

**4-METÜÜLUMBELLIFERÜÜLIL PÕHINEVAD MIKROBIOLOOGIA  
MÄRGISED TILGA MIKROFLUIDIKAS**

Bakalaureusetöö

Saari Anete Loog

Juhendaja: Ott Scheler,  
Keemia ja biotehnoloogia instituut, kaasprofessor  
Kaasjuhendaja: Simona Bartkova,  
Keemia ja biotehnoloogia instituut, teadur  
Õppekava: Rakenduskeemia ja geenitehnoloogia



# **4-METHYLUMBELLIFERYL BASED MICROBIOLOGICAL LABELS IN DROPLET MICROFLUIDICS**

Bachelor thesis

Saari Anete Loog

Supervisor: Ott Scheler,  
Department of Chemistry and Biotechnology, associate professor

Co-supervisor: Simona Bartkova,  
Department of Chemistry and Biotechnology, researcher

Study program: Applied Chemistry, Gene Technology

Tallinn 2023

## Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Saari Anete Loog

[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Ott Scheler

[allkiri ja kuupäev]

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees:

[allkiri ja kuupäev]

## Sisukord

Lühendid .....	5
Sissejuhatus.....	6
1. Kirjanduse ülevaade.....	7
1.1 Mikrofluidika.....	7
1.1.1 Tilga mikrofluidika.....	7
1.1.2 Tilga mikrofluidika rakendused.....	8
1.1.3 Tilga mikrofluidika kasutamine erinevates mikrobioloogia valdkondades.....	9
1.2 Mikrobioloogias kasutatavad fluorestseeruvad märgised tilga mikrofluidikas.....	10
1.2.1 Resorufiin.....	10
1.2.2 C-12 resorufiin.....	11
1.2.3 MUG.....	11
1.2.4 MUGal.....	12
2. Töö eesmärk.....	14
3. Materjalid ja meetodid .....	15
3.1 Kiibi valmistamine.....	15
3.1.1 PDMS segu ettevalmistamine.....	15
3.1.2 Kiibi vormi valmistamine.....	15
3.1.3 Kiibi valmistamine.....	16
3.2 Bakterite kasvatamine ja märgiste lisamine.....	16
3.3 Mikroskopeerimine.....	17
3.4 Pildi ja andmeanalüüs.....	18
4. Tulemused.....	20
4.1 MUG märgisega <i>E. coli</i> kasvu tuvastamine tilkades.....	20
4.2 MUGal märgisega <i>E. coli</i> kasvu tuvastamine tilkades.....	22
5. Arutelu .....	24
Kokkuvõte .....	25
Abstract.....	26
Kasutatud kirjandus .....	27

## Lühendid

**MUG** – 4-metüülumbelliferüül- $\beta$ -D-glükuroniid

**DMSO** – dimetüülsulfoksiid

**PDMS** – polüdimetüüsiloksaan

**CFU** – colony-forming unit - kolooniat moodustav ühik

**PC** – polükarbonaat

**MUGal** – 4-metüülumbelliferüül-  $\beta$ -D-galaktopüranosiid

**GUS** –  $\beta$ -D-glükuronidaas

**GFP** – green fluorescent protein – roheline fluoresseruv valk

***E. coli*** – *Escherichia coli*

## Sissejuhatus

Tilga mikrofluidika on mikrofluidika alaliik, kus tehakse lühikese ajaga palju väikeseid vesi-õlis tilkasid. Meetodi eeliseks on kasutatavate reagentide väikesed ruumalad, mis teevad selle kiireks, odavaks ja kuna ka jääke tekib vähe, ka loodussõbralikuks. Kuna iga tilk on nagu eraldi väike katseklaas saab korraka teha palju katseid. Mikrobioloogias kasutatakse tilga mikrofluidikat, sest see võimaldab tuvastada baktereid ja määrata nende resistentsust antibiootikumidele kiiremini kui klassikaline väljakülv Petri tassile. Kuna tilga ruumala on väike kasvavad bakterid selle sees kiiresti tuvastamiseks vajaliku kontsentratsioonini. Lisaks aitab see viia läbi suuremahulisi katseid ja uurida mikroobide füsioloogiat ning omavahelisi interaktsioone.

Käesoleva töö eesmärgiks on leida mikrofluidika laboris edaspidiseks kasutamiseks sobivaid mikrobioloogia määrgiseid. Sobiv määrgis peaks tuvastama bakterite kasvu tilkades võimalikult kiiresti ja võimalikult vähe lekkima tilkade vahel, kuna see põhjustaks valepositiivseid signaale.

Töö esimene peatükk annab ülevaate tilga mikrofluidikast ja selle kasutusest mikrobioloogias. Lisaks katsetest, mida uuritavate määrgiste, 4-metüülumbelliferüül-beeta-D-glükuroniidi (MUG) ja 4-metüülumbelliferüül-beeta-D-galaktopüranosiidiga (MUGal), varem tehtud on. Teises peatükis on kirjeldatud kasutatud materjale ja meetodeid, läbiviidud katseid ning analüüsiks kasutatud mikroskoopi ja tilkade analüüsi programmi. Viimases peatükis on katsete tulemused ja tehtud järeldused.

Töö tulemustena selgus, et mõlema uuritud määrgisega on bakterite kasv mikrofluidika tilkades tuvastatav, aga kumbki neist ei tööta täiuslikult. Mõlema määrgisega tekib mõnedes tilkades valepositiivne signaal, tilkades toimub iseeneslik fluooreseeruva produkt teke või leke tilkade vahel.

## 1. Kirjanduse ülevaade

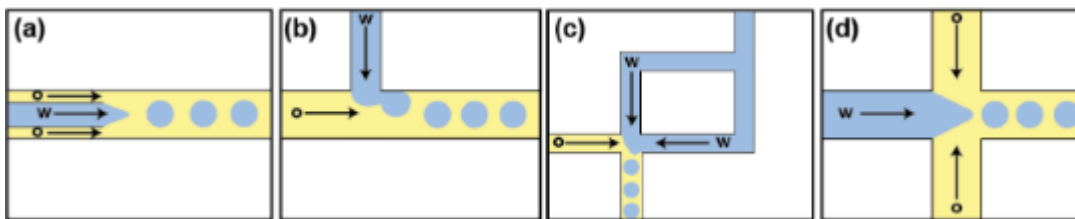
### 1.1 Mikrofluidika

Mikrofluidika on tehnoloogia, kus manipuleeritakse peenikeste kanalitega, mille läbimõõdud on kümnetes või sadades mikromeetrites. See on gaasikromatograafia, kapillaarelektroforeesi ja kõrgsurve-vedelikkromatograafia edasiarendus. Võrreldes eelnevate meetoditega on mikrofluidika kompaktsem ja mitmekülgsem. Meetodi väljaarendamist alustati 1990. aastatel USA-s ja selle algne eesmärk võitlus keemiliste ja bioloogiliste relvadega – vaja oli võimalikult lihtsalt, kiirelt ja väikesest proovi kogusest teha kindlaks nende relvade kasutamist. (Whitesides, 2006)

#### 1.1.1 Tilga mikrofluidika

Tilga mikrofluidikas tehakse mikrokanalite abil emulsioone. Emulsiooni moodustavad kaks teineteises mitte segunevat vedelikku, näiteks õli ja vesi. Lisaks neile kasutatakse mikrofluidikas tilgade tegemisel ka surfaktanti, mis hoiab tilkaside koos, muidu laguneksid need aja jooksul ja katseklaasi tekkiks uuesti eraldi vee ja õli kiht. Katsetulemuste mugavamaks analüüsimiseks peavad tilgad olema ühesuguse suurusega, selle saavutamiseks kasutatakse mikrofluidika kiipe. (Autour & Ryckelynck, 2017)

Kuna ühesuuruste tilgade tegemiseks ei piisa lihtsalt vee ja õli segamisest, on identsete tilgade saamiseks välja arendatud erinevaid meetodeid ja eri-geomeetriaga kiipe, mille abil võimalikult sarnased tilgad saada. (Autour & Ryckelynck, 2017)

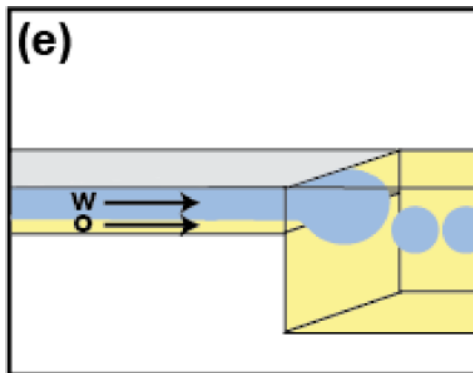


Joonis 1. Joonisel on erinevad kiibi geomeetria võimalused tilgade tegemiseks: a) on ühise teljega vedelikevood, b) T-kujuline ühendus, c) T-kujulise ühenduse täiendus, kus proov tuleb kahest suunast ja d) voogude fookusseerimine. Mugandatud joonis (Autour & Ryckelynck, 2017)

Üks võimalus selleks on kaasvoog ehk vee kapillaar õli voolu sees. Sellisel juhul on kahe vedeliku mikrokanalitel ühine telg. Vesi tuleb keskelt ja õli on igal pool selle ümber. Seda on kujutatud joonisel a. Teine võimalus on T-kujuline ühendus, kus õli voolab otse ja vesi tuleb õli sisse 90° nurga all. Faaside kokku saamisel tekib nihe, mille tulemusena eraldub tilk. Selle meetodiga on hea teha suuremaid tilkaside ning seda on kujutatud joonisel b. Joonisel c on kujutatud T-kujulise ühenduse täiendus, mis võimaldab algsest variandist paremini tilkade suurust ja tekkimise sagedust kontrollida ning sättida sobivaks edasise analüüsi masinatele või tilkade sorteerijale. Viimasel joonisel, d, on kujutatud voogude fookusseerimise meetodit, mida kasutades on hea teha väikeseid tilkaside, samuti on see eelnevalt mainitust kõige kõrgema tootlikkusega viis, mis teeb selle optimaalseks meetodiks suuremahuliste katsete läbiviimiseks. (Shang et al., 2017; Taylor et al., 2022)

Lisaks varem mainitud meetoditele, mida nimetatakse passiivseteks, kuna need ei vaja täiendavaid jõudusid, on olemas veel aktiivsed meetodid, kus kasutatakse tilgade tegemiseks kõrvalisi jõude. Üheks sellistest meetoditest on järsk rõhu muutmine. Joonisel e on näidatud tehnoloogia, kus vedelikud on alguses kõrge rõhu all ja kui seejärel ruumala järsult suureneb ning rõhk seeläbi langeb, tekivad tilgad. Lisaks rõhu muutmisele on võimalik erineva suurusega tilkaside teha näiteks viskoossust ära kasutades, tänu sellele, et viskoossus temperatuuri muutudes väga palju muutub.

Pärast tilkade genereerimist on neid võimalik säilitada selleks ettenähtud kambritega kiibis või korjata kiibilt eraldi olevasse reservuaari, näiteks süstlasse, tuubi või kapillaari. (Autour & Ryckelynck, 2017; Christopher & Anna, 2007)



Joonis 2. Aktiivne tilkade tegemine. Sinisega on joonisel märgitud vesi, mis voolab vasakult paremale. Alguses on see kõrge rõhu all, pärast muutub rõhk järsku väiksemaks ja tekivad tilgad. Mugandatud joonis (Autour & Ryckelynck, 2017)

### 1.1.2 Tilga mikrofluidika rakendused

Tilga mikrofluidika üheks peamiseks eeliseks teiste meetodite ees on katse väike ruumala. Tilkade ruumala on tavaliselt nanoliitrites, mis teeb katse kiireks ja odavaks. Lisaks võimaldab see teha palju tilkaid, mis tagab suure läbilaskevõime ning teeb meetodi tundlikuks ja spetsiifiliseks. Katse väike ruumala on hea ka keskkonnale, sest kasutatakse vähe reagente ja ka jääke tekib vähe. See võimaldab protsesse automatiseerida ja vähendab vea ohtu võrreldes käsitsi tehtavate katsetega. Kuna iga tilk on nagu üks paralleelkatse, võimaldab tilkade hulk saada statistiliselt olulisi andmeid. Samuti saab analüüsida suures hulgas haruldasi sündmusi või väikestes kontsentratsioonides aineid. Tänu sellele kasutatakse tilga mikrofluidikat paljudes eri valdkondades. Näiteks analüütilises keemias molekulide tuvastamiseks, ravimiuuringutes, rakubioloogias ja toidutehnoloogias. See on ka paljulubav tehnoloogia meditsiinis kliiniliste skriiningute jaoks, kuna võimaldab kiiresti ja odavalt analüüsida palju proove. (Chou et al., 2015; Scheler et al., 2019)

Üheks tilga mikrofluidika kasutusala on ühe raku tasandil analüüsid. Kuna uuritavad rakud on ükshaaval väga väikesed on nendega ükshaaval ümberkäimine klassikalisel meetodil, kasutades petri tasse, keeruline. Lisaks sisalduvad paljud komponendid rakkudes vaid väga madalatel kontsentratsioonidel mille tõttu vajab nende analüüsimine kõrge tundlikkuse ja spetsiifilisusega meetodeid. Sellise analüüsi esimese etapina on vaja rakud ühekaupa eraldada. Eraldamine on võimalik läbivoolu tsütomeetriaga, mis tuvastab ja jagab rakke neil olevate fluorestsentsmärgiste järgi, selline meetod on aga kallis ja vajab suuri proovi hulkasid. Tilga mikrofluidika aga võimaldab rakke odavamalt ükshaaval kapseldada ja vajab väikeseid koguseid proove, mis tähendab, et ka jääke tekib palju vähem. Lisaks võimalab tilga mikrofluidika erinevalt varem selleks kasutusel olnud läbivoolu tsütomeetriast rakke pikema aja jooksul jälgida. Pärast ükshaaval kapseldamist saab tilkades olevaid rakke, optilisi, elektrokeemilisi, akustilisi, magneetilisi meetodeid või massispektromeetriat kasutades detekteerida ja edaspidiste katsete tarbeks sorteerida. (Luo et al., 2019)



### 1.1.3 Tilga mikrofluidika kasutamine erinevates mikrobioloogia valdkondades

Mikrobioloogia valdkonnas on mikrofluidikal neli peamist kasutusala. Selle abil detekteeritakse ja identifitseeritakse mikroorganisme (i), uuritakse mikroobide antibiootikumiresistentsust (ii) ja (iii) nende füsioloogiat ning omavahelisi interaktsioone. Samuti uuritakse tilga mikrofluidikat kasutades uusi tehnikaid biotehnoloogias(iii), kuna see võimaldab teha suuremahulisi katseid (iv). (Agresti et al., 2010; Kaminski et al., 2016; Song et al., 2006)

**i) Mikroorganismide detekteerimine ja identifitseerimine.** Näiteks saab tilga mikrofluidikat kasutada sepsise analüüsiks. Kuigi soolestikus on *E. coli* normaalne, põhjustab ta rasket seisundit sattudes verre. Üks analüüsides, kus on väga oluline määrata baktereid kiiresti, on *E. coli* otsimine verest sepsise kahtluse korral. Sepsis areneb kiiresti ja seoses antibiootikumiresistentsuse tõusuga on seda aina raskem ravida. Oluline on mitte ainult võimalikult kiire diagnoosimine, vaid ka sepsist põhjustanud bakterite resistentsus antibiootikumidele. Lisaks klassikalisele väljakülvile saab baktereid verest otsida PCR-ga. See on palju kiirem, aga ei ole tihti piisavalt tundlik meetod, et tuvastada ka väga madalaid bakterikontsentratsioone (1-100 CFU/ml). Lisaks bakteritele on veres palju teisi rakke, mis segavad analüüsi ja tekitavad tugevat taustasignaali. (Choi et al., 2017; Das et al., 2017; Kang et al., 2014)

Teise näitena saab tilga mikrofluidikas kasutatakse bakterispetsiifilisi DNA oligonukleotiididega sensoreid, mis on mikrokanalite seinte küljes. Pärast sellise kanali läbimist juhitakse vereproov kokku õliga ja tehakse sellest tilgad. Edasi juhitakse baktereid sisaldavad tilgad automaatsesse analüsaatorisse. Kuna tilgad on ühesuurused ja bakteritest on eraldatud muud analüüsi segavad vererakud, on analüüs tarkvara abil teostatav. Baktereid sisaldavad tilgad fluoreseeruvad ning tarkvara loeb kokku kõik tilgad ja arvutab nende hulgas floresseeruvate osakaalu, mille järgi saab arvutada bakterite kontsentratsiooni. (Kang et al., 2014)

**ii) Mikroobide antibiootikumitundlikkuse uuringud.** Mikrofluidika tilkade kasutamine patogeensete *E. coli* tüvede põhjustatud haiguste raviks. Kuna ravimiresistentsus aina suureneb, vajatakse samade haiguste raviks pidevalt uusi ravimeid. Pidevalt testitakse kombinatsioone tuhandetest olemasolevatest ravimitest ja antibiootikumidest leidmaks selliseid, mis ka reistentsetele mikroobidele mõjuvad. Selliste katsete jaoks saab kasutada tilga mikrofluidikat, mis võimaldab väikeste proovikogustega läbi proovida palju erinevaid kombinatsioone. Tehakse 1 nl vesi õlis tilgad, mis sisaldavad baktereid, fluoreseeruvad märgist ja uuritavaid ühendeid. Tilkasid inkubeeritakse PDMS-ist kiibis ja seejärel skanneeritakse mikroskoobis. Mikroskopeerimine võimaldab kindlaks määrata, millised ühendid on igas tilgas ja, kas bakterid seal kasvavad. (Kulesa et al., n.d.; Scheler et al., 2019)

Analüüsimaiks paljude bakteritega proovist just *E. coli* baktereid on mikrofluidikat võimalik ühendada näiteks viirusvektorite tehnoloogiaga. Selleks kasutatakse *E. coli* spetsiifilisi bakteriofaage. Faagid lüüsiivad ensümaatiliste reaktsioonidega peremeesraku ja selle käigus vabaneb palju uusi bakteriofaagi virione. Nii on vaja alguses väga vähe viiruseid ja kui proovis üksikuidki *E. coli* baktereid leidub, hakkavad faagid kiiresti paljunema, mis teeb meetodi nii spetsiifiliseks kui ka tundlikuks. Protsessi jälgimiseks on faagid geneetiliselt muundatud ja sisaldavad reporter-geene, mis kodeerivad mikroskoobis lihtsasti tuvastatavaid signaale. Üheks selliseks on modifitseeritud T7 faag, mis toodab lutsiferaasi abil fluoreseeruvat signaali. Sellise modifitseeritud T7 bakteriofaagidega ja mikrofluidika tilkadega meetodiga 100 ml vee analüüsimine võtab aega 5,5 tundi, mis on palju kiirem kui baktereid Petri tassile külvates. (Alonzo et al., 2022)

**iii) Mikroorganismide füsioloogia uuringud biotehnoloogia rakendusteks.** Ensümaatiliste protsesside toimimiseks on vaja üksteisest sõltvate reaktsioonide võrgustikku. Sellised reaktsioonid ei kulge

tavaliselt iseeneslikult, mis teeb nende kontrollimise ja enda taatele allutamise keeruliseks. Tänu võimalusele vedelike vooga vajalikke reagente vajalikul ajal kohale tuua ja produkte eemale viia saab tilga mikrofluidika abil teostada mitteiseeneslikke reaktsioone. Üheks biokeemilistest reaktsioonikaskaadidest, mida mikrofluidika abil on tehnikult saavutatud on  $\text{Co}^{2+}$  ionide autokatalüütiline teke. Looduslikult on see vajalik signaalide edasikandumiseks rakus. (Song et al., 2006)

Mikrofluidika abil saab segaproovidest eraldada haruldasi või väga aeglaselt paljunevaid mikroorganisme. Seda tehnoloogiat on kasutatud mullasproovidest üksikute bakteriliikide eraldamiseks. (Song et al., 2006)

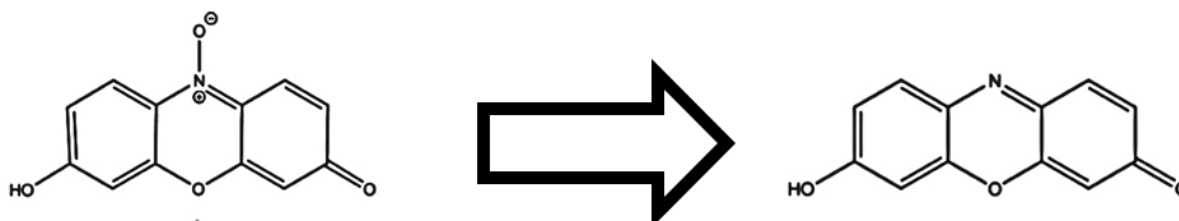
**iv) Suuremahulised katsed mikrobioloogias ja biotehnoloogias.** Sellisteks on näiteks skriining. Üks sellistest näidetest on pärmis mädarõika peroksüdaasi tootmise muutmine efektiivsemaks. Pärmirakkudesse transformeeriti juhuslike mutatsioonidega mädarõika peroksüdaasi kodeerivad geenid. Rakkude kasvatamisel ekspresseeruvad erinevad ensüümivariandid. Seejärel kapseldati pärmirakud mitte-fluoresseeruva substraadiga mikrofluidika tilkadesse ning inkubeeriti. Inkubeerimise järel sorteeriti tilgad kibil nii, et intensiivsema fluorestsentsiga tilgad sisaldaks sobivaimaid ensüümivariante. Korrates protseduuri neli korda saavutati kümnekordne ensüümi aktiivsuse tõus. (Agresti et al., 2010) Sellise katse jaoks on vaja tilkasid sorteerida ja seda tehakse erineva geomeetriaga kiipe kasutades. Lisaks sorteerimisele võimaldavad kibid ka ühesuuruseid tilkasid segada ja väikseid suuremateks ühendada. (Song et al., 2006)

## 1.2 Mikrobioloogias kasutatavad fluorestseeruvad märgised tilga mikrofluidikas

Fluoresseeruvad märgised on vajalikud bakterite kasvu kindlaks tegemiseks. Mikrofluidika tilkades on vaja märgiseid, mille abil saab öelda, millises tilgas bakterid kasvavad ja millises mitte.

### 1.2.1 Resorufiin

Resorufiiniga bakterite kasvu tuvastamine põhineb mikroorganismide oksüdatiivsel hingamisel. Selle käigus toimub märgisega redutseerimisreaktsioon. Bakterirakkude oksüdatiivsel hingamisel osalev NADH oksüdeerub  $\text{NAD}^+$ -ks ja rezozurin redutseerub resorufiiniks. Reaktsiooni toimumiseks on vaja kahte prootonit iga märgise molekuli kohta ja kõrvalproduktina tekib vesi. E. coli bakterite fluoreseeruva signaali tekkimiseks läheb aega umbes kolm tundi. Ergastuse maksimum on 550 nm ja emissiooni maksimum 585 nm. Mikroskoobis mõõdetakse fluorestsentsi tavaliselt punases vahemikus. (Boitard et al., 2015; Scheler et al., 2016)



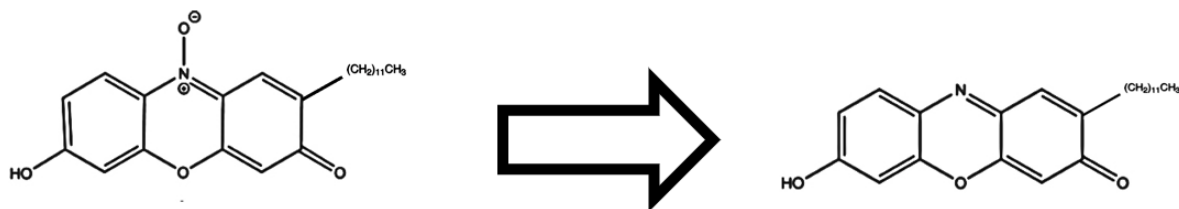
Joonis 3. Vasakul on resazurin ja paremal resorufiin. Noolega on tähistatud reaktsiooni kulgemise suund oksüdatiivselt hingavate mikroorganismide tuvastamisel. Resazurin redutseeritakse fluoreseeruvaks resorufiiniks. (Scheler et al., 2016)

Resorufiin on levinud metaboolselt aktiivsete bakterite jälgimiseks. Kuna selle fluorestsentssignaal tekib ainult siis kui toimub oksüdatiivne hingamine, saab seda mikrobioloogia katsetes kasutada

tuvastamiseks, kas mikroorganismides toimub parajasti oksüdatiivne hingamine või käärimine. See on levinud märgis ka tilga mikrofluidikas metaboolselt aktiivsete mikroorganismide tuvastamiseks, aga selle puuduseks on suur leke tilkade vahel. Märgis läheb veetilgast vesiikulitega õlisse ja sealt teistesse veetilkadesse. See teeb positiivsete, baktereid sisaldavate ja negatiivsete, tühjade tilkade signaalide vahe peaaegu olematuks. Positiivsete tilkade signaal nõrgeneb, sest osa märgist läheb sealt välja ja tühjade tilkade signaal tõuseb kuna märgis siseneb sinna tilkasid ümbritsevast õlist. (Scheler et al., 2016)

### 1.2.2 C-12 resorufiin

Sarnaselt resorufiinile tekib märgis reaktsioonil oksüdatiivselt hingavate rakkude NADH-ga, aga selle märgisega läheb fluorestsentsi tekkimiseks natuke kauem aega ning signaali nähti 4 tunni pärast. Pikema aja kulumise põhjuseks võib olla C-12 resorufiini nõrgem fluorestsents – selleks, et signali nähe oleks on vaja rohkem molekule. Samuti võib põhjuseks olla molekuli suurus. Kuna võrreldes resorufiiniga on C-12 resorufiini molekulil lisaks pikk süsinikuahel, võib see aeglustada molekuli liikumist läbi plasmamembraani bakteri sisse või takistada reaktsionil ensüümidega seondumist. Märgise ergastamiseks on vaja lainepikkust 490 nm ja emissioon toimub 575 nm. Mikroskoobis mõõdetakse signaali punases vahemikus. (Braissant et al., 2020; Scheler et al., 2016)



Joonis 4. Vasakul on C-12 resazurin ja paremal C-12 resorufiin. Noolega on tähistatud reaktsiooni kulgemise suund oksüdatiivselt hingavate mikroorganismide tuvastamisel. Reaktsiooni käigus redutseerub C-12 resazurin C-12 resorufiiniks ja NADH oksüdeerub NAD<sup>+</sup>-ks, reaktsiooni toimumiseks on vaja kahte prootoneid ja kõrvalproduktina tekib vesi. (Scheler et al., 2016)

C-12 resorufiin lekitab palju vähem kui resorufiin. See on ka tundlikum ja spetsiifilisem ning kasvavate bakteritega tilga positiivne püsib pikema aja vältel palju tugevam kui ilma bakteriteta negatiivse tilga oma. Tänu nendele omadustele on C-12 resorufiin sobiv märgis mikrofluidika tilkades mikroorganismide kasvu tuvastamiseks ja jälgimiseks. Võrreldes resorufiiniga püsib selle märgise signaal kauem. Resorufiiniga märgistatud tilkades on positiivne signaal negatiivsega võrdne juba 9 tunni pärast, aga C-12 resorufiiniga on ka 15 tunni möödudes signaalid selgelt eristatavad. (Braissant et al., 2020; Scheler et al., 2016)

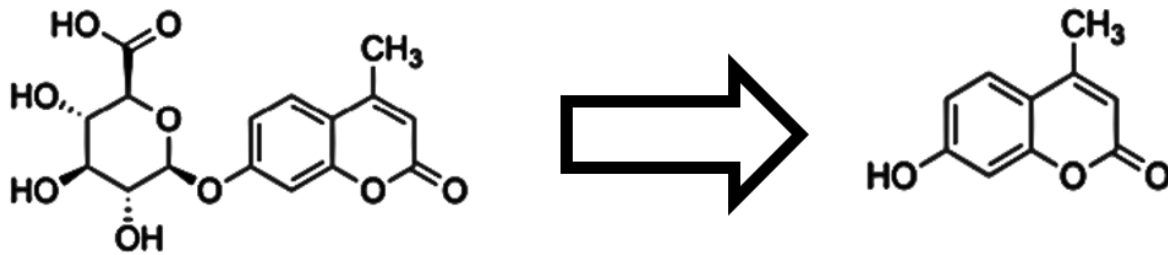
### 1.2.3 MUG

MUG on 4-metüülumbelliferüülil põhinev märgis, millega saab *Escherichia coli* baktereid tuvastada tänu mikroobide toodetavale ensüümile, β-D-glükuronidaasile (GUS). Selleks lisatakse vedelsöötmes kasvavatele bakteritele MUG märgist, mida β-D-glükuronidaas lagundab. Selle reaktsiooni tulemusena tekib fluoreseeruv produkt, mida on võimalik mikroskoobis näha ja selle järgi bakterid tuvastada. (Pala et al., 2020)

4-metüülumbelliferüül-β-D-glükuronidi (MUG) ergastuseks on vaja valgust lainepikkusega 360nm ja fluorestsentsi mõõdetakse lainepikkusel 450 nm. Märgise eelisteks on lahustuvus vees, mis tähendab, et ei ole vaja kasutada lahustamiseks eraldi lisaaineid, mis võivad olla mikroorganismidele toksilised. MUG ise on väga nõrgalt toksiline ja hüdrofüülsus mikroobide ensüümide toimel kergesti. Lisaks on see fluorogeenne, mis teeb ta hästi mikroskoobis jälgitavaks. Märgise puudusteks on nõrk stabiilsus

vees, mis tähendab, et see võib iseenesest laguneda ja selle tõttu on oluline teha lahus vahetult enne katse läbiviimist. Samuti on MUG-il üsna kõrge happe dissotsiatsioonikonstant,  $pK_a = 7,8$ , mis tähendab, et see on aluseline. (Pala et al., 2020)

*E. coli* baktereid määratakse tihti kindlaks vees, et otsustada nende kontsentratsiooni järgi kogu vee saastatuse üle. Selleks saab teha kasutades qPCR, väljakülvi või membraani filtratsiooni meetodeid, aga nende kõigi puuduseks on *E. coli* tuvastamiseks piisava koguseni kasvamiseks kuluv aeg. Ühtegi neist analüüsides ei saa teha kiiremini kui 18 tunniga. (Pala et al., 2020)



Joonis 5. Vasakul pool on MUG märgise struktuur. Paremal on fluoresseeruv produkt, mis saadakse märgise glükosiidsideme lagundamisel bakterite  $\beta$ -D-glükuronidaasi katalüüsil. (Pala et al., 2020)

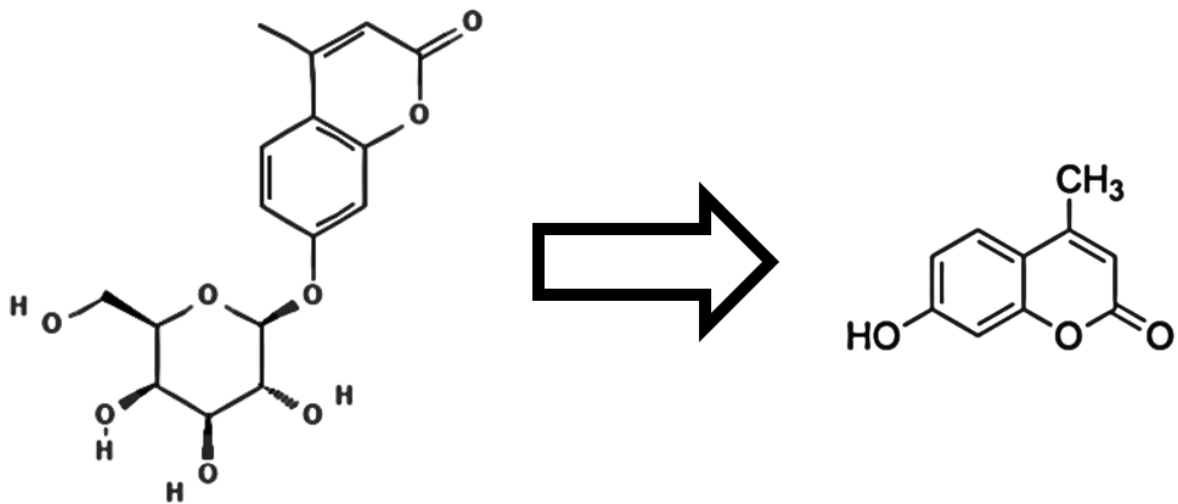
Varem on MUG-i kasutatud vortexil tehtud tilkades *E. coli* kasvu jälgimiseks. Vortexiga tilkade tegemiseks on vaja segada tuubi kokku bakterid vedelsöötmes ning uuritava märgis ja lisada sinna surfaktandi lahust õlis. Surfaktant on vajalik selleks, et tilgad oleksid stabiilsed, ilma selleta lagunevad nad kiiresti ära ja tuubis olevad õli ning vesi kihistuvad. Sellisel viisil vortexiga tehtud tilkasid vaadati mikroskoobis 9 tunni jooksul iga 30 minuti tagant. (Pala et al., 2020)

Kuna vortexil tehtud tilgad ei ole identse suurusega, tuleb sellisel juhul kasutada tilkade suuruse mõõtmiseks mikroskoobiga tavalisese valguse väljas väljas tehtud pilte. Bakterite kasvu kindlaksmääramiseks, mille järgi uuritava märgise efektiivsuse üle saab otsustada pimedas DAPI filtrit kasutades. (Byrnes et al., 2018; Pala et al., 2020)

Sellised tilgad jäävad stabiilseks rohkem kui 144 tunniks, mis tähendab, et neid saab kogu selle aja vältel inkubeerida ja meetod sobib ka *Escherichia colist* aeglasemalt paljunevate bakterite kasvu jälgimiseks. Vortexil tilkade tegemise eeliseks on meetodi kiirus, see võtab palju vähem aega, kui pumpade ja kiipidega identse suurusega tilkade valmistamine. (Byrnes et al., 2018; Freier & Hartman, 1987)

#### 1.2.4 MUGal

MUGal märgise abil saab tuvastada kolibaktereid tänu nende ensüümile beeta-galaktosidaasile, mis 4-metüülumbelliferüül-beeta-D-galaktopüranosiidi lagundab ja selle reaktsiooni käigus UV-valguses fluoresseeruvat 4-metüülumbelliferüüli toodab. Looduses katalüüsib ensüüm beeta-glükosiidsidemete lõhustamist aidates bakteril laktoosi glükoosiks ja galaktoosiks lõhustada. Fluorestsentsi saab näha samal lainepikkusel nagu MUG märgise oma, 450 nm. (Pala et al., 2020)



Joonis 6. Vasakul on MUGal määrgise struktuur ja paremal produkt, mis tekib määrgise lagudamisel. Parempoolsel pildil olev 4-metüülumbelliferüül tekitab UV valguses nähtava fluorestsentsi. (Pala et al., 2020)

MUGal määrgise kasutamisest mikrofluidika tilkades ei ole artikeid kirjutatud, aga seda kasutatakse bakterite tardsöötme koostisosana kasvu tuvastamiseks. Üks sellistest on kommertsiaalne MI-Broth Media komplekt. Komplektis on tahke agarsööde, millel kasvavad E. coli kolooniad muutuvad tänu söötmes olevale MUGal määrgisele siniselt fluoreseeruvaks. Sööde sisaldab ka antibiootikumi cefsulodin, mis inhibeerib Gram-positiivsete ja ka mõnede Gram-negatiivsete bakterite kasvu, mis võiksid muidu lisaks kolibakteritele määrgist lagundavaid ensüüme toota ja seeläbi valepositiivse tulemuse anda. Selle pH on 6,95. (Byrnes et al., 2018; Mary Jo Zimbro et al., n.d.)

## 2. Töö eesmärk

Käesoleva töö üldiseks eesmärgiks on leida mikrofluidika labori edaspidiseks tööks sobivaid fluorestsentsmärgiseid, mille abil saaks tuvastada bakterite kasvu vesi-õlis tilkades.

Konkreetseteks töö ülesanneteks oli uurida järgmiste märgiste kasutamist vesi-õlis tilkades bakterite kasvu tuvastamiseks:

- 1) 4-metüülumbelliferüül-beeta-D-glükuroniid (MUG)
- 2) 4-metüülumbelliferüül-beeta-D-galaktopüranosiid (MUGal)

### 3. Materjalid ja meetodid

Töös uuriti mikrobioloogias kasutatavate fluorestsentsmärgiste 4-metüülumbelliferüül-beeta-D-glükuroniid (MUG) ja 4-metüülumbelliferüül-beeta-D-galaktopüranosiid (MUGal) kasutamist tilga mikrofluidikas.

- Esimese etapina valmistati mikrofluidika kiip, mida edaspidi kasutati tilkade tegemiseks
- Selle kiibiga tehti baktereid sisaldavad vesi-õlis tilgad, et uurida MUG ja MUGal märgiste kasutamist
- Tilkasid mikroskopeeriti erinevatel ajapunktidel peale inkubeerimist
- Mikroskoobis tehtud pilte analüüsiti Cellprofiler tarkvaraga

#### 3.1 Kiibi valmistamine

Tilkade tegemiseks kasutati polüdimetüüsiloksaanist mikrofluidika kiipi, mis valmistati samuti töö raames. Referentsina kasutati polükarbonaadist kiipi, mille abil tehti vorm ja seejärel valati vormi uus kiip.

- Polüdimetüüsiloksaani (PDMS) segu SYLGARD 184 Silicone Elastomer Kit (Dow Corning, USA)
- Ahi DRY-Line® DL-53 (VWR®, USA)
- Polükarbonaadist mikrofluidika kiibi toorik (professor Piotr Garstecki töögrupi kingitus, Poola Teaduste Akadeemia, Füüsikalise Keemia Instituut)
- Biopsianõel (Agar Scientific Ltd, Suurbritannia)
- Perfluorooktüültri-klorosilaan (Alfa Aesar, USA)
- Tilga mikrofluidika õli EGC-1720 Novec™ Electronic Grade Coating (3MTM, USA)
- Corona süsteem BD-20AC (Electro-Technic Products Inc., USA) (Borók et al., 2021)
- Alusklaas mõõtmega 75x50x~1 (Corning®, USA)

##### 3.1.1 PDMS segu ettevalmistamine

Antud töös kasutatud mikrofluidika kiibid valmistati kohapeal mikrofluidika laboris. Kiip oli valmistatud PDMS-ist, mis oli kinnitatud alusklaasile. Kiibi tegemiseks kasutati PDMS segu. See koosneb põhivedelikust ja seda tahkeks muutvast reagentist, mida lisatakse 100g põhivedeliku kohta 10 g. Reagente segati plasttopsis, kuni need olid täielikult segunenud. Selle käigus tekib segusse palju õhumulle, millest vabanemiseks kasutati vaakumit. Tops seguga asetati tsentraalvaakumiga ühendatud eksikaatorisse ja käivitati pump. Kui segu oli tõusnud tpsi ääreni lülitati pump välja ja jäeti tops 30-40 minutiks eksikaatorisse seisma. Selle aja jooksul vajus segu alla ja õhumullid olid kadunud.

##### 3.1.2 Kiibi vormi valmistamine

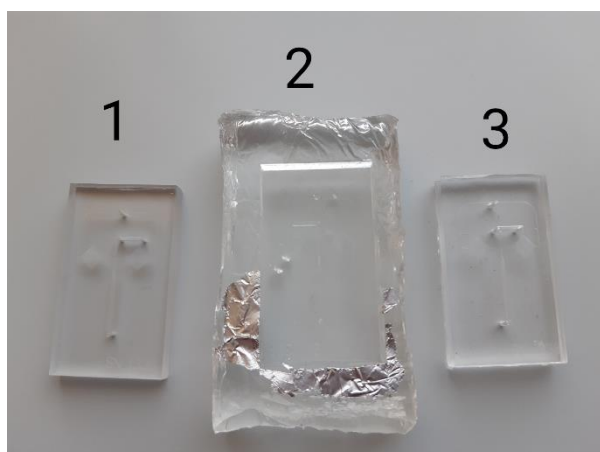
Vorm kiibi valamiseks tehti samuti PDMS segust. Selleks valati segu fooliumist vormitud anumasse, valati selle põhja õhuke kiht PDMS segu, lisati polükarbonaadist kiip ja valati peale 5 cm paksune PDMS segu kiht. Kui segu tekkimisel tekkisid õhumullid, eemaldati need pipetiotsaga. Seejärel hoiti vormi 60 min ahjus 120 °C juures, et see tarduks. Tardunud segu ümbert eemaldati foolium ja lõigati välja polükarbonaadist kiip.

Saadud vorm asetati kolmeks tunniks tõmbekapi all asuvasse eksikaatorisse koos kahe 1,5 ml tuubiga, milles mõlemas on 5 µl SILANE-t ning lülitati sisse vaakum. Pärast silaanimist ei jää vormi valatav PDMS segu enam selle külge kinni ja kiipi on võimalik vormist eraldada. Polükarbonaadist kiip saadi Professor Piotr Garstecki töögrupist, Poola Teaduste Akadeemia Füüsikalise Keemia Instituudist.

### 3.1.3 Kiibi valmistamine

Kiibi tegemiseks valati PDMS segu saadud vormi ja eemaldati pipetiotsaga tekkinud õhumullid. Kõige olulisem on, et mulle ei oleks kanalite läheduses. Seejärel asetati segu tunniks ajaks 120 °C ahju. Valmis kiip lõigati vormist välja, et see kergemini lahti tuleks tilgutati ääre alla metanooli.

Valmis kiibile torgati 1 mm biopsianõelaga neli auku voolikute ühendamiseks ja kinnitati alusklaasile mõõtmetega 75\*50\*1 mm. Kõigepealt asetati kiip ja klaas laminaari alla ning puhastati teibiga. Kiibi kinnitamiseks klaasile töödeldi nende pindasid Corona Electrode-ga (Borók et al., 2021) liigutades seadet 0,5 cm kaugusel pinnast 2 korda üle nende ja asetati kiip klaasi külge. Seejärel muudeti kiibi kanalid hüdrofoobseks viies kanalitesse süstlaga Novec™ 1720 Electronic Grade Coating reagent ning lastes vedeliku auramiseni tõmbekapi all seista.



Joonis 7. 1 - polükarbonaadist kiip, mida kasutatakse PDMS-ist vormide tegemiseks. 2 - PDMS-segust kiibi vorm, mis silaanitakse, et valatav kiip selle kuumutamise ajal selle külge kinni ei jääks. 3 - PDMS-segust kiip, mis on vormist välja võetud ning millesse on voolikute jaoks biopsianõelaga augud tehtud. Vedel PDMS pannakse fooliumist vormi ja selle sisse surutakse polükarbonaadist kiip nii, et kõik kanalid täituksid PDMS-iga. Seejärel kuumutatakse seda ahjus ja lõigatakse vormist välja. Saadud vorm silaanitakse ja edaspidi kasutatakse seda uute kiipide valmistamiseks. Selleks valatakse silaanitud vormi vedelat PDMS-i ja kuumutatakse. Silaanimine on vajalik selleks, et kiip vormi külge kinni ei jääks.

### 3.2 Bakterite kasvatamine ja määrgiste lisamine

- Surfaktant PFPE (professor Piotr Garstecki töögrupi kingitus, Poola Teaduste Akadeemia, Füüsikalise Keemia Instituut)
- 0,5 mm ja 0,8 mm läbimõõduga voolikud (Bohlander GmbH, Saksamaa)
- Stereomikroskoop SMZ-171 (Motic, Hiina)
- 2 pumpa SyringePump (New Era Instruments, USA)
- Süstlad diameetriga 7,29 mm Gastight® Syringes (Hamilton Co, USA)
- Tarkvara SyringePumpPro (SyringePumpPro, Austraalia)
- Spektrofotomeeter BioSpec-mini (Shimadzu, Jaapan)
- *Escherichia coli* bakterid, tüvi W3110
- Inkubaator Orbital shaker ES-20 (Biosan, Latvia)
- Vedelsööde The Luria Broth (Biomaxima, Poland)

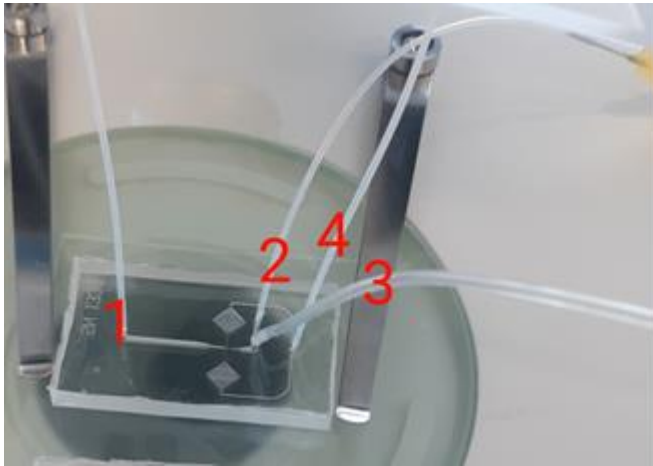
*Escherichia coli* (tüvi W3110) bakterite kultuur vedelsöötmes kasvas inkubaatoris 37°C juures segamisega 250 rpm üleöö. Kuna sellel tüvel on GFP kodeeritud kromosoomis, ei ole antibiootikumide lisamine vajalik ja bakterid on alati fluoreseeruvad. See on vajalik, sest GFP fluorestsentsi kasutatakse katses uuritavate määrgiste funktsionaalsuse hindamiseks. Kultuur oli 50 ml tuubis ja LB söödet oli 5ml. Katseks vajaliku lahjenduse arvutamiseks mõõdeti vedelsöötmes olevast kultuurist tehtud 100 ja 10 kordsete lahjenduste optiline tihedus plastküvetis lainepikkusel 600 nm. Mõõtmiseks kasutati spektrofotomeetrit BioSpec-mini (Shimadzu, Jaapan). Optilise tiheduse kaudu bakterite kontsentratsiooni arvutamiseks kasutati Agilent Genomics kalkulaatorit.



Vedelsöötmes olevat kultuuri lahjendati kontsentratsioonini  $5 \cdot 10^5$  CFU/ml ja lisati sellele fluorestsentsmärgist (õhes katses MUG ja teises MUGal) kontsentratsioonis 0,1 mg/ml nii, et segu oleks kokku 1 ml. MUG pulbrit hoiti +4°C juures külmkapis ja lahustati vees vahetult enne bakteritega segamist. Kõiki lahjendusi teostati laminaari all. Nii katsetati märgiseid MUG ja MUGal.

Saadud lahusest tehti mikrofluidika kiibi ja pumpade abil tilgad. Bakterite kontsentratsioon on valitud nii, et mõnedes tilkades oleksid bakterid ja teistes mitte. Tilkade saamiseks kasutati kahte SyringePump seadet Gastight® Syringes süstaldega, mille diameetrid olid 7,29 mm, stereomikroskoopi SMZ-171 ning arvutit. Protsessi kontrollimiseks olid pumbad ühendatud arvutiga, millesse oli installitud SyringePumpPro tarkvara nende juhtimiseks. Ühes pumbaga süstlas on alguses õli ja teises surfaktandi 2% lahus õlis. Esimese pumba liigutatava vedeliku voolukiirus oli 170  $\mu$ l/min ja teise oma 120  $\mu$ l/min.

Õli ja proovi viimiseks kiipi kasutati 0,5 mm voolikuid – lisaks õli ja vee liigutamisele kiipi oli sellega ühendatud süstlaga voolik, mille abil vajadusel kõik kiibis olev õhuga välja lükata ja 0,8 mm läbimõõduga voolik, mille kaudu valmis tilgad kiibist kogumistuubi liikusid. Tilkade tegemist jälgiti mikroskoobi all kontrollimaks, et need on ühesuursed.



Joonis 8. Voolikutega ühendatud kiip. 1 – õli sisaldava süstla ja pumbaga ühendatud voolik, millese tõmmatakse katse tegemisel proov. 2 – õhku täis süstlaga ühendatud voolik kiibi puhastamiseks vajadusel. 3 – valmis tilkade kogumise voolik. 4 – surfaktandi lahuse süstla ja pumbaga ühendatud voolik. Voolikust 1 siseneb proov kiipi, voolikust 4 liigub kiipi surfaktandi lahus õlis, mis pärast filtrite läbimist saab kokku prooviga ja tekivad vesi õlis tilgad. Vooliku 2 abil, mille otsas on õhuga süstal, saab vajadusel mustust mikrokanalitest välja puhuda.

Katsesegu imeti tuubist voolikusse pumba abil, millega ühendatud süstlas alguses õli oli. Seejärel ühendati voolik kiibiga ja pumbati selles olev bakterisegu kiipi. Samal ajal liikus mööda teist voolikut kiipi ka surfaktandi lahus ja vedelike kokkupuutel tekkisid tilgad, mis koguti 5 ml tuubi.

Valmis tilkadest võeti 10  $\mu$ l ja pipeteeriti Petri tassile, et vaadata neid uuesti mikroskoobi all ja veenduda, et tilgad on ühesuursed. Tilkasid vaadati mikroskoobi all kohe pärast tegemist, 1, 3, 6, 12 ja 24 tundi hiljem. 1 ja 3 tunni möödudes ei olnud muutuseid näha. Kuna MUGal märgisega oli pärast 6 tundi inkubeerimist näha, et bakterid on kasvanud ja märgise signaal intensiivsemaks muutunud, skaneeriti kogu kamber. MUG märgisega oli muutusi näha alles 12 tunni möödudes ja kogu kamber skaneeriti siis. Lisaks skaneeriti mõlema märgise puhul kogu kamber katse lõpetamisel, pärast 24 tunni möödumist.

### 3.3 Mikroskopeerimine

- Konfokaalmikroskoop Zeiss LSM 900 (ZEISS, Saksamaa)
- Tarkvara Zen 3.3 software (blue edition)

- Countess TM cell counting chamber slides (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific)

Analüüsi jaoks pipeteeriti osa tilkadest Countess TM cell counting chamber slides preparaadiklaasi kambrisse ja asetati konfokaalmikroskoobi preparaadilauale. Kasutati 10 kordse suurendusega objektiivi ja mikroskoopi juhiti sellega ühenduses oleva arvuti Zen tarkvara abil. Kogu kamber skaneeriti ja pildistati 36-44 pildina. Tilkasid pildistati LSM 900 skanneeriva laseriga mikroskoobiga, kasutades ZEN 3.3 (blue edition) tarkvara järgnevate sätetega:

1. 10X suurendusega objektiiv, Plan-Apochromat 10x (NA 0.45)
2. Kasutatud laserid 405 nm ja 488 nm
3. Sinise kanali ergastus on 396 nm juures ja emissioon mõõdetakse 410-470 nm vahemikus
4. Rohelises kanalis toimub ergastus 395 nm juures ja emissioon mõõdetakse 500-700 nm vahemikus

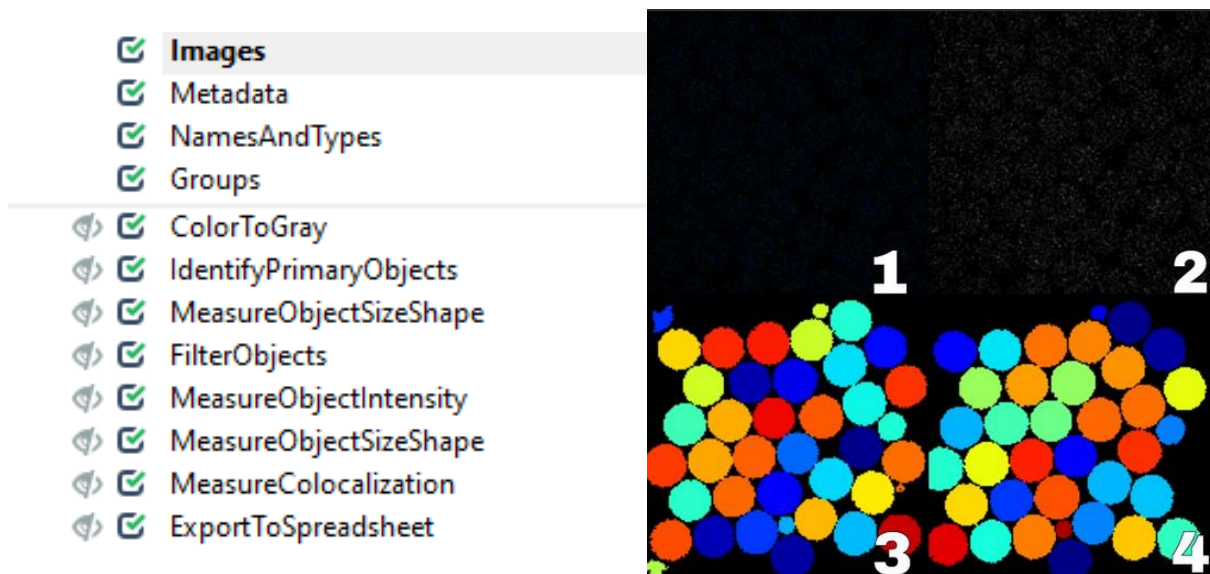
Protseduuri korrati kui tilgad olid inkubaatoris 37°C juures olnud ja bakteritel oli olnud aega kasvada.

### 3.4 Pildi ja andmeanalüüs

- Tarkvara CellProfiler (USA, Eli and Edythe L. Broad Institute of MIT and Harvard) <https://cellprofiler.org/>

Piltide analüüsimiseks kasutati tarkvara CellProfiler ja varem mikrofluidika laboris välja töötatud CellProfiler-i protokolle. (Bartkova et al., 2020; Sanka et al., 2021)

Programmi sisestatakse konfokaalmikroskoobiga tehtud pildid, kus on korraga näha bakteritest tulev roheline ja nende kasvu näitava makeri sinine signaal, üks selline pilt on joonise 4 esimene pilt. Analüüsi alguses eraldatakse pildil olevad roheline ja sinine signaal teineteisest ning tehakse saadud pildid mustvalgeks. 4. joonise teisel pildil on näha eraldatud sinist signaali värvituna mustvalgeks. Eraldamise järel tuvastatakse piltidelt kõik objektid, mida on näha 4. joonise kolmandal pildil. Sellisel pildil mõõdetakse objektide suurus ja kuju ning filtreeritakse välja need, mis ei ole ümmargused, näiteks pildi äärde jäänud poolikud tilgad. Ka teistest väiksemad ja suuremad tilgad jäävad analüüsist välja. Allesjäänud ümmargused objektid on 4. joonise neljandal pildil. Pärast filtreerimist loetakse need kokku ning mõõdetakse uuesti nende kõigi suurus ja emiteeritava valguse intensiivsus igas tilgas eraldi. Tulemused väljastatakse tabelina, kus on näha, mitu tilka proovis oli ja milline on iga tilga emiteeritav valgus. Roheline signaal on kontrolliks, sest rohelist valgust emiteerivad GFP-ga bakterid ja sinine valgus tuleb testitavast märgisest.



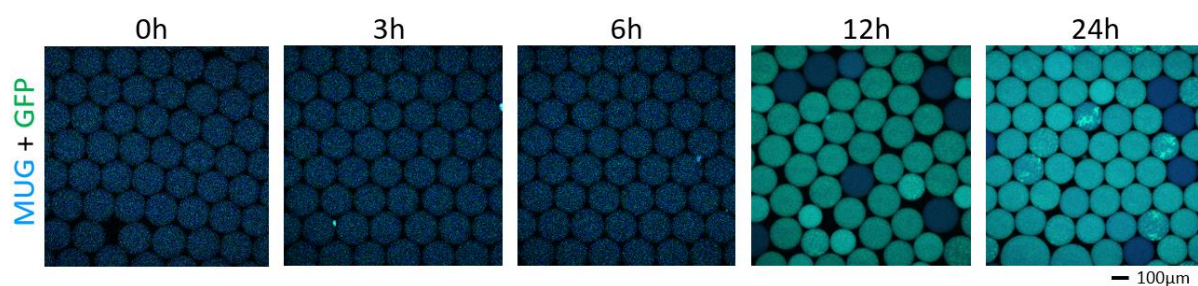
Joonis 9. CellProfiler tarkvara toimimiseeskiri, kus on näha, mida ja, millises järjekorras tarkvara sisestatud piltidega teeb. 1 – Mikroskoobis tehtud pilt, millel on koos sinise ja rohelise kanali enk GFP ja uuritava märgise signaal. Pilt on sellisena nagu seda analüüsiks kasutati. 2 – ainult sinine kanal märgise signaaliga, tarkvara muudab kõik analüüsitavad pildid must-valgeks, 3 – tarkvara poolt pildilt leitud objektid, 4 – tarkvara eemaldab analüüsitavalt pildilt muu kujuga objektid ja analüüsib ainult ümmargusi.

Edaspidi näidatud mikroskoobi piltidel on heledust Microsoft Word programmis 70% suurendatud, et neid visuaalselt parem vaadata oleks. Andmeanalüüsiks on kasutatud töötlemata pilte.

## 4. Tulemused

Töö eesmärk oli leida sobivaid mikrobioloogia märgiseid bakterite kasvu tuvastamiseks tilkades. Selleks testida kahte märgist: MUG ja MUGal. Mõlemat märgist lisati vedelsöötmes kasvavatele bakteritele ja tehti sellest lahusest vesi-õlis tilkade emulsioon. Tilkasid inkubeeriti 37°C juures, et nende sees olevad bakterid paljuneksid ja muudaks märgise substraadi nähtavaks produktiks. Kui baktereid oli inkubeeritud 3, 6 ja 12 tundi, mikroskopeeriti tilkasid uuesti ning kui oli näha signaali muutumist intensiivsemaks, skaneeriti konfokaalmikroskoobiga kogu preparaadikamber, et saadud pilte hiljem Cellprofiler tarkvaraga analüüsida. Tulemuste analüüsil on **negatiivsed tilgad** kõik need, kus baktereid ei ole või on nii vähe, et nad ei ole veel tuvastatavad. **Positiivsed tilgad** on need, mille signaal on võrreldes algsega intensiivsemaks muutunud ehk, milles on bakterid kasvanud.

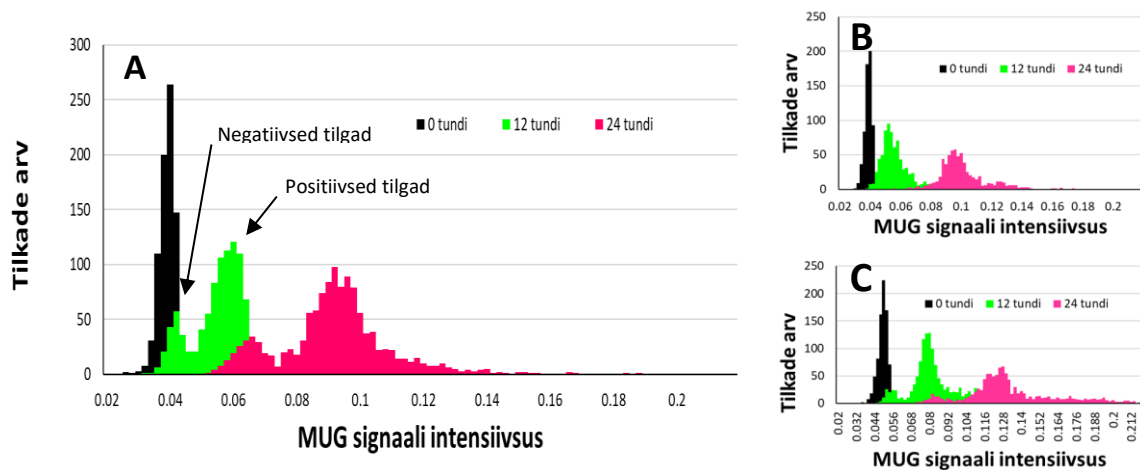
### 4.1 MUG märgisega *E. coli* kasvu tuvastamine tilkades



Joonis 10. Tilkade pildid mikroskoobis kohe pärast tegemist, 3, 6, 12 ja 24 tundi hiljem. Joonisel on sinises kanalis pildistatud uuritava märgise fluorestsents ja rohelises kanalis pildistatud GFP fluorestsents koos. Alates 12 tunnist on näha, et osa tilkasid jäävad samasuguseks ja teistes hakkab signaal intensiivsemaks muutuma, seal on toimunud bakterite kasv ja need tilgad annavad positiivse signaali.

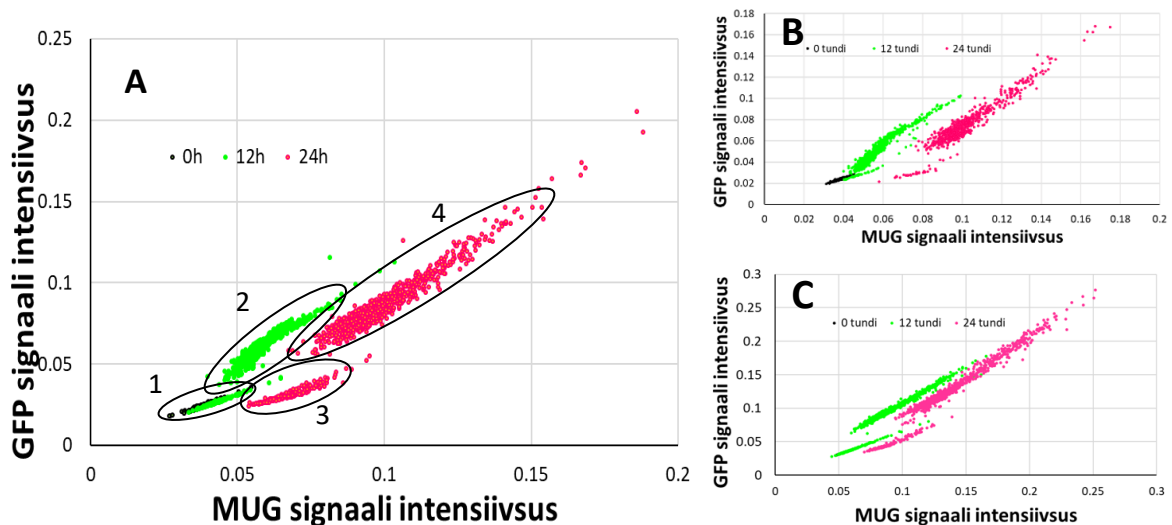
Joonisel 10 on näha, kuidas fluoresseeruv signaal ajas muutub. Alguses on kõik tilgad negatiivsed, mis tähendab, et neis ei ole baktereid või on nii vähe, et signaali ei ole veel näha. 3 tunni möödudes tilkasid mikroskoobis vaadates on kõik tilgad ikka veel negatiivsed ja ühtegi tugevama signaaliga tilka veel ei ole. Samasugune on olukord ka pärast 6-tunnist inkubeerimist. Alles 12-tunnise inkubeerimise järel tehtud mikroskopeerimisel on näha, et bakterid on kasvanud ja märgist lagundanud, mille tulemusena on osades tilkades intensiivsem signaal kui teistes. 24 tunni möödudes on kõik signaalid veel intensiivsemad.

Edaspidised mõõtmised on tehtud 12 ja 24 tunni möödudes, sest 12 tunniga on näha esimese signaali teket ja katse lõpetati 24 tunni möödudes.



Joonis 11. MUG signaali intensiivsus kohe pärast tilkade tegemist, 12 ja 24 tundi hiljem. X-teljel on sinises kanalis mõõdetava MUG märgise signaali intensiivsus ja y-teljel vastava tugevusega fluoreseerunud tilkade arv. Kolmel graafikul A, B ja C on näidatud kolme korduskatse tulemusi. 12 tunni pärast tehtud mõõtmisel, mille tulemused on märgitud rohelisega, tähistab vasakpoolne küür negatiivseid tilkasid, milles ei ole baktereid kasvanud ja parempoolne küür positiivseid tilkasid, milles on bakterid kasvanud ja signaal intensiivsemaks muutunud. Samamoodi on ka 24 tunni pärast tehtud mõõtmisel, mille tulemused on tähistatud roosaga.

MUG-i signaali põhjal on kasvavate bakteritega tilgad eristatavad tühjadest tilkadest 12h möödudes. Mustaga on graafikul tähistatud kohe pärast märgise lisamist ja tilkade tegemist sinises kanalis mõõdetud signaal. Siis on kõigil tilkadel sarnane signaali intensiivsus, sest üheski ei ole bakterid veel paljuneda jõudnud ja kõik tilgad on negatiivsed. 12 tundi hiljem tehtud mõõtmisel jagunevad tilgad juba kahte ossa. Parempoolses osas on positiivsed tilgad, mille sees kasvavad bakterid ja põhjustavad sellega signaali intensiivistumist, vasakpoolses osas on negatiivsed, ilma bakteriteta tilgad. 24 tundi hiljem tehtud mõõtmisel on signaal veel intensiivsemaks muutunud ja tühjade ning bakteritega signaalide keskmised intensiivsused on üksteisest kaugemal, aga ikkagi ei ole need täielikult lahus. Keskele jäävad ikka tilgad, mille emiteeritava valguse põhjal ei saa öelda, kas neis kasvavad bakterid või mitte. Korduskatsetel negatiivsete ja positiivsete tilkade suhe varieerub, kuna bakterite algne kontsentratsioon oli veidi erinev.

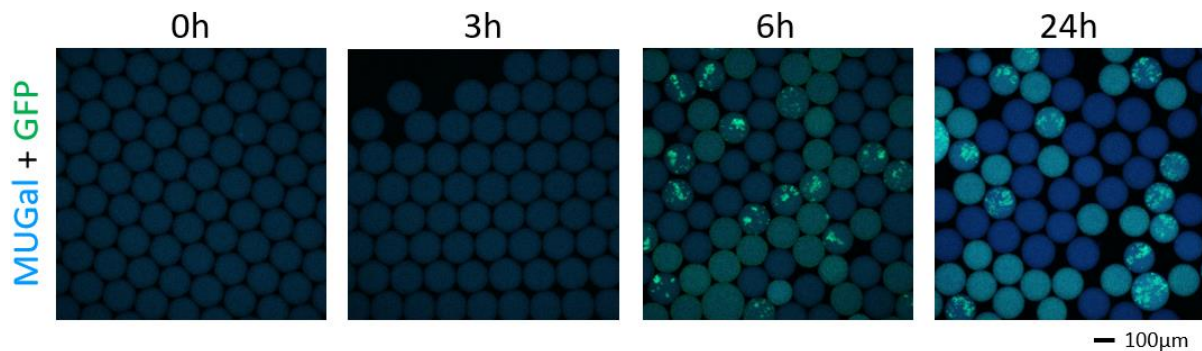


Joonis 12. Sinise ja rohelise signaali intensiivsus 0, 12 ja 24 tundi pärast tilkade tegemist. X-teljel on sinises kanalis mõõdetud MUG märgise signaal ja y-teljel rohelises kanalis mõõdetud GFP signaal. Kolmel graafikul A, B ja C on näidatud kolme korduskatse tulemusi. Mustaga on tähistatud kohe pärast tilkade tegemist mõõdetud signaalid, rohelisega 12 tundi hiljem tehtud mõõtmiste tulemused ning roosaga 24-tunnise inkubeerise järel mõõdetud signaalid. Number 1-ga on tähistatud

negatiivsed tilgad esimesel mõõtmisel. 2-ga Positiivsed tilgad pärast 12 tunnist inkubeerimist. 3-ga negatiivsed tilgad 24 tunni pärast, nende signaali intensiivsus on tõusnud. 4-ga on tähistatud pärast 24-tunnist inkubeerimist mõõdetud positiivsed signaalid.

12 tunni pärast hakkavad positiivsed tilgad negatiivsetest eralduma ja 24 tunni pärast on nad paremini eraldunud. Number 1-ga on tähistatud kohe pärast tilkade tegemist mõõdetud tilkade signaali intensiivsused. Need on negatiivsed tilgad ja ideaalis peaks kõik negatiivsed tilgad sinna jääma. Number 2-ga on tähistatud 12 möödudes tehtud mõõtmise positiivsed, baktereid sisaldavad tilgad. Number 3-ga on tähistatud 24 tunni möödudes tehtud mõõtmisel negatiivse signaaliga tilkade moodustatud pilv ning number 4-ga 24 tunni möödudes mõõdetud baktereid sisaldavate tilkade pilv. 12 tunni möödudes on tühjad tilgad lähedal algele negatiivsele väärtusele, aga negatiivsete ja positiivsete tilkade pilved ei ole üksteisest lahus. Y-teljel, kus tilgad paigutuvad GFP signaali järgi hakkavad pilved teineteisest juba eralduma, aga x-teljel, kus tilkade asukoha määrab MUG signaal, kattuvad pilved väga palju. Pärast 24 tundi inkubeerimist, kui bakteritel on olnud aega kasvada, on positiivsete ja negatiivsete tilkade pilved y teljel, GFP signaali järgi, lahus. X-teljel MUG signaali järgi on aga isegi seal kattuv osa. Lisaks kasvab MUG signaal ajaga iseeneslikult. Seda näitab kolmanda pilve liikumine paremale poole.

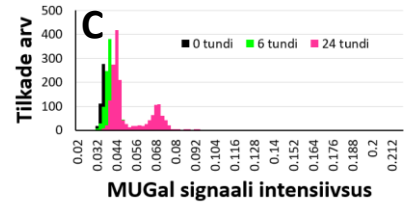
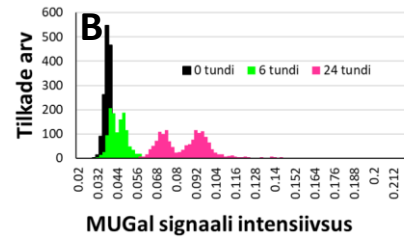
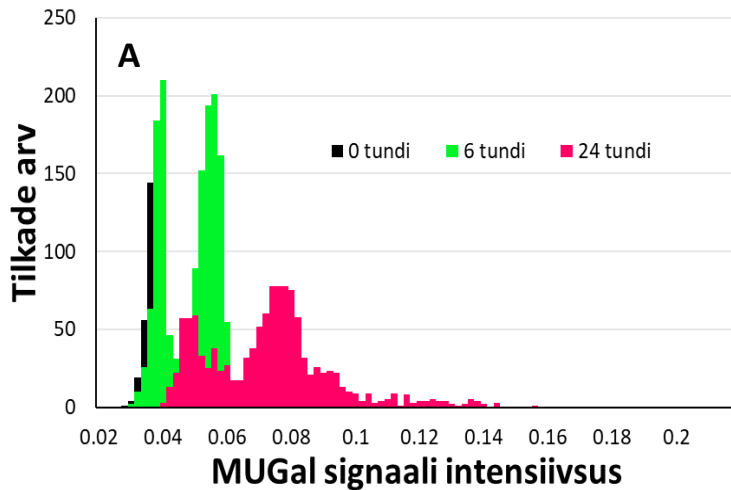
#### 4.2 MUGal märgisega *E. coli* kasvu tuvastamine tilkades



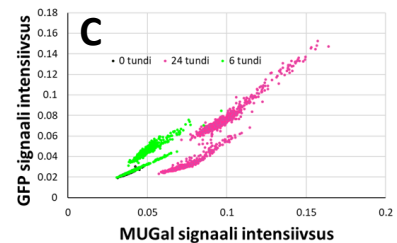
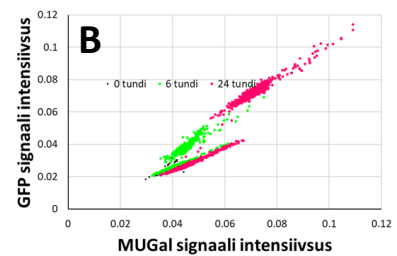
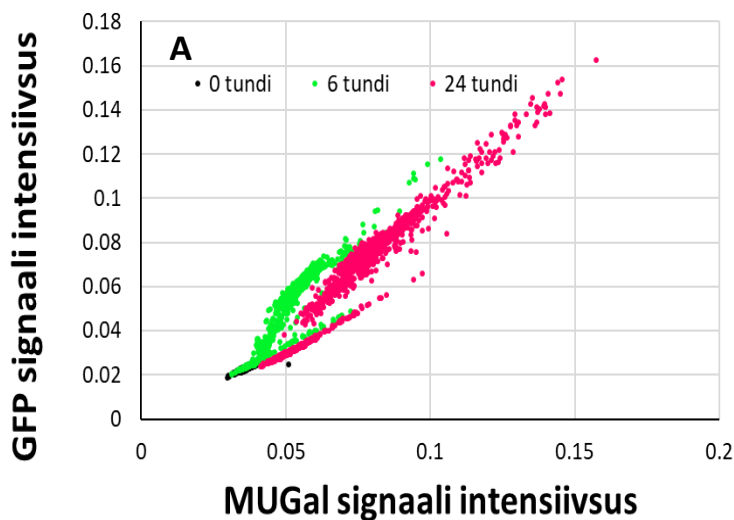
Joonis 13 Tilgade pildid mikroskoobis kohe pärast tegemist, 1, 3, 6 ja 24 tundi hiljem. Joonisel on sinises kanalis pildistatud uuritava märgise fluorestsents ja rohelistes kanalis pildistatud GFP fluorestsents koos. Joonisel olevate piltide heledust on suurendatud, et neid silmaga heledas toas parem vaadata oleks. Cellprofiler programmiga analüüsiks on kasutatud originaalpilte. Alates 6 tunnist on näha, et osa tilkasid jäävad samasuguseks ja teistes hakkab signaal intensiivsemaks muutuma, seal on toimunud bakterite kasv ja need tilgad annavad positiivse signaali.

MUGal märgis töötab kiiremini kui MUG. Esimesel kahel mõõtmisel ei ole näha sinist ega rohelist signaali. Kui tilkade tegemisest on möödunud 6 tundi ja bakterid on kasvanud ning märgist lagundanud, on näha, et signaal muutub intensiivsemaks. Pärast 24 tunnist inkubeerimist on signaalid kõigis tilkades veel intensiivsemaks muutunud. Sellepärast on edaspidisteks katseteks tehtud mõõtmised pärast 6-tunnist inkubeerimist, kui on näha esimest signaali ja pärast 24 tundi katse lõpetamisel, et võrrelda tulemusi MUG märgisega.





Joonis 14. MUGal signaali intensiivsus kohe pärast tilkade tegemist, 6 ja 24 tundi hiljem. X-teljel on sinises kanalis mõõdetava MUGal märgise signaali intensiivsus ja y-teljel vastava tugevusega fluoreseerunud tilkade arv. Kolmel graafikul A, B ja C on näidatud kolme korduskatse tulemusi. 6 tunni pärast tehtud mõõtmisel, mille tulemused on märgitud rohelisega, tähistab vasakpoolne küür negatiivseid tilkasid, milles ei ole bakterid kasvanud ja parempoolne küür positiivseid tilkasid, milles on bakterid kasvanud ja signaal intensiivsemaks muutunud. Samamoodi on ka 24 tunni pärast tehtud mõõtmisel, mille tulemused on tähistatud roosaga.



Joonis 15. Sinise ja rohelise signaali intensiivsus 0, 6 ja 24 tundi pärast tilkade tegemist. Kolmel graafikul A, B ja C on näidatud kolme korduskatse tulemusi. X-teljel on sinises kanalis mõõdetud MUGal märgise signaal ja y-teljel rohelises kanalis mõõdetud GFP signaal. Mustaga on tähistatud kohe pärast tilkade tegemist mõõdetud signaalid, rohelisega 12 tundi hiljem tehtud mõõtmiste tulemused ning roosaga 24-tunnise inkubeerise järel mõõdetud signaalid.

Pärast 6-tunnist inkubeerimist mikroskopeerimisel nähtav erinevus on tingitud peamiselt GFP signaali suurenemisest. Graafikul all paremal on tilgad, mida on pildistatud kohe pärast tegemist. Seal on kõik tilgad negatiivsed, sest baktereid on väga vähe. Rohelise peale sinisega märgitud tilgad on pildistatud 6 tundi hiljem. Pärast 6 tunnist inkubeerimist on näha, et bakterid on kasvanud ja neid sisaldavate tilkade pilv hakkab tühjade tilkade pilvest eralduma. See toimub aga peamiselt tänu GFP signaalile y-teljel. X-teljel, kus on huvialuse MUGal märgise signaal, kattuvad pilved peaaegu täielikult. 24 tunni möödudes on tühjade ja bakteritega tilkade pilved teineteisest eraldunud tänu GFP-le. Ka MUGal signaal on bakteritega tilkades tugevam kui tühjadel ja bakteritega tilkadel on x-teljel väga suur ühine ala, mis tähendab, et selle märgise põhjal ei ole võimalik teha piiri, millise intensiivsusega signaal peaks olema, et kinnitada või välistada bakterite kasv tilgas. Sarnaselt MUG-le toimub ka siin tühjade tilkade signaali intensiivistumine.

## 5. Arutelu

Käesolevas töös uuriti MUG ja MUGal märgiste kasutamist tilga mikrofluidikas bakterite kasvu tuvastamisel. MUG märgisega on bakteritega tilkade signaali intensiivistumine näha 12 ja MUGal märgisega 6 tunni pärast. Täiusliku tulemuse korral peaksid tühjad ja bakteritega tilgad olema üksteisest täielikult eraldunud ja tühjade tilkade signaal sama madal kui enne inkuberimist.

Mõlema märgisega on tilgad skaneeritud kohe pärast tegemist ja järgmine kord siis, kui on näha signaali – MUG märgisega toimus see pärast 12 tunnist inkubeerimist ja MUGal märgisega juba 6 tunni pärast, mille tõttu on ka analüüsitavad pildid tehtud varem. Joonistelt 12 ja 15 on näha, et 12 ja 6 tunni pärast tehtud piltidel on bakterid kasvanud ja positiivsed tilgad hakkavad negatiivsetest eralduma. Positiivsetes tilkades kasvavad bakterid ja nende ensüümide toimel märgised lagundatakse. Need tilgad, millesse tilkade tegemisel ühtegi bakterit ei sattunud, jäävad lõpuni negatiivse signaaliga. See peaks olema sama väikese intensiivsusega nagu enne inkubeerimist, aga graafikutelt on näha, et 24 tunni pärast on ka negatiivne signaal intensiivsemaks muutunud. Referentsina on kasutatud GFP signaali kuna see ei saa kuidagi tilkade vahel liikuda, kuna asub bakteri sees. Uuritud märgised MUG ja MUGal on aga lahustatud vees. Pärast seda kui märgis bakteritega tilgas nende ensüümide toimel lagundatakse ja see fluoreseeruma hakkab, võib see tilkade vahel lekkida ja sattuda nendesse tilkadesse, kus baktereid ei ole. Nii tekib valepositiivne signaal.

Teine põhjus, miks signaal tühjades tilkades intensiivsemaks võib muutuda on substraadi iseeneslik muundumine fluoreseeruvaks produktiks. Kuna kumbki märgis ei ole vees eriti stabiilne, on need lahustatud vahetult enne tilkade tegemist. Bakterite kasvamine aga vajab aega ja 24-tunnise inkubeerimise ajal võib tilkades olev märgis iseenesest laguneda. Nii tekib fluoreseeruv produkt ilma bakteriteta.

Esimesel mõõtmisel, kui signaal alles tugevnema hakkab, on negatiivsed tilgad sama intensiivse signaaliga nagu katse alguses enne inkubeerimist pildistatud tilgad. Negatiivsed ja positiivsed hakkavad üksteisest eralduma, aga nende keskele jääb suur ala, kus ei ole veel võimalik öelda, kas tilgas on bakterid või mitte. Teisel mõõtmisel, mis toimus pärast 24-tunnist inkuberimist, on positiivsete ja negatiivsete tilkade keskmised intensiivsused üksteisest kaugemal ja nende vahel olevasse piirkonda, kus ei ole võimalik märgise signaali põhjal bakterite kasvu üle otsustada jääb palju vähem tilkasid kui esimesel mõõtmisel. Täiuslikult lahus ei ole piigid ka siis. Probleemiks hakkab aga kerkima valepositiivne signaal. Tühjade tilkade emiteeritava signaali intensiivsus tõuseb oluliselt, selle põhjusteks võivad olla varem kirjeldatud iseeneslik märgise lagunemine, mille tulemusena tekib fluorestsents või produkti leke tilkade vahel.

Kuigi mõlemad märgised leکید tilkade vahel, on bakterite kasv nende abil tuvastatav, sest tilkades, kus bakterid tegelikult kasvavad on fluorestsents intensiivsem. Seda võib seletada see, et lekke või iseenesliku lagunemise tulemusena on kõigis tilkades võrdne signaal ja bakterite toimel tekkinud fluorestsents lisandub sellele. MUG märgis töötab aeglasemalt ja sellega läheb substraadist fluoreseeruva signaali tekkimiseks 12 tundi. MUGal märgise eeliseks on kiirem reaktsioon, mille tulemusena on fluorestsents tuvastatav juba 6 tunni möödudes. Graafikutel 12 ja 15 näha olev roheline kanali GFP signaali muutumine intensiivsemaks võib tulla sellest, et sinisel ja rohelisel värvil on sarnased lainepikkused. Kui sinine signaal on vähe intensiivne, võib see anda lisafotoneid ka rohelisse kanalis. MUG märgisega 12 tundi ja MUGal märgisega 6 tundi pärast tilkade valmistamist tehtud piltide analüüsi põhjal võib öelda, et nende märgistega saab baktereid mikrofluidika tilkades tuvastada, aga siiani läbiviidud katsete tulemusel ei saa kindlalt öelda, et kõik positiivsed signaalid on ikka õiged. Enne märgise kasutuselevõtmist peaks veel tegema täiendavaid kontrollkatseid või täiustama tilga analüüsi meetodeid.



## Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli leida mikrofluidika labori edasiseks tööks mikrobioloogia märgiseid, mille abil saaks tuvastada bakterite kasvu vesi-õlis tilkades. Uuriti kahte fluoreseeruvat märgist - 4-metüülumbelliferüül- $\beta$ -D-glükuroniidi (MUG) ja 4-metüülumbelliferüül- $\beta$ -D-galaktopüranosiidi (MUGal). Katseid tehti tilkadega, mille tegemiseks kasutati kiipi ning mikrofluidika pumпасid. Kiip tehti PDMS-ist kasutades polükarbonaadist referentskiipi. Tilkade saamiseks segati õli ja vedelsöötmes kasvavad bakterid koos märgisega. Saadud tilkasid inkubeeriti ja vaadeldi mikroskoobi abil erinevatel ajapunktidel alates tilkade tegemisest kuni 24h möödumiseni. Tehtud pilte analüüsiti Cellprofiler tarkvara abil varem laboris väljatöötatud protokolle kasutades.

Töö tulemustest selgub, et nii MUG, kui ka MUGal märgisega on bakterite kasv tuvastatav. MUGal märgisega toimub reaktsioon kiiremini ja intensiivsemat signaali on näha juba pärast 6 tunnist inkubeerimist. MUG märgise ensümaatiliseks lagundamiseks kulub kasvavatel bakteritel kauem aega ja signaali intensiivistumist on näha alles pärast 12 tunnist inkubeerimist tehtud mikroskopeerimisel. Preparaadikambris olevate skaneerimisel saadud piltide analüüsimisel tarkvaraga selgus, et kuigi 6 (MUGal märgis) ja 12 tunni (MUG märgis) pärast tehtud mõõtmistel on positiivne signaal negatiivsest eristatav, on see veel üsna nõrk ja selle järgi ei saa kindlalt iga tilga kohta öelda, kas selles bakterid kasvavad või mitte. Mõlema märgisega tilkasid pärast 24 tunnist inkubeerimist uuesti pildistades ning neid pilte analüüsid on positiivne ja negatiivne signaal üksteisest palju paremini eristatavad, kuigi ka siis ei ole need täielikult lahus. Keskele jäävad ikka tilgad, milles bakterite kasv ei ole kindlaks määratud. Lisaks hakkab 24 tunni pärast tehtud piltide analüüsil probleemiks kerkima kasvav signaal tühjades tilkades. Kuna märgised on lahustatud vees, võib selle põhjuseks fluoreseeruva produkti lekkimine tilkade vahel. Kuna märgised ei ole vees lahustatuna eriti stabiilsused on ka võimalik, et need lagunevad iseenesest tekitades valepositiivse signaali.

Uuritud märgiste kasutamine bakterite tuvastamiseks mikrofluidika tilkades on võimalik, aga nende töös esineb veel puudujääke. Mikrofluidika töögrupis jätkatakse nende uurimisega.

## Abstract

The main purpose of this Bachelor thesis was to find microbiological labels for future work of microfluidics group, which could be used to detect bacterial growth in microfluidics droplets. Two fluorescent labels, 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide (MUG) and 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (MUGal), were investigated. Experiments were performed with monodispersed droplets made using a chip and microfluidics pumps. The chip was made from PDMS using a polycarbonate reference chip. The oil and the bacteria growing in the liquid medium were mixed to obtain the droplets. The resulting droplets were incubated and observed under a microscope at different timepoints from the beginning of the droplet generation until 24h later. All images were analyzed using CellProfiler software using protocols previously developed in the laboratory.

The results of the work reveal that bacterial growth can be detected with both MUG and MUGal labels. With the MUGal marker, the reaction occurs faster and a more intense signal is visible already after 6 hours of incubation. It takes longer for growing bacteria to enzymatically degrade the MUG label, and signal intensification is only visible by microscopy after 12 hours of incubation. Analyzing the images obtained from the scanning on the cell counting chamber microscope slide with the software revealed that although the positive signal is distinguishable from the negative in the measurements made after 6 (MUGal label) and 12 hours (MUG label), it is still quite weak and it cannot be said with certainty for each drop whether it contains bacteria grow or not. By reimaging the drops with both labels after 24 hours of incubation and analyzing these images, the positive and negative signals are much more distinguishable from each other, although even then they are not completely separated. There are still drops in the middle, in which the growth of bacteria has not been determined. On the other hand the increasing signal in the empty drops starts to become a problem in the analysis of the images taken after 24 hours. Since the labels are dissolved in water, this may be due to leakage of the fluorescent product between the drops. Since the labels are not particularly stable when dissolved in water, it is also possible that they break down by themselves, creating a false positive signal.

It is possible to use the studied markers to identify bacteria in microfluidics droplets, but there are still shortcomings in their work. The microfluidics working group will continue to investigate them.

## Kasutatud kirjandus

- Agresti, J. J., Antipov, E., Abate, A. R., Ahn, K., Rowat, A. C., Baret, J. C., Marquez, M., Klibanov, A. M., Griffiths, A. D., & Weitz, D. A. (2010). Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(9), 4004–4009. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910781107>
- Alonzo, L. F., Hinkley, T. C., Miller, A., Calderon, R., Garing, S., Williford, J., Clute-Reinig, N., Spencer, E., Friend, M., Madan, D., Dinh, V. T. T., Bell, D., Weigl, B. H., Nugen, S. R., Nichols, K. P., & Le Ny, A. L. M. (2022). A microfluidic device and instrument prototypes for the detection of *Escherichia coli* in water samples using a phage-based bioluminescence assay. *Lab on a Chip*, *22*(11), 2155–2164. <https://doi.org/10.1039/d1lc00888a>
- Autour, A., & Ryckelynck, M. (2017). Ultrahigh-throughput improvement and discovery of enzymes using droplet-based microfluidic screening. In *Micromachines* (Vol. 8, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/mi8040128>
- Bartkova, S., Vendelin, M., Sanka, I., Pata, P., & Scheler, O. (2020). Droplet image analysis with user-friendly freeware CellProfiler. *Analytical Methods*, *12*(17), 2287–2294. <https://doi.org/10.1039/d0ay00031k>
- Boitard, L., Cottinet, D., Bremond, N., Baudry, J., & Bibette, J. (2015). Growing microbes in millifluidic droplets. In *Engineering in Life Sciences* (Vol. 15, Issue 3, pp. 318–326). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400089>
- Borók, A., Laboda, K., & Bonyár, A. (2021). PDMS bonding technologies for microfluidic applications: A review. In *Biosensors* (Vol. 11, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/bios11080292>
- Braissant, O., Astasov-Frauenhoffer, M., Waltimo, T., & Bonkat, G. (2020). A Review of Methods to Determine Viability, Vitality, and Metabolic Rates in Microbiology. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.547458>
- Byrnes, S. A., Phillips, E. A., Huynh, T., Weigl, B. H., & Nichols, K. P. (2018). Polydisperse emulsion digital assay to enhance time to detection and extend dynamic range in bacterial cultures enabled by a statistical framework. *Analyst*, *143*(12), 2828–2836. <https://doi.org/10.1039/c8an00029h>
- Choi, J., Jeong, H. Y., Lee, G. Y., Han, S., Han, S., Jin, B., Lim, T., Kim, S., Kim, D. Y., Kim, H. C., Kim, E. C., Song, S. H., Kim, T. S., & Kwon, S. (2017). Direct, rapid antimicrobial susceptibility test from positive blood cultures based on microscopic imaging analysis. *Scientific Reports*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01278-2>
- Chou, W. L., Lee, P. Y., Yang, C. L., Huang, W. Y., & Lin, Y. S. (2015). Recent advances in applications of droplet microfluidics. In *Micromachines* (Vol. 6, Issue 9, pp. 1249–1271). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/mi6091249>
- Christopher, G. F., & Anna, S. L. (2007). Microfluidic methods for generating continuous droplet streams. In *Journal of Physics D: Applied Physics* (Vol. 40, Issue 19). <https://doi.org/10.1088/0022-3727/40/19/R01>
- Das, S., Shibib, D. R., & Vernon, M. O. (2017). The new frontier of diagnostics: Molecular assays and their role in infection prevention and control. *American Journal of Infection Control*, *45*(2), 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2016.08.005>

- Freier, T. A., & Hartman, P. A. (1987). Improved Membrane Filtration Media for Enumeration of Total Coliforms and *Escherichia coli* from Sewage and Surface Waterst. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 53, Issue 6).
- Kaminski, T. S., Scheler, O., & Garstecki, P. (2016). Droplet microfluidics for microbiology: Techniques, applications and challenges. In *Lab on a Chip* (Vol. 16, Issue 12, pp. 2168–2187). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c6lc00367b>
- Kang, D. K., Ali, M. M., Zhang, K., Huang, S. S., Peterson, E., Digman, M. A., Gratton, E., & Zhao, W. (2014). Rapid detection of single bacteria in unprocessed blood using Integrated Comprehensive Droplet Digital Detection. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms6427>
- Kulesa, A., Kehe, J., Hurtado, J., Tawde, P., & Blainey, P. C. (n.d.). *Supplementary Information for Combinatorial Drug Discovery in Nanoliter Droplets Tables S1-S2 Captions for Movies S1-S3 Captions for Datasets S1-S5 References for SI reference citations.* <https://doi.org/10.1073/pnas>
- Luo, T., Fan, L., Zhu, R., & Sun, D. (2019). Microfluidic single-cell manipulation and analysis: Methods and applications. In *Micromachines* (Vol. 10, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/mi10020104>
- Mary Jo Zimbro, E., David Power, M. A., Miller, S. M., George Wilson, M. E., & Julie Johnson, M. A. (n.d.). *Difco & BBL Manual Manual of Microbiological Culture Media Second Edition.*
- Pala, L., Sirec, T., & Spitz, U. (2020). Modified enzyme substrates for the detection of bacteria: A review. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 16). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules25163690>
- Sanka, I., Bartkova, S., Pata, P., Smolander, O. P., & Scheler, O. (2021). Investigation of Different Free Image Analysis Software for High-Throughput Droplet Detection. *ACS Omega*, 6(35), 22625–22634. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c02664>
- Scheler, O., Kaminski, T. S., Ruszczak, A., & Garstecki, P. (2016). Dodecylresorufin (C12R) Outperforms Resorufin in Microdroplet Bacterial Assays. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 8(18), 11318–11325. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b02360>
- Scheler, O., Postek, W., & Garstecki, P. (2019). Recent developments of microfluidics as a tool for biotechnology and microbiology. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 55, pp. 60–67). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.08.004>
- Shang, L., Cheng, Y., & Zhao, Y. (2017). Emerging Droplet Microfluidics. In *Chemical Reviews* (Vol. 117, Issue 12, pp. 7964–8040). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00848>
- Song, H., Chen, D. L., & Ismagilov, R. F. (2006). Reactions in droplets in microfluidic channels. In *Angewandte Chemie - International Edition* (Vol. 45, Issue 44, pp. 7336–7356). <https://doi.org/10.1002/anie.200601554>
- Taylor, D., Verdon, N., Lomax, P., Allen, R. J., & Titmuss, S. (2022). Tracking the stochastic growth of bacterial populations in microfluidic droplets. *Physical Biology*, 19(2). <https://doi.org/10.1088/1478-3975/ac4c9b>
- Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. In *Nature* (Vol. 442, Issue 7101, pp. 368–373). <https://doi.org/10.1038/nature05058>



**Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks<sup>1</sup>**

Mina \_\_\_\_\_ (autori nimi)

Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on \_\_\_\_\_,

(juhendaja nimi)

- 1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

1. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

2. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

\_\_\_\_\_ (kuupäev)

<sup>1</sup> Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingulise tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtajaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.