

Sławomir Jakięta

.....
imię i nazwisko

ZAŁĄCZNIK 2A

**AUTOREFERAT WNIOSKODAWCY PRZEDSTAWIAJĄCY OMÓWIENIE OSIĄGNIĘCIA
NAUKOWEGO ZGŁASZANEGO JAKO PRZEDMIOT POSTĘPOWANIA HABILITACYJNEGO
I POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH**

Warszawa, dnia 24.10.2016

Załącznik nr 2a - Autoreferat

Spis treści

1	Życiorys	3
1.1	Imię i nazwisko.....	3
1.2	Posiadane dyplomy i stopnie naukowe	3
1.3	Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	3
2	Osiągnięcie naukowe	4
2.1	Tytuł osiągnięcia naukowego	4
2.2	Lista publikacji przedstawionych jako osiągnięcie naukowe.....	4
2.3	Opis osiągnięcia naukowego	5
3	Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych	16
3.1	Tematyka badań będących przedmiotem mojego zainteresowania przed uzyskaniem stopnia doktora.....	16
3.2	Tematyka badań będących przedmiotem mojego zainteresowania po uzyskaniu stopnia doktora	16
3.3	Perspektywy dalszego rozwoju - własna grupa badawcza	17
3.4	Podsumowanie dorobku naukowego.....	18
4	Bibliografia	18

Sławomir Jakiela

1 Życiorys

1.1 Imię i nazwisko

Sławomir Roman Jakieta

1.2 Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

- 2007 Doktor nauk chemicznych w zakresie chemii
INSTYTUT KATALIZY I FIZYKOCHEMII POWIERZCHNI
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
"Emisja akustyczna drewna w obiektach zabytkowych pod wpływem fluktuacji klimatu" - rozprawa obroniona z wyróżnieniem 19.04.2007r
promotor: Prof. dr hab. Roman Kozłowski
- 2003 Magister
Instytut Fizyki UNIWERSYTETU JAGIELLOŃSKIEGO
"Rezonans stochastyczny w kondensacie Bosego-Einsteina"
Magna cum Laude
promotor: Prof. dr hab. Jakub Zakrzewski

1.3 Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- od X.2014 Adiunkt
SZKOŁA GŁÓWNA GOSPODARSTWA WIEJSKIEGO W WARSZAWIE
WYDZIAŁ TECHNOLOGII DREWNA
KATEDRA FIZYKI, ZAKŁAD BIOFIZYKI
Warszawa
- XI. 2010 - XII.2015 Adiunkt
INSTYTUT CHEMII FIZYCZNEJ POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Warszawa
- XI.2009 - X.2010 Asystent
INSTYTUT CHEMII FIZYCZNEJ POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Warszawa
- IX.2007 - X.2008 Postdoc Fellowship
UNIVERSITY OF LONDON, BIRKBECK COLLEGE
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL SCIENCES
Londyn
- VI. 2007 - XII.2009 Asystent
INSTYTUT KATALIZY I FIZYKOCHEMII POWIERZCHNI POLSKIEJ AKADEMII NAUK
KRAKÓW

Sławomir Jakieta

2 Osiągnięcie naukowe

2.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

"Mechanika przepływów dwufazowych w zaawansowanych laboratoriach biologiczno-chemicznych w mikroskali."

Powyższe osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane w formie jednotematycznego cyklu publikacji. Oświadczenie współautorów publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego i kopie publikacji habilitanta zawarte są w Załącznikach Z-4 i Z-5.

2.2 Lista publikacji przedstawionych jako osiągnięcie naukowe

- A1. **Sławomir Jakiela**, Tomasz S. Kaminski, Olgierd Cybulski, Piotr Garstecki, "Parallel micro-chemostats in an automated droplet microfluidic system", 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences 2011, MicroTAS 2011, Volume 3, pp. 2083-2085, (2011)
ISBN: 978-161839595-5
- A2. **Sławomir Jakiela**, Sylwia Makulska, Piotr M. Korczyk, Piotr Garstecki, "Speed of flow of individual droplets in microfluidic channels as a function of the capillary number, volume of droplets and contrast of viscosities", Lab on a Chip, vol. 11, pp. 3603-3608, (2011),
Impact Factor: 5.670, MNiSW: 32, liczba cytowań: 20
- A3. **Sławomir Jakiela**, Piotr M. Korczyk, Sylwia Makulska, Olgierd Cybulski, Piotr Garstecki, "Discontinuous transition in a laminar fluid flow: a change of flow topology inside a droplet moving in a micron-size channel", Physical Review letters, vol. 108, pp. 134501, (2012),
Impact Factor: 7.943, MNiSW: 45, liczba cytowań: 12
- A4. Sylwia Makulska, **Sławomir Jakiela**, Piotr Garstecki, "A micro-rheological method for determination of blood type", Lab on a Chip, vol. 13, pp. 2796-2801, (2013),
Impact Factor: 5.748, MNiSW: 40, liczba cytowań: 6
- A5. **Sławomir Jakiela**, Tomasz S. Kaminski, Olgierd Cybulski, Douglas B. Weibel, Piotr Garstecki, "Bacterial growth and adaptation in microdroplet chemostats", *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 52, pp. 8908-8911, (2013),
Impact Factor: 11.336, MNiSW: 45, liczba cytowań: 24

A6. Sławomir Jakiela,

"Measurement of the hydrodynamic resistance of microdroplets",

Lab on a Chip, vol. 16, pp. 3695-3699, (2016),

Impact Factor: 5.586, MNIŚW: 40, liczba cytowań: 0

2.3 Opis osiągnięcia naukowego

2.3.1 Wstęp

Przewodnim tematem moich badań w ostatnich latach były, i są nadal, złożone laboratoria mikroprzepływowe wykorzystywane do badań w mikroskali. Jednak by móc skutecznie tworzyć takie laboratoria i je automatyzować potrzebne jest zrozumienie praw mechaniki opisujących ruch dwóch niemieszających się faz. Tutaj skupię się tylko na wycinku mojej dotychczasowej pracy naukowej, zawartej w sześciu publikacjach, które opisują sposób poznania funkcji rządzących przepływem w mikrokropeli, a potrzebnych do skonstruowania złożonego eksperymentu mającego na celu badanie nabywania odporności przez bakterie na antybiotyki.

Natura, z punktu widzenia fizyka, jest leniwa - dąży do równowagowych stanów, w lokalnych minimach energetycznych. Dotyczy to również kropeł, które jeśli zostaną wytworzone, czy to na zasadzie kondensacji, czy w układzie dwufazowym będą minimalizowały swoją powierzchnię. W niemieszających się układach dwufazowych formowanie kropli odbywać się może w złączu typu T - kanały krzyżują się zgodnie z kształtem litery T. Wprowadzając w takim złączu, np. olej i wodę, do odpowiednio dwóch różnych końców krzyżujących się kanałów i uruchamiając przepływy, otrzymamy krople wody płynące w oleju (Okushima et al. 2004; Garstecki et al. 2006; Clegg et al. 2016). Opis tworzenia się uporządkowanego ruchu fazy rozproszonej w fazie ciągłej można znaleźć w publikacjach Thorsen et al. 2001, Anna et al. 2003. Wynika z nich, że wielkość otrzymanej kropli zależy przede wszystkim od stosunku przepływów obu faz, a także od ich lepkości i międzyfazowego napięcia powierzchniowego. Jednak mechanizm, który tłumaczy zjawisko tworzenia kropli w złączu typu T - urywania się fazy rozproszonej spowodowane przez fazę ciągłą przy laminarnych przepływach obu cieczy - został podany kilka lat później (Garstecki et al. 2006). Z punktu widzenia użytkownika, ważne jest by zadać odpowiednie przepływy w obu cieczach, tak by tworzące się krople były jak najbardziej powtarzalne - by otrzymać monodispersyjny rozkład objętości kropeł (Okushima et al. 2004; Tan et al. 2006; Chu et al. 2007). Ważne jest również, by w trakcie ruchu fazy wodnej nie występował efekt zwilżania ścian kanału (de Gennes et al. 2004) - można to osiągnąć poprzez odpowiedni dobór materiału, w którym wykonujemy układ mikroprzepływowy, a także za pomocą chemicznej modyfikacji powierzchni mikrokanalu (Jankowski et al. 2011).

Krople w układach mikroprzepływowych przyjmują objętości od pL (pikolitrow) do μL (mikrolitrow), a ich rozmiary i wielkości głównie zależą od kształtu przekroju poprzecznego i wymiarów kanału przepływowego (Theberge et al. 2010; Pompano et al.

2011). Tak małe krople wykorzystuje się jako pojedyncze bioreaktory, w których w sposób ściśle kontrolowany można przeprowadzać eksperymenty chemiczne, czy biologiczne. Zaletami wykorzystania takiego bioreaktora w mikroprzepływie są przede wszystkim małe objętości substratów biorących udział w reakcji oraz szybkie i efektywne mieszanie wewnątrz kropli, w której w trakcie ruchu tworzą się wiry. Wykorzystując te zalety oraz pamiętając, że większość protokołów wykonywanych podczas analiz i syntez chemicznych oparta jest na płynnych substratach, a kropla jako bioreaktor, dla wspomnianych procesów, wydaje się być idealnym narzędziem (Murthy et al. 2002; Hansen and Quake 2003; Li 2005; Churski et al. 2010 - B6; Dolega et al. 2012 - B8; Jakiela et al. 2013 - A6; Czekalska et al. 2015 - B15).

Odczyt informacji o przemianach zachodzących w kropli poruszającej się wewnątrz mikrokanatu można zrealizować na zasadzie pomiaru absorpcji (Jakiela et al. 2013 - A6), a także fluorescencji (Ryu et al. 2011). Pomimo krótkiej drogi optycznej - pomiaru dokonuje się zwykle w poprzek kanału - wspomniane techniki znakomicie się sprawdzają. Metoda fluorescencyjna umożliwia nawet obserwację odpowiednio zmodyfikowanych pojedynczych komórek, które pułapkuje się w mikrokroplach (Debs et al. 2012; Mazutis et al. 2013).

Na kroplach wykonuje się szereg operacji, począwszy od ich wytworzenia, poprzez łączenie, dzielenie, sortowanie, na odczycie informacji kończąc (Churski et al. 2010 - B6; Theberge et al. 2010; Pompano et al. 2011; Abate et al. 2011; Jakiela et al. 2013 - A6; Kaminski et al. 2016). Komplikacja protokołów analiz i syntez chemicznych oraz biologicznych wymaga pełnej kontroli nad każdą mikrokroplą. Z pomocą przychodzi automatyzacja przepływów, która sprowadza się do uruchamiania i zamykania przepływów różnych faz, tak by osiągnąć żądany efekt. Przykładowo, wygenerowanie kropli o określonej długości w zautomatyzowanym układzie mikroprzepływowym na złączu typu T, wymaga trzech kroków: i) zablokowania przepływu fazy ciągłej - zamykamy zawór, który steruje jej przepływem, ii) otwarcia przepływu fazy wodnej - do głównego kanału wpływa czoło fazy wodnej - otwieramy zawór, który steruje jej przepływem, iii) zablokowania przepływu fazy wodnej, a otwarcia przepływu fazy ciągłej - w kanale urywamy kroplę, której długość (objętość) zależy od czasu trwania punktu ii (Churski et al. 2010; Jakiela et al. 2014 - B14).

Automatyzacja przysparza jednak trudności. Wyobraźmy sobie, że w sieci kanałów chcemy szybko połączyć dwie krople o różnej objętości, które poruszają się w kanałach o różnych przekrojach poprzecznych. Sytuacja byłaby prosta, gdyby obie krople poruszały się z tymi samymi prędkościami. Niestety mają różne prędkości, a ich szybkość poruszania się zależy od parametrów fizyczno-chemicznych i mechanicznych, takich jak lepkość, długość, obecność surfaktantu, geometria kanału czy wielkość liczby kapilarnej. Oczywiście można umieścić dodatkowe czujniki, które będą kontrolowały łączenie się mikroreaktorów. Nie jest to jednak rozwiązanie szybkie, nie tylko z powodu braku miejsca na wszystkie czujniki w układzie mikroprzepływowym, ale także ze względu na inercję płynu i wzrost prawdopodobieństwa kontaktu kropli ze ścianą mikrokanatu, co skutkować będzie zakażeniem krzyżowym pomiędzy kroplami. Dlatego wymagane jest poznanie zależności fizycznych i mechanicznych, które mają wpływ na szybkość poruszania się kropli, tak by niewielką liczbą czujników móc sterować w sposób płynny wszystkimi operacjami

w zminiaturyzowanych układach laboratoryjnych. Zagadnienie to zostanie opisane poniżej w prezentowanym osiągnięciu naukowym.

2.3.2 Mikrochemostat kropelkowy (dot. A1)

Klasyczny chemostat w mikrobiologii (Novick and Szilard 1950) zapewnia stałą wymianę medium (pożywka wraz z kolonią bakterii wypływa z układu, a wpływa świeżażywka), tak by zachować stałą liczebność hodowanej populacji mikroorganizmów. W ten sposób można badać wpływ zmiennego środowiska chemicznego na bakterie, drożdże, czy algi (Chait et al. 2007). Istotnym problemem w takich hodowlach jest pojawiający się biofilm i koszt odczynników, jakie trzeba zużyć w doświadczeniu. Przyjmując założenia chemostatu klasycznego, zbudowałem układ eksperymentalny, który w mikrokropeli - bioreaktorze umożliwiał hodowlę mikroorganizmów z kontrolowaną (w pewnym zakresie) liczebnością kolonii.

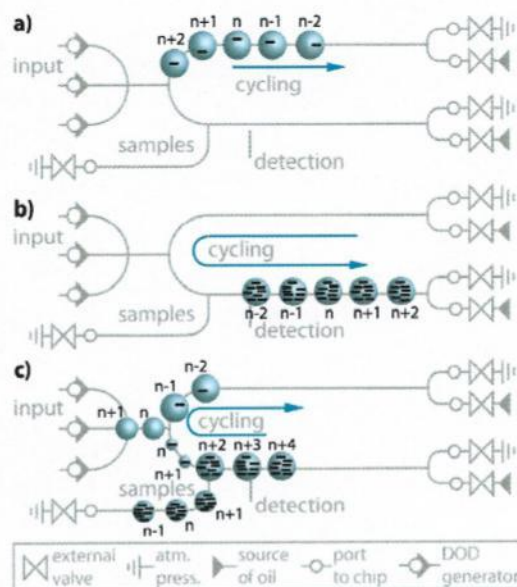
Zaproponowane przez ze mnie rozwiązanie nie zapewniało stałej liczebności populacji, ale umożliwiał wymiany chemostatowe, tzn. część kropli zawierającej bakterie była zabierana, a na to miejsce podawano świeżążywkę. Powodowało to rozwój drobnoustrojów w określonym reżimie liczebności.

Doświadczenie polegało na wygenerowaniu określonej liczby mikrokropli zawierających: początkową kolonię bakterii *Escherichia Coli*, żywkę umożliwiającą wzrost bakteriom i zadane stężenia antybiotyku (różniące się pomiędzy kroplami), a następnie poddaniu tak wygenerowanego ciągu kropli (tzw. pociągu) obróbce automatycznej. Na kroplach przeprowadzono następujące operacje: i) odczyt gęstości optycznej za pomocą spektrofotometru (na zasadzie pomiaru absorbancji wzdłuż kanału) - odczyt przebiegał w jednym miejscu układu mikroprzepływowego, a każda kropla była skanowana co minutę, ii) podział objętości kropli w różnych stosunkach - część kropli usuwano z układu mikroprzepływowego, a druga pozostawała do dalszych badań, iii) łączenie - na miejsce zabranej części kropli dołączono kroplę zawierającą świeżążywkę, bądź żywkę z antybiotykiem, tak by końcowa objętość była stała w czasie całego eksperymentu (rys.1).

W pracy A1 przedstawiłem wyniki pozwalające stwierdzić, że takie rozwiązanie działa poprawnie - poziom liczebności bakterii można zmieniać sterując wymienianą objętością kropli. Ponadto wykazałem, że z dużą dokładnością można w takim układzie utrzymać, bądź zmieniać stężenie antybiotyku w zaprogramowany sposób.

Działający układ eksperymentalny generował jednak błędy: krople nie dzieliły się zawsze tak jak to zostało zaplanowane, a podczas długich czasów inkubacji następowało ich łączenie. Uniemożliwiał to działanie układu eksperymentalnego bez operatora, który w razie konieczności przerywał wykonanie programu i wprowadzał "ręcznie" zmiany. Powodem tego stanu, nie był zły algorytm, ale brak pełnej wiedzy o tym, jak zależy prędkość poruszania się kropli od jej lepkości (która w trakcie eksperymentu ulegała zmianie ze względu na wzrost kolonii bakterii oraz zmienianie stężenia antybiotyku) i od szybkości przepływu fazy ciągłej.

7
Sławomir Jakieła



Rysunek 1) Schemat działania układu do analizy uodparniania się bakterii tzw. chemostat kropelkowy. a) Generacja pociągu kropli. b) Inkubacja i odczyt gęstości optycznej - pozwalamy populacji bakterii osiągnąć zadaną wielkość. c) Podział kropli na dwie składowe: jedną usuwamy z układu, a drugą pozostawiamy do dalszych badań i dopełniamy ją do zadanej objętości świeżą pożywką, bądź pożywką z antybiotykiem. Źródło A1.

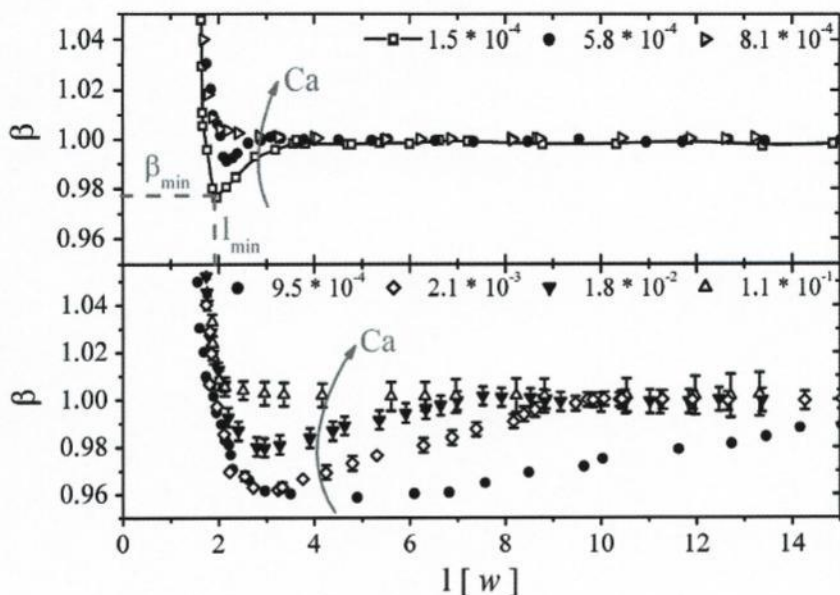
2.3.3 Mobilność kropli w kanale mikroprzepływowym o przekroju kwadratowym (opis A2)

Mobilność kropli (β) to stosunek prędkości kropli poruszającej się w kanale do średniej wartości prędkości oleju. W celu wyznaczenia tej wielkości zaproponowałem technikę pomiarową A2 opartą na obserwacji prostego kanału za pomocą kamery liniowej pracującej z szybkością 70 tys. obrazów na sekundę. Cały system, oprogramowałem w LabView, by móc analizować wyniki w czasie rzeczywistym. Układ eksperymentalny umieściłem w termostатовanym pojemniku. Pojedyncza kropla poruszała się w kanale o przekroju kwadratowym i generowana była przy wykorzystaniu techniki kropli na żądanie (DOD - droplet on demand).

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów pokazują, że mobilność kropli jest złożoną funkcją szybkości poruszania się fazy ciągłej (czyli zależy od liczby kapilarnej¹ - Ca), długości kropli w kanale (l), oraz stosunku lepkości kropli do lepkości oleju. Gdy faza rozproszona ma lepkość mniejszą od fazy ciągłej (tutaj: heksadekan $\mu_o \sim 3cP$), małe krople, których długość jest porównywalna z szerokością kanału, poruszają się znacznie szybciej niż średnia prędkość oleju. Następnie wraz ze wzrostem długości kropli jej mobilność osiąga minimum. Dla dalszego wzrostu długości fazy wodnej obserwowałem asymptotyczne dążenie mobilności kropli do jedności. Minimum występujące dla małych liczb kapilarnych (wolny przepływ) jest

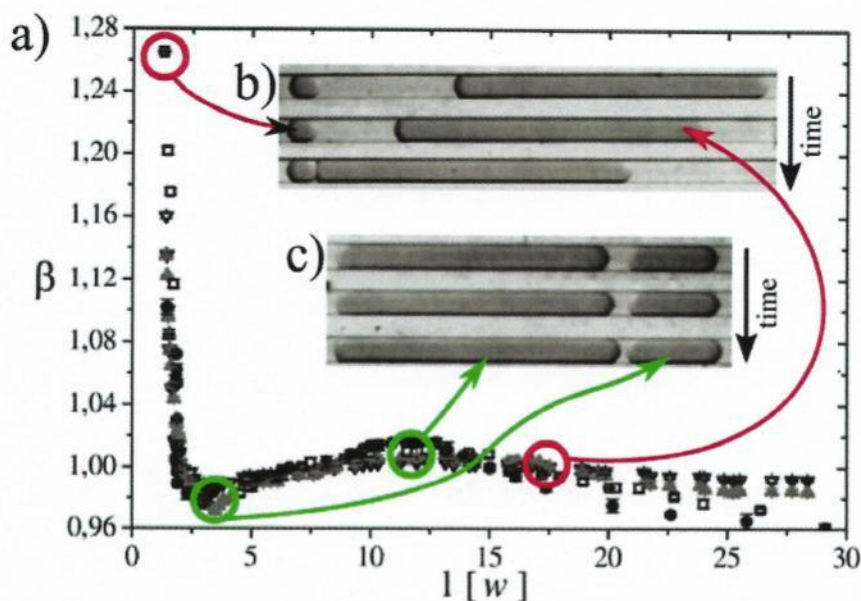
¹ liczbę kapilarną definiujemy jako stosunek sił lepkościowych do sił kapilarnych i wyrażamy wzorem $Ca = \mu v / \gamma$, gdzie μ - to lepkość dynamiczna, v - charakterystyczna prędkość przepływu, a γ - to międzyfazowe napięcie powierzchniowe pomiędzy płynącymi fazami (bądź między cieczą i gazem dla przepływu jednofazowego)

wąskie, i staje się coraz płytsze wraz ze wzrostem przepływu oleju. Następnie dla wartości $Ca = 8.1 \cdot 10^{-4}$ staje się niewidoczne - mobilność kropli maleje hiperbolicznie do jedności. Dalszy wzrost liczby kapilarnej powoduje ponowne pojawienie się minimum mobilności kropli, które następnie zanika wraz z dalszym wzrostem liczby kapilarnej - Rys. 2.



Rysunek 2) Wykres zależności mobilności kropli (woda destylowana $\mu_d \sim 1 \text{ cP}$) od jej długości dla różnych liczb kapilarnych. Wykres górny przedstawia funkcję mobilności dla liczb kapilarnych mniejszych bądź równych $8.1 \cdot 10^{-4}$, z kolei wykres dolny przedstawia mobilność kropli dla liczb kapilarnych większych od $8.1 \cdot 10^{-4}$. Długość kropli l wyrażono jako wielokrotność szerokości kanału - w . Przepływ odbywał się w prostym kanale o przekroju kwadratowym: $360 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m}$, a fazą ciągłą był heksadekan. Źródło A3.

Interesujący wynik otrzymałem dla lepkości kropli równej lepkości oleju. Funkcja pokazująca zależność mobilności kropli od jej długości posiada minimum i maksimum, odpowiednio dla 3.5 i 12 długości szerokości kanału (w). Zakłada się, że małe krople poruszają się szybciej niż długie krople, co w ogólności jest prawdą. Jednak jak wykazały badania, w przypadku takich samych lepkości faz olejowej i wodnej, długa kropla poruszająca się w kanale może dogonić krótszą - rys. 3.



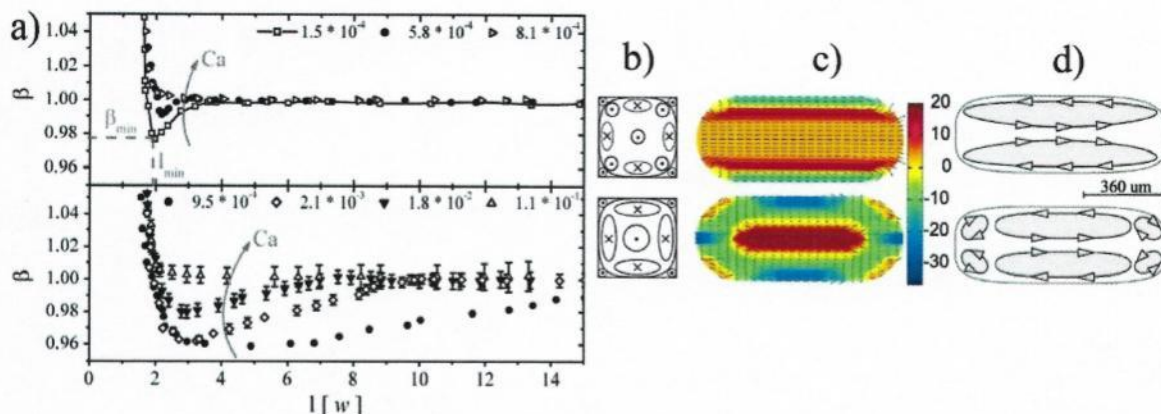
Rysunek 3) a) Wykres zależności mobilności kropli (mieszanka wody destylowanej i gliceryny $\mu_d \sim 3 \text{ cP}$) od jej długości dla czterech liczb kapilarnych z przedziału od 10^{-4} – 10^{-1} . Przepływ odbywał się w prostym kanale o przekroju kwadratowym: $360 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m}$, a fazą ciągłą był heksadecan ($\mu_o \sim 3 \text{ cP}$). b) i c) Przedstawiają klatki z filmu, na którym poruszają się krople o zadanej długości (długość kropli wskazana na wykresie kolorowymi strzałkami). Skala czasu na trzech ujęciach w b) i c) biegnie w dół, a kierunek przepływu fazy ciągłej skierowany jest na prawo. b) Mała kropla $l = 1.5 \mu\text{m}$ dogania dużą kroplę $l = 17 \mu\text{m}$. c) Duża kropla $l = 12 \mu\text{m}$ dogania mniejszą kroplę $3.5 \mu\text{m}$. Źródło A2.

2.3.4 Topologia wirów wewnątrz kropli (opis A3)

W związku ze zmianą położenia minimum funkcji mobilności kropli wraz ze zmianą jej długości dla różnych wartości liczby kapilarnej zaprojektowałem eksperyment, który miał odpowiedzieć na pytanie, co może być przyczyną tak przebiegającego zjawiska. W celu uzyskania odpowiedzi wykorzystałem technikę obrazowania małych poruszających się cząstek (z ang. PIV - Particle Image Velocimetry) zawieszonych wewnątrz kropli, a wzbudzanych do świecenia światłem emitowanym przez diodę LED. Ustawiając głębię ostrości mikroskopu na różnych głębokościach wewnątrz kropli wyznaczyłem topologie wirów w jej wnętrzu. Zaobserwowałem dwa obszary, w których dla liczb kapilarnych mniejszych od $Ca = 8.1 \cdot 10^{-4}$ wiry układały się wzdłuż kropli, analogicznie jak zauważył Kinoshita et al. 2007. Na wykresie zależności mobilności kropli od jej długości, tej topologii odpowiada wąskie minimum - rys.4 (górne wykresy i obrazy). Po przekroczeniu wartości liczby kapilarnej $Ca = 8.1 \cdot 10^{-4}$ pojawiała się inna topologia wirów - zbliżona do najczęściej spotykanych w literaturze (Lindken et al. 2009; Baroud et al. 2010) - centralny wir i dwa dużo mniejsze: jeden z przodu, a drugi z tyłu kropli. Na wykresie mobilności kropli od jej długości, dla tej konfiguracji wirów, widoczne jest wówczas szerokie i płaskie minimum - rys.4 (dolne wykresy i obrazy).

Dalsze badania nad zmianą topologii wykazały, że opisany efekt występuje dla lepkości kropli mniejszych od lepkości oleju. Dla kropli, dla których lepkość jest taka sama, bądź większa od lepkości oleju nie obserwujemy już tego zjawiska.

Zaobserwowane przeze mnie zjawisko zostało ostatnio potwierdzone w pracy Hein et al. 2015.



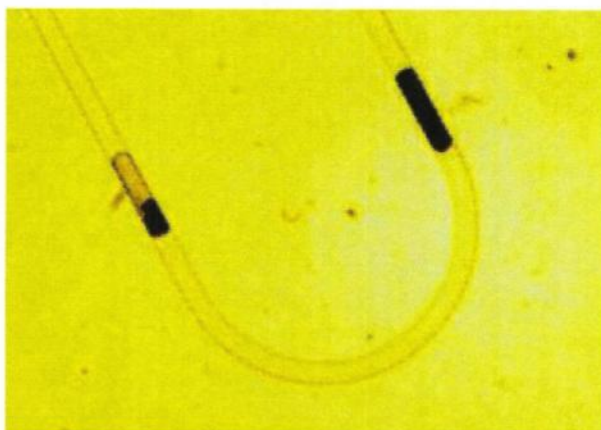
Rysunek 4) a) Zależność mobilności kropli od jej długości dla różnych wartości liczb kapilarnych. b) Topologia rozkładu pola prędkości w przekroju poprzecznym środka kropli - kropka obrazuje wektor prędkości skierowany do oglądającego wykres, z kolei krzyżyk obrazuje wektor prędkości o zwrocie przeciwnym. c) Topologia rozkładu pola prędkości wzdłuż środka kropli - kolor czerwony jest tożsamy z polem prędkości skierowanym zgodnie z przepływem oleju, z kolei kolor niebieski obrazuje przepływ skierowany przeciwnie do przepływu oleju. d) Grafika przedstawia schematycznie rozkład cyrkulacji wzdłuż środka kropli i jest tożsama z c). Źródło A3.

2.3.5 Zastosowanie wirów do wykrywania aglutynacji (opis A4)

Znajomość topologii wirów wskazała na możliwość separacji materiału zawartego wewnątrz kropli (dla kanałów o przekroju kwadratowym). Okazało się, że wykorzystanie pierwszej topologii rozkładu wirów dla kropli poruszającej się z liczbą kapilarną mniejszą od $Ca = 8.1 * 10^{-4}$ powodowało, że duże cząstki zawarte wewnątrz kropli nie były w stanie nadążyć za polem prędkości cieczy i były spychane na koniec kropli - rys.5. Dla większych liczb kapilarnych obserwowane zjawisko nie było już tak efektywne, by móc je ocenić wizualnie.

W pracy A3 wykorzystałem topologię rozkładu wirów do oznaczania grup krwi. Łącząc kroplę pełnej krwi z kroplą zawierającą odpowiednie przeciwciała: Anty-A lub Anty-B albo Anty-D (przeciwciała wykrywające czynnik Rh) pozwalałem połączonych kropli płynąć swobodnie wzdłuż kanału przy zadanej liczbie kapilarnej. Jeśli we krwi wystąpiły odpowiednie antygeny, to wówczas, na zasadzie reakcji typu klucz-zamek, następowało połączenie się przeciwciała z antygenem i krwinki czerwone tworzyły aglomeraty - aglutynowały. Efekt ten był widoczny w kropli skutkiem wytrącanie się gruboziarnistego osadu składającego się z polepionych czerwonych krwinek gromadzących się na końcu kropli - rys.5. Do tej pory udało się tą metodą potwierdzić grupę krwi dla kilkudziesięciu dawców. Badania prowadzone były na zlecenie firmy zewnętrznej zainteresowanej wdrożeniem przedstawionej metody.

Opisane zjawisko separacji materiału wewnątrz kropli skutkiem występowania wirów zostało potwierdzone niezależnie przez Hein et al. 2015.



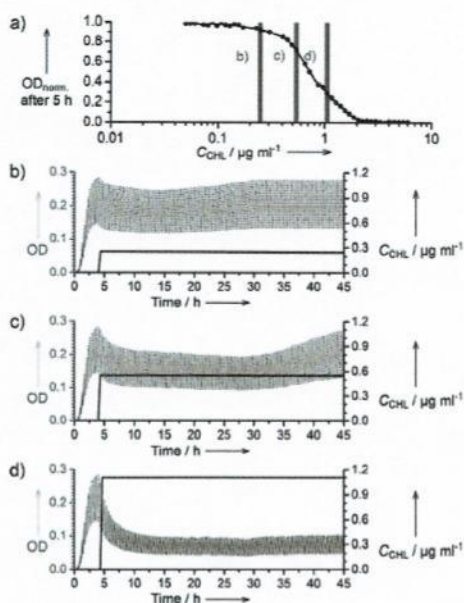
Rysunek 5) Fotografia mikrokanalu zawierającego dwie krople. W obu kroplach jest połączona pełna krew (osocze + krwinki czerwone) z odczynnikiem Anty-D. W kropli po lewej stronie widzimy zajście zjawiska aglutynacji - obecny antygen D na powierzchni krwinek czerwonych - krew RH+, z kolei po prawej stronie widzimy kroplę o jednorodnej barwie - brak antygenu D na krwinkach czerwonych - krew RH-.

2.3.6 Układ mikroprzepływowy do badania uzyskiwania odporności przez bakterie na antybiotyki - chemostat kropelkowy (opis A5)

Wyznaczone eksperymentalnie zależności mobilności kropli od jej długości, lepkości i wartości liczby kapilarnej dla kanału o przekroju kwadratowym, pozwoliły na dopracowanie algorytmu tzw. chemostatu kropelkowego. W programie sterującym pracą systemu dodałem dodatkowe więzy odnoszące się do zmiany prędkości poruszania się mikroreaktora w układzie przepływowym. Dynamika poruszania się kropli okazała się być skorelowana zarówno ze wzrostem kolonii drobnoustrojów, jak i ze zmianą stężenia antybiotyku - było to spowodowane przez zmianę lepkości fazy wodnej.

Zmodyfikowany eksperyment umożliwił długotrwałą hodowlę bakterii w kroplach (do 50 godzin). Dzięki temu można było obserwować szybkość wzrostu drobnoustrojów w zależności od zadanego stężenia antybiotyku. Wyniki otrzymane podczas badań, w których kolonie bakterii utrzymywane były w środowisku o stałym stężeniu antybiotyku i cyklicznie następowała podmiana połowy objętości mikroreaktora, wskazują, że:

- po podaniu antybiotyku (chloramfenikolu) do rozwiniętej kolonii bakterii jej szybkość wzrostu malała,
- cykliczne zmiany połowy objętości pozwalały utrzymać wielkość populacji bakterii w stałym przedziale - stworzony algorytm nie dopuszczał do wymycia bakterii z kropli, jak i nie pozwalał na jej duży wzrost,
- szybkość wzrostu bakterii rosła w czasie do poziomu jaki obserwowałem przed podaniem antybiotyku
- dynamika uzyskiwania odporności przez drobnoustroje zależy od zastosowanego stężenia antybiotyku (rys. 6).



Rysunek 6) a) Wykres przedstawia zmianę OD dla hodowli bakterii (tożsamą z wielkością populacji), które namnażano w środowisku o regulowanym stężeniu chloramfenikolu. Na wykresie pokazano stężenia antybiotyku (słupki), który zaaplikowano kolonii bakterii w chemostacie kropelkowym. b) Wykres przedstawia uśrednioną (dla 10 kropeł) zmianę OD w kroplach zawierających 0.25 $\mu\text{g/ml}$ chloramfenikolu. Widoczny jest powrót kolonii do pierwotnej liczebności po około 23 godzinach. c) Wykres przedstawia uśrednioną (dla 10 kropeł) zmianę OD w kroplach zawierających 0.55 $\mu\text{g/ml}$ chloramfenikolu. Widoczny jest powrót kolonii do pierwotnej liczebności po około 40 godzinach. d) Wykres przedstawia uśrednioną (dla 10 kropeł) zmianę OD w kroplach zawierających 1.1 $\mu\text{g/ml}$ chloramfenikolu. Nie zaobserwowano ponownego wzrostu populacji drobnoustrojów.

Znajomość funkcji zmian mobilności kropli od jej długości, lepkości i liczby kapilarnej pozwoliła znacząco wydłużyć czas prowadzenia eksperymentu - do 50 godzin. Jednak z upływem czasu, niektóre krople zbliżały się do siebie, by w rezultacie połączyć się. Proces nie był szybki, jednak uniemożliwiał przeprowadzenie eksperymentów trwających dłużej niż dwie doby.

2.3.7 Pomiar oporu hydrodynamicznego kropli (opis A6)

Reakcje, które zachodzą w kroplach poruszających się w sieci kanałów mikroprzepływowych, mogą powodować zmianę właściwości reologicznych tworzącej jej cieczy. Najczęściej powodem jest zmiana lepkości i międzyfazowego napięcia powierzchniowego. Również rozwój mikroorganizmów w kropli powoduje zauważalną zmianę właściwości reologicznych, którą możemy utożsamiać ze zmianą jej lepkości. Kropla, która zmienia swoją lepkość poruszając się w sieci kanałów zmienia również swój dodany do układu opór hydrodynamiczny. Jeżeli jest to jedna kropla to występujący efekt jest niezauważalny w rozbudowanym układzie. Jednak gdy jest ich więcej - sto, tysiąc - to przyczynek wprowadzony do oporu hydrodynamicznego układu przez każdą kroplę powinien być proporcjonalny do ich liczby w tzw. pociągu kropelkowym. Zmiana oporu hydrodynamicznego pociąga za sobą zmianę przepływu fazy ciągłej, zwłaszcza gdy przepływ jest wywołany stałą różnicą ciśnień.

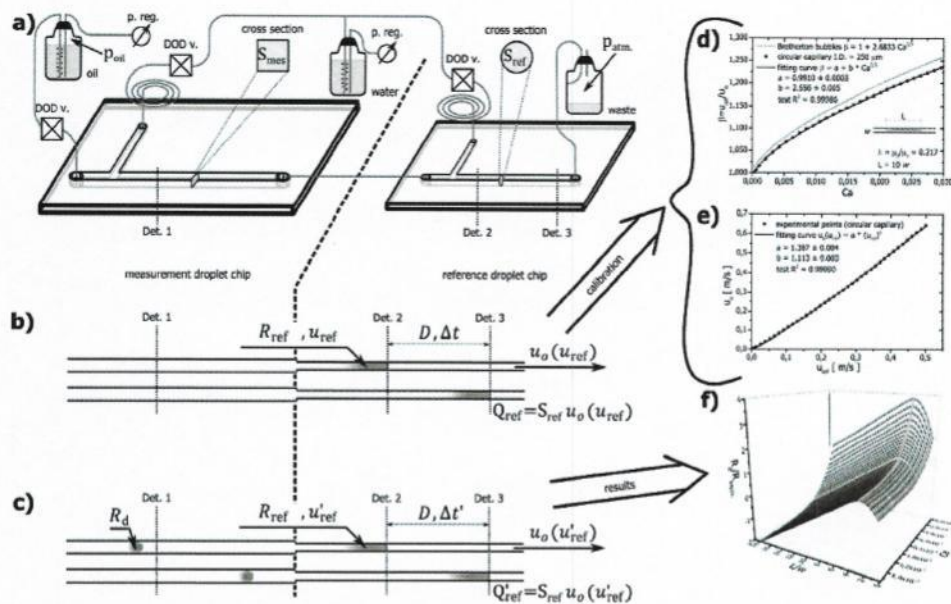
Wspomniany efekt został przeze mnie zauważony i powodował znaczne trudności w projektowaniu układu chemostatowego - A1, A5. Zmiany lepkości kropeł można było zauważyć podczas obserwacji rozwoju kolonii mikroorganizmów. Skutkowało to błędami

w algorytmie stosowanym do sterowania eksperymentem - dochodziło do kolizji elementów fazy rozproszonej. Był to jeden z głównych powodów, dla których eksperyment opisany w pracy A5 nie mógł trwać dłużej niż 50 godzin. Dlatego aby przewyciężyć te ograniczenia i badać długotrwały wpływ środowiska antybiotykowego na bakterie, zacząłem badać od czego zależy i jak zmienia się opór hydrodynamiczny kropli - praca A6.

Zaproponowałem pomiar, który był oparty na precyzyjnym pomiarze przepływu kropli referencyjnej umieszczonej w kanale o przekroju okrągłym w chipie (tzw. referencyjnym) - rys. 7a. Kalibrując układ wyznaczyłem jak zależy szybkość przepływu oleju od prędkości liniowej kropli referencyjnej - rys. 7d i 7e. Następnie chip referencyjny połączyłem z chipem pomiarowym, w którym generowano badane krople, których opór był wyznaczany. Cały pomiar sprowadzał się do wyznaczenia czasu przepływu kropli referencyjnej pomiędzy dwoma czujnikami kolejno dla dwóch przypadków: i) najpierw gdy w układzie poruszała się sama kropla referencyjna - rys. 7b, a następnie ii) gdy w układzie wraz z kroplą referencyjną poruszała się kropla (bądź krople), której opór hydrodynamiczny był wyznaczany - rys. 7c. Porównując oba czasy byłem w stanie wyznaczyć opór hydrodynamiczny badanej kropli.

Cały układ pomiarowy wymagał precyzyjnej stabilizacji temperaturowej (występuje istotna zależność lepkości od temperatury). W tym celu wykonałem stabilizację temperaturową całego układu: chipu referencyjnego, chipu pomiarowego, zaworów sterujących przepływem, jak i pojemników zawierających fazy wodną i olejową.

Omawiana metoda, pozwalała na wykazanie tego, że opór hydrodynamiczny kropli (woda destylowana) jest największy dla jej długości z przedziału 3-4 szerokości kanału (dla kanału o przekroju kwadratowym $360 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m}$) i maleje ze wzrostem liczby kapilarnej. Dla mniejszych i większych kropeł od wspomnianej ich długości - na prawo i lewo od ekstremum - opór hydrodynamiczny jest mniejszy. Ponadto wykazałem, że krople, które poruszają się w pociągu kropelkowym, mogą oddziaływać na siebie powodując to, że opór pociągu jest większy, bądź mniejszy, niż by to wynikało ze zwykłej sumy arytmetycznej oporów stawianych przez pojedynczą kroplę. Spowodowane jest to prawdopodobnie przez wiry, które są obecne w fazie ciągłej pomiędzy elementami fazy rozproszonej (Labrot et al. 2009; Baroud et al. 2010). Wykazałem, że dla małych kropeł $l = 1w$ (porównywalnych z szerokością kanału), dla odległości pomiędzy nimi mniejszej od $3w$, opór hydrodynamiczny pociągu maleje, a z kolei dla długich kropeł $l = 10w$ i dla odległości pomiędzy nimi mniejszej niż $10w$, opór pociągu rośnie. W obu przypadkach gdy odległości pomiędzy kroplami były większe od $10w$ nie obserwowałem zmian oporu hydrodynamicznego pociągu - był równy sumie arytmetycznej oporów wszystkich kropeł.



Rysunek 7) Schemat działania algorytmu do wyznaczania oporu hydrodynamicznego kropli. a) Układ eksperymentalny z zaznaczonymi zbiornikami na fazy wodną i olejową, zaworami oraz chipami. b) Schemat układu wykorzystywanego do kalibracji kropli referencyjnej poruszającej się w chipie referencyjnym c) Schemat układu pomiarowego, dzięki któremu wyznaczamy opór kropli poruszającej się w chipie pomiarowym. d) Funkcja mobilności kropli referencyjnej od liczby kapilarnej. e) Funkcja średniej prędkości oleju od prędkości liniowej kropli referencyjnej. f) Wynik eksperymentalny obrazujący zależność zmian oporu hydrodynamicznego kropli od jej długości i liczby kapilarnej.

2.3.8 Główne osiągnięcia prowadzonych badań:

- stworzenie ultra-precyzyjnej metody pomiaru oporu hydrodynamicznego kropli w przepływie,
- wykazanie, że istnieje maksimum oporu hydrodynamicznego ruchu kropli w zależności od jej długości (objętości) w kanale mikroprzepływowym,
- wykazanie, że istnieją oddziaływania pomiędzy kroplami poruszającymi się w tzw. pociągu kropelkowym,
- wykazanie zmienności mobilności mikrokropli w zależności od jej długości, lepkości i szybkości przepływu w kanale o przekroju kwadratowym,
- zaobserwowanie zjawiska zmiany topologii rozkładu wirów wewnątrz kropli wraz ze wzrostem liczby kapilarnej,
- wykorzystanie znajomości topologii wirów w kropli do wykrywania aglutynacji czerwonych krwinek,
- wykorzystanie znajomości krzywych mobilności kropel do budowania zaawansowanych zautomatyzowanych układów mikroprzepływowych.

3 Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

3.1 Tematyka badań będących przedmiotem mojego zainteresowania przed uzyskaniem stopnia doktora

Przed obroną pracy doktorskiej zajmowałem się zagadnieniami związanymi z niszczeniem drewna, kamienia oraz cementu, w wyniku zmian mikroklimatu. Do badania wykorzystywałem nieinwazyjną metodę badawczą opartą na zjawisku emisji akustycznej. Wykazałem, między innymi, że natychmiastowa zmiana wilgotności względnej o 30% jest w stanie spowodować trwałe zniszczenia wewnątrz struktury drewnianej - owocem tej pracy są cztery publikacje B1², B3, C1 i C2. Stworzyłem również model numeryczny, by wyjaśnić za jego pomocą wykonane eksperymenty. Efektem obliczeń jest jedna publikacja B2. Całość tych prac stanowiła moją dysertację.

W trakcie trwania doktoratu byłem wykonawcą w dwóch dużych grantach europejskich: NOAH'S ARK i SENSORGAN. Pierwszy projekt miał na celu wykazanie jak będzie postępować degradacja drewna, kamienia i cementu dla różnych scenariuszy klimatycznych. W projekcie stworzyłem model naprężeń oparty o równania mechaniki oraz dyfuzję. Wyniki tych prac można odnaleźć w publikacji C3. Z kolei projekt SENSORGAN miał na celu badanie zabytkowych organów kościelnych. Obiektem referencyjnym były dla nas organy znajdujące w olkuskiej farze. W trakcie trwania projektu byłem odpowiedzialny za montaż urządzeń do pomiaru emisji akustycznej i kilkumiesięczny monitoring sygnału. Otrzymane wyniki stanowią podstawę dwóch publikacji: C5 i C6.

3.2 Tematyka badań będących przedmiotem mojego zainteresowania po uzyskaniu stopnia doktora

Po obronie pracy doktorskiej wyjechałem na roczny staż podoktorski na Uniwersytet Londyński, do grupy dr Marianne Odlyha, znajdującego się w Birkbeck College. W trakcie pobytu za granicą badałem wpływ kwasów organicznych wydzielających się w gablotach muzealnych, na zawarte wewnątrz eksponaty: stare monety, obrazy, płótna. Był to temat grantu PROPAINTE realizowany przez Birkbeck College. W tym celu zbudowałem urządzenie oparte na pomiarze zmiany masy adsorbującej się na kryształach piezoelektrycznych, czyli tzw. mikrowagę piezoelektryczną. Urządzenie wykorzystywało fakt zmiany częstotliwości własnej piezoelektryka spowodowaną przez zwiększenie się masy zgromadzonej na okładkach kwarcu. Wstępnie na kwarc napylałem ołów, który ulegał utlenieniu, a następnie wchodził w reakcje z kwasami organicznymi, takimi jak kwas mrówkowy, czy octowy. Wyniki uzyskane podczas badań zostały opublikowane w pięciu artykułach w czasopismach naukowych: B4, C5, C6, C8 i C11.

Po powrocie z Londynu częściowo kontynuowałem badania metodą emisji akustycznej w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN w Krakowie. W roku 2009

² Publikacje oznaczone przez Bxx (z listy filadelfijskiej) i Cxx (spoza listy filadelfijskiej) odnoszą się do załącznika numer 3.



wygrałem ogłoszony przez prof. Piotra Garsteckiego konkurs na stanowisko postdoca w ramach grantu TEAM Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej. Po przeprowadzce do Warszawy, zacząłem zajmować się badaniami ruchu fazy rozproszonej w układach mikroprzepływowych, w Instytucie Chemii Fizycznej (ICHF) PAN. Równocześnie zacząłem planować z innymi osobami z grupy prof. dr hab. Piotra Garsteckiego eksperymenty wymagające pełnej automatyzacji eksperymentu. Dzięki zdobytym umiejętnościom w dotychczasowej edukacji i hobbistycznemu podejściu do elektroniki, zacząłem organizować i budować złożone eksperymenty mikroprzepływowe. Od tamtej pory moim podstawowym "narzędziem" pracy stała się mikropropla.

Wynikiem mojej kreatywnej pracy w grupie Mikroprzepływów i Płynów Złożonych ICHF PAN jest 23 publikacje naukowe: B5 - B11, B14 - B20, C7, C9 - C16. Wśród nich można wyróżnić następujące węższe tematy badawcze:

- badania wysokoprzepustowych układów mikroprzepływowych - B5, B6, C7, C12,
- zastosowanie układów mikroprzepływowych do diagnostyki medycznej - B6, B16, C7, C12,
- badania emulsji wielokrotnych - B7, B9, B11, C9, C10, C15, C16,
- zastosowanie układów mikroprzepływowych do wyznaczania wykresów fazowych krystalizacji białek - B8,
- wytwarzanie kroplowych pułapek hydrodynamicznych w układach mikroprzepływowych - B10,
- badania dwuwarstwy lipidowej i transportu białek przez nią - B15,
- badania efektywności reakcji chemicznej zachodzących w mikrokroplach - B17, B18,
- badanie zachowania się dużej liczby kropeł w układach mikroprzepływowych - B19,
- konstrukcje zaworów przepływowych do wytwarzania kropli na żądanie i do kontrolowanie przepływu - B14, B20,
- konstrukcja elektronicznego układu sterującego do zaworów piezoelektrycznych - C14,

Podczas pracy w Instytucie Chemii Fizycznej PAN zajmowałem się również wraz z grupą prof. dr hab. Roberta Hołysta zagadnieniami transportu cząstek koloidalnych i białek w roztworach. Wykonane przeze mnie autorskie projekty dokładnego pomiaru lepkości wspomnianych roztworów zaowocowały dwoma wspólnymi publikacjami B12 - B13.

3.3 Perspektywy dalszego rozwoju - własna grupa badawcza

W roku 2014 wygrałem konkurs na stanowisko adiunkta w Katedrze Fizyki Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie kierowanej przez prof. dr hab. Krzysztofa Dołowego. W Katedrze Fizyki rozpocząłem wspólne badania z dr hab. Magdaleną Stobiecką nad biosensorem przy wykorzystaniu wagi piezoelektrycznej. Dotychczasowe wspólne badania zakończyły się dwiema publikacjami B21 i B22. Równocześnie rozpocząłem tworzenie własnej pracowni i grupy badawczej. Mój pomysł badań oporu hydrodynamicznego kropli, a następnie jego aplikacja w urządzeniu służącym do diagnostyki

medycznej pozwolił pozyskać grant Opus8 w roku 2015. Realizowany projekt umożliwił rozwój mojej pracowni mikroprzepływów, czego efektem jest publikacja A6. Uzyskane wyniki umożliwiają dalsze badania nad chemostatem kropelkowym, a także pozwalają wdrożyć nową metodę badawczą do diagnostyki medycznej.

Obecnie jestem promotorem pracy magisterskiej studentki Kierunku Biotechnologia SGGW, która realizuje mój temat badawczy oraz intensywnie poszukuję kandydata na stanowisko postdoca, który spełni moje wymagania dotyczące pracy eksperymentalnej, bądź teoretycznej w dziedzinie mikroprzepływów kropelkowych.

3.4 Podsumowanie dorobku naukowego:

Mój dorobek naukowy obejmuje 43 recenzowane publikacje, w tym 27 prac opublikowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej, współautorstwo jednej książki i jednej monografii. Ponadto do mojego dorobku można zaliczyć 6 przyznanych już patentów oraz 36 komunikatów konferencyjnych zaprezentowanych w formie referatu, bądź posteru.

Publikacje z badań wykonanych przed obroną pracy doktorskiej	
Artykuły w czasopismach z listy filadelfijskiej	3
Artykuły w recenzowanych anglojęzycznych czasopismach bez współczynnika oddziaływania IF	3
Komunikaty konferencyjne - postery i wystąpienia ustne	2
Publikacje z badań wykonanych po obronie pracy doktorskiej	
Artykuły w czasopismach z listy filadelfijskiej	24
Artykuły w recenzowanych anglojęzycznych czasopismach bez współczynnika oddziaływania IF	11
Monografie	1
Książki	1
Komunikaty zawierające wystąpienia ustne i posterowe	34
Sumaryczny współczynnik oddziaływania IF	122.3
Sumaryczne punkty MNiSW	932
Indeks Hirscha	10

4 Bibliografia

Abate AR, Rotem A, Thiele J, Weitz DA (2011) Efficient encapsulation with plug-triggered drop formation. Phys Rev E. doi: 10.1103/PhysRevE.84.031502

Anna SL, Bontoux N, Stone HA (2003) Formation of dispersions using "flow focusing" in microchannels. Appl Phys Lett 82:364–366.

Baroud CN, Gallaire F, Dangla R (2010) Dynamics of microfluidic droplets. Lab Chip 10:2032–2045. doi: 10.1039/C001191F

Chait R, Craney A, Kishony R (2007) Antibiotic interactions that select against resistance. Nature 446:668–671. doi: 10.1038/nature05685

- Chu L-Y, Utada AS, Shah RK, et al (2007) Controllable monodisperse multiple emulsions. *Angew Chem - Int Ed* 46:8970–8974.
- Churski K, Korczyk P, Garstecki P (2010) High-throughput automated droplet microfluidic system for screening of reaction conditions. *Lab Chip* 10:816–818. doi: 10.1039/b925500a
- Churski K, Michalski J, Garstecki P (2010) Droplet on demand system utilizing a computer controlled microvalve integrated into a stiff polymeric microfluidic device. *Lab Chip* 10:512–518. doi: 10.1039/b915155a
- Clegg PS, Tavecchi JW, Wilde PJ (2016) One-step production of multiple emulsions: microfluidic, polymer-stabilized and particle-stabilized approaches. *Soft Matter* 12:998–1008. doi: 10.1039/C5SM01663K
- Czekalska MA, Kaminski TS, Jakiela S, et al (2015) A droplet microfluidic system for sequential generation of lipid bilayers and transmembrane electrical recordings. *Lab Chip* 15:541–548. doi: 10.1039/C4LC00985A
- Debs BE, Utharala R, Balyasnikova IV, et al (2012) Functional single-cell hybridoma screening using droplet-based microfluidics. *Proc Natl Acad Sci* 109:11570–11575. doi: 10.1073/pnas.1204514109
- De Gennes P-G, Brochard-Wyart F, Quéré D (2004) *Capillarity and Wetting Phenomena*. Springer New York, New York, NY
- Dolega ME, Jakiela S, Razew M, et al (2012) Iterative operations on microdroplets and continuous monitoring of processes within them; determination of solubility diagrams of proteins. *Lab Chip* 12:4022. doi: 10.1039/c2lc40174f
- Garstecki P, Fuerstman MJ, Stone HA, Whitesides GM (2006) Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction - scaling and mechanism of break-up. *Lab Chip* 6:437–446. doi: 10.1039/b510841a
- Hansen C, Quake SR (2003) Microfluidics in structural biology: smaller, faster... better. *Curr Opin Struct Biol* 13:538–544. doi: 10.1016/j.sbi.2003.09.010
- Hein M, Moskopp M, Seemann R (2015) Flow field induced particle accumulation inside droplets in rectangular channels. *Lab Chip* 15:2879–2886. doi: 10.1039/C5LC00420A
- Jakiela S, Debski PR, Dabrowski B, Garstecki P (2014) Generation of Nanoliter Droplets on Demand at Hundred-Hz Frequencies. *Micromachines* 5:1002–1011. doi: 10.3390/mi5041002
- Jakiela S, Kaminski TS, Cybulski O, et al (2013) Bacterial Growth and Adaptation in Microdroplet Chemostats. *Angew Chem Int. Edit.* 52:8908–8911. doi: 10.1002/anie.201301524

- Jankowski P, Ogonczyk D, Kosinski A, et al (2011) Hydrophobic modification of polycarbonate for reproducible and stable formation of biocompatible microparticles. *Lab Chip* 11:748–752. doi: 10.1039/c0lc00360c
- Kaminski TS, Scheler O, Garstecki P (2016) Droplet microfluidics for microbiology: techniques, applications and challenges. *Lab Chip* 16:2168–2187. doi: 10.1039/C6LC00367B
- Kinoshita H, Kaneda S, Fujii T, Oshima M (2007) Three-dimensional measurement and visualization of internal flow of a moving droplet using confocal micro-PIV. *Lab Chip* 7:338–346. doi: 10.1039/B617391H
- Labrot V, Schindler M, Guillot P, et al (2009) Extracting the hydrodynamic resistance of droplets from their behavior in microchannel networks. *Biomicrofluidics* 3:012804. doi: 10.1063/1.3109686
- Lindken R, Rossi M, Große S, Westerweel J (2009) Micro-Particle Image Velocimetry (μ PIV): Recent developments, applications, and guidelines. *Lab Chip* 9:2551–2567. doi: 10.1039/B906558J
- Li PCH (2005) *Microfluidic Lab-on-a-Chip for Chemical and Biological Analysis and Discovery*. CRC Press
- Mazutis L, Gilbert J, Ung WL, et al (2013) Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. *Nat Protoc* 8:870–891. doi: 10.1038/nprot.2013.046
- Murthy N, Thng YX, Schuck S, et al (2002) A novel strategy for encapsulation and release of proteins: Hydrogels and microgels with acid-labile acetal cross-linkers. *J Am Chem Soc* 124:12398–12399.
- Novick A, Szilard L (1950) Description of the Chemostat. *Science* 112:715–716. doi: 10.1126/science.112.2920.715
- Okushima S, Nisisako T, Torii T, Higuchi T (2004) Controlled Production of Monodisperse Double Emulsions by Two-Step Droplet Breakup in Microfluidic Devices. *Langmuir* 20:9905–9908. doi: 10.1021/la0480336
- Pompano RR, Liu W, Du W, Ismagilov RF (2011) Microfluidics Using Spatially Defined Arrays of Droplets in One, Two, and Three Dimensions. *Annu Rev Anal Chem* 4:59–81. doi: 10.1146/annurev.anchem.012809.102303
- Ryu G, Huang J, Hofmann O, et al (2011) Highly sensitive fluorescence detection system for microfluidic lab-on-a-chip. *Lab Chip* 11:1664–1670. doi: 10.1039/C0LC00586J
- Tan Y-C, Cristini V, Lee AP (2006) Monodispersed microfluidic droplet generation by shear focusing microfluidic device. *Sens Actuators B Chem* 114:350–356. doi: 10.1016/j.snb.2005.06.008

Theberge AB, Courtois F, Schaerli Y, et al (2010) Microdroplets in microfluidics: an evolving platform for discoveries in chemistry and biology. *Angew Chem Int Ed Engl* 49:5846–5868. doi: 10.1002/anie.200906653

Thorsen T, Roberts RW, Arnold FH, Quake SR (2001) Dynamic Pattern Formation in a Vesicle-Generating Microfluidic Device. *Phys Rev Lett* 86:4163–4166. doi: 10.1103/PhysRevLett.86.4163

Sławomir Jakieta