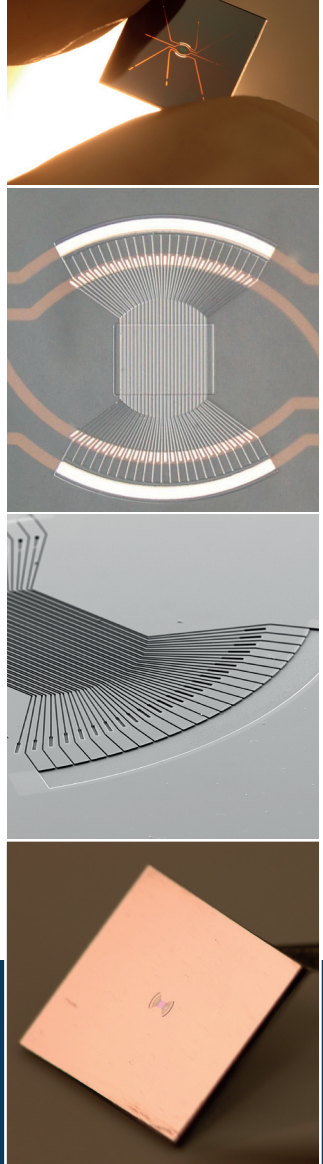


# Optofluidic Microsystem for Antibiotic Susceptibility Testing

Jan Friedrich Busche

Supervised by:  
Prof. Dr. rer. nat.  
Andreas Dietzel



Technische  
Universität  
Braunschweig

imt  
Institut für  
Mikrotechnik

# Optofluidic Microsystem for Antibiotic Susceptibility Testing

Von der Fakultät für Maschinenbau  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung der Würde

eines Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigte Dissertation

von: Jan Friedrich Busche, M. Sc.

aus (Geburtsort): Gehrden

eingereicht am: 06. Juli 2021

mündliche Prüfung am: 14. September 2021

Vorsitz: Prof. Dr. rer. nat. Rainer Krull

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Dietzel

Prof. Ph.D. Thomas Burg

**2021**



Schriftenreihe Mikrotechnik  
herausgegeben von Prof. Dr. rer. nat. Andreas Dietzel

**Jan Friedrich Busche**

**Optofluidic Microsystem for  
Antibiotic Susceptibility Testing**

Shaker Verlag  
Düren 2021

**Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek**

The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.d-nb.de>.

Zugl.: Braunschweig, Techn. Univ., Diss., 2021

Copyright Shaker Verlag 2021

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publishers.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-8311-8

ISSN 2568-2040

Shaker Verlag GmbH • Am Langen Graben 15a • 52353 Düren

Phone: 0049/2421/99011-0 • Telefax: 0049/2421/99011-9

Internet: [www.shaker.de](http://www.shaker.de) • e-mail: [info@shaker.de](mailto:info@shaker.de)

# Vorwort und Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mikrotechnik (IMT) der Technischen Universität Braunschweig im Rahmen eines vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten Projekts zur Erforschung eines optofluidischen Antibiotikaresistenztests.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Andreas Dietzel, der mir immer sein volles Vertrauen entgegenbrachte und mir damit auch immer großen Freiraum bei der Umsetzung meiner Arbeit ermöglichte. Mein spezieller Dank geht auch an Prof. Ph.D. Thomas P. Burg für seine Unterstützung während der gesamten Projektlaufzeit.

Prof. Dr. rer. nat. Rainer Krull danke ich für seine fachliche Unterstützung bei biotechnologischen Fragen und für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Ich danke Dr. rer. nat. Stehr, der immer wieder *Escherichia coli* (*E. coli*) für Strömungsversuche geliefert hat sowie Ph.D. Margherita Bassu für Ihre Unterstützung während meines Projekts. Mein Dank geht auch an das gesamte Team des IMT.

Ich danke meinen fleißigen Studenten für ihren Einsatz während ihrer Abschlussarbeiten. Besonderer Dank geht dabei an Svenja Möller und Ann-Kathrin Klein für ihren unermüdlichen Einsatz beim Durchführen von Versuchen im Fluidiklabor.

Ich danke meinen Bürokollegen Kai, Lars, Thalke, Mayra, Thomas und Jan Niklas für die vielen Stunden an fachlichen und überfachlichen Gesprächen und die tolle Arbeitsatmosphäre und ihre Unterstützung.

Mein ganz persönlicher Dank geht an meine Familie. Ich danke meinen wundervollen Eltern Martina und Dr. rer. nat. Roger Busche für ihre unendliche Liebe und Unterstützung sowie meinem Bruder Tim Busche, der mir immer zur Seite steht. Meiner Frau Dr. rer. nat. Stephanie Busche möchte ich für ihre bedingungslose Unterstützung danken und meinem Sohn Felix für die Abwechslung und Freude, für die er immer aufs Neue sorgt.



# Kurzfassung

Nosokomiale Infektionen mit antimikrobiell resistenten Bakterien sind auf dem Vormarsch und selbst Reserveantibiotika verlieren ihre Wirksamkeit. Bei einer bakteriellen Infektion mit dem Risiko einer Sepsis müssen schnell die am besten geeigneten Antibiotika verordnet werden. Unwirksame Antibiotika gefährden das Leben der Patienten, unnötig verabreichte Antibiotika wiederum gefährden deren langfristige Wirksamkeit. Dies würde viele heute routinemäßig durchgeführte Operationen und Therapien unmöglich machen.

Derzeit erfolgt die Durchführung des Nachweises von Antibiotikaresistenzen oft außerhalb des Krankenhauses und dauert zu lange. Schnelle Point-of-Care-Tests werden deswegen benötigt, um eine rechtzeitige Medikation mit wirksamen Antibiotika zu erreichen. Dies könnte mit phänotypischen mikrofluidischen Diagnoseverfahren erreicht werden, die markierungsfrei arbeiten. In dieser Arbeit werden verschiedene Ansätze zur bakteriellen Immobilisierung und anschließenden Wachstumsdetektion untersucht. Zunächst wird ein membranbasierter Ansatz untersucht. Anschließend wird eine Kreuzfluss-Immobilisierung an einem Nanospalt untersucht. Danach wird dieses Immobilisierungsprinzip mit einem asymmetrischen Beugungsgitter kombiniert, um die Bakterien zu konzentrieren und ihr Wachstum markierungsfrei unter dem Einfluss von Antibiotika zu untersuchen.

Ergebnisse von CFD-Simulationen der Kreuzfluss-Immobilisierung zeigen, dass die auftretende Schubspannung in den Systemen etwa halb so groß ist, wie die als wachstumslimitierend für *E. coli*-Zellen in der Literatur berichteten Spannungen. Das vorgestellte interferometrische Messprinzip den Nachweis des Bakterienwachstums in weniger als 4 h bei einer Verdopplungszeit von 79 min und Probenvolumina von 187.2  $\mu\text{L}$  und erlaubte auch die markierungsfreie Beobachtung des Einflusses der applizierten Antibiotika auf das Wachstumsverhalten.

Zur Vervollständigung dieses Konzepts wird eine Optimierung der Herstellungskosten mikrofluidischer Systeme mit der Zwei-Photonen-Polymerisation und anschließender Replikation für deren breite Anwendung untersucht.





# Abstract

Nosocomial infections with antimicrobial resistant bacteria are on the rise and even reserve antibiotics are losing their effectiveness. In case of a bacterial infection with the risk of sepsis, the most appropriate antibiotics must be prescribed quickly. Ineffective antibiotics risks patients' lives, unnecessarily administered antibiotics endanger their long-term effectiveness. This would make many operations and therapies routinely performed today impossible. Currently, detection of antimicrobial resistance is often done off-site and takes too long. Rapid point-of-care testing is needed to achieve medication with effective antibiotics in time. This could be achieved with phenotypic microfluidic diagnostic methods that work label-free.

In this thesis, different approaches for bacterial immobilization and subsequent growth detection are investigated. First, a membrane-based approach is examined. Subsequently, a cross-flow immobilization at a nano gap is investigated. Thereafter, this immobilization principle is combined with an asymmetric diffraction grating to concentrate the bacteria and study their growth label-free under the influence of antibiotics.

Results of CFD simulations of the cross flow immobilization suggested the shear stress in the systems to be approximately half the value reported to be growth limiting for *E. coli* cells. In line with that, the interferometric measuring principle enabled bacterial growth detection in less than 4 h with a doubling time of 79 min and sample volumes of 187.2  $\mu\text{L}$  and also allowed observing the effect of applied antibiotics label-free.

To complete this concept, an improvement of the fabrication of microfluidic systems with two-photon polymerization and subsequent multiple replication is investigated for their wide-spread use.



# Contents

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Introduction</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>Fundamentals</b>   | <b>5</b>  |
| 2.1      | Microbiological Fundamentals . . . . .                      | 6         |
| 2.1.1    | Bacterial Growth . . . . .                                  | 6         |
| 2.1.2    | Bacterial Growth under Shear Stress Influence . . . . .     | 8         |
| 2.1.3    | Growth in Restricted Spatial Conditions . . . . .           | 9         |
| 2.2      | Microfluidic Fundamentals . . . . .                         | 10        |
| 2.2.1    | Flow Resistance . . . . .                                   | 10        |
| 2.2.2    | Oxygen Supply in Culture Medium . . . . .                   | 11        |
| 2.2.3    | Computational Fluid Dynamics . . . . .                      | 12        |
| <b>3</b> | <b>State of the Art</b>                                     | <b>15</b> |
| 3.1      | Antimicrobial Susceptibility Tests (ASTs) . . . . .         | 16        |
| 3.1.1    | Conventional ASTs . . . . .                                 | 16        |
| 3.1.2    | Microfluidic Antimicrobial Susceptibility Tests (MicroASTs) | 18        |
| 3.2      | Microfluidic Cell Filtration Devices . . . . .              | 20        |
| 3.2.1    | Nanoporous Membranes . . . . .                              | 20        |
| 3.2.2    | Micro- and Nanogaps . . . . .                               | 21        |
| 3.2.3    | Immobilisation with Antibodies . . . . .                    | 22        |
| 3.3      | Asymmetric Optofluidic Gratings for Biosensing . . . . .    | 23        |
| 3.4      | Microfabrication . . . . .                                  | 25        |
| 3.4.1    | Silicon on Insulator (SOI) Technology . . . . .             | 26        |
| 3.4.2    | Lithography Technology . . . . .                            | 26        |
| 3.4.3    | Wafer Bonding . . . . .                                     | 28        |
| 3.4.4    | Etching Technologies . . . . .                              | 30        |
| 3.4.5    | Femtosecond Laser Ablation . . . . .                        | 32        |
| <b>4</b> | <b>Cell Immobilization on Nanoporous Membranes</b>          | <b>33</b> |
| 4.1      | Membrane Device Development . . . . .                       | 34        |
| 4.1.1    | Basic Measuring Principle of the Membrane Chip . . . . .    | 34        |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 4.1.2    | Design of the Membrane Chip . . . . .                                    | 35         |
| 4.1.3    | Membrane Tension and Deflection . . . . .                                | 38         |
| 4.1.4    | Flow Simulations . . . . .   | 40         |
| 4.1.5    | Microfluidic Chip Fabrication . . . . .                                  | 43         |
| 4.1.6    | Experimental Setup . . . . .   | 48         |
| 4.2      | Experimental Results . . . . .   | 50         |
| 4.2.1    | Bacterial Immobilization Procedure . . . . .                             | 50         |
| 4.3      | Summary and Discussion . . . . .   | 52         |
| <b>5</b> | <b>Cell Immobilization at a Nanogap</b>                                  | <b>55</b>  |
| 5.1      | Single Gap Cross-Flow Filtration Microchip . . . . .                     | 56         |
| 5.1.1    | Design of the Device . . . . .   | 56         |
| 5.1.2    | Single Gap Chip Microfabrication . . . . .                               | 57         |
| 5.1.3    | CFD Simulation . . . . .   | 60         |
| 5.2      | Experiments . . . . .  | 71         |
| 5.2.1    | Experimental Setup . . . . .   | 71         |
| 5.2.2    | Flow States for Cell Capture and Growth Detection . .                    | 73         |
| 5.2.3    | Pressures and Volume Flow for Bacterial Capture . . .                    | 75         |
| 5.2.4    | Bacterial Growth Experiments . . . . .                                   | 77         |
| 5.2.5    | Antimicrobial Susceptibility Experiments . . . . .                       | 79         |
| 5.3      | Summary and Discussion . . . . .   | 80         |
| <b>6</b> | <b>Optofluidic Grating Chip</b>  | <b>83</b>  |
| 6.1      | Optofluidic Growth Detection for Antibiotic Susceptibility Testing       | 84         |
| 6.1.1    | Nanofluidic Chip Design . . . . .  | 84         |
| 6.2      | Fabrication of the Optofluidic Chip . . . . .                            | 85         |
| 6.2.1    | Experimental Setup . . . . .   | 101        |
| 6.3      | Experimental Results . . . . .   | 103        |
| 6.3.1    | Bacterial Capture Experiments . . . . .                                  | 103        |
| 6.3.2    | Fluorescent Growth Detection . . . . .                                   | 104        |
| 6.3.3    | Calibration Experiments . . . . .  | 107        |
| 6.3.4    | Growth under Antibiotic Treatment with Diffraction Measurement . . . . . | 108        |
| 6.4      | Summary and Discussion . . . . .   | 111        |
| <b>7</b> | <b>3D Printing of Microstructures</b>                                    | <b>113</b> |
| 7.1      | Introduction . . . . .   | 114        |
| 7.2      | Design of the Microstructures . . . . .                                  | 114        |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 7.3      | Fabrication Process . . . . .                      | 115        |
| 7.3.1    | Printing the Master Mold . . . . .                 | 115        |
| 7.3.2    | Multistep Replication Molding . . . . .            | 116        |
| 7.4      | Characterization . . . . .                         | 117        |
| 7.5      | Potential Application for Microfluidics . . . . .  | 118        |
| <b>8</b> | <b>Summary and Outlook</b>                         | <b>121</b> |
| 8.1      | Summary . . . . .                                  | 121        |
| 8.2      | Outlook . . . . .                                  | 123        |
| <b>9</b> | <b>Bibliography</b>                                | <b>125</b> |
| 9.1      | List of References . . . . .                       | 125        |
| 9.2      | List of Own Publications . . . . .                 | 145        |
| 9.3      | List of Student Theses . . . . .                   | 145        |
|          | <b>Appendix</b>                                    | <b>149</b> |
| A        | Fabrication Process . . . . .                      | 149        |
| A.1      | Equipment Used . . . . .                           | 149        |
| A.2      | Process Plan: Nanoporous Membrane System . . . . . | 151        |
| A.3      | Process Plan Single Gap System . . . . .           | 154        |
| A.4      | Process Plan Optofluidic Grating System . . . . .  | 159        |



# List of Acronyms

| Notation                       | Description                             |
|--------------------------------|---|
| <i>E. coli</i>                 | <i>Escherichia coli</i>                 |
| 2PP                            | two-photon polymerization               |
| AMR                            | antimicrobial resistance                |
| AST                            | antimicrobial susceptibility test       |
| BHF                            | buffered hydrogen fluoride              |
| BOX                            | buried oxide                            |
| C <sub>4</sub> F <sub>8</sub>  | octafluorocyclobutane                   |
| CAD                            | computer-aided design                   |
| CAN                            | ceric ammonium nitrate                  |
| CCD                            | charge-coupled device                   |
| CFD                            | computational fluid dynamics            |
| CHF <sub>3</sub>               | trifluoromethane                        |
| CMOS                           | complementary metal-oxide-semiconductor |
| DNA                            | deoxyribonucleic acid                   |
| DRIE                           | deep reactive ion etching               |
| EBL                            | electron beam lithography               |
| EBR                            | edge bead removal                       |
| EPR                            | electronic pressure regulator           |
| FEM                            | finite element method                   |
| FKM                            | fluorocarbon                            |
| fs-laser                       | femtosecond laser                       |
| GFP                            | green fluorescent protein               |
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> | phosphoric acid                         |
| HF                             | hydrogen fluoride                       |
| HMDS                           | hexamethyldisilazane                    |
| ICP                            | inductive coupled plasma                |
| IMT                            | Institute of Microtechnology            |
| ITO                            | Indium tin oxide                        |



## List of Acronyms

---

| <b>Notation</b> | <b>Description</b>                                 |
|-----------------|--|
| $K_2HPO_4$      | dipotassium hydrogen phosphate                     |
| $KH_2PO_4$      | potassium dihydrogen phosphate                     |
| KOH             | potassium hydroxide                                |
| MIC             | minimum inhibition concentration                   |
| $O_2$           | oxygen   |
| PDMS            | polydimethylsiloxane                               |
| PEB             | post exposure bake                                 |
| PECVD           | plasma-enhanced chemical vapor deposition          |
| PGMEA           | 1-methoxy-2-propanol acetate                       |
| PLB             | post lamination bake                               |
| PMMA            | polymethylmethacrylate                             |
| POC             | point-of-care                                      |
| PTFE            | polytetrafluorethylen                              |
| RF              | radiofrequency                                     |
| sCMOS           | scientific complementary metal-oxide-semiconductor |
| SEM             | scanning electron microscope                       |
| $SF_6$          | sulfur hexafluoride                                |
| $Si_3N_4$       | silicon nitride                                    |
| $SiO_2$         | silicon dioxide                                    |
| SOI             | silicon on insulator                               |
| TB              | Terrific Broth                                     |
| UV              | ultraviolet  |

# List of Symbols

| Symbol      | Unit                          | Description                                     |
|-------------|-------------------------------|---|
| $A$         | $\text{m}^2$                  | Area  |
| $a$ to $e$  | $\text{m}^2$                  | Empirically calculated constants                |
| $\alpha_0$  | –                             | Bunsen coefficient                              |
| $C$         | $\text{m}$                    | Circumference of the channel                    |
| $c_{O_2}$   | $\text{g L}^{-1}$             | Oxygen concentration                            |
| $\delta$    | $\text{m}$                    | Mean distance of the centers of the molecules   |
| $D_h$       | $\text{m}$                    | Characteristic length                           |
| $E$         | $\text{Pa}$                   | Young's modulus                                 |
| $\eta$      | $\text{m}$                    | Dynamic viscosity                               |
| $h$         | $\text{m}$                    | Height  |
| $H_i$       | $\text{L mol}^{-1}$           | Gas specific constant                           |
| $K$         | $\text{L g}^{-1}$             | Substance-specific constant                     |
| $K_n$       | –                             | Knudsen number                                  |
| $l$         | $\text{m}$                    | Displacement                                    |
| $M_G$       | $\text{g mol}^{-1}$           | Molar mass of the gas                           |
| $N$         | –                             | Cell number                                     |
| $Re$        | –                             | Reynolds number                                 |
| $n_e$       | –                             | Mean refractive index of <i>E.coli</i>          |
| $n_p$       | –                             | Refractive index of <i>E.coli</i> protoplasm    |
| $n_w$       | –                             | Refractive index of the <i>E.coli</i> cell wall |
| $p$         | $\text{bar}$                  | Pressure  |
| $p_A$       | $\text{bar}$                  | Patial pressure                                 |
| $P$         | $\text{m}$                    | Perioticity                                     |
| $p_s$       | $\text{bar}$                  | Vapor pressure of the solvent                   |
| $p_t$       | $\text{bar}$                  | Total pressure                                  |
| $Q$         | $\text{m s}^{-1}$             | Flow rate                                       |
| $R_{rect}$  | $\text{Pa}^3 \text{s m}^{-1}$ | Hydraulic resistance of a rectangular channel   |
| $R_{hydro}$ | $\text{Pa}^3 \text{s m}^{-1}$ | Hydraulic resistance                            |

## List of Symbols

---

| Symbol             | Unit               | Description              |
|--------------------|--------------------|--------------------------|
| $\sigma_{tensile}$ | Pa                 | Tensile stress           |
| $S_m$              | –                  | Mean signal              |
| $\tau$             | Pa                 | Shear stress             |
| $t_d$              | –                  | Cell doubling time       |
| $T$                | °C                 | Temperature              |
| $t$                | s                  | Time                     |
| $V_0$              | L mol              | Gas molar volume         |
| $v$                | $\text{m s}^{-1}$  | Flow velocity            |
| $v_m$              | $\text{m s}^{-1}$  | Mean flow velocity       |
| $w$                | m                  | Width                    |
| $\omega_{max}$     | m                  | Maximal displacement     |
| $x_i$              | –                  | Number of ions           |
| $z_i$              | –                  | Charge number of the ion |
| $\lambda$          | m                  | Wavelength               |
| $\mu$              | $\text{s}^{-1}$    | Growth rate              |
| $\rho$             | $\text{kg m}^{-3}$ | Density of the fluid     |