wartość scMIC byłaby identyczna w mniejszych i większych kroplach. Autor niniejszej rozprawy skłania się ku wersji, w której wartość scMIC zmienia się wraz z objętością kropeł zbliżoną do rozmiarów bakterii, tj. femtolitrów, zaś w większych kroplach (setki pikolitrów – nanolitry) scMIC nie zmienia się wraz z objętością kropeł. W większych kroplach w tym samym stężeniu antybiotyku znajduje się więcej cząstek antybiotyku niż mniejszych i być może bakteria nie jest narażona na działanie wszystkich cząstek antybiotyku w okresie przed podziałem bakteryjnym – wtedy zmiana liczby cząstek antybiotyku w próbce powyżej pewnej krytycznej wartości nie grałaby roli. Pozostaje to jednak na razie w sferze spekulacji i oferuje bardzo ciekawy kierunek badań na przyszłość. Krople o różnych rozmiarach pomiędzy setkami pikolitrów a nanolitrami są łatwe do generacji przy wykorzystaniu opisanych tu geometrii do emulsyfikacji MSE. Krople mniejsze, o rozmiarze pojedynczych pikolitrów, są raczej niemożliwe do uzyskania w geometriach tego rodzaju ze względu na ograniczone możliwości frezowania (nie można otrzymać odpowiednio małych geometrii kanałów), jednak można wykorzystać do takich badań inne systemy generacji kropeł i odczytu wzrostu bakterii<sup>132,145,212</sup>.

Istnieje także możliwość wykorzystania cystem mikroprzepływowych do prowadzenia badań nad formowaniem się agregatów bakteryjnych w kroplach pod wpływem antybiotyków. Takie badania mogłyby przynieść odpowiedzi na pytania, czy agregacja

zwiększa odporność bakterii na antybiotyki (podobnie jak w biofilmach) lub czy dynamika agregacji jest inna w zależności od użytych stężeń antybiotyków (a na to wygląda w przeprowadzonych przez nas eksperymentach) czy użytych stężeń początkowych bakterii.

## 5.5. Wnioski końcowe

W niniejszej rozprawie doktorskiej opisałem moduły mikroprzepływowe, z których każdy z osobna może być wykorzystany do prowadzenia badań z zakresu np. biologii czy chemii analitycznej i które stanowią wartość dodaną do dziedziny mikroprzepływów: szeregowy rozcieńczalnik oparty na kroplach, który cechuje się nieosiągalną do tej pory dla tak małych objętości precyzją i dokładnością oznaczeń; geometrie modułów do pasywnej emulsyfikacji, także wysokoprzepustowej, która umożliwia emulsyfikację szeregu próbek bez objętości martwych, tak w układzie zorientowanym poziomo (z bypassami), jak i pionowo, w dodatku z możliwością integracji z innymi modułami mikroprzepływowymi; metoda separacji emulsji w szeregu bez usuwania ich z układu mikroprzepływowego i identyfikacji warunków reakcji w emulsji dzięki znajomości kolejności generowania emulsji. Integracja niektórych z tych modułów umożliwiła opracowanie metody wysokoprzepustowego oznaczania parametru scMIC, tj. odporności na antybiotyki na poziomie pojedynczych komórek, z przepustowością znacznie wyższą niż uzyskiwana w oznaczeniach klasycznymi metodami przy użyciu płytek wielodołkowych.

Badania nad emulsyfikacją, które tu opisałem, umożliwiają lepszy wgląd w mechanizm wymuszonej geometrii kanału emulsyfikacji dużych kropeł, zaś opracowane przeze mnie metody eksperymentalne oferują szerokie spektrum możliwości badawczych dla każdego, kto zechce z tych metod skorzystać.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 ECDC/EMA, *The bacterial challenge : time to react*, 2009.
- 2 J. O'Neill, *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report And Recommendations*, 2016.
- 3 T. Frieden, *Antibiotic resistance threats in the United States*, 2013.
- 4 ECDC, *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).*, Stockholm, 2017.
- 5 C. L. Ventola, The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats., *Pharm. Ther.*, 2015, **40**, 277–283.
- 6 K. P. Smith and J. E. Kirby, The Inoculum Effect in the Era of Multidrug Resistance: Minor Differences in Inoculum Have Dramatic Effect on MIC Determination, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2018, **62**, e00433-18.
- 7 E. Bingen, N. Lambert-Zechovsky, P. Mariani-Kurkdjian, C. Doit, Y. Aujard, F. Fournerie and H. Mathieu, Bacterial counts in cerebrospinal fluid of children with meningitis, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1990, **9**, 278–281.
- 8 K. P. Smith and J. E. Kirby, Verification of an Automated, Digital Dispensing Platform for At-Will Broth Microdilution-Based Antimicrobial Susceptibility Testing, *J. Clin. Microbiol.*, 2016, **54**, 2288–2293.
- 9 T. Artemova, Y. Gerardin, C. Dudley, N. M. Vega and J. Gore, Isolated cell behavior drives the evolution of antibiotic resistance., *Mol. Syst. Biol.*, 2015, **11**, 822.
- 10 E. Wistrand-Yuen, M. Knopp, K. Hjort, S. Koskiniemi, O. G. Berg and D. I. Andersson, Evolution of high-level resistance during low-level antibiotic exposure, *Nat. Commun.*, 2018, **9**, 1599.
- 11 A. Manz, D. J. Harrison, E. M. J. Verpoorte, J. C. Fettinger, A. Paulus, H. Lüdi and H. M. Widmer, Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems, *J. Chromatogr. A*, 1992, **593**, 253–258.
- 12 E. K. Sackmann, A. L. Fulton and D. J. Beebe, The present and future role of



- microfluidics in biomedical research., *Nature*, 2014, **507**, 181–9.
- 13 D. J. Beebe, G. A. Mensing and G. M. Walker, Physics and Applications of Microfluidics in Biology, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2002, **4**, 261–286.
- 14 T. S. Kaminski and P. Garstecki, Controlled droplet microfluidic systems for multistep chemical and biological assays, *Chem. Soc. Rev.*, 2017, **46**, 6210–6226.
- 15 G. M. Whitesides, The origins and the future of microfluidics., *Nature*, 2006, **442**, 368–73.
- 16 T. M. Squires and S. R. Quake, Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale, *Rev. Mod. Phys.*, 2005, **77**, 977–1026.
- 17 Y. Xia and G. M. Whitesides, Soft lithography, *Annu. Rev. Mater. Sci.*, 1998, **28**, 153–184.
- 18 M. A. Unger, H.-P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer and S. R. Quake, Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography, *Science (80-. )*, 2000, **288**, 113–116.
- 19 N. L. Jeon, S. K. W. Dertinger, D. T. Chiu, I. S. Choi, A. D. Stroock and G. Whitesides, M.Generation of Solution and Surface Gradients using Microfluidic Systems, *Langmuir*, 2000, **16**, 8311–8316.
- 20 H. Song, M. R. Bringer, J. D. Tice, C. J. Gerdtts and R. F. Ismagilov, Experimental test of scaling of mixing by chaotic advection in droplets moving through microfluidic channels, *Appl. Phys. Lett.*, 2003, **83**, 4664–4666.
- 21 M. R. Bringer, C. J. Gerdtts, H. Song, J. D. Tice and R. F. Ismagilov, Microfluidic systems for chemical kinetics that rely on chaotic mixing in droplets, *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. A Math. Phys. Eng. Sci.*, 2004, **362**, 1087–1104.
- 22 H. Song, D. L. Chen and R. F. Ismagilov, Reactions in droplets in microfluidic channels, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2006, **45**, 7336–7356.
- 23 J.-C. Baret, Surfactants in droplet-based microfluidics, *Lab Chip*, 2012, **12**, 422–433.
- 24 S. Jakiela, T. S. Kaminski, O. Cybulski, D. B. Weibel and P. Garstecki, Bacterial growth and adaptation in microdroplet chemostats, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2013, **52**, 8908–8911.

- 25 M. Horka, S. Sun, A. Ruszczak, P. Garstecki and T. Mayr, Lifetime of Phosphorescence from Nanoparticles Yields Accurate Measurement of Concentration of Oxygen in Microdroplets, Allowing One To Monitor the Metabolism of Bacteria, *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 12006–12012.
- 26 T. Szymborski, P. Jankowski, D. Ogończyk and P. Garstecki, An FEP Microfluidic Reactor for Photochemical Reactions, *Micromachines*, 2018, **9**, 156.
- 27 O. Cybulski, S. Jakiela and P. Garstecki, Whole Teflon valves for handling droplets, *Lab Chip*, 2016, **16**, 2198–2210.
- 28 Y. Chevalier and M.-A. Bolzinger, Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, 2013, **439**, 23–34.
- 29 M. Pan, L. Rosenfeld, M. Kim, M. Xu, E. Lin, R. Derda and S. K. Y. Tang, Fluorinated pickering emulsions impede interfacial transport and form rigid interface for the growth of anchorage-dependent cells, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, **6**, 21446–21453.
- 30 L. E. Nielsen, R. Wall and G. Adams, Coalescence of liquid drops at oil-water interfaces, *J. Colloid Sci.*, 1958, **13**, 441–458.
- 31 E. S. Basheva, T. D. Gurkov, I. B. Ivanov, G. B. Bantchev, B. Campbell and R. P. Borwankar, Size Dependence of the Stability of Emulsion Drops Pressed against a Large Interface, *Langmuir*, 1999, **15**, 6764–6769.
- 32 J.-C. Baret, Surfactants in droplet-based microfluidics, *Lab Chip*, 2012, **12**, 422–433.
- 33 P. Gruner, B. Riechers, B. Semin, J. Lim, A. Johnston, K. Short and J. C. Baret, Controlling molecular transport in minimal emulsions, *Nat. Commun.*, 2016, **7**, 10392.
- 34 G. Etienne, A. Vian, M. Biočanin, B. Deplancke and E. Amstad, Cross-talk between emulsion drops: how are hydrophilic reagents transported across oil phases?, *Lab Chip*, 2018, **18**, 3903–3912.
- 35 C. Holtze, A. C. Rowat, J. J. Agresti, J. B. Hutchison, F. E. Angile, C. H. J. Schmitz, S. Koster, H. Duan, K. J. Humphry, R. A. Scanga, J. S. Johnson, D. Pisignano, D. a Weitz, F. E. Angilè, C. H. J. Schmitz, S. Köster, H. Duan, K. J. Humphry, R. A.

- Scanga, J. S. Johnson, D. Pisignano and D. A. Weitz, Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions, *Lab Chip*, 2008, **8**, 1632–1639.
- 36 T. Thorsen, R. W. Roberts, F. H. Arnold and S. R. Quake, Dynamic Pattern Formation in a Vesicle-Generating Microfluidic Device, *Phys. Rev. Lett.*, 2001, **86**, 4163–4166.
- 37 P. Garstecki, M. J. Fuerstman, H. a Stone and G. M. Whitesides, Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction-scaling and mechanism of break-up., *Lab Chip*, 2006, **6**, 437–446.
- 38 P. Zhu and L. Wang, Passive and active droplet generation with microfluidics: a review, *Lab Chip*, 2017, **17**, 34–75.
- 39 M. Zagnoni, J. Anderson and J. M. Cooper, Hysteresis in Multiphase Microfluidics at a T-Junction, *Langmuir*, 2010, **26**, 9416–9422.
- 40 A. C. Hatch, J. S. Fisher, S. L. Pentoney, D. L. Yang and A. P. Lee, Tunable 3D droplet self-assembly for ultra-high-density digital micro-reactor arrays., *Lab Chip*, 2011, **11**, 2509–2517.
- 41 A. R. Abate and D. A. Weitz, Faster multiple emulsification with drop splitting, *Lab Chip*, 2011, **11**, 1911.
- 42 A. B. Theberge, E. Mayot, A. El Harrak, F. Kleinschmidt, W. T. S. Huck and A. D. Griffiths, Microfluidic platform for combinatorial synthesis in picolitre droplets, *Lab Chip*, 2012, **12**, 1320–1326.
- 43 A. R. Abate, T. Hung, R. A. Sperling, P. Mary, A. Rotem, J. J. Agresti, M. A. Weiner and D. A. Weitz, DNA sequence analysis with droplet-based microfluidics., *Lab Chip*, 2013, **13**, 4864–9.
- 44 T. S. Kaminski, S. Jakiela, M. A. Czekalska, W. Postek and P. Garstecki, Automated generation of libraries of nL droplets, *Lab Chip*, 2012, **12**, 3995.
- 45 H. Lee, C.-H. Choi, A. Abbaspourrad, C. Wesner, M. Caggioni, T. Zhu, S. Nawar and D. A. Weitz, Fluorocarbon Oil Reinforced Triple Emulsion Drops, *Adv. Mater.*, 2016, **28**, 8425–8430.
- 46 C.-X. Zhao, D. Chen, Y. Hui, D. A. Weitz and A. P. J. Middelberg, Controlled Generation of Ultrathin-Shell Double Emulsions and Studies on Their Stability, *ChemPhysChem*, 2017, **18**, 1393–1399.

- 47 T. Kawakatsu, Y. Kikuchi and M. Nakajima, Regular-sized cell creation in microchannel emulsification by visual microprocessing method, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1997, **74**, 317–321.
- 48 S. M. Joscelyne and G. Trägårdh, Membrane emulsification — a literature review, *J. Memb. Sci.*, 2000, **169**, 107–117.
- 49 R. Dangla, E. Fradet, Y. Lopez and C. N. Baroud, The physical mechanisms of step emulsification, *J. Phys. D. Appl. Phys.*, 2013, **46**, 114003.
- 50 N. Mittal, C. Cohen, J. Bibette and N. Bremond, Dynamics of step-emulsification: From a single to a collection of emulsion droplet generators, *Phys. Fluids*, 2014, **26**, 082109.
- 51 S. L. Sullivan, B. W. Hardy and C. D. Holland, Formation of air bubbles at orifices submerged beneath liquids, *AIChE J.*, 1964, **10**, 848–854.
- 52 H. Tsuge and S.-I. Hibino, Bubble formation from a submerged single orifice accompanied by pressure fluctuations in gas chamber, *J. Chem. Eng. Japan*, 1978, **11**, 173–178.
- 53 S. Sugiura, M. Nakajima and M. Seki, Prediction of droplet diameter for microchannel emulsification, *Langmuir*, 2002, **18**, 3854–3859.
- 54 Z. Li, A. M. Leshansky, L. M. Pismen and P. Tabeling, Step-emulsification in a microfluidic device, *Lab Chip*, 2015, **15**, 1023–1031.
- 55 E. Amstad, M. Chemama, M. Eggersdorfer, L. R. Arriaga, M. P. Brenner and D. A. Weitz, Robust scalable high throughput production of monodisperse drops, *Lab Chip*, 2016, **16**, 4163–4172.
- 56 A. Pit, M. Duits and F. Mugele, Droplet Manipulations in Two Phase Flow Microfluidics, *Micromachines*, 2015, **6**, 1768–1793.
- 57 E. Stolovicki, R. Ziblat and D. A. Weitz, Throughput enhancement of parallel step emulsifier devices by shear-free and efficient nozzle clearance, *Lab Chip*, 2017, **18**, 132–138.
- 58 A. Ofner, D. G. Moore, P. A. Rühs, P. Schwendimann, M. Eggersdorfer, E. Amstad, D. A. Weitz and A. R. Studart, High-Throughput Step Emulsification for the Production of Functional Materials Using a Glass Microfluidic Device, *Macromol. Chem. Phys.*, 2017, **218**, 1600472.

- 59 R. Dangla, S. C. Kayi and C. N. Baroud, Droplet microfluidics driven by gradients of confinement, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013, **110**, 853–858.
- 60 F. Schuler, N. Paust, R. Zengerle and F. von Stetten, Centrifugal Step Emulsification can Produce Water in Oil Emulsions with Extremely High Internal Volume Fractions, *Micromachines*, 2015, **6**, 1180–1188.
- 61 S. Kahkeshani and D. Di Carlo, Drop formation using ferrofluids driven magnetically in a step emulsification device, *Lab Chip*, 2016, **16**, 2474–2480.
- 62 Y. Xia and G. M. Whitesides, SOFT LITHOGRAPHY, *Annu. Rev. Mater. Sci.*, 1998, **28**, 153–184.
- 63 E. Palacios, L. E. Ocola, A. Joshi-Imre, S. Bauerdick, M. Berse and L. Peto, Three-dimensional microfluidic mixers using ion beam lithography and micromachining, *J. Vac. Sci. Technol. B, Nanotechnol. Microelectron. Mater. Process. Meas. Phenom.*, 2010, **28**, C6I1-C6I6.
- 64 P. Mali, A. Sarkar and R. Lal, Facile fabrication of microfluidic systems using electron beam lithography, *Lab Chip*, 2006, **6**, 310.
- 65 D. J. Guckenberger, T. E. de Groot, A. M. D. Wan, D. J. Beebe and E. W. K. Young, Micromilling: a method for ultra-rapid prototyping of plastic microfluidic devices, *Lab Chip*, 2015, **15**, 2364–2378.
- 66 C. Cramer, P. Fischer and E. J. Windhab, Drop formation in a co-flowing ambient fluid, *Chem. Eng. Sci.*, 2004, **59**, 3045–3058.
- 67 P. M. Korczyk, V. van Steijn, S. Blonski, D. Zaremba, D. A. Beattie and P. Garstecki, Accounting for corner flow unifies the understanding of droplet formation in microfluidic channels, *Nat. Commun.*, 2019, **10**, 2528.
- 68 I. Wiegand, K. Hilpert and R. E. W. Hancock, Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances., *Nat. Protoc.*, 2008, **3**, 163–75.
- 69 F. Gielen, T. Buryska, L. Van Vliet, M. Butz, J. Damborsky, Z. Prokop and F. Hollfelder, Interfacing microwells with nanoliter compartments: A sampler generating high-resolution concentration gradients for quantitative biochemical analyses in droplets, *Anal. Chem.*, 2015, **87**, 624–632.
- 70 S. Jambovane, E. C. Duin, S. K. Kim and W. H. Jong, Determination of kinetic

- parameters,  $K_m$  and  $k_{cat}$ , with a single experiment on a chip, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 3239–3245.
- 71 P. R. Debski and P. Garstecki, Designing and interpretation of digital assays: Concentration of target in the sample and in the source of sample, *Biomol. Detect. Quantif.*, 2016, **10**, 24–30.
- 72 P. R. Debski, K. Gewartowski, M. Sulima, T. S. Kaminski and P. Garstecki, Rational design of digital assays., *Anal. Chem.*, 2015, **16**, 8203–8209.
- 73 J. E. Dowd and D. S. Riggs, A comparison of estimates of Michaelis-Menten kinetics constants from various linear transformations, *J. Biol. Chem.*, 1965, **240**, 863–869.
- 74 X. Wang, Z. Liu and Y. Pang, Concentration gradient generation methods based on microfluidic systems, *RSC Adv.*, 2017, **7**, 29966–29984.
- 75 B. M. Paegel, W. H. Grover, A. M. Skelley, R. A. Mathies and G. F. Joyce, Microfluidic serial dilution circuit, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 7522–7527.
- 76 S. Ahrar, M. Hwang, P. N. Duncan and E. E. Hui, Microfluidic serial dilution ladder, *Analyst*, 2014, **139**, 187–190.
- 77 M. J. Fuerstman, P. Garstecki and G. M. Whitesides, Coding/Decoding and Reversibility of Droplet Trains in Microfluidic Networks, *Science (80-. )*, 2007, **315**, 828–832.
- 78 O. J. Miller, A. El, T. Mangeat, J. Baret, L. Frenz, B. El, E. Mayot, M. L. Samuels, E. K. Rooney, P. Dieu, M. Galvan, D. R. Link and A. D. Griffiths, High-resolution dose – response screening using droplet-based microfluidics, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2012, **109**, 378–83.
- 79 K. Churski, T. S. Kaminski, S. Jakiela, W. Kamysz, W. Baranska-Rybak, D. B. Weibel and P. Garstecki, Rapid screening of antibiotic toxicity in an automated microdroplet system, *Lab Chip*, 2012, **12**, 1629.
- 80 A. R. Abate, T. Hung, P. Mary, J. J. Agresti and D. A. Weitz, High-throughput injection with microfluidics using picoinjectors., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, **107**, 19163–19166.
- 81 X. Niu, F. Gielen, J. B. Edel and A. J. deMello, A microdroplet dilutor for high-throughput screening, *Nat. Chem.*, 2011, **3**, 437–442.

- 82 P. M. Korczyk, L. Derzsi, S. Jakiela and P. Garstecki, Microfluidic traps for hard-wired operations on droplets, *Lab Chip*, 2013, **13**, 4096–4102.
- 83 M. Sun, S. S. Bithi and S. A. Vanapalli, Microfluidic static droplet arrays with tuneable gradients in material composition, *Lab Chip*, 2012, **11**, 3949–3952.
- 84 M. G. Simon, R. Lin, J. S. Fisher and A. P. Lee, A Laplace pressure based microfluidic trap for passive droplet trapping and controlled release, *Biomicrofluidics*, 2012, **6**, 014110-014110–13.
- 85 X. Niu, S. Gulati, J. B. Edel and A. J. deMello, Pillar-induced droplet merging in microfluidic circuits., *Lab Chip*, 2008, **8**, 1837–1841.
- 86 H.-H. Jeong, B. Lee, S. H. Jin, S.-G. Jeong and C.-S. Lee, A highly addressable static droplet array enabling digital control of a single droplet at pico-volume resolution, *Lab Chip*, 2016, **16**, 1698–1707.
- 87 M. Sun and S. A. Vanapalli, Generation of chemical concentration gradients in mobile droplet arrays via fragmentation of long immiscible diluting plugs, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 2044–2048.
- 88 L. Derzsi, T. S. Kaminski and P. Garstecki, Antibioassays in five pipetting steps: precise dilution assays in sub microliter volumes with a conventional pipette, *Lab Chip*, 2016, **16**, 893–901.
- 89 M. A. Czekalska, T. S. Kaminski, K. Makuch and P. Garstecki, Passive and parallel microfluidic formation of droplet interface bilayers (DIBs) for measurement of leakage of small molecules through artificial phospholipid membranes, *Sensors Actuators B Chem.*, 2019, **286**, 258–265.
- 90 M. A. Czekalska, T. S. Kaminski, S. Jakiela, K. Tanuj Sapra, H. Bayley and P. Garstecki, A droplet microfluidic system for sequential generation of lipid bilayers and transmembrane electrical recordings, *Lab Chip*, 2015, **15**, 541–548.
- 91 H. C. Davison, M. E. J. Woolhouse and J. C. Low, What is antibiotic resistance and how can we measure it?, *Trends Microbiol.*, 2000, **8**, 554–559.
- 92 I. Yelin and R. Kishony, Antibiotic Resistance, *Cell*, 2018, **172**, 1136-1136.e1.
- 93 J. Davies and D. Davies, Origins and Evolution of Antibiotic Resistance, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2010, **74**, 417–433.



- 94 E. Toprak, A. Veres, S. Yildiz, J. M. Pedraza, R. Chait, J. Paulsson and R. Kishony, Building a morbidostat: an automated continuous-culture device for studying bacterial drug resistance under dynamically sustained drug inhibition, *Nat. Protoc.*, 2013, **8**, 555–567.
- 95 K. Poole, Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms, *Ann. Med.*, 2007, **39**, 162–176.
- 96 B. Jaurin and S. Normark, Insertion of IS2 creates a novel ampC promoter in *Escherichia coli*, *Cell*, 1983, **32**, 809–816.
- 97 M. L. M. Salverda, J. A. G. M. De Visser and M. Barlow, Natural evolution of TEM-1  $\beta$ -lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2010, **34**, 1015–1036.
- 98 K. Hiramatsu, L. Cui, M. Kuroda and T. Ito, The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Trends Microbiol.*, 2001, **9**, 486–493.
- 99 Y.-Y. Liu, Y. Wang, T. R. Walsh, L.-X. Yi, R. Zhang, J. Spencer, Y. Doi, G. Tian, B. Dong, X. Huang, L.-F. Yu, D. Gu, H. Ren, X. Chen, L. Lv, D. He, H. Zhou, Z. Liang, J.-H. Liu and J. Shen, Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study, *Lancet Infect. Dis.*, 2016, **16**, 161–168.
- 100 A. C. Palmer and R. Kishony, Opposing effects of target overexpression reveal drug mechanisms, *Nat. Commun.*, 2014, **5**, 4296.
- 101 M. Zampieri, T. Enke, V. Chubukov, V. Ricci, L. Piddock and U. Sauer, Metabolic constraints on the evolution of antibiotic resistance, *Mol. Syst. Biol.*, 2017, **13**, 917.
- 102 S. Ameyama, S. Onodera, M. Takahata, S. Minami, N. Maki, K. Endo, H. Goto, H. Suzuki and Y. Oishi, Mosaic-Like Structure of Penicillin-Binding Protein 2 Gene (*penA*) in Clinical Isolates of *Neisseria gonorrhoeae* with Reduced Susceptibility to Cefixime, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, **46**, 3744–3749.
- 103 L. M. Weigel, D. B. Clewell, S. R. Gill, N. C. Clark, L. K. McDougal, S. E. Flannagan, J. F. Kolonay, J. Shetty, G. E. Killgore and F. C. Tenover, Genetic Analysis of a High-Level Vancomycin-Resistant Isolate of *Staphylococcus aureus*, *Science (80-. )*, 2003, **302**, 1569–1571.
- 104 Y. Q. Liu, Y. Z. Zhang and P. J. Gao, Novel Concentration-Killing Curve Method

- for Estimation of Bactericidal Potency of Antibiotics in an In Vitro Dynamic Model, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, **48**, 3884–3891.
- 105 J. H. Jorgensen and M. J. Ferraro, Antimicrobial Susceptibility Testing: General Principles and Contemporary Practices, *Clin. Infect. Dis.*, 1998, **26**, 973–980.
- 106 P. J. Wu, K. Shannon and I. Phillips,  $\beta$ -Lactamases and susceptibility to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Escherichia coli*, *J. Antimicrob. Chemother.*, 1992, **30**, 868–870.
- 107 J. R. Lenhard and Z. P. Bulman, Inoculum effect of  $\beta$ -lactam antibiotics, *J. Antimicrob. Chemother.*, , DOI:10.1093/jac/dkz226.
- 108 E. J. Benner, J. V. Bennett, J. L. Brodie and W. M. M. Kirby, No Title Inactivation of Cephalothin and Cephaloridine by *Staphylococcus aureus*, *J. Bacteriol.*, 1965, **90**, 1599–1604.
- 109 L. D. Sabath, C. Garner, C. Wilcox and M. Finland, Effect of Inoculum and of Beta-Lactamase on the Anti-Staphylococcal Activity of Thirteen Penicillins and Cephalosporins, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1975, **8**, 344–349.
- 110 R. H. Eng, C. Cherubin, S. M. Smith and F. Buccini, Inoculum effect of beta-lactam antibiotics on Enterobacteriaceae., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1985, **28**, 601–606.
- 111 S. E. Luria, A Test for Penicillin Sensitivity and Resistance in *Staphylococcus*., *Exp. Biol. Med.*, 1946, **61**, 46–51.
- 112 R. H. Eng, S. M. Smith and C. Cherubin, Inoculum effect of new beta-lactam antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa*., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1984, **26**, 42–47.
- 113 I. Brook, Inoculum Effect, *Clin. Infect. Dis.*, 1989, **11**, 361–368.
- 114 C. Konig, Bacterial concentrations in pus and infected peritoneal fluid--implications for bactericidal activity of antibiotics, *J. Antimicrob. Chemother.*, 1998, **42**, 227–232.
- 115 D. Szabo, A. Mathe, Z. Filetoth, P. Anderlik, L. Rokusz and F. Rozgonyi, In Vitro and In Vivo Activities of Amikacin, Cefepime, Amikacin plus Cefepime, and Imipenem against an SHV-5 Extended-Spectrum -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strain, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, **45**, 1287–1291.

- 116 I. Morrissey and J. T. George, The effect of the inoculum size on bactericidal activity, *J. Antimicrob. Chemother.*, 1999, **43**, 423a – 424.
- 117 N. Cotroneo, R. Harris, N. Perlmutter, T. Beveridge and J. A. Silverman, Daptomycin Exerts Bactericidal Activity without Lysis of *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2008, **52**, 2223–2225.
- 118 F. Soriano, Optimal dosage of  $\beta$ -lactam antibiotics: time above the MIC and inoculum effect, *J. Antimicrob. Chemother.*, 1992, **30**, 567–569.
- 119 W. A. Craig, S. M. Bhavnani and P. G. Ambrose, The inoculum effect: Fact or artifact?, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2004, **50**, 229–230.
- 120 K. I. Udekwu, N. Parrish, P. Ankomah, F. Baquero and B. R. Levin, Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2009, **63**, 745–757.
- 121 C. Tan, R. P. Smith, J. K. Srimani, K. A. Riccione, S. Prasada, M. Kuehn and L. You, The inoculum effect and band-pass bacterial response to periodic antibiotic treatment, *Mol. Syst. Biol.*, 2012, **8**, 617.
- 122 M. T. Duraisingh, P. Jones, I. Sambou and L. Von Seidlein, Inoculum effect leads to overestimation of in vitro resistance for artemisinin derivatives and standard antimalarials: a Gambian field study, *Parasitology*, 1999, **119**, 435–440.
- 123 F. Soriano, C. Ponte, M. Santamaria and M. Jimenez-Arriero, Relevance of the inoculum effect of antibiotics in the outcome of experimental infections caused by *Escherichia coli*, *J. Antimicrob. Chemother.*, 1990, **25**, 621–627.
- 124 J. L. Martinez and F. Baquero, Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000, **44**, 1771–1777.
- 125 T. S. Kaminski, O. Scheler and P. Garstecki, Droplet microfluidics for microbiology: techniques, applications and challenges, *Lab Chip*, 2016, **16**, 2168–2187.
- 126 O. Scheler, W. Postek and P. Garstecki, Recent developments of microfluidics as a tool for biotechnology and microbiology, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2019, **55**, 60–67.
- 127 J. Yuan and P. A. Sims, An Automated Microwell Platform for Large-Scale Single Cell RNA-Seq, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 33883.

- 128 R. H. Cole, S.-Y. Tang, C. A. Siltanen, P. Shahi, J. Q. Zhang, S. Poust, Z. J. Gartner and A. R. Abate, Printed droplet microfluidics for on demand dispensing of picoliter droplets and cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2017, **114**, 8728–8733.
- 129 A. Kulesa, J. Kehe, J. E. Hurtado, P. Tawde and P. C. Blainey, Combinatorial drug discovery in nanoliter droplets, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2018, **115**, 6685–6690.
- 130 H.-H. Jeong, V. R. Yelleswarapu, S. Yadavali, D. Issadore and D. Lee, Kilo-scale droplet generation in three-dimensional monolithic elastomer device (3D MED), *Lab Chip*, 2015, **15**, 4387–4392.
- 131 J. Abatemarco, M. F. Sarhan, J. M. Wagner, J. L. Lin, L. Liu, W. Hassouneh, S. F. Yuan, H. S. Alper and A. R. Abate, RNA-aptamers-in-droplets (RAPID) high-throughput screening for secretory phenotypes, *Nat. Commun.*, 2017, **8**, 332.
- 132 F. Gielen, R. Hours, S. Emond, M. Fischlechner, U. Schell and F. Hollfelder, Ultrahigh-throughput-directed enzyme evolution by absorbance-activated droplet sorting (AADS), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2016, **113**, E7383–E7389.
- 133 A. S. Basu, Digital Assays Part I: Partitioning Statistics and Digital PCR, *SLAS Technol. Transl. Life Sci. Innov.*, 2017, **22**, 369–386.
- 134 S. Moon, E. Ceyhan, U. A. Gurkan and U. Demirci, Statistical Modeling of Single Target Cell Encapsulation, *PLoS One*, 2011, **6**, e21580.
- 135 S. Dube, J. Qin and R. Ramakrishnan, Mathematical analysis of copy number variation in a DNA sample using digital PCR on a nanofluidic device, *PLoS One*, 2008, **3**, 1–9.
- 136 A. C. Hatch, J. S. Fisher, A. R. Tovar, A. T. Hsieh, R. Lin, S. L. Pentoney, D. L. Yang and A. P. Lee, 1-Million droplet array with wide-field fluorescence imaging for digital PCR, *Lab Chip*, 2011, **11**, 3838.
- 137 E. Ozkumur, A. M. Shah, J. C. Ciciliano, B. L. Emmink, D. T. Miyamoto, E. Brachtel, M. Yu, P. -i. Chen, B. Morgan, J. Trautwein, A. Kimura, S. Sengupta, S. L. Stott, N. M. Karabacak, T. A. Barber, J. R. Walsh, K. Smith, P. S. Spuhler, J. P. Sullivan, R. J. Lee, D. T. Ting, X. Luo, A. T. Shaw, A. Bardia, L. V. Sequist, D. N. Louis, S. Maheswaran, R. Kapur, D. A. Haber and M. Toner, Inertial Focusing for Tumor Antigen-Dependent and -Independent Sorting of Rare Circulating Tumor Cells, *Sci. Transl. Med.*, 2013, **5**, 179ra47-179ra47.

- 138 M. Kalinich, I. Bhan, T. T. Kwan, D. T. Miyamoto, S. Javaid, J. A. LiCausi, J. D. Milner, X. Hong, L. Goyal, S. Sil, M. Choz, U. Ho, R. Kapur, A. Muzikansky, H. Zhang, D. A. Weitz, L. V. Sequist, D. P. Ryan, R. T. Chung, A. X. Zhu, K. J. Isselbacher, D. T. Ting, M. Toner, S. Maheswaran and D. A. Haber, An RNA-based signature enables high specificity detection of circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2017, **114**, 1123–1128.
- 139 E. Z. Macosko, A. Basu, R. Satija, J. Nemes, K. Shekhar, M. Goldman, I. Tirosh, A. R. Bialas, N. Kamitaki, E. M. Martersteck, J. J. Trombetta, D. A. Weitz, J. R. Sanes, A. K. Shalek, A. Regev and S. A. McCarroll, Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets, *Cell*, 2015, **161**, 1202–1214.
- 140 A. M. Klein, L. Mazutis, I. Akartuna, N. Tallapragada, A. Veres, V. Li, L. Peshkin, D. A. Weitz and M. W. Kirschner, Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells, *Cell*, 2015, **161**, 1187–1201.
- 141 R. Zilionis, J. Nainys, A. Veres, V. Savova, D. Zemmour, A. M. Klein and L. Mazutis, Single-cell barcoding and sequencing using droplet microfluidics, *Nat. Protoc.*, 2017, **12**, 44–73.
- 142 B. Adamson, T. M. Norman, M. Jost, M. Y. Cho, J. K. Nuñez, Y. Chen, J. E. Villalta, L. A. Gilbert, M. A. Horlbeck, M. Y. Hein, R. A. Pak, A. N. Gray, C. A. Gross, A. Dixit, O. Parnas, A. Regev and J. S. Weissman, A Multiplexed Single-Cell CRISPR Screening Platform Enables Systematic Dissection of the Unfolded Protein Response, *Cell*, 2016, **167**, 1867–1882.
- 143 F. Lan, B. Demaree, N. Ahmed and A. R. Abate, Single-cell genome sequencing at ultra-high-throughput with microfluidic droplet barcoding, *Nat. Biotechnol.*, 2017, **35**, 640–646.
- 144 G. Amselem, C. Guermontprez, B. Drogue, S. Michelin and C. N. Baroud, Universal microfluidic platform for bioassays in anchored droplets, *Lab Chip*, 2016, **16**, 4200–4211.
- 145 F. Lyu, M. Pan, S. Patil, J. Wang, A. C. Matin, J. R. Andrews and S. K. Y. Tang, Phenotyping antibiotic resistance with single-cell resolution for the detection of heteroresistance, *Sensors Actuators B. Chem.*, 2018, **270**, 396–404.

- 146 X. Liu, R. E. Painter, K. Enesa, D. Holmes, G. Whyte, C. G. Garlisi, F. J. Monsma, M. Rehak, F. F. Craig and C. A. Smith, High-throughput screening of antibiotic-resistant bacteria in picodroplets, *Lab Chip*, 2016, **16**, 1636–1643.
- 147 L. Baraban, F. Bertholle, M. L. M. Salverda, N. Bremond, P. Panizza, J. Baudry, J. A. G. M. de Visser and J. Bibette, Millifluidic droplet analyser for microbiology, *Lab Chip*, 2011, **11**, 4057–4062.
- 148 L. Boitard, D. Cottinet, N. Bremond, J. Baudry and J. Bibette, Growing microbes in millifluidic droplets, *Eng. Life Sci.*, 2015, **15**, 318–326.
- 149 D. Cottinet, F. Condamine, N. Bremond, A. D. Griffiths, P. B. Rainey, J. A. G. M. de Visser, J. Baudry and J. Bibette, Lineage Tracking for Probing Heritable Phenotypes at Single-Cell Resolution, *PLoS One*, 2016, **11**, e0152395.
- 150 K. Churski, M. Nowacki, P. M. Korczyk and P. Garstecki, Simple modular systems for generation of droplets on demand, *Lab Chip*, 2013, **13**, 3689–3697.
- 151 O. Scheler, T. S. Kaminski, A. Ruszczak and P. Garstecki, Dodecylresorufin (C12R) Outperforms Resorufin in Microdroplet Bacterial Assays, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2016, **8**, 11318–11325.
- 152 T. Szymborski, P. M. Korczyk, R. Hołyst and P. Garstecki, Ionic polarization of liquid-liquid interfaces; dynamic control of the rate of electro-coalescence, *Appl. Phys. Lett.*, 2011, **99**, 094101.
- 153 J. Avesar, D. Rosenfeld, M. Truman-Rosentsvit, T. Ben-Arye, Y. Geffen, M. Bercovici and S. Levenberg, Rapid phenotypic antimicrobial susceptibility testing using nanoliter arrays, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2017, **114**, E5787–E5795.
- 154 J. Q. Boedicker, L. Li, T. R. Kline and R. F. Ismagilov, Detecting bacteria and determining their susceptibility to antibiotics by stochastic confinement in nanoliter droplets using plug-based microfluidics., *Lab Chip*, 2008, **8**, 1265–1272.
- 155 M. Pan, M. Kim, L. Blauch and S. K. Y. Tang, Surface-functionalizable amphiphilic nanoparticles for pickering emulsions with designer fluid–fluid interfaces, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 39926–39932.
- 156 M. Pan, F. Lyu and S. K. Y. Tang, Fluorinated Pickering Emulsions with Nonadsorbing Interfaces for Droplet-based Enzymatic Assays, *Anal. Chem.*, 2015, **87**, 7938–7943.

- 157 Ö. Baltekin, A. Boucharin, E. Tano, D. I. Andersson and J. Elf, Antibiotic susceptibility testing in less than 30 min using direct single-cell imaging, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2017, **114**, 9170–9175.
- 158 P. Sabhachandani, S. Sarkar, P. C. Zucchi, B. A. Whitfield, J. E. Kirby, E. B. Hirsch and T. Konry, Integrated microfluidic platform for rapid antimicrobial susceptibility testing and bacterial growth analysis using bead-based biosensor via fluorescence imaging, *Microchim. Acta*, 2017, **184**, 4619–4628.
- 159 J. Choi, J. Yoo, M. Lee, E.-G. Kim, J. S. Lee, S. Lee, S. Joo, S. H. Song, E.-C. Kim, J. C. Lee, H. C. Kim, Y.-G. Jung and S. Kwon, A rapid antimicrobial susceptibility test based on single-cell morphological analysis, *Sci. Transl. Med.*, 2014, **6**, 267ra174.
- 160 N. G. Schoepp, E. M. Khorosheva, T. S. Schlappi, M. S. Curtis, R. M. Humphries, J. A. Hindler and R. F. Ismagilov, Digital Quantification of DNA Replication and Chromosome Segregation Enables Determination of Antimicrobial Susceptibility after only 15 Minutes of Antibiotic Exposure, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2016, **55**, 9557–9561.
- 161 N. G. Schoepp, T. S. Schlappi, M. S. Curtis, S. S. Butkovich, S. Miller, R. M. Humphries and R. F. Ismagilov, Rapid pathogen-specific phenotypic antibiotic susceptibility testing using digital LAMP quantification in clinical samples., *Sci. Transl. Med.*, 2017, **9**, eaal3693.
- 162 W. Postek, P. Gargulinski, O. Scheler, T. S. Kaminski and P. Garstecki, Microfluidic screening of antibiotic susceptibility at a single-cell level shows inoculum effect of cefotaxime in *E. coli*, *Lab Chip*, 2018, **18**, 3668–3677.
- 163 Z. Z. Chong, S. B. Tor, A. M. Gañán-Calvo, Z. J. Chong, N. H. Loh, N.-T. Nguyen and S. H. Tan, Automated droplet measurement (ADM): an enhanced video processing software for rapid droplet measurements, *Microfluid. Nanofluidics*, 2016, **20**, 66.
- 164 Y. Abe, K. Kamiya, T. Osaki, H. Sasaki, R. Kawano, N. Miki and S. Takeuchi, Nonlinear concentration gradients regulated by the width of channels for observation of half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of transporter proteins, *Analyst*, 2015, **140**, 5557–5562.



- 165 D. R. Link, S. L. Anna, D. A. Weitz and H. A. Stone, Geometrically mediated breakup of drops in microfluidic devices., *Phys. Rev. Lett.*, 2004, **92**, 054503.
- 166 S. Sugiura, M. Nakajima and M. Seki, Effect of Channel Structure on Microchannel Emulsification, *Langmuir*, 2002, **18**, 5708–5712.
- 167 K. van Dijke, R. de Ruiter, K. Schroën and R. Boom, The mechanism of droplet formation in microfluidic EDGE systems, *Soft Matter*, 2010, **6**, 321–330.
- 168 F. Dutka, A. S. Opalski and P. Garstecki, Nano-liter droplet libraries from a pipette: step emulsificator that stabilizes droplet volume against variation in flow rate, *Lab Chip*, 2016, **16**, 2044–2049.
- 169 F. Schuler, F. Schwemmer, M. Trotter, S. Wadle, R. Zengerle, F. von Stetten and N. Paust, Centrifugal step emulsification applied for absolute quantification of nucleic acids by digital droplet RPA, *Lab Chip*, 2015, **15**, 2759–2766.
- 170 L. Shui, A. Van Den Berg and J. C. T. Eijkel, Scalable attoliter monodisperse droplet formation using multiphase nano-microfluidics, *Microfluid. Nanofluidics*, 2011, **11**, 87–92.
- 171 S. Sugiura, M. Nakajima, S. Iwamoto and M. Seki, Interfacial Tension Driven Monodispersed Droplet Formation from Microfabricated Channel Array, *Langmuir*, 2001, **17**, 5562–5566.
- 172 B. O’Donovan, T. Tran, A. Sciambi and A. Abate, Picoinjection of Microfluidic Drops Without Metal Electrodes, *J. Vis. Exp.*, , DOI:10.3791/50913.
- 173 J. R. Haliburton, S. C. Kim, I. C. Clark, R. A. Sperling, D. A. Weitz and A. R. Abate, Efficient extraction of oil from droplet microfluidic emulsions, *Biomicrofluidics*, 2017, **11**, 034111.
- 174 A. Vian, B. Reuse and E. Amstad, Scalable production of double emulsion drops with thin shells, *Lab Chip*, 2018, **18**, 1936–1942.
- 175 S. Sugiura, M. Nakajima and M. Seki, Preparation of monodispersed emulsion with large droplets using microchannel emulsification, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2002, **79**, 515–519.
- 176 E. Brouzes, M. Medkova, N. Savenelli, D. Marran, M. Twardowski, J. B. Hutchison, J. M. Rothberg, D. R. Link, N. Perrimon and M. L. Samuels, Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening., *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. U. S. A.*, 2009, **106**, 14195–200.
- 177 Y. Hori, K. Chaitanya, R. M. Murray and A. R. Abate, Cell-free extract based optimization of biomolecular circuits with droplet microfluidics, *Lab Chip*, 2017, 3037–3042.
- 178 J. D. Tice, H. Song, A. D. Lyon and R. F. Ismagilov, Formation of Droplets and Mixing in Multiphase Microfluidics at Low Values of the Reynolds and the Capillary Numbers, *Langmuir*, 2003, **19**, 9127–9133.
- 179 J. Shiloach and S. Bauer, High-yield growth of *E. coli* at different temperatures in a bench scale fermentor, *Biotechnol. Bioeng.*, 1975, **17**, 227–239.
- 180 M. A. Unger, H.-P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer and S. R. Quake, Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography, *Science (80-. )*, 2000, **288**, 113–116.
- 181 S. Jakiela, P. R. Debski, B. Dabrowski and P. Garstecki, Generation of nanoliter droplets on demand at Hundred-Hz frequencies, *Micromachines*, 2014, **5**, 1002–1011.
- 182 J. J. Agresti, E. Antipov, A. R. Abate, K. Ahn, A. C. Rowat, J.-C. Baret, M. Marquez, A. M. Klibanov, A. D. Griffiths and D. A. Weitz, Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, **107**, 4004–9.
- 183 C. Priest, S. Herminghaus and R. Seemann, Controlled electrocoalescence in microfluidics: Targeting a single lamella, *Appl. Phys. Lett.*, 2006, **89**, 134101.
- 184 C. M. Hindson, J. R. Chevillet, H. a Briggs, E. N. Gallichotte, I. K. Ruf, B. J. Hindson, R. L. Vessella and M. Tewari, Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR., *Nat. Methods*, 2013, **10**, 1003–5.
- 185 B. J. Hindson, K. D. Ness, D. A. Masquelier, P. Belgrader, N. J. Heredia, A. J. Makarewicz, I. J. Bright, M. Y. Lucero, A. L. Hiddessen, T. C. Legler, T. K. Kitano, M. R. Hodel, J. F. Petersen, P. W. Wyatt, E. R. Steenblock, P. H. Shah, L. J. Bousse, C. B. Troup, J. C. Mellen, D. K. Wittmann, N. G. Erndt, T. H. Cauley, R. T. Koehler, A. P. So, S. Dube, K. A. Rose, L. Montesclaros, S. Wang, D. P. Stumbo, S. P. Hodges, S. Romine, F. P. Milanovich, H. E. White, J. F. Regan, G. A. Karlin-Neumann, C. M. Hindson, S. Saxonov and B. W. Colston, High-Throughput

- Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number, *Anal Chem*, 2011, **83**, 8604–8610.
- 186 F. Schuler, C. Siber, S. Hin, S. Wadle, N. Paust, R. Zengerle and F. von Stetten, Digital droplet LAMP as a microfluidic app on standard laboratory devices, *Anal. Methods*, 2016, **8**, 2750–2755.
- 187 I. Shestopalov, J. D. Tice and R. F. Ismagilov, Multi-step synthesis of nanoparticles performed on millisecond time scale in a microfluidic droplet-based system, *Lab Chip*, 2004, **4**, 316.
- 188 A. M. Nightingale, T. W. Phillips, J. H. Bannock and J. C. de Mello, Controlled multistep synthesis in a three-phase droplet reactor, *Nat. Commun.*, 2014, **5**, 3777.
- 189 T. W. Phillips, I. G. Lignos, R. M. Maceiczky, A. J. DeMello and J. C. DeMello, Nanocrystal synthesis in microfluidic reactors: where next?, *Lab Chip*, 2014, **14**, 3172.
- 190 L. Du, Y. Li, R. Gao, J. Yin, C. Shen, Y. Wang and G. Luo, Controllability and flexibility in particle manufacturing of a segmented microfluidic device with passive picoinjection, *AIChE J.*, 2018, **64**, 3817–3825.
- 191 J. N. Lee, C. Park and G. M. Whitesides, Solvent Compatibility of Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 6544–6554.
- 192 T. Szymborski, P. Jankowski and P. Garstecki, Teflon microreactors for organic syntheses, *Sensors Actuators B Chem.*, 2018, **255**, 2274–2281.
- 193 K. Ren, W. Dai, J. Zhou, J. Su and H. Wu, Whole-Teflon microfluidic chips, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2011, **108**, 8162–8166.
- 194 P. Jankowski, D. Ogończyk, W. Lisowski and P. Garstecki, Polyethyleneimine coating renders polycarbonate resistant to organic solvents, *Lab Chip*, 2012, **12**, 2580.
- 195 A. G. Håti, T. R. Szymborski, M. Steinacher and E. Amstad, Production of monodisperse drops from viscous fluids, *Lab Chip*, 2018, **18**, 648–654.
- 196 A. S. Opalski, K. Makuch, Y.-K. Lai, L. Derzsi and P. Garstecki, Grooved step emulsification systems optimize the throughput of passive generation of monodisperse emulsions, *Lab Chip*, 2019, **19**, 1183–1192.

- 197 L. Mazutis, J.-C. Baret, P. Treacy, Y. Skhiri, A. F. Araghi, M. Ryckelynck, V. Taly and A. D. Griffiths, Multi-step microfluidic droplet processing: kinetic analysis of an in vitro translated enzyme., *Lab Chip*, 2009, **9**, 2902–2908.
- 198 Y. Skhiri, P. Gruner, B. Semin, Q. Brosseau, D. Pekin, L. Mazutis, V. Goust, F. Kleinschmidt, A. El Harrak, J. B. Hutchison, E. Mayot, J.-F. Bartolo, A. D. Griffiths, V. Taly and J.-C. Baret, Dynamics of molecular transport by surfactants in emulsions, *Soft Matter*, 2012, **8**, 10618.
- 199 O. Scheler, P. R. Debski, M. Horka, A. Ruszczak, N. Pacocha, W. Postek, K. Makuch and Gars, Multiplex droplet assay reveals coinciding inoculum effect and phenotypic heterogeneity during beta- lactam treatment of bacteria, *bioRxiv*, 2018, doi: 10.1101/328393.
- 200 M. B. Elowitz, Stochastic Gene Expression in a Single Cell, *Science (80-. )*, 2002, **297**, 1183–1186.
- 201 A. Raj and A. van Oudenaarden, Nature, Nurture, or Chance: Stochastic Gene Expression and Its Consequences, *Cell*, 2008, **135**, 216–226.
- 202 H. H. McAdams and A. Arkin, Stochastic mechanisms in gene expression, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997, **94**, 814–819.
- 203 A. San Millan, A. Santos-Lopez, R. Ortega-Huedo, C. Bernabe-Balas, S. P. Kennedy and B. Gonzalez-Zorn, Small-Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance Is Enhanced by Increases in Plasmid Copy Number and Bacterial Fitness, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, **59**, 3335–3341.
- 204 J. P. J. Hall and E. Harrison, Bacterial evolution: Resistance is a numbers game, *Nat. Microbiol.*, 2016, **1**, 16235.
- 205 J. Haaber, M. T. Cohn, D. Frees, T. J. Andersen and H. Ingmer, Planktonic aggregates of *Staphylococcus aureus* protect against common antibiotics, *PLoS One*, 2012, **7**, e41075.
- 206 G. Corno, M. Coci, M. Giardina, S. Plechuk, F. Campanile and S. Stefani, Antibiotics promote aggregation within aquatic bacterial communities, *Front. Microbiol.*, 2014, **5**, 297.
- 207 T. Trunk, H. S. Khalil and J. C. Leo, Bacterial autoaggregation, *AIMS Microbiol.*, 2018, **4**, 140–164.

- 208 J. Buijs, A. S. M. Dofferhoff, J. W. Mouton, J. H. T. Wagenvoort and J. W. M. Van Der Meer, Concentration-dependency of  $\beta$ -lactam-induced filament formation in Gram-negative bacteria, *Clin. Microbiol. Infect.*, 2008, **14**, 344–349.
- 209 T. S. B. Kjeldsen, M. O. A. Sommer and J. E. Olsen, Extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* forms filaments as an initial response to cefotaxime treatment, *BMC Microbiol.*, 2015, **15**, 1–6.
- 210 W. Postek, T. S. Kaminski and P. Garstecki, A precise and accurate microfluidic droplet dilutor, *Analyst*, 2017, **142**, 2901–2911.
- 211 W. Postek, T. S. Kaminski and P. Garstecki, A passive microfluidic system based on step emulsification allows to generate libraries of nanoliter-sized droplets from microliter droplets of varying and known concentration of sample, *Lab Chip*, 2017, **17**, 1323–1331.
- 212 T. Yang, S. Stavrakis and A. DeMello, A High-Sensitivity, Integrated Absorbance and Fluorescence Detection Scheme for Probing Picoliter-Volume Droplets in Segmented Flows, *Anal. Chem.*, 2017, **89**, 12880–12887.



B. 515/19



Biblioteka Instytutu Chemii Fizycznej PAN

**F-B.515/19**



10000000105658