

미세유로 내에서 *Pseudomonas aeruginosa*의 유영 운동 분석

장성찬 · 정현호 · 이창수[†]

충남대학교 화학공학과
305-764 대전 유성구 궁동 220
(2012년 2월 12일 접수, 2012년 3월 20일 채택)

Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Motility in Microchannels

Sung-Chan Jang, Heon-Ho Jeong and Chang-Soo Lee[†]

Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, 220 Gung-dong, Yuseong-Gu, Daejeon 305-764, Korea
(Received 12 February 2012; accepted 20 March 2012)

요 약

본 논문에서는 미세 환경이 *Pseudomonas aeruginosa*의 운동성에 주는 영향을 조사하기 위하여 다양한 크기의 미세 유로 내에서 박테리아의 운동성을 분석하였다. 본 논문에서는 미세유체 칩을 사용하여 2차원 공간을 만들며, 10~100 μm 너비의 채널 안에서 단일 박테리아의 운동 변수인 이동속도, 'run'운동 지속시간, 'tumble' 각도를 측정하였고 각 미세유로 내에서 박테리아의 운동을 표현할 수 있는 물리적 상수인 random motility coefficient를 구하였다. 상기의 물리적 측정치를 분석한 결과, 박테리아는 공간제약이 있는 경우 편모의 운동이 채널의 벽의 영향으로 인하여 회전 운동에 영향을 받게 되고, 'run' 운동 지속 시간이 짧아지는 것을 확인하였다. 따라서, 공간의 제한이 박테리아의 운동성을 감소시킴을 알 수 있었다. 본 연구의 결과는 박테리아의 운동성을 쉽고 정확하게 분석할 수 있는 측정 방법으로 널리 활용될 것으로 기대된다.

Abstract – This study presents the effects of micro-geometries on the swimming behavior of *Pseudomonas aeruginosa*. First, we have measured parameters of single-cell motility including cell speed, run duration time, and tumble angle under two dimensional space. The results are used to calculate motility coefficients in the width of microchannels ranging from 10 to 100 μm . Since the single-cell motility parameters measured depend on the interaction of flagella with the microchannel wall, the duration time of the running cell in restricted geometries is distinctively different. Therefore, the motility of bacteria is decreased by restricted geometries. This study suggests that microfluidic approach is useful tool for the analysis of bacterial motility under the restricted space and rapid analytical tool.

Key words: Microenvironment, Random Walk, Microchannel, Motility, *Pseudomonas aeruginosa*

1. 서 론

박테리아는 자연계에서 널리 분포하고 있으며 다양한 환경의 서식처에 존재한다[1-4]. 박테리아 서식처는 마이크로미터 크기의 기공이나 매우 좁은 틈과 같은 구조를 띄며, 담수와 해수, 토양, 사람의 피부조직 등과 같이 다양하게 존재한다. 매우 좁은 공간에서 생활하는 박테리아들도 개인적인 움직임과 집단적 움직임을 가지고 있으며 박테리아를 이해하기 위한 운동성에 관한 연구들이 많이 수행되고 있다. 최근에는 제한된 공간에서 박테리아의 성장과 운동은 토양 마이크로 생물학, 물 정제, 생물 의학적 연구 분야에서 중요한 역할을 하고 있으며 많은 관심을 끌고 있다[5-6].

박테리아의 특성을 연구하기 위해 지난 수 년 동안 미세유체

(microfluidic) 기술은 미생물들의 행동 연구에 있어서 유용하게 사용되어 왔다[7]. 자연에 존재하는 박테리아는 마이크로미터 크기의 제한된 공간에서 유영을 하며 생활을 한다. 이런 제한된 공간을 인위적으로 구현할 수 있는 미세공정 기술은 복잡한 환경을 만드는데 유용하게 사용될 수 있다[8-11]. 특히, 반도체 사진공정(photolithography)과 poly(dimethyl)siloxane (PDMS)를 이용한 소프트-리소그래피(soft-lithography) 공정으로 만들어진 미세유체 유로는 투명하고 무독성이며 산소투과성이 뛰어나기 때문에 살아있는 세포 연구에서 많이 사용된다[12]. 대표적인 예로는 박테리아의 회전 운동과 유로의 벽과의 상관관계를 유로의 기질에 따라 일정한 방향으로 회전 운동 분석 연구[13], 박테리아의 크기 보다 작은 크기의 유로(약 0.3 μm)을 만들어 박테리아가 움직이지 못하는 공간에서 박테리아의 번식을 알아보는 연구[14], 또는 박테리아의 서식처를 모사하여 박테리아의 운동 속도를 알아보는 연구[15], 더 나아가서 외부의 동력 없이 박테리아의 운동성만을 이용하여 톱니바퀴를 돌아가게 하는 미세유체 칩

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: rhadum@cnu.ac.kr

[‡]이 논문은 KAIST 홍원희 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

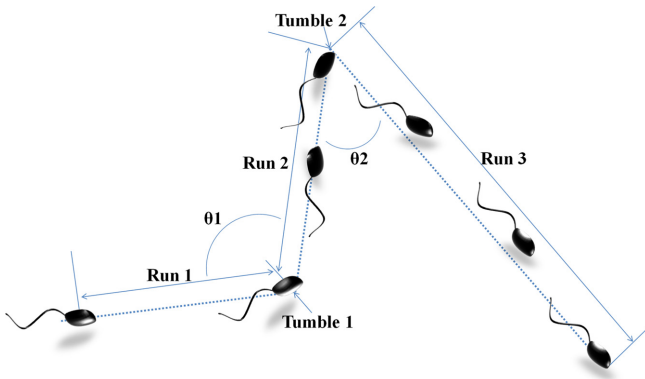


Fig. 1. Representative motility of swimming bacteria in nature such as running and tumbling.

을 만들 수 있고[16], 유로의 기하학적 구조를 변경하여 한쪽 방향으로만 박테리아를 진행하게 유도하는 실험이 진행되고 있다[17,18].

위의 연구들은 박테리아의 운동성을 기초로 하는데, 박테리아의 운동은 필라멘트처럼 생긴 편모가 세포벽에 위치하여 회전 운동을 하여 박테리아가 움직이게 된다[19-21]. 편모는 시계방향과 반 시계 방향으로 회전 운동을 할 수 있고, 이 회전 운동에 균형을 맞추기 위해서 몸통은 편모의 반대 방향으로 회전을 하게 된다. 만약 편모가 반 시계 방향으로 회전 운동을 하게 되면 편모가 묶음이 되고 몸통은 시계 방향으로 회전 운동을 하게 되면서 박테리아가 직선형 움직임을 보이게 되는데 이러한 움직임을 ‘run’ 운동이라고 한다. 반대로 편모가 시계 방향으로 회전하면 편모가 풀리게 되고 몸통이 반 시계 방향으로 회전을 하게 되면 박테리아가 진행 방향을 바꾸는 운동을 하게 되는데 이러한 운동을 ‘tumble’ 운동이라고 한다(Fig. 1)[22,23]. 박테리아의 운동성 특성인 두 가지 운동을 연속적으로 반복하게 되면 마치 브라운 운동을 하는 입자와 비슷한 무작위적 운동을 하게 된다. 이런 이유로 박테리아의 운동을 random motility coefficient로 표현할 수 있게 된다.

본 연구에서는 제한된 공간에서 박테리아의 운동성 변화를 알아보기 위하여, 유로의 너비 변화에 따른 박테리아의 운동성 차이를 알아볼 수 있는 미세유체 칩을 제작하였다. 이를 사용하여 미세유체 유로 내에서 한 개씩 박테리아의 운동성을 분석하고 환경에 따라 운동성이 어떻게 달라지는지 알아보았다. 또한 박테리아 운동의 변수(Cell speed, Run time, Tumble angle)를 측정하고 측정된 변수들을 사용하여 박테리아의 random motility coefficient (μ)를 구하였다.

2. 실험방법

2-1. 미세유체 칩 유로 설계(Microchannel design)

본 연구에 사용된 미세유체 칩은 오토 캐드(Auto CAD 2008) 프로그램을 사용하여 설계하였다. Inlet과 outlet을 유로 양쪽에 한 개씩 만들었고, inlet과 outlet 사이에 레저버(reservoir) 두 개와 reservoir를 연결하는 유로의 가운데에 실험을 위한 유로를 만들었다. 실험에 사용된 유로의 너비는 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 μm 크기로 설계를 하였으며, 길이는 300 μm 의 유로로 설계를 하였다(Fig. 2(a)).

2-2. 미세유체 칩의 제조

실리콘 마스터(silicon master)는 positive photoresist (AZ 9260)을

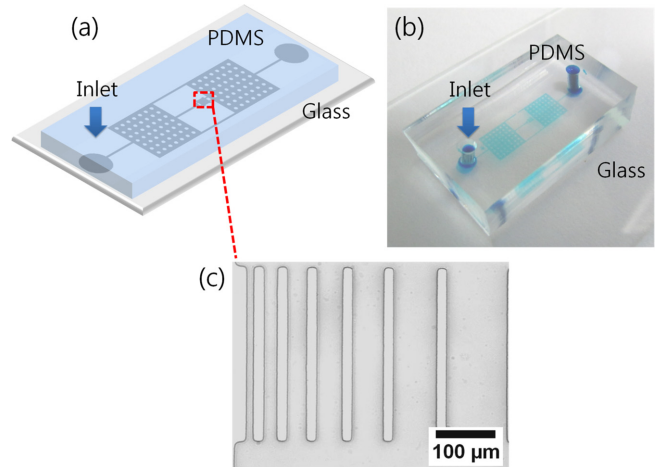


Fig. 2. (a) schematic diagram of the microchannels. (b) the Final assembled microfluidic chip composed of PDMS microchannels and glass substrate. (c) optical image of microchannels having different range of microchannel's width from 10 to 100 μm .

사용하여 반도체사진 공정을 통하여 제작하였다. 반도체사진 공정 시 4000 rpm으로 30 s 동안 스핀코팅을 진행하여 포토레지스트 층이 약 7 μm 높이가 되도록 하였다. 미세유체 칩은 복제 마이크로몰딩 방법(replica micromolding method)을 이용하였다. 먼저 반도체사진 공정 기술을 이용하여 웨이퍼에 유로가 새겨진 마스터를 호일을 사용하여 그릇 모양으로 감싼 후 여기에 PDMS (Dow Corning sylgard 184)를 붓는다. 이 PDMS는 올리고머와 경화제를 10:1의 비율로 섞은 후 진공 펌프를 사용하여 섞어줄 때 발생된 기포를 제거한다. 이를 고온상태의 오븐(65 $^{\circ}\text{C}$)에서 4시간 경화시킨 후에 PDMS를 실리콘 마스터에서 떼어낸다. 떼어 낸 PDMS에 inlet과 outlet을 펀칭 기구를 이용하여 지름 1.5 mm 크기의 구멍을 뚫어준다. 그 후에 유리 슬라이드와 결합시키기 위해 산소 플라즈마 클리너에서 플라즈마 처리를 한다. 플라즈마 처리를 한 PDMS와 유리 슬라이드에는 라디칼이나 반응성이 큰 오존분자가 형성되고 따라서 PDMS와 유리 슬라이드 표면의 화학적 결합이 이루어진다.

PDMS와 glass substrate 로 이루어진 미세유체 칩은 공기 투과성이 좋기 때문에 미생물 실험에 적합하며 투명한 특성으로 현미경을 사용하여 박테리아를 관찰하기 좋다는 이점이 있다. 또한 칩 내부의 양쪽 네모 모양의 reservoir (3 mm×3 mm)를 만들어 유체의 유속을 조절하기 쉽도록 하였다(Fig. 2(b)). 이는 유체의 흐름을 조절하여 실험 관찰 도중 유체의 흐름을 없애 박테리아가 자신의 운동을 통해 이동을 움직이도록 하기 위해 필요한 공간이다. 또한 Reservoir에서의 박테리아의 운동을 관찰하기 위한 목적으로 사용하여 좁은 유로에서의 박테리아와 비교를 하기 위하여 사용되어졌다. Reservoir에서 둥근 모양의 구조는 소프트-리소그래피 공정 후에 낮은 유로의 높이에 의해 천장이 바닥면과 붙는 섯다운(shutdown) 현상을 방지하기 위해서 기능 역할을 하게 된다. Reservoir의 기능은 지름이 200 μm 의 크기로 제작하였고 간격도 200 μm 씩 떨어져 설계를 하였다(Fig. 2(c)).

2-3. 미세유로 표면처리

미세유체 유로를 박테리아 운동성 실험에 사용하기 위해서 BSA (Bovine Serum Albumin)로 코팅을 해주었다. 박테리아는 유로의 바

막면으로 사용하는 유리화 nonspecific bonding을 하기 때문에 운동성을 관찰할 수 없다. 이런 이유로 유로 내부를 BSA로 코팅을 하여 박테리아와 유리의 접촉을 막아 주었다. 먼저 PBS buffer (Phosphate Buffered Saline)를 사용한 BSA 1% 용액을 이용을 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 유속으로 유로에 주입 후에, 표면이 고르게 코팅이 될 수 있도록 하기 위해 inlet과 outlet을 모두 테이프로 막은 후에 12 시간 동안 냉장고 (4 °C)에 보관을 하였다. 12 시간 후에 펌프를 사용하여 유로 내부에 존재하는 여분의 BSA 용액을 제거하기 위하여 PBS buffer 용액을 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 유속으로 10분 동안 흘려주면서 유로 내부를 세척을 하였다.

2-4. 박테리아 균주 배양

본 연구에 사용된 균주는 *Pseudomonas aeruginosa* (PAOI)로 유기영양세균류인 녹농균속의 무산소성 그람음성간균으로 토양이나 물 등의 환경에서 쉽게 발견되는 균주이다. 박테리아의 크기는 약 1~3 μm 정도의 크기이며 한 개 또는 여러 개의 편모를 가지고 있어 운동성을 가지고 있는 미생물이다.

박테리아는 동결 상태의 박테리아를 LB 배지 4 ml에 4 μl 를 접종하여 배양한다. 4 ml 배지에는 오염을 방지하기 위해서 항생제 (carbenicillin)를 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 넣어준다. 박테리아는 36.5 °C, 12시간 배양 후에 계대배양으로 6시간을 배양을 한다. 박테리아 용액의 분산매를 LB 배지에서 PBS buffer로 바꿔주기 위해 원심 분리기를 이용하여 상등액은 버리고 PBS buffer를 분산매로 박테리아를 재 분산시키는 과정을 3번 반복하여 실험용 박테리아를 준비한다. 주입된 박테리아의 농도는 $\text{O.D}_{600} = 0.8$ 로 맞추어 실험을 하였다. 박테리아의 농도가 $\text{O.D}_{600} = 1$ 이상이 되면 현미경을 이용하여 박테리아의 이동 궤적을 추적할 때 여러 개체가 서로 섞이게 되어 정확한 궤적을 추적하기 어렵다. 따라서 박테리아 용액을 희석하는 과정을 통해 개체수를 조절하여 현미경으로 관찰이 쉽도록 조절하였다.

박테리아는 inlet을 통해 집종을 한다. 마이크로 파이펫을 사용하여 20 μl 정도의 박테리아를 inlet에 떨어뜨리게 되면 inlet과 outlet의 높이 차이에 의해 발생한 유체의 흐름으로 박테리아들이 미세유체 유로 안으로 유입 된다. 유체의 흐름에 의해서 유입된 박테리아들이 관찰하려는 유로까지 도달하게 되면 유체의 흐름을 멈추어야 한다. 이때 사용하는 방법은 inlet 위로 올라온 박테리아 용액을 휴지를 사용하여 제거를 한 다음, PDMS 조각을 가지고 inlet과 outlet을 덮어 주게 되면 미세유체 유로 내부의 유체의 흐름을 멈출 수가 있다. 이런 방법으로 박테리아가 자신의 운동성을 가지고 운동을 할 수 있도록 만들어 준다.

2-5. 박테리아 운동 분석

박테리아의 이동 궤적 추적은 Image-Pro 프로그램을 사용하여 분석을 하였다. 프로그램의 연속 촬영 기능을 사용하여 0.1초 간격으로 50장을 연속 촬영하여 5초 동안의 동영상을 찍었다. 박테리아의 이동 궤적은 Manual Object Tracking 기술을 사용하여 연속 촬영된 동영상의 프레임 넘기면서 박테리아 움직임을 매뉴얼로 위치를 지정해 포인트를 찍는 방식으로 궤적을 추적하였다[24-28]. 0.1 s 간격으로 50 프레임 촬영된 동영상을 분석해보면 박테리아의 5초 동안의 움직임 궤적을 구할 수 있다. 그러나 모든 박테리아들을 5초 동안 관찰할 수는 없는데, 그 이유는 유로의 높이가 7 μm 로 박테리아의 크기인 3×1 μm 보다 큰 높이를 가지고 있어서 현미경의 초점을 벗어

나는 경우가 발생할 수도 있고, 박테리아가 어느 순간 유로의 벽이나 바닥이 붙어 버리는 경우도 발생하기 때문에 박테리아의 궤적을 확인할 수 있는 프레임 구간에서만 추적을 하였다.

박테리아의 움직임을 추적하면 소프트웨어에서 각 포인트 사이에서 박테리아의 이동 거리를 확인할 수 있고, 추가적으로 각 포인트당 각도의 변화량을 얻을 수 있다. 이렇게 얻어진 데이터를 이용하여 박테리아의 이동 속도를 얻었고, 박테리아의 각도 변화량을 이용하여 tumble 운동할 때의 박테리아의 평균 각도를 구했다.

3. 결과 및 토의

3-1. 박테리아의 속도

마이크로 미터의 제한된 공간에서 박테리아의 운동성 변화를 분석하기 위하여 유로의 너비 변화에 따른 *Pseudomonas aeruginosa* (PAOI)의 이동 속도를 측정하였다. 박테리아의 이동 속도는 박테리아의 움직임을 추적하여 식 (1)을 이용하여 구할 수 있다.

$$\text{Cell speed}(\mu\text{m/s}) = \frac{d_1 + d_2 + d_3 + \dots + d_n}{\text{Observation time}} \quad (1)$$

Reservoir와 각각의 유로 내에서 박테리아의 속도를 비교해 보면 차이가 크지 않고 평균적으로 58.98 $\mu\text{m/s}$ 의 속도를 유지하고 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3(a)). 하지만 유로가 너비가 좁아지면(10~20 μm) 표준 편차가 커지는 것으로 보아 각 유로 안에서 박테리아의 속도가 다양해지는 것을 알 수 있었다. 이러한 이유는 박테리아가 운동을 할 때 편모의 회전운동이 필요로 하는데, 이런 편모의 운동이 유로의 벽에 의해 영향을 받게 되며, 유로의 너비가 줄어들수록 회전 운동에 영향이 커져 속도의 분포가 커진 것으로 보인다[29,30]. 편차가 가장 작은 100 μm 유로와 편차가 가장 큰 20 μm 유로의 속도 분포를 비교해 보면 유로가 넓을수록 정상 속도 분포를 띄고 있으며 유로가 좁을수록 분포도가 넓어 지는 것으로 보아 유로 벽에 의하여 박테리아의 운동에 방해가 받는다는 것을 알 수가 있었다(Fig. 3(b)).

3-2. Run time과 Tumble angle

Run time은 박테리아가 지속적으로 직선형 운동을 하는 것을 측정하는 변수이다[31,32]. Run time을 측정하기 위해선 동영상 촬영 후에 'Run' 운동을 지속하는 시간을 측정해야 한다. 하지만 박테리아 개체가 많이 있기 때문에 기술적으로 어려움이 있어 추적된 궤적을 보고 'Tumble' 운동을 한 지점의 개수를 체크하여 이를 사용하여 쉽게 'Run' 구간의 수를 알 수 있고 식 2를 사용하면, run time을 구할 수 있다. Fig. 1를 확인해 보면 'Run' 구간이 'Tumble' 구간의 개수보다 1이 많은 것을 확인할 수 있고, 이것을 식 2에 나타내었다.

$$\text{Run time(s)} = \frac{\text{Observation time}}{\text{Number of tumbling} + 1} \quad (2)$$

Run time의 유로 내에서의 값과 Reservoir에서의 값의 경우 10~100 μm 유로 내에서는 평균적으로 0.34 s 정도의 값을 갖지만 Reservoir에서는 0.56 s라는 60.7% 증가한 값을 가지게 되는 것을 알 수 있다(Fig. 4(a)). 이는 박테리아의 속도에 영향을 준 것처럼 유로 벽이 박테리아가 'Run' 운동을 유지하는데 장애물이 되어 매우 좁은 유로 내에서는 'Run' 운동 지속 시간이 짧지만 Reservoir에서는 박테

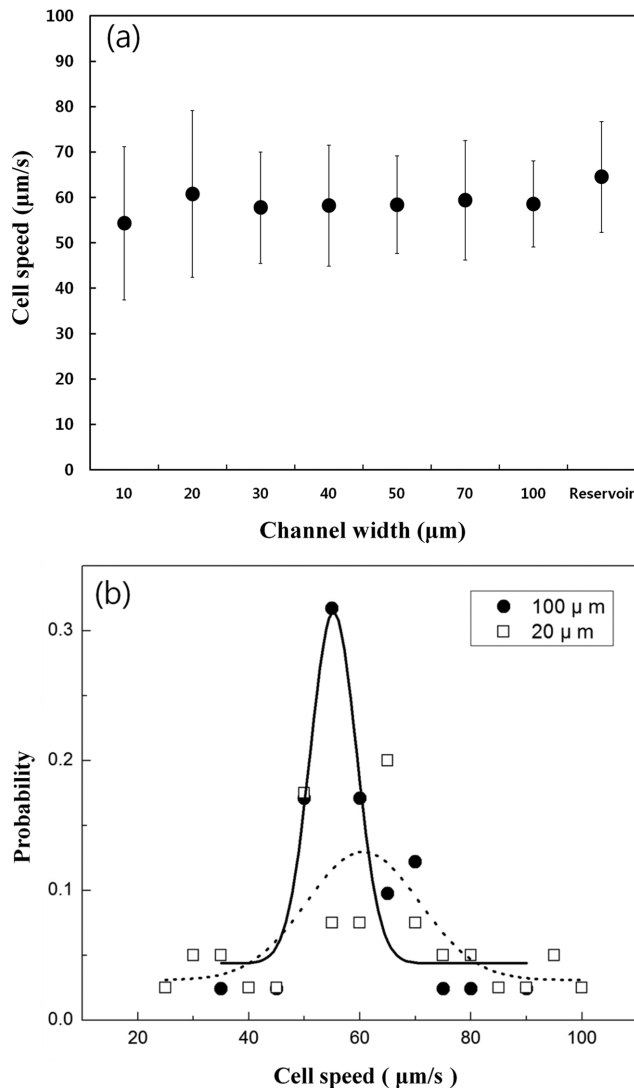


Fig. 3. (a) mean cell speed at each microchannel. (b) probability distribution for cell speed in the 20 μm and 100 μm channel.

리아 고유의 운동특성이 나타난 것으로 보인다.

Tumble angle은 박테리아가 'Tumble' 운동을 하게 되면 진행 방향을 바꾸게 되는데, 이때의 각도를 측정을 한 것을 말한다. Tumble angle은 Image-Pro 소프트웨어를 사용하여 쉽게 측정을 할 수 있다.

$$\text{Mean tumble angle } (\theta) = \frac{\theta_1 + \theta_2 + \theta_3 + \dots + \theta_n}{n} \quad (3)$$

Tumble angle 값은 20 μm~Reservoir 값은 평균 113.03° 값을 유지하고 있지만 10 μm 유로의 값은 100.76°로 비교적 차이가 있는 값을 얻을 수 있었다(Fig. 4(b)).

3-3. Bacteria motility coefficient

박테리아의 운동성이 brownian motion을 하는 입자와 비슷하기 때문에 이를 이용하여 확산 계수를 구하는 식을 변형하여 식 (4)와 같은 bacteria random motility coefficient (μ)를 구할 수 있다[33,34]. v (Mean cell speed), τ (Mean run time), θ (Mean tumble angle)을 사용하고, n_d (Dimension)은 실험을 하는 환경의 차원을 입력한다.

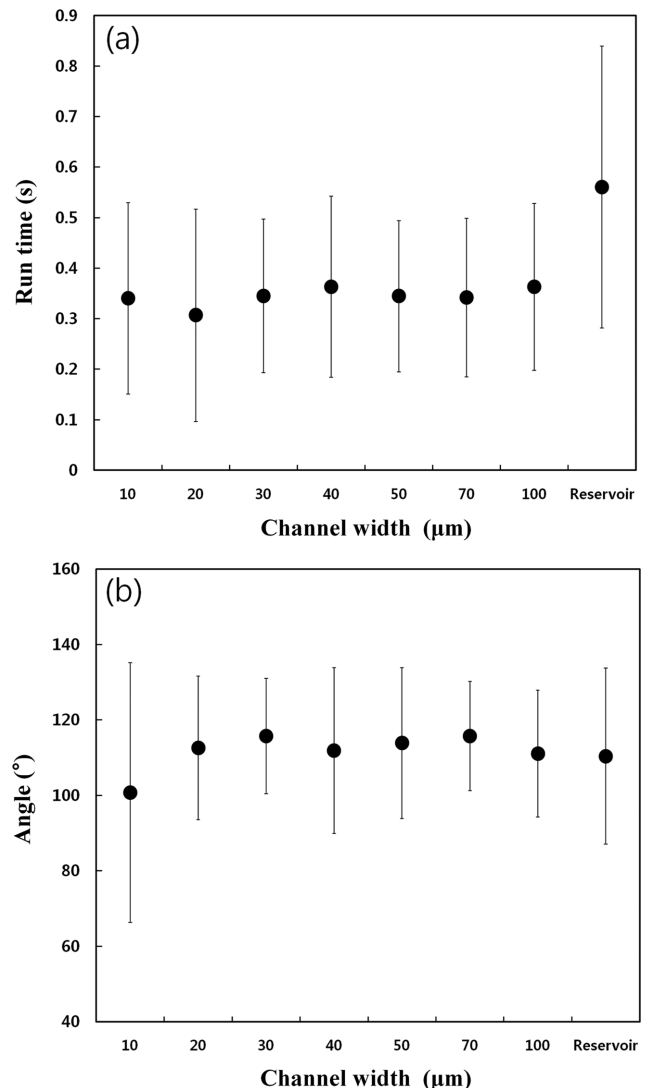


Fig. 4. (a) mean run time. (b) mean tumble angle at each microchannel.

본 연구에서는 매우 낮은 높이(7 μm)의 미세유체 유로를 사용하여 실험을 진행하며, 2차원(n=2)에서의 박테리아의 움직임을 관찰하였다.

$$\mu(\text{cm}^2/\text{s}) = \frac{v^2 \times \tau}{n_d(1 - \cos\theta)} \quad (4)$$

Fig. 5를 보면 Motility coefficient 또한 유로 내와 Reservoir 값의 크게 차이가 나는 것을 확인할 수 있다. 유로 내에서의 값은 평균적으로 $4.25 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ 의 값을 가지며, Reservoir에서는 $8.66 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ 값을 가지는 것으로 확인된다. 또한 2차원 내의 10 μm 유로에 대한 참고문헌 값은 $4.8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ 로 실험 결과 값은 $4.22 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ 실험 결과가 상당히 신뢰성 있는 값을 가진 것으로 확인된다.

따라서 유로 내에서는 reservoir에서의 박테리아 움직임보다 단위 시간 동안 작은 면적을 활동하는 것을 확인할 수 있고, 이는 2차원과 같은 얇은 공간의 reservoir에서의 움직임 보다 매우 좁은 다공성 공간과 비슷한 유로 내에서 박테리아 움직임이 활동이 적어짐을 의미한다. 따라서 박테리아의 움직임에 유로의 벽이 저항으로 작용을 하

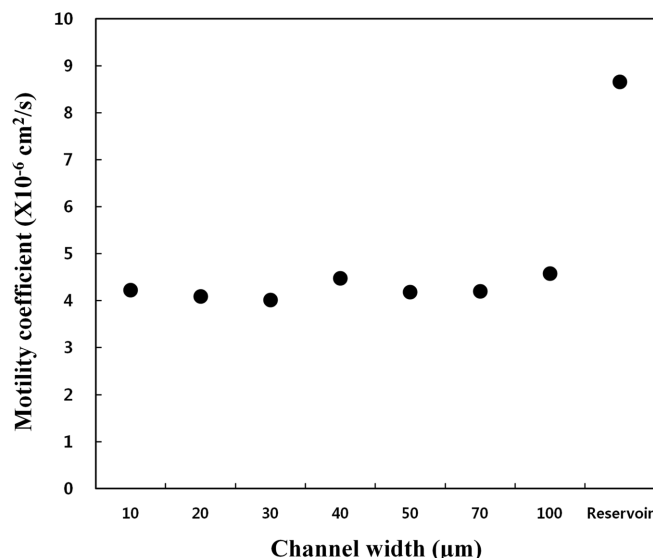


Fig. 5. Bacteria motility coefficient. The data is average value obtained from 50 measurements at each channel.

며, 박테리아의 움직임의 동력인 박테리아의 편모의 운동에 방해가 된다고 볼 수 있다[35,36].

4. 결 론

본 논문은 박테리아의 운동성 분석을 위해 자연 상태의 박테리아들의 서식처와 유사한 미세유로환경을 미세유체유로를 제작하여 모사하였으며 미세유체유로 내에서 단일 박테리아의 운동성을 손쉽게 관찰할 수 있었다. 상기의 방법을 이용하여 박테리아의 운동성 궤적을 추적하여 *Pseudomonas aeruginosa* (PAOI) 운동성의 기초 정보인 운동속도, Run time, Tumble angle 등을 계산할 수 있었다. 물리적 측정치를 분석한 결과, 유영하는 박테리아의 편모의 회전 운동이 미세유체 칩의 벽에 의해 제약을 받는 것을 확인할 수 있었으며, 'run' 운동 지속 시간이 짧아짐을 확인하였다.

따라서, 본 연구에서 제시한 방법으로, 미세 환경에서의 박테리아의 운동성을 예측 및 분석할 수 있으며, 더 나아가 단일 박테리아의 운동을 이해함으로써 박테리아의 집단적 운동을 이해하는데 중요한 기초 정보들을 획득할 수 있을 것으로 기대된다.

감 사

이 논문은 한국 극지연구소 학연 극지연구 진흥프로그램(Polar Academic Program (PAP), KOPRI), 2011년도 교육과학기술부의 재원으로 첨단의료기기사업본부-신기술융합형성장동력사업(2011K000709) 및 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업(2010-0028173-0) 지원을 받아 수행되었으며, 이에, 연구비 지원에 감사드립니다.

사용기호

d_n : Distance [μm]
 v : Mean cell speed [$\mu\text{m/s}$]

τ : Mean run time [s]
 n_d : Dimension of channel
 θ : Mean tumble angle [$^\circ$]
 μ : Bacteria random motility coefficient (μ)

참고문헌

1. Ringen, L. M. and Drake, C. H., "A Study of the Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* from Various Natural Sources," *J. Bacteriol.*, **64**, 841-845(1952).
2. Remold, S. K., Brown, C. K., Farris, J. E., Hundley, T. C., Perpich, J. A. and Purdy, M. E., "Differential Habitat Use and Niche Partitioning by *Pseudomonas* Species in Human Homes," *Microb. Ecol.*, **62**, 505-517(2011).
3. Ranjard, L. and Richaume, A. S., "Quantitative and Qualitative Microscale Distribution of Bacteria in Soil," *Res. Microbiol.*, **152**, 707-716(2001).
4. Saye, D. J., Ogunseitan, O. A., Sayler, G. S. and Miller, R. V., "Transduction of Linked Chromosomal Genes between *Pseudomonas-Aeruginosa* Strains during Incubation Insitu in a Fresh-Water Habitat," *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 140-145(1990).
5. Wiehlmann, L., Munder, A., Adams, T., Juhas, M., Kolmar, H., Salunkhe, P. and Tummli, B., "Functional Genomics of *Pseudomonas aeruginosa* to Identify Habitat-specific Determinants of Pathogenicity," *Int. J. Med. Microbiol.*, **297**, 615-623(2007).
6. Wang, Y., Hammes, F., Boon, N. and Egli, T., "Quantification of the Filterability of Freshwater Bacteria Through 0.45, 0.22, and 0.1 μm Pore Size Filters and Shape-dependent Enrichment of Filterable Bacterial Communities," *Environ. Sci. Technol.*, **41**, 7080-7086(2007).
7. Ahmed, T., Shimizu, T. S. and Stocker, R., "Microfluidics for Bacterial Chemotaxis," *Integr. Biol.*, **2**, 604-629(2010).
8. Park, A., Jeong, H. H., Lee, J., Kim, K. P. and Lee, C. S., "Effect of Shear Stress on the Formation of Bacterial Biofilm in a Microfluidic Channel," *Biochip J.*, **5**, 236-241(2011).
9. Kim, K. P., Kim, Y. G., Choi, C. H., Kim, H. E., Lee, S. H., Chang, W. S. and Lee, C. S., "In situ Monitoring of Antibiotic Susceptibility of Bacterial Biofilms in a Microfluidic Device," *Lab Chip*, **10**, 3296-3299(2010).
10. Jeong, H. H., Lee, S. H., Kim, J. M., Kim, H. E., Kim, Y. G., Yoo, J. Y., Chang, W. S. and Lee, C. S., "Microfluidic Monitoring of *Pseudomonas aeruginosa* Chemotaxis Under the Continuous Chemical Gradient," *Biosens. Bioelectron.*, **26**, 351-356(2010).
11. Huh, Y. S., Jeon, S. J., Lee, E. Z., Park, H. S. and Hong, W. H., "Microfluidic Extraction Using two Phase Laminar Flow for Chemical and Biological Applications," *Korean J. Chem. Eng.*, **28**, 633-642(2011).
12. Sia, S. K. and Whitesides, G. M., "Microfluidic Devices Fabricated in Poly(dimethylsiloxane) for Biological Studies," *Electrophoresis*, **24**, 3563-3576(2003).
13. DiLuzio, W. R., Turner, L., Mayer, M., Garstecki, P., Weibel, D. B., Berg, H. C. and Whitesides, G. M., "Escherichia coli Swim on the Right-hand Side," *Nature*, **435**, 1271-1274(2005).
14. Mannik, J., Driessen, R., Galajda, P., Keymer, J. E. and Dekker, C., "Bacterial Growth and Motility in Sub-micron Constrictions," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 14861-14866(2009).

15. Binz, M., Lee, A. P., Edwards, C. and Nicolau, D. V., "Motility of Bacteria in Microfluidic Structures," *Microelectron. Eng.*, **87**, 810-813(2010).
16. Di Leonardo, R., Angelani, L., Dell'arciprete, D., Ruocco, G., Iebba, V., Schippa, S., Conte, M. P., Mecarini, F., De Angelis, F. and Di Fabrizio, E., "Bacterial Ratchet Motors," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 9541-9545(2010).
17. Kaehr, B. and Shear, J. B., "High-throughput Design of Microfluidics Based on Directed Bacterial Motility," *Lab Chip*, **9**, 2632-2637(2009).
18. Hulme, S. E., DiLuzio, W. R., Shevkoplyas, S. S., Turner, L., Mayer, M., Berg, H. C. and Whitesides, G. M., "Using Ratchets and Sorters to Fractionate Motile Cells of *Escherichia coli* by Length," *Lab Chip*, **8**, 1888-1895(2008).
19. Maki, N., Gestwicki, J. E., Lake, E. M., Kiessling, L. L. and Adler, J., "Motility and Chemotaxis of Filamentous Cells of *Escherichia coli*," *J. Bacteriol.*, **182**, 4337-4342(2000).
20. Turner, L., Zhang, R. J., Darnton, N. C. and Berg, H. C., "Visualization of Flagella During Bacterial Swarming," *J. Bacteriol.*, **192**, 3259-3267(2010).
21. Berg, H. C. and Anderson, R. A., "Bacteria Swim by Rotating Their Flagellar Filaments," *Nature*, **245**, 380-382(1973).
22. Yuan, J., Fahrner, K. A., Turner, L. and Berg, H. C., "Asymmetry in the Clockwise and Counterclockwise Rotation of the Bacterial Flagellar Motor," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 12846-12849(2010).
23. Berg, H. C., *E. coli* in motion, Springer, New York(2004).
24. Li, G. L., Tam, L. K. and Tang, J. X., "Amplified Effect of Brownian Motion in Bacterial Near-surface Swimming," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 18355-18359(2008).
25. Thar, R. and Kuhl, M., "Bacteria are Not Too Small for Spatial Sensing of Chemical Gradients: An Experimental Evidence," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 5748-5753(2003).
26. Maeda, K., Imae, Y., Shioi, J. I. and Oosawa, F., "Effect of Temperature on Motility and Chemotaxis of *Escherichia coli*," *J. Bacteriol.*, **127**, 1039-1046(1976).
27. Frymier, P. D., Ford, R. M., Berg, H. C. and Cummings, P. T., "Three-dimensional Tracking of Motile Bacteria Near a solid Planar Surface," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 6195-6199(1995).
28. Berg, H. C., "How to Track Bacteria," *Rev. Sci. Instrum.*, **42**, 868-871(1971).
29. Jeon, H., Lee, Y., Jin, S., Koo, S., Lee, C. S. and Yoo, J. Y., "Quantitative Analysis of Single Bacterial Chemotaxis Using a Linear Concentration Gradient Microchannel," *Biomed. Microdevices*, **11**, 1135-1143(2009).
30. Frymier, P. D. and Ford, R. M., "Analysis of Bacterial Swimming Speed Approaching a Solid-liquid Interface," *AIChE J.*, **43**, 1341-1347(1997).
31. Liu, Z. and Papadopoulos, K. D., "A Method for Measuring Bacterial Chemotaxis Parameters in a Microcapillary," *Biotechnol. Bioeng.*, **51**, 120-125(1996).
32. Berg, H. C. and Brown, D. A., "Chemotaxis in *Escherichia coli* Analysed by Three-dimensional Tracking," *Nature*, **239**, 500-504(1972).
33. Othmer, H. G., Dunbar, S. R. and Alt, W., "Models of Dispersal in Biological Systems," *J. Math. Biol.*, **26**, 263-298(1988).
34. Lewus, P. and Ford, R. M., "Quantification of Random Motility and Chemotaxis Bacterial Transport Coefficients Using Individual-cell and Population-scale Assays," *Biotechnol. Bioeng.*, **75**, 292-304(2001).
35. Ramia, M., Tullock, D. L. and Phan-Thien, N., "The Role of Hydrodynamic Interaction in the Locomotion of Microorganisms," *Biophys. J.*, **65**, 755-778(1993).
36. Biondi, S. A., Quinn, J. A. and Goldfine, H., "Random Motility of Swimming Bacteria in Restricted Geometries," *AIChE J.*, **44**, 1923-1929(1998).