

## 이미지 분석 프로그램을 이용한 액적 내 세포 계수 방법

김진경 · 김재성 · 이창수<sup>†</sup>

충남대학교 공과대학 응용화학공학과  
34134, 대전광역시 유성구 대학로 99  
(2022년 9월 7일 접수, 2022년 10월 23일 수정본 접수, 2022년 11월 8일 채택)

## Automated Bacterial Cell Counting Method in a Droplet Using ImageJ

Jingyeong Kim, Jae Seong Kim and Chang-Soo Lee<sup>†</sup>

Department of Chemical Engineering and Applied Chemistry, Chungnam National University,  
99, Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon, 34134, Korea

(Received 7 September 2022; Received in revised form 23 October 2022; Accepted 8 November 2022)

### 요 약

본 연구에서는 이미지 분석 프로그램을 통해 액적 내 박테리아 세포의 개수를 측정하는 코딩-기반의 자동화된 세포 계수 방법을 제시하였다. 먼저, 형광 이미지 기반의 분석을 위하여, 형광단백질을 발현하는 균주를 담지한 액적을 형성하고 이를 광학 및 형광 현미경을 이용하여 분석 결과를 나타냈다. 액적의 관찰을 용이하게 위하여 유리 그리드에 도포하고, 촬영한 광학 이미지를 통해 분석하고자 하는 영역(Region of Interest)을 지정하였다. 동일한 위치에서 촬영한 형광 이미지에서 앞서 지정된 영역 속 특정 임계 값을 넘는 형광 신호를 계수하여 세포 수를 정량화 하였다. 또한 서로 다른 농도의 항생제를 처리한 액적 내 박테리아의 시간에 따른 세포 개수 변화의 차이를 추적하였다. 30분 간격으로 동일한 위치에서의 형광 이미지들을 동시에 분석함으로써 시간에 따른 세포 개수 변화를 도출하였고, 본 계수법의 성능을 실험적으로 검증하였다. 본 논문의 방법은 외부 분석 프로그램을 이용한 기존 방법 대비 분석 시간을 15배 가량 단축하고, 99%의 정확도를 보이는 것으로 확인되었다. 더 나아가 사용자의 연구의 방향에 맞춰 제시된 코드의 확장 수정을 통해 다양한 종류의 세포 계수 연구에 도움이 될 것으로 기대된다.

**Abstract** – Precise counting of cell number stands in important position within clinical and research laboratories. Conventional methods such as hemocytometer, migration/invasion assay, or automated cell counters have limited in analytical time, cost, and accuracy, which needs an alternative way with time-efficient *in-situ* approach to broaden the application avenue. Here, we present simple coding-based cell counting method using image analysis tool, freely available image software (ImageJ). Firstly, we encapsulated RFP-expressing bacteria in a droplet using microfluidic device and automatically performed fluorescence image-based analysis for the quantification of cell numbers. Also, time-lapse images were captured for tracking the change of cell numbers in a droplet containing different concentrations of antibiotics. This study confirms that our approach is approximately 15 times faster and provides more accurate number of cells in a droplet than the external analysis program method. We envision that it can be used to the development of high-throughput image-based cell counting analysis.

Key words: Droplet, Cell-counting, ImageJ, Macro, Coding

### 1. 서 론

살아있는 세포를 이용하는 실험들에 있어, 일반적인 실험 절차와 분석에서 연구자들은 항상 정확한 세포의 수를 정량화 하는 것이

중요하다. 특히나 미생물 계수는 세포 기반 연구의 필수적인 부분으로 식품 및 의약품 안전성 시험, 생물 의학 시험 및 환경 모니터링에 널리 사용되어오고 있다[1]. 현재까지 미생물을 비롯한 세포의 수는 이미지 기반을 비롯하여 다양한 방법으로 계수되고 있다[2]. 총 균수(total cell number) 측정법에는 현미경 측정법(microscopic count)과 입자계수기(electronic particle counter) 사용법이 있으며, 생존수(viable cell number) 측정법에는 평판배지법(plate culture method), 막막여과법(membrane filtration), 최확수법(MPN, most probable number) 등이 있다.

<sup>†</sup> To whom correspondence should be addressed.

E-mail: rhadum@cnu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

가장 보편적으로 이용되는 방법인 혈구 계산기(Hemocytometer)는 중간에 에칭된 수직선 그리드가 있는 두꺼운 유리 현미경 슬라이드로 구성되며, 사각형 그리드 영역 당 세포의 수를 계산하여 특정 부피의 세포 용액에서 세포 수를 계산하는 방법이다. 이 방법은 세포 종류에 관계없이 이용할 수 있을 뿐만 아니라 다양한 염색염료를 이용하여 세포 염색 또한 가능하다. 집락계수법(Plate counting)이라고도 하는 평판 계수법은 멸균된 고체 배지에 세포를 분주하는 방법으로, 배지 표면 혹은 내부에서 균주가 성장하며 형성한 집락(colony) 수를 계수하는 방법으로 진행된다[3]. 앞선 두 방법들은 현미경을 제외한 별도의 기기가 필요하지 않으며 간단하고 전문지식이 많지 않더라도 수행할 수 있는 방법이라는 장점이 있다. 그러나 앞선 방법들은 많은 양의 샘플을 한 번에 분석할 수 없을 뿐만 아니라 분석자들간 실험 편차가 발생하기 쉽기 때문에 정확하고 균일한 데이터를 얻기 어렵다는 단점이 존재한다. 이를 위해 최근에는 계수를 위한 상업화된 기기들이 많이 등장하고 있다[4]. 그러나 상업화된 자동화장비는 고가일 뿐만 아니라 세포 종류 등 여러가지 조건에 제약이 있을 수 있다. 또한 대부분의 자동계수 장비들은 세포를 화학물질을 이용하여 관찰하고자 하는 장치 내부 특정 부분에 고정시키거나 별도의 세포 염색을 한 채로 계수를 진행한다. 앞서 고정이나 염색 같이 세포에게 자극을 주는 경우에는 세포의 생존능력에 영향을 줄 뿐이라, 실시간으로 세포의 수나 표현형이 변화하는 모습을 관찰하기 어렵다는 단점이 존재한다. 최근에는 이를 보완하기 위하여 사용자가 수천 개의 이미지에서 표현형을 정량적으로 측정할 수 있도록 설계된 무료 오픈 소스 소프트웨어인 CellProfiler 등 이미지 기반의 자동 계수를 수행할 수 있는 여러 프로그램들도 다양하게 제시되고 있다[5-8]. 그럼에도 불구하고 앞선 상업화된 기기나 무료로 배포되고 있는 이미지 기반 소프트웨어를 이용한 분석 방법들은 혈구계산기나 상업화된 기기 내부의 부품을 이용한 방법이다. 따라서 미세유체장치를 통하여 제작된 액적과 같은 다른 시스템에서는 그 내부에 존재하는 세포의 수를 계수 할 수 없다는 한계가 존재한다.

기존의 액적 기반 미세유체시스템에서는 유세포 분석기(Flow cytometer)나 미세유체장치 내에서 세포가 내는 신호를 기반으로 신호의 세기에 따라 분류하는 방법을 이용해오고 있다[9]. 액적 내에서 세포를 감지하는 데 크게 이미지 기반 분석과 레이저 유도 형광(LIF: laser-induced fluorescence)의 두 가지 주요 방법이 사용된다[10,11]. 이미지 기반 분석은 형체를 이용해 세포를 라벨링하는 등의 형광 분석과 함께 이용되며[12], 이를 통해 세포의 표현형과 세포 생리학적 상태와 관련된 직접적인 정보를 얻을 수 있다. 그러나 이는 앞서 생성된 액적이 미세유체장치 내에 특정 구조를 이용하여 고정되어야 하거나 자동화된 분석이 어렵다는 단점이 있다[13]. 대조적으로, LIF는 각 액적 속 합입된 세포가 미세 유체 장치 채널을 따라 흐르며, 특정 분석 구간에서 레이저로 연속적으로 스캔하고 분석하는 방법이다. 레이저 스캔을 통해 얻어진 형광 신호가 신호 수신기에 의해 측정되기 때문에 초당 수만 개 이상으로 빠른 시간에 처리량이 많은 분석에 사용할 수 있다[14,15]. 그러나 LIF는 이미지 분석과 다르게 액적이 레이저를 쬔 시간만 스치고 지나가는 방식으로 액적 내에 단일 세포가 존재할 경우에 그 세포의 신호가 약해 분석이 어려울 뿐만 아니라 액적 내 세포의 시간 경과에 따른 정보를 얻기 어렵다는 단점이 있다.

ImageJ는 이미지 처리를 위한 오픈 소스 프로그램으로, 전세계적

으로 배포되어 있기 때문에 생물/미생물학 분야에서 많이 이용되고 있는 도구 중 하나이다. 특히 특정 세포의 종류나 시스템에 제한 받지 않고 범용적으로 활용할 수 있기 때문에 많은 연구에서 이용되고 있다[16,17]. 하지만 이와 같은 이미지 분석 프로그램을 이용해 동일한 이미지를 분석하더라도, 분석하는 연구자마다 형광 신호에 대한 임계값과 같은 분석 조건을 다르게 설정할 수 있다[18]. 이로 인해 동일한 이미지에 대한 서로 다른 결과 값을 도출할 수 있기 때문에 실험 결과에 대한 재현성을 확보하기 어렵고 실험 편차가 발생할 수 있다. 따라서 Matlab과 같은 외부 프로그램을 추가로 도입한 자동화된 분석 공정이 요구된다.

따라서 본 논문에서는 기존의 액적 내 형광 신호를 내는 세포의 수를 시간의 경과에 따른 변화를 관찰하기 어려울 뿐만 아니라 분석 시간이 오래 걸린다는 단점을 보완하고자, 이미지 분석 프로그램을 통해 간단한 코딩 기반의 자동화된 액적 내 박테리아 세포 실시간 계수 방법을 제시하였다. 무료이며 확장성이 있는 배포용 이미지 분석 프로그램에 이용가능한 코딩을 디자인하였고, 외부 프로그램을 사용하지 않고 광학 및 형광 현미경만을 이용하여 액적을 관찰 및 분석할 수 있는 자동화 공정을 설계하였다. 미세유체장치를 통해 형광을 발현하는 박테리아 세포를 액적 내에 담지하여, 형광 이미지 내에서 각 세포로부터 발생하는 특정 임계 값 이상의 형광 신호를 계수하였다. 이후 액적 내 실시간으로 세포의 수 변화를 관찰 및 추적하기 위하여 다양한 농도의 항생제와 박테리아 세포를 동시에 합입하고 있는 액적으로부터 시간에 따른 세포 개수의 변화를 모니터링 하였다. 형광 이미지의 경우 30분 간격으로 3시간동안 촬영하여 분석하였다. 결과적으로 항생제 농도가 증가할수록 박테리아 세포의 성장이 점진적으로 저해되는 양상을 확인하였을 뿐만 아니라, 기존 방법 대비 약 15배 가량 분석 시간을 단축하였다. 이에 더하여 분석의 정확도면에서도 약 3% 더 높은 선형성을 보이는 것을 통해 간단한 코딩 기반의 이미지 분석 방법의 효용성을 검증하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2-1. 분석 프로그램 소개

ImageJ는 미국 국립보건원(National Institutes of Health)과 광학 및 전산 계측 연구소(LOCI, University of Wisconsin)에서 개발한 Java 기반 이미지 처리 프로그램이다. Java 플러그인을 통하여 다양한 기능을 사용할 수 있게 개방형 아키텍처로 설계되어 있다. ImageJ는 8비트 컬러 및 그레이 스케일, 16비트 정수 및 32비트 표시, 편집, 분석, 처리, 저장 등 다양한 작업을 수행할 수 있다. 사용가능한 이미지의 형식 또한 TIFF, PNG, GIF, JPEG, BMP, DICOM 및 FITS 등 다양한 이미지 파일 형식에 널리 이용이 가능하다. 또한, ImageJ는 사용자가 정의한 신호 임계 값 및 픽셀 값 통계를 계산할 수 있다. ImageJ의 가장 큰 장점으로는 본 논문에서도 이용한 것처럼 내장 편집기와 Java 컴파일러를 사용하여 맞춤형 수집, 분석 및 처리 플러그인을 개발할 수 있다는 점이다. 분석에 사용자가 원하는 대로 사용자 코드 작성 플러그인을 사용하여 분석방법을 제작한다면 3차원 살아있는 세포 이미징에서 방사선 이미지 처리 다중 이미징 시스템 데이터 비교, 자동화된 혈액학 시스템에 이르기까지 많은 이미지 처리 및 분석 문제를 해결할 수 있다는 장점을 가지고 있다[19-21].

## 2-2. 미세유체장치를 이용한 세포를 함유한 액적의 제작

우리는 본 실험에서 세포가 함유된 액적을 제작하기 위하여 Fig. 1에 제시된 미세유체장치(microfluidic device)를 이용하였다. 본 실험에서 사용된 미세유체장치의 구조와 그에 따른 실제 실험 이미지는 Fig. 1과 같다.

미세유체장치는 수십에서 수백 마이크로미터 영역의 크기를 가진 미세유로를 사용하여 매우 적은 양의 유체를 생산하는 기술을 이용한 장치이다[22]. Fig. 1의 장치를 이용하여, 기름상(연속상)과 수용상(분산상)과 같이 섞이지 않는 유체들을 주입할 경우, 두 유체가 교차하는 지점에서 연속상의 전단력(shear stress) 등에 의해 분산상(disperse phase)이 끊어지며 콜로이드 형태의 액적이 생성된다[23]. 결과적으로 액적 기반 미세유체 장치를 통해 분산상(disperse phase)으로 주입된 수용액의 구성을 갖는 액적이 생성된다.

본 실험에서는 시린지 펌프(Harvard Apparatus PHD 2000 Advance Syringe Pump)를 사용하여 연속상은 1000  $\mu\text{L/hr}$ 으로, 분산상은 200  $\mu\text{L/hr}$ 의 유속을 미세유체장치에 주입하였다. 미세유체장치의 경우 액적이 흐르는 유로의 구조가  $50 \times 50 \mu\text{m}$ 의 dimension을 갖도록 설계되었으며, 이를 통해 제작한 미세유체장치의 채널에서 액적이 구형의 형태를 유지할 수 있는 가장 최대의 크기로 지름 약 55  $\mu\text{m}$ 의 액적을 형성하였으며 연속상에 3M™ Novec™ 7500 Engineered Fluid를 이용하였다. 사용된 3M™ Novec™ 7500 Engineered Fluid는 불활성, 생체 적합성 생체 적합성일 뿐만 아니라 기체 교환을 가능하게 생물을 기반으로 한 미세유체 장치의 응용에 널리 이용되고

있다. 또한 콜로이드 형태의 액적을 제작할 뿐만 아니라 안정적으로 생성된 액적을 유지하기 위하여 앞선 유체에 계면 활성제로서 2 wt%의 PFPE-PEG-PFPE도 첨가하였다.

본 방법이 세포의 형광 신호를 계수하기 때문에 실험에 사용될 세포는 적색 형광 단백질을 발현하는 포도상구균인 *Staphylococcus aureus* NCTC 8325-4를 사용하였다. 따라서 분산상으로는 1X Mueller Hinton broth (MHB) 배지(22 g/L)와 함께 세포를 담지한 세포 현탁액을 제조하여 액적을 제작함으로써 세포가 액적 내에서 자랄 수 있는 환경을 조성해주었다.

## 2-3. 단일세포 함입을 위한 확률분포기반의 세포 농도

미세유체장치의 채널 속 세포는 채널을 따라 흐르다가 액적이 형성되는 지점에서 액적 속에 캡슐화(encapsulation)된다. 이때 분산상에 세포를 포함하여 액적을 제작하는 경우 형성된 액적 속 세포의 존재 여부는 푸아송(Poisson) 확률분포 함수를 따른다[24,25].

푸아송 확률 분포는 다음과 같은 수식으로 나타 낼 수 있으며,

$$P(k) = e^{-\lambda} \frac{\lambda^k}{k!} \quad (1)$$

위의 수식에서  $\lambda$ 는 액적 부피당 세포 수의 평균값을,  $k$ 는 가능성으로 액적 속에  $\lambda$ 개의 세포가 들어있을 가능성을 의미한다. 세포가 액적이 제작되는 지점에 도달할 확률인  $P(k, \lambda)$ 는 세포의 농도와 관련이 있으므로 수용액 속 세포의 농도에 따라 확률분포는 달라진다.

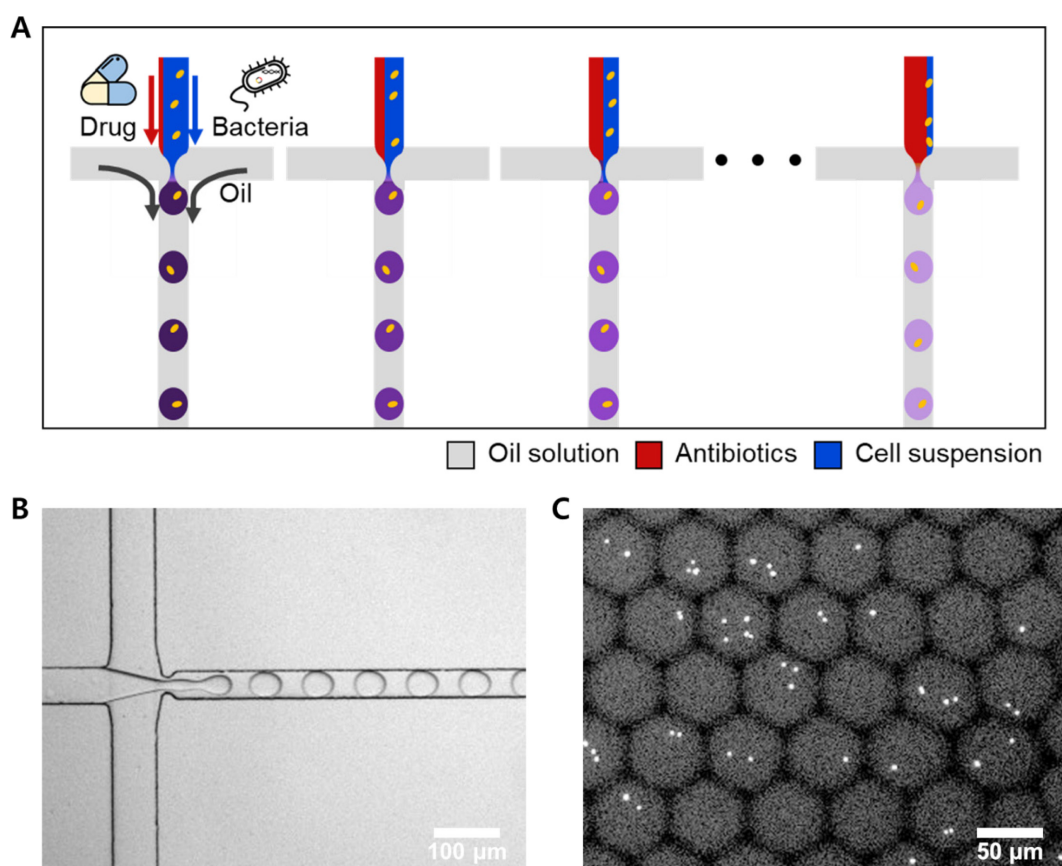


Fig. 1. Devices for microfluidic encapsulation A. Schematic diagram of producing droplets with cells using microfluidic devices B. Microscopic image of droplet generation. C. Fluorescence image of droplets with encapsulated bacteria strain of *Staphylococcus aureus* NCTC 8325-4 expressing red fluorescence protein (RFP).

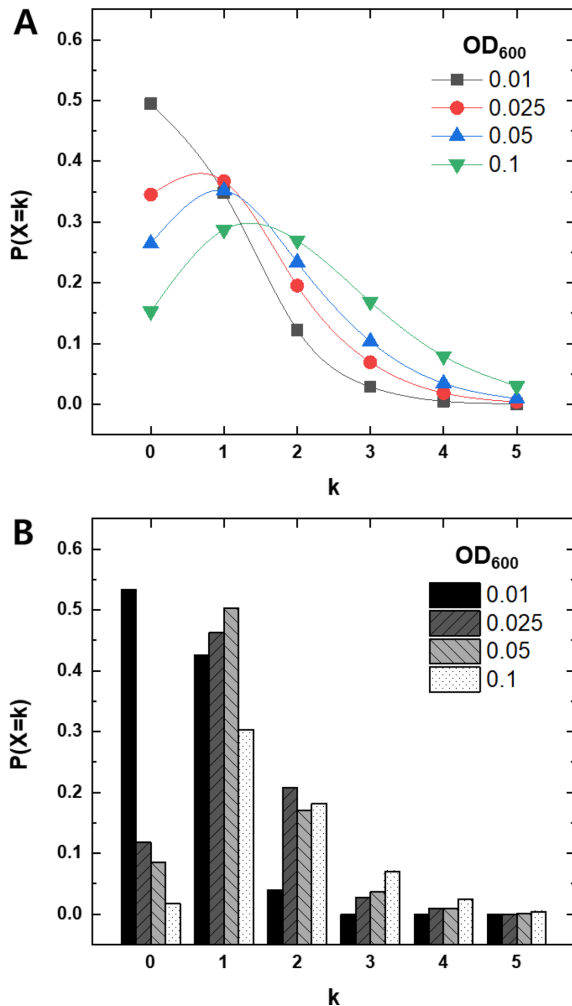


Fig. 2. Poisson distribution.  $OD_{600}$  means Optical Density in 600 nm. A. Theoretical distribution graph of encapsulation efficiency of cell according to cell optical density. B. Experimental probability distribution graph of encapsulation efficiency of cell according to cell optical density.

Fig. 2에서는 사용한 미세유체장치에서 세포의 농도에 따른 푸아송 분포를 나타내었다. 본 실험에서 미세유체장치에 사용된 세포의 농도는 600 nm에서 흡광도(optical density,  $OD_{600}$ )를 측정하여 계산되었다.

액적 내에 세포를 함입 시킴과 동시에 단일 세포가 들어갈 확률을 최대화하기 위하여, 세포의 주입 농도에 따른 액적 내 세포 수를 분석하였다. Fig. 2A에서는 사용된 세포의 농도에 따른 이론적인 푸아송 분포의 값이며, B에서는 실제 실험을 통하여 도출된 액적당 확률 값을 계산하였다. 이론 값과 실험값에서 공통적으로 확인할 수 있듯이 미세유체장치에 사용된 세포 수용액 속 세포의 농도가 낮을수록 세포가 액적 내에 함입될 확률이 적어지게 되며 빈 액적이 형성될 확률이 높다. 반대로 세포의 농도가 높은 경우에는 한 액적에 여러 개의 세포가 동시에 함입되어 들어갈 가능성이 높다. 세포의 농도가 흡광도 0.05보다 높을 경우에는 빈 액적의 수는 0에 수렴하지만 액적 내에 단일세포가 아닌 여러 개의 세포가 동시에 함입될 확률이 70%이상임을 확인할 수 있다.

결론적으로, 빈 액적의 수가 적으며 단일 세포가 들어가는 것을 의미하는  $k=1$ 일 확률이 높은 0.05의 흡광도를 가지는 농도로 세포

수용액을 희석하여 실험을 진행하였다. 그 결과, 분석 대상인 단일 세포가 함입되어 있는 액적은 50% 이상 확보하였으며, 2개 이상의 세포를 함입한 액적의 경우 30% 이하인 것을 확인하였다. 이 때, 액적 내 평균 세포 개수는 0.58, 표준 편차  $\sigma$ 는 1.84로 계산되었다.

#### 2-4. 액적 기반의 환경에서의 균주의 광학 및 형광 이미지 촬영

실험에 이용된 세포인 *Staphylococcus aureus* NCTC 8325-4는 적색 형광 단백질을 발현하는 포도상구균이다. 우리는 미세유체장치에 다음의 균을 배지와 함께 함입하여 액적을 제작하였다. 액적 내 존재하는 박테리아의 성장 동력학을 관찰하기 위해서는 제작된 액적의 고정화(immobilization) 혹은 인덱싱과(indexing) 장시간 배양 및 모니터링이 필요하다. 이를 위하여 floating droplet array (FDA)와 같이 액적을 관찰하기 위한 미세유체장치 구조들이 제시되었다[26]. 하지만 이와 같은 PDMS 기반의 미세유체장치 내에서 액적을 장시간동안 관찰할 경우, PDMS의 다공성 구조를 통한 수성상의 증발로 인해 액적의 수축 및 변형이 야기된다. 이를 방지하기 위한 방법으로서 미세유체장치를 물에 잠기도록 하고 주변 습도 환경을 포화상태로 만들어주는 온도 제어가 가능한 외부 구조의 추가 도입이 필요하다[27,28]. 따라서 별도의 외부 장치 필요 없이 액적을 장시간 관찰하기 위해서는 유리나 poly(methyl methacrylate)와 같이 투과성이 없고 변형 효과를 나타내지 않는 대체 물질의 사용이 요구된다[29].

액적을 고정 및 관찰하기 위한 틀을 만들기 위한 대체 물질로서, 슬라이드 글라스 위에 photoresist SU-8 3025를 도포하여 포토리소 그래피를 통해 Fig. 3의 A와 같은 구조를 제작하였다. 제작된 액적은 해당 구조 내부에 고정되며, 100 배율(대물렌즈 곱 접안렌즈)에서 관찰 시 하나의 윈도우 내에서 최대로 관찰하기 위해 Fig. 3B와 같이 하나 당 가로, 세로, 높이가 92569060  $\mu\text{m}$ 인 상자와 같은 직사각형 형태를 가진 그리드를 이용하여 액적을 고정시켰다. 고정된 액적의 단면은 Fig. 3의 C와 같은 모습이다.

고정된 액적들은 37  $^{\circ}\text{C}$ 가 유지되는 챔버를 제작하여 실험 종료까지 일정한 온도 유지하에 액적을 배양하였으며 실제로 실험이 종료시까지 움직임 없이 그리드에 고정 되어있는 모습을 보인다. 그리드 속 고정된 액적들에 대해 배양 시간 동안 특정 시간 간격으로 동일 그리드 위치에서 액적에 대한 광학 이미지와 형광 이미지를 각각 촬영하였다. 본 실험에서는 박테리아가 증식하는 평균적인 증식시간인 30분을 기본으로 이미지 촬영을 진행하였으며, 이와 같이 일정한 시간 간격으로 액적 내부의 형광 신호를 지속적으로 모니터링하고 이미지를 진행하였다. 균주가 적색 형광 단백질을 생산하므로, 균주의 증식은 TRITC 필터를 이용하여 형광을 관찰함을 통해 그 액적의 내부에 함입된 균주의 형광 신호 개수의 증가를 관찰하였다. 균주는 형광 단백질을 발현하는 균주이기에 시간이 지나 액적 내에서 균주가 증식할 경우 액적 내에 형광 신호의 개수가 증가함을 이용하였다.

항생제를 함께 함입한 액적은 세포가 희석된 현탁액과 목표하는 항생제의 농도의 혼합으로 제작하여 분산상의 Inlet에 주입해 주었다. 항생제의 농도는 균주의 성장이 저해되는 최소저해농도 문헌 값과 비교하여 최소저해농도를 중심으로 그 이상과 이하를 2개씩 더 진행하여 총 5개의 농도에 대해서 실험을 진행하였다. 각각의 항생제 농도를 포함한 액적을 동일하게 그리드에 분주하고 기 제시 하였던 동일한 시간과 방법으로 이미지를 진행하였다.



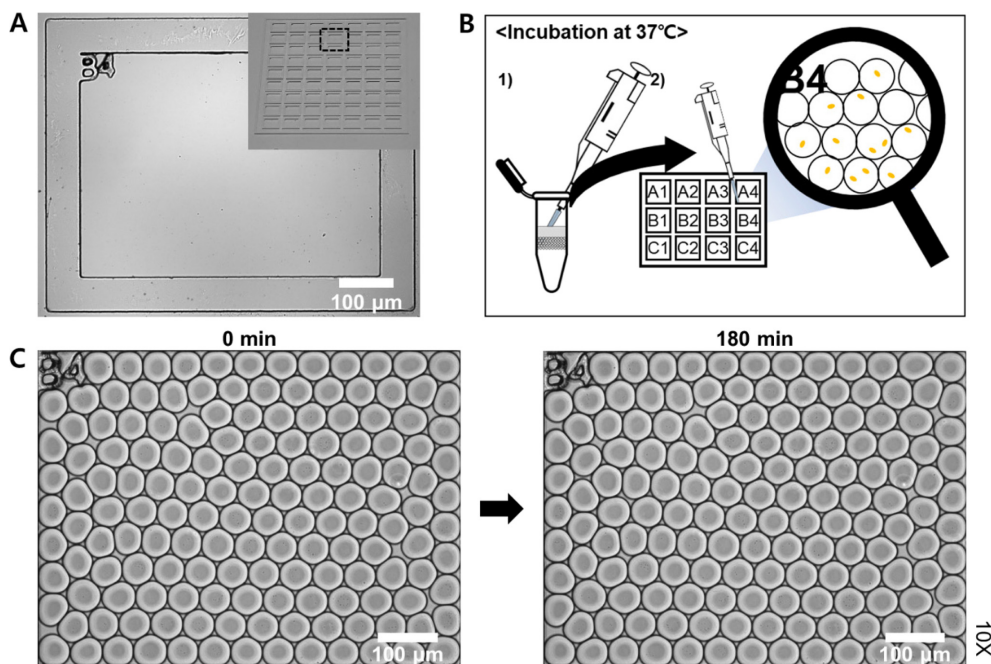


Fig. 3. Imaging methods for droplet. A. Example of single well in a glass grid. (Inset) Glass grid fabricated with photoresistor for immobilization of droplets. B. Schematic diagram of droplet loading on glass grid and counting the number of cells. C. Microscopic image of immobilized droplet over 3 hours with high stability.

## 2-5. 매크로 프로그램을 이용한 분석 과정

본 논문에서는 계수 속도와 정확도를 개선하고자 하는 것을 목표로 하였다. 따라서 본 논문에서 이용한 이미지 분석 프로그램을 보편적으로 사용되는 매크로 프로그램과 장점을 대조적으로 비교하여 본 방법의 장점을 증명하고자 하였다.

대조군으로 사용한 매크로 프로그램은 G Macro로 현 모바일 게임회사 티치홀릭 대표인 조한남이 제작한 프로그램이다. 작동원리는 마우스와 키보드가 원하는 대로 움직이도록 좌표를 설정하면 이를 반복 실행하게 하는 간단한 매크로 프로그램이다. 따라서 따로 키보드나 마우스를 누르지 않아도 위치 기반으로 반복작업을 진행해 주기 때문에 단순 반복 클릭이 이용한 곳에 널리 사용되고 있다.

프로그램의 사용 방법은 Fig. 4에 전반적인 과정을 제시하였다. 우선 매크로를 실행하고 우측의 메뉴 중 키보드와 마우스 중 반복작업을 수행하고자 하는 장비를 선택한다. 이후 시간지연을 선택하는데, 본 프로그램에서는 프로그램 내에서 이벤트가 발생하고, 그 결과로 발생된 다른 창을 활성화될 때까지 기다려 주어야 한다. 따라서 활성화된 창들이 중복되지 않기 위해 반드시 시간지연과정이 요구된다. 반복작업을 하고자 하는 장치가 키보드면 키보드 키를 입력해주고, 마우스일 경우 마우스 설정에서 사용 기능을 선택하고 작업을 수행할 위치를 모니터의 화면상에서 X, Y좌표를 입력한다. 최종적으로 설정한 전체 과정을 반복하고 싶다면 하단 우측의 반복을 설정하면 반복 작업이 가능하다.

그러나 본 매크로 프로그램은 단순작업을 반복해주는 프로그램이기 때문에, 액적 내에 형광의 ‘계수과정’만 반복이 가능하다. 매크로 프로그램을 이용할 경우 분석 방법은 다음과 같다. 우선, 실험자가 액적의 광학 이미지에서 수동으로 임계 값을 설정하여 액적의 둘레만을 남긴다. 이 액적의 둘레는 ‘analysis particle’기능을 통해 계산된 면적의 둘레가 ROI (Region of Interest)로 지정된다. 따라

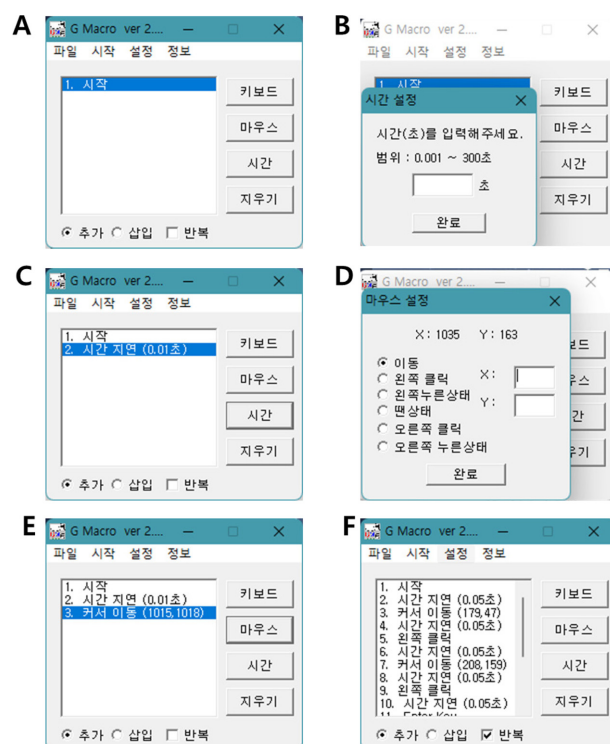


Fig. 4. Procedure of setting macro in G Macro program. A. First run screen of G Macro program. B. Steps to set the time delay. C. Start delay step added to the macro process screen. D. The progress of adding the mouse position. Select an action on the left and input the coordinates of the position on the screen to move the cursor on the right. E. A screen with additional mouse cursor position movement added to C. F. Final screen with multiple steps added for analysis. Repeat is checked in the lower right corner for repeat operation.

서 수동으로 규정된 ROI에 대하여 부여된 번호의 액적 구역 내부에 존재하는 형광 신호가 형광 임계 값을 넘어가는지 여부를 판단하고, 넘어가는 개수를 계수한다. 이후 다음 번호의 액적으로 넘어가기 위해 매크로 반복작업에 아래 방향키 작동을 추가하면 다음 번호의 액적으로 넘어가서 동일한 작업을 반복한다.

매크로를 사용하는 경우, 광학 이미지로부터 ROI를 수동으로 설정하여야 하며, 단일 시간에 해당하는 이미지에 대해서 분석이 가능할 뿐만 아니라 이미지를 인식하지 못하고 커서만 옮겨주는 반복작업을 진행하므로, 프로그램 특성상 마지막 ROI를 지나쳐서 반복 계수를 진행하기 때문에 마지막 액적이 계수되는 행위를 인지하고 수동으로 매크로를 정지해 주는 사용자의 주의가 필요하다.

## 2-6. 이미지 분석 프로그램 내 분석 과정과 코드 해석

우리는 우선 앞선 액적의 광학 이미지를 기반으로 분석하고자 하는 액적을 분석 영역으로 지정하였다. 전체적인 분석은 Fig. 5의 순서도에 따른 순서로 진행되었으며, Fig. 5에서 분석을 위한 알고리즘을

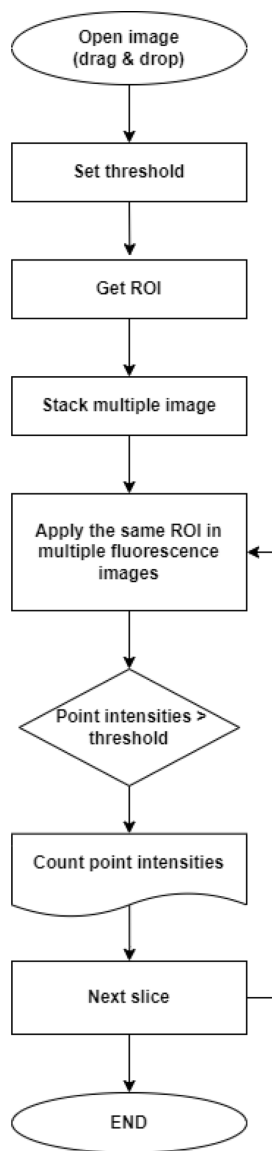


Fig. 5. Algorithm of coding for image analysis.

제시하였다. Fig. 6A의 광학 이미지에서 현미경에서 촬영된 RGB 이미지가 Fig. 6B와 같이 검은 배경을 가진 그레이스케일(8 또는 16비트)로 변환된다. 이후 분석은 제작된 코드를 이용하여 진행되었다. “Despeckle” 명령을 통해 이미지 속의 노이즈들을 잡아준다. “Despeckle”은 보통 사진에서 노이즈를 제거할 때 이용하는 방법으로 가장자리를 흐리게 하지 않고 이미지에서 노이즈만을 제거하는데 유용하게 이용된다. 따라서 액적 내부에 물질과 무관하게 광학 이미지로부터 액적의 경계면만을 분리해 낼 수 있다. 이후 노이즈들로 인해 끊긴 액적 부분을 연결 해주기 위하여 “Watershed” 명령을 지정하였다. “Watershed”는 일반적으로 이미지에서 접촉하거나 겹치는 개체를 분리하는 데 목적으로 이용이 된다. 본 연구에서는 액적간의 경계를 분명하게 분리해 주기 위하여 이용되었다. 앞선 명령들을 통해 액적들 간의 경계를 분명하게 한 후 “Analyze Particles” 명령을 통해 분석에 이용할 액적의 특성을 정의하였다. 이 명령에서는 액적의 크기, 구형도를 지정해 주었다. 구형도는 분석하고자 하는 액적의 형태를 정의하기 위한 변수로서 0-1의 값을 가진다. 완벽한 원의 구형도는 1 이고 모가 나 있거나 불규칙적인 물질은 0에 가깝다. 그리드 내부로 액적들이 도포될 경우, 그 형태가 변형될 수 있다는 점을 고려하여 구형도의 최소값을 0.70, 최대값을 1.0으로 지정하였다. 위의 명령과정을 거치면 프로그램은 해당 조건에 부합하는 분석 구역을 분석하고자 하는 영역인 Region of Interest (ROI)로 지정하게 된다. 이 ROI는 구역 별로 프로그램이 자동으로 번호를 매기며 이를 통해 각각의 액적들은 각각의 고유 번호를 가지게 된다. 이미지와 같은 각각의 고유 번호가 매겨진 액적들은 여러 시간대의 촬영 이미지를 쌓아 올리더라도 동일한 구역 번호를 유지하기에 시간별로 다른 분석 영역의 변화를 동일하게 관찰할 수 있다. 이후 앞선 지정된 구역은 결과 창에 결과가 남아 다음 형광 이미지 분석에 혼선을 줄 수 있다. 따라서 “Clear results” 명령을 통해 ROI에 대한 결과를 삭제한다. 다음으로 배양 시간 별로 촬영된 여러 장의 형광 이미지에 대하여 “Images to Stack” 명령을 통하여 이미지들을 한 개의 창에 여러 장 쌓아 올리는 이미지 세트인 스택을 제작하였다. 스택에 대해 앞서 지정한 ROI를 ROI manager를 이용하여 올렸으며 이후 여러 장의 이미지에 대해 작업을 반복하는 루프를 시작하였다. 앞선 이미지 스택을 구성하는 각각의 이미지를 슬라이스라고 한다. 따라서 n번째 슬라이스에 대해서 아래의 작업을 수행하고 다음 슬라이스로 넘어가면 반복하게 제작되었다. 하나의 슬라이스에 대해 분석하려는 형광 신호의 크기에 대해 모든 픽셀 값 주변의 허용되는 크기인 tolerance 값을 지정한다. 따라서 이를 통해 프로그램은 형광 신호가 초기 형광 신호 값의 면적+tolerance 사이의 범위에 있어야 한다는 조건에서 인접한 신호를 선택하였다. 사용자가 지정한 이 값에 따라 크기가 큰 세포이거나 뭉친 세포 속 여러 개의 형광 시그널을 하나의 영역 속 하나의 시그널로 볼 것인지 여러 개로 볼 것인지 결정할 수 있다. 이후 이미지를 8 비트로 변환하고 앞서 지정한 i-번째 ROI 구역 내부에 대해 다음의 계수작업을 진행한다. 사용자는 ROI 구역 내에서 배경 대비 구분되는 세포의 유의미한 형광 신호의 임계 값을 지정한다. 이에 “Find maxima”를 이용하는 지정된 값을 넘는 형광 신호를 파악하고 그 개수를 계수하기 위하여 동일 명령 행에 output=[Count]를 삽입하였다. 추가적으로 다음 행에 output=[Point Selection] 명령을 삽입하여 사용자가 프로그램이 계수한 형광 신호가 옳은 것인지를 육안으로 확인할 수 있도록 계수한 신호를 포인트로도 확인할 수 있다.

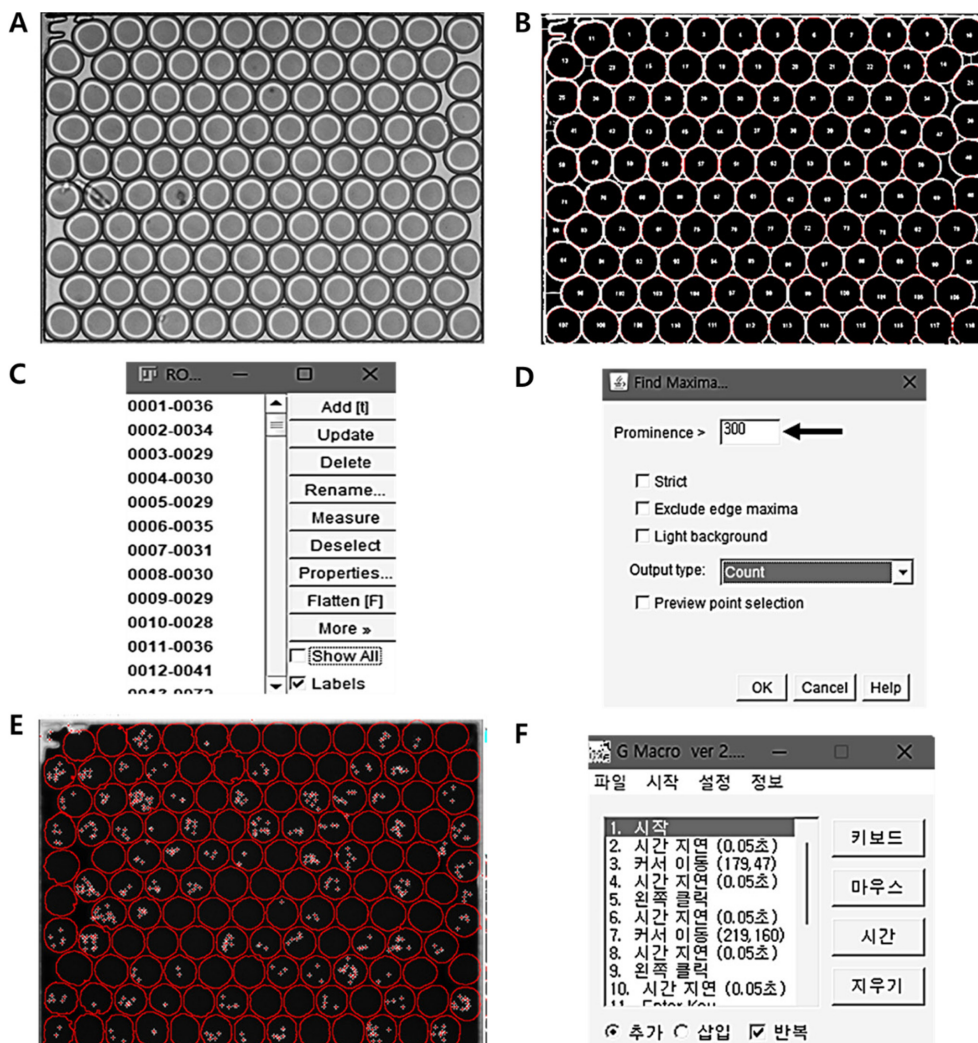


Fig. 6. Procedure of counting cell in droplet based on fluorescence image. A. Bright field image of immobilized droplets in grid. B. Setting ROI (Region of interest) from bright field image. C. List of ROIs from B. D. Marked positions of value that exceeds threshold. E. User can change the threshold from change value of prominence in 'find maxima' function in ImageJ software. F. Separate program (G macro) to perform repetitive tasks.

록 하였다. 또한 계수한 포인트가 다음 번호를 가진 액적으로 계수가 넘어가더라도 사용자가 확인할 수 있도록 “Add Selection”을 추가하였다. 마지막으로 루프의 마지막에 “Next Slice [>]”를 추가하여 동일한 작업을 스택의 다른 슬라이드에서도 동일하게 수행될 수 있도록 하였다. 추가로, 사용자의 편의성을 더하는 방법으로는 ImageJ의 플러그인 실행 시 키보드 단축키(“플러그인>단축키>단축키 만들기”)에 할당할 수 있다. 따라서 세포 계수는 사용자가 키보드에 지정한 단축키 버튼을 누르면 시작되는 절차로 시간을 더 절약할 수 있다. 본 연구에 이용된 분석 코드는 Fig. 7에 제시되어 있다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3-1. 분석 시간 및 개선

기존의 연구에서는 자동화 분석을 위해 보편적으로 광범위에 사용되는 반복 프로그램인 G Macro를 도입하여 분석을 진행하였다. 기존의 프로그램인 G Macro는 매크로 유틸리티 프로그램이다. 직

접 손으로 키를 누르거나 마우스 버튼을 누르고 이동하지 않아도 설정을 하면 그대로 움직여주는 프로그램이다. 모니터 화면상에 x, y 좌표를 기반으로 마우스 커서가 움직이며 작동한다. 또한 직관적이고도 간단한 인터페이스와 사용 방법으로 보편적으로 다양한 영역에서 반복 작업을 설계 및 실행하는데 이용되어오고 있다. 우리는 기존의 이미지 기반 분석에 다음의 외부 프로그램을 이용하여 이미지 분석 반복 작업을 수행해 왔다. 그러나 앞서 언급하였듯이 모니터의 x, y 좌표를 기반으로 커서가 직접 움직이는 기존 프로그램의 특성상 분석 중에 마우스 커서를 움직일 수 없어 분석 중 다른 프로그램을 수행하지 못한다는 단점이 존재하였다. 또한 커서가 움직이고 작업이 수행하는 데에 다음 작업으로 넘어가기 위해서는 단계간 시간 ‘지연’ 단계가 필수적으로 요구되었다. 이는 컴퓨터 성능에 따라서 가능한 최소 지연 시간이 결정되며 설계된 작업 단계와 분석하려는 이미지의 수가 증가할수록 이 지연 시간 또한 증가하여 결과적으로는 분석 시간의 증가를 가져왔다. 그러나 본 연구에서 이용된 코딩을 이용할 경우 프로그램의 내부에서 작동하는 원리로 앞서 언급된 단점을 해결할 수 있었다. 프로그램 내부에서 반복작업

```

//set ROI
//Bright field to binary image
selectWindow("untitled026.tif");
setAutoThreshold("Default dark no-reset");

//run("Threshold...");
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask");
run("Despeckle");
run("Watershed");
run("Analyze Particles...", "size=0.01-Infinity circularity=0.70-1.00 display exclude clear add");

// empty the results table
run("Clear Results");

/*****

//counting macro start
//image to stack
run("Images to Stack", "name=Stack title=[] use keep");

//start stack macro
selectWindow("Stack");
roiManager("Show None");
roiManager("Show All");

/*****
//loop
for (n=1; n<=nSlices; n++) {
selectWindow("Stack");
setSlice(n);

// counting macro
var tolerance = 20;

originalImage = getTitle();
run("8-bit");
for(i=0; i<roiManager("count"); i++) {
    roiManager("select", i);

    //run("Threshold...");
    //setThreshold(500, 10000);
    run("Find Maxima...", "noise="+tolerance+" output=[Count]");
    run("Find Maxima...", "noise="+tolerance+" output=[Point Selection]");
    run("Add Selection...");
}

/*****

//next stack
run("Next Slice [>]");
}

```

Fig. 7. Coding for image analysis.

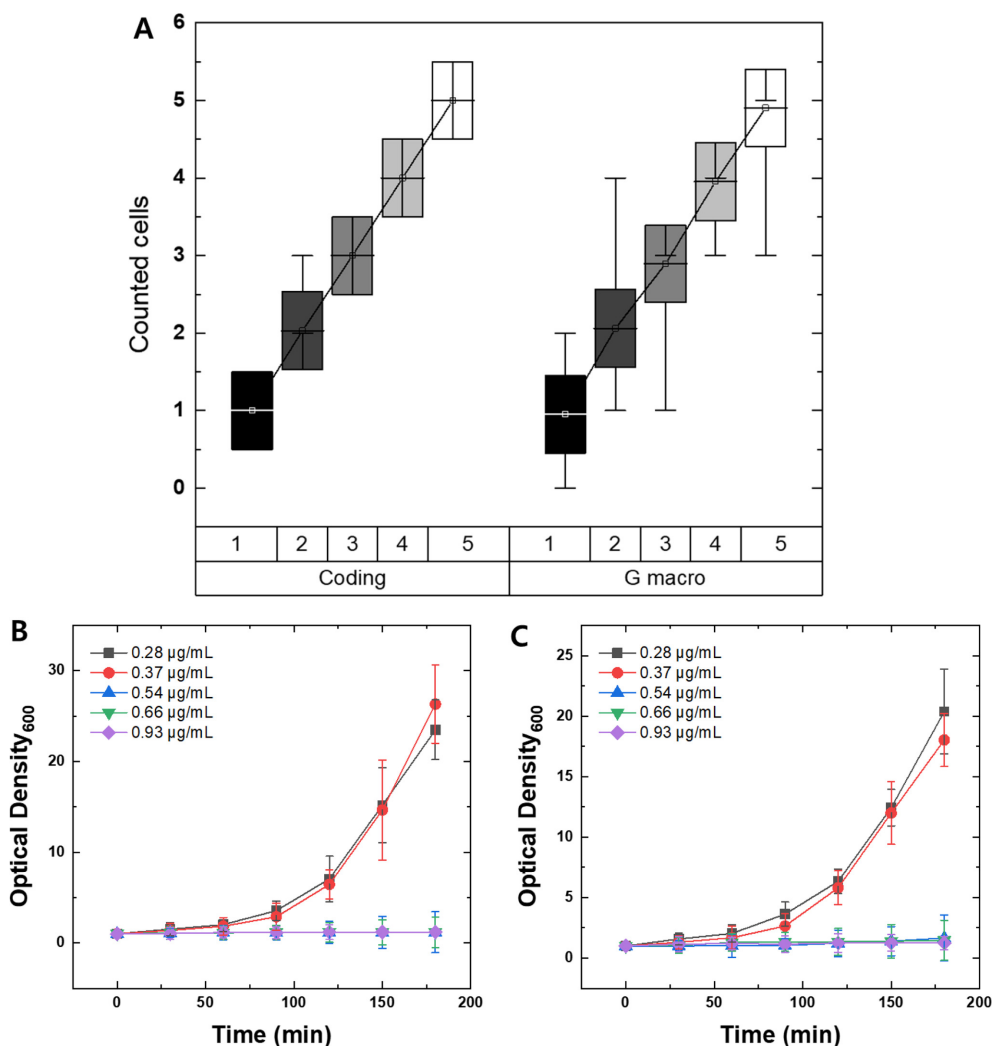
을 해주는 매크로를 실행을 해주면 프로그램 내부에서 반복작업을 수행하기 때문에 다른 작업을 수행할 수 있으며 ImageJ 프로그램이 비교적 앞선 G Macro에 비해 가벼운 프로그램이 때문에 실험 중에도 비교적 컴퓨터의 성능에 무관하게 이용할 수 있다. 또한 앞서 G Macro에서 필수적으로 요구하는 단계간 지연 시간이 불필요하기 때문에 지연시간으로 인한 분석 소요 시간이 줄어든다는 장점이 있다. 추가적으로 사용자의 필요성에 따라 이미지를 쌓아 올려 동일한 작업을 여러 장의 이미지 스택에 대해서 반복할 수 있어 추가적인 시간의 단축을 가져올 수 있다. 동일한 한 장의 형광 이미지에 대해 기존의 프로그램인 G Macro와 코딩을 동시에 이용하여 분석에 걸리는 시간을 측정한 결과, G Macro는 약 100초가 소요된

반면에 코딩은 약 7초정도 소요되었다(Movie 1,2). 분석의 효율을 시간당 분석가능한 액적의 수로 환산한다면 G Macro는 약 4900개를, 코딩은 약 70,000개로 코딩을 이용할 경우가 기존의 G Macro 대비 약 15배 정도 빠른 분석 시간의 단축 결과를 보였다. 또한 이를 단일 이미지가 아닌 여러 장의 이미지 스택에 대해서 완전히 자동화된 반복 작업을 수행했을 경우 약 87,000개의 액적을 분석할 수 있다(Movie 3). 결과적으로는 기존의 G Macro대비 약 15배정도 분석시간을 단축할 수 있었다.

### 3-2. 분석의 정확도

앞서 분석 시간과 방법을 확인함에 이어 우리는 실제 실험 분석에





**Fig. 8.** Comparison of analysis accuracy between external program G Macro and Coding in ImageJ. **A.** Box plot for validation of accuracy between two methods. **B, C.** Growth profiles of *S. aureus* NCTC 8325-4 under various antibiotic concentrations analyzed by G Macro and ImageJ. **B.** G Macro method shows reversed data of average number of cells at 180 min between vancomycin concentration of 0.28 ug/mL (black) to 0.37 ug/mL (red). **C.** Analysis using a coding in ImageJ. The tendency of cell number increase according to the concentration of vancomycin is more accurate than in the previous program.

이용하기 위하여 기존 프로그램과 코딩 간의 분석의 정확도도 확인하였다. 분석의 정확도는 기존의 포인터 기반 외부 매크로 프로그램 G Macro와 표준 편차 및 선형성에 대한 비교를 진행하였다. 분석에는 여러가지 개수의 세포들을 합입한 액적에서의 계수된 세포 개수를 25회 반복 측정한 결과를 비교하였다. 단일세포부터 5개의 세포까지 비교하였으며, 박스 플롯(box plot)을 이용하여 프로그램을 통하여 계수된 세포들의 중간값, 최댓값 그리고 최솟값을 표기하였다.

우선 각 그래프의 표준편차를 비교하였다. 두 방법 모두 표준편차가 유의미하게 크게 보이는 세포 수는 2였으며, 각각의 표준편차는 코딩이 0.17, G Macro가 0.42로 G Macro를 이용한 경우가 0.25 만큼 더 컸다. 또한 Fig. 8A에서 각각 방법을 통해 계수된 박스 플롯 그래프 속 중심 값의 선형성을 비교하였을 때, 각각 G Macro 0.97와 코딩을 이용한 방법이 0.99로 코딩이 더 선형성에 가까운 수치를 보였다. 따라서 두 계수 방법 중 코딩을 이용할 경우가 표준편차가 더 작을 뿐만 아니라 선형성을 보이는 것을 통하여 코딩 방법

이 더 실제에 가까운 정확한 세포의 개수를 계수할 수 있음을 확인하였다.

추가적으로 우리는 두 가지 방법을 통하여 다양한 항생제 농도를 가진 액적 속 세포의 평균 수 증가를 확인하였다. 그 결과 기존의 G Macro는 *Staphylococcus*와 같이 균집으로 뭉쳐서 성장하는 경우에는 그 균주들이 뭉쳐진 균집들을 분리해 내지 못하고 균집 자체를 균주 1개로 인식하거나 반대로 면적당으로 계산하여 더 축 계수된 개수가 증가하는 등 예상이 어려운 결과 값 오류가 빈번하게 발생하였다. 이로 인해 Fig. 8의 B에서는 G Macro 데이터가 균주가 성장하여 뭉쳐진 경우 이를 더 많이 계수하는 오류를 보인다. 이를 통해 다양한 항생제 농도를 함께 합입한 경우에, G Macro 방법은 액적 내에 항생제의 농도가 낮아 균주가 더 성장할수록 계수에 오류가 생겨 최종 계수 시 경향성이 역전된 모습을 보인다. 반면에 새롭게 도입된 코딩 방법인 코드상에서 포함된 “tolerance” 기능을 통해 균주간의 경계를 분리할 수 있어 균주가 성장하며 균집을 이루더라도 균집 내 균주의 개수를 분리해 계수할 수 있다. 결과적으로 코딩

을 이용한 결과인 Fig. 8C에서 Fig. 8B와 달리 액적 내 함께 합입된 항생제의 농도구배에 따라 균주의 성장 경향성이 순차적으로 일치함을 관찰할 수 있다. 이를 통하여 코드를 이용하여 세포를 계수할 때 정확도가 더 높음을 확인할 수 있었다.

본 방법은 사용자가 균주의 성장 양상이 균집을 형성하지 않는 균주를 이용할 경우에는 더 쉽게 정확한 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각되며, 이를 이용하여 추가적인 개선을 사용자가 원하는 방향으로 이용한다면 다양한 형광으로 표지 되거나 다양한 종류의 세포들도 빠르고 정확하게 계수 할 수 있을 것으로 예상된다.

#### 4. 결 론

세포 계수 방법들에 있어 기존의 이미지 기반 세포 계수방법은 액적 내에서는 적용하기 어렵다는 한계점이 존재하였다. 따라서 본 논문에서는 이미지 기반의 프로그램을 이용하여 분석을 진행하였고 액적 내부에서의 세포 계수의 한계를 보완할 수 있었다. 이는 기존의 세포 시그널 기반으로 여러 장치를 요구하던 세포 분석과 달리 더 간편하게 시간의 경과에 따른 이미지를 분석할 수 있다. 또한 연구자에 무관하게 동일한 이미지에 대해서 동일한 결과를 얻을 수 있다는 큰 장점이 있다. 코딩을 이용한 계수 방법은 액적 내에 단일 세포가 존재할 경우 단일세포 수준에서 그 수의 변화를 관찰할 수 있을 뿐만 아니라 균주의 균집을 형성하는 성장 양상으로 인한 균주 계수의 오류도 해결이 가능함을 보인다. 이를 사용자가 동물세포나 평면으로 자라는 세포들을 계수하는 방법으로 이용한다면 더 빠르고 정확한 결과를 얻을 수 있을 것으로 보인다.

본 논문에서는 앞선 기존의 세포 계수법의 단점을 보완한 이미지 분석프로그램 기반에서의 간단한 코딩을 이용하여 여러 장의 시간에 따른 액적의 형광 이미지에서의 자동 세포 계수방법을 제시하였다. 본 논문의 방법은 기존의 방법과 비교하였을 때 분석 시간이 단축되었을 뿐만 아니라 정확도에서도 더 높은 결과를 보였다. 이에 더 나아가 연구자의 연구의 방향에 맞춰 코드의 추가 확장을 통한 다면 연구자가 원하는 방법으로 이용이 가능하여 세포 계수 연구에 도움이 될 것으로 판단된다.

#### 감 사

본 논문은 정부(과학기술정보통신부, 산업통상자원부, 보건복지부, 식품의약품안전처)의 재원으로 한국연구재단(No. 2021R1A2C3004936) 및 범부처전주기료기기연구개발사업단(No. KMDF\_PR\_20200901\_0073, 9991006746)의 지원을 받아 수행된 연구임.

#### References

- Liu, X., Wang, S., Sendi, L. and Caulfield, M. J., "High-throughput Imaging of Bacterial Colonies Grown on Filter Plates with Application to Serum Bactericidal Assays," *J. Immunol. Methods*, **292**, 187-193(2004).
- Zhang, J., Li, C., Rahaman, M. M., Yao, Y., Ma, P., Zhang, J., Zhao, X., Jiang, T. and Grzegorzczek, M., "A Comprehensive Review of Image Analysis Methods for Microorganism Counting: From Classical Image Processing to Deep Learning Approaches," *Artif. Intell. Rev.*, **55**, 2875-2944(2022).
- Camacho-Fernández, C., Hervás, D., Rivas-Sendra, A., Marín, M. and Seguí-Simarro, J. M., "Comparison of Six Different Methods to Calculate Cell Densities," *Plant Methods*, **14**, 1-15(2018).
- Vembadi, A., Menachery, A. and Qasaimeh, M. A., "Cell Cytometry: Review and Perspective on Biotechnological Advances," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **7**, 147(2019).
- Carpenter, A. E., Jones, T. R., Lamprecht, M. R., Clarke, C., Kang, I. H., Friman, O., Guertin, D. A., Chang, J. H., Lindquist, R. A., Moffat, J., Golland, P. and Sabatini, D. M., "Cellprofiler: Image Analysis Software for Identifying and Quantifying Cell Phenotypes," *Genome Biol.*, **7**, R100(2006).
- Rajapaksha, P., Elbourne, A., Gangadoo, S., Brown, R., Cozzolino, D. and Chapman, J., "A Review of Methods for the Detection of Pathogenic Microorganisms," *Analyst*, **144**, 396-411(2019).
- Geissmann, Q., "Opencfu, a New Free and Open-source Software to Count Cell Colonies and Other Circular Objects," *PLoS One*, **8**, e54072(2013).
- Lee, H.-C., "Automatic Counting of Yeast Cells in Baker's Yeast Culture Using pc Camera and Conventional Light Microscope," *KSBB Journal*, **26**, 87-91(2011).
- Suh, J.-S., Lee, C., Pan, Y., Wang, Y., Jung, Y. and Kim, T.-J., "A Study on Single Cell Polarized Signals Using Polydimethylsiloxane-based Micropatterned Channel System," *Korean Chem. Eng. Res.*, **58**, 122-126(2020).
- Lu, H., Caen, O., Vignon, J., Zonta, E., El Harrak, Z., Nizard, P., Baret, J.-C. and Taly, V., "High Throughput Single Cell Counting in Droplet-based Microfluidics," *Sci. Rep.*, **7**, 1-9(2017).
- Khorshidi, M. A., Rajeswari, P. K. P., Wählby, C., Joensson, H. N. and Svahn, H. A., "Automated Analysis of Dynamic Behavior of Single Cells in Picoliter Droplets," *Lab Chip*, **14**, 931-937(2014).
- Yang, I. J. and Lim, S. I., "Site-specific Dye-labeling of the Bacterial Cell Surface by Bioconjugation and Self-assembly," *Korean Chem. Eng. Res.*, **60**, 398-406(2022).
- Ganguly, R., Lee, B., Kang, S., Kim, Y. S., Jeong, S.-G., Kim, J. S., Park, S. Y., Yohei, Y. and Lee, C.-S., "Microfluidic Single-cell Trapping and Cultivation for the Analysis of Host-viral Interactions," *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **26**, 179-187(2021).
- Ahn, K., Kerbage, C., Hunt, T. P., Westervelt, R., Link, D. R. and Weitz, D. A., "Dielectrophoretic Manipulation of Drops for High-speed Microfluidic Sorting Devices," *Appl. Phys. Lett.*, **88**, 024104(2006).
- Brouzes, E., Medkova, M., Savenelli, N., Marran, D., Twardowski, M., Hutchison, J. B., Rothberg, J. M., Link, D. R., Perrimon, N. and Samuels, M. L., "Droplet Microfluidic Technology for Single-cell High-throughput Screening," *PNAS*, **106**, 14195-14200(2009).
- Lozano-Gerona, J. and García-Otín, Á. L., "ImageJ-based Semi-automatic Method to Analyze Senescence in Cell Culture," *Anal. Biochem.*, **543**, 30-32(2018).
- Grishagin, I. V., "Automatic Cell Counting with ImageJ," *Anal. Biochem.*, 63-65(2015).
- Nichele, L., Persichetti, V., Lucidi, M. and Cincotti, G., "Quantitative evaluation of ImageJ thresholding algorithms for microbial cell counting," *OSA Contin.*, **3**, 1417-1427(2020).
- Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T. and Eliceiri, K. W., "ImageJ2: Imagej for the Next Generation of Scientific Image Data," *BMC Bioinformatics*, **18**, 1-26(2017).

20. Schindelin, J., Rueden, C. T., Hiner, M. C. and Eliceiri, K. W., "The ImageJ Ecosystem: An Open Platform for Biomedical Image Analysis," *Molecular Reproduction and Development* **82**, 518-529(2015).
21. Vosatka, K. W., Lavenus, S. B. and Logue, J. S., "A Novel Fiji/ImageJ Plugin for the Rapid Analysis of Blebbing Cells," *PloS one* **17**, e0267740(2022).
22. Jin, S. H., Kim, T., Oh, D., Kang, K.-K. and Lee, C.-S., "Preparation of Monodisperse Pegda Microparticles Using a Dispensing Needle Based Microfluidic Device," *Korean Chem. Eng. Res.*, **57**, 58-64(2019).
23. Lee, H. J., Jang, S. H., Chang, S. M. and Kim, J. M., "Study on Polymerization Condition of Water-based Acrylic Adhesion," *Korean Chem. Eng. Res.*, **48**, 609-614(2010).
24. Jeong, H.-H., Noh, Y.-M., Jang, S.-C. and Lee, C.-S., "Droplet-based Microfluidic Device for High-throughput Screening," *Korean Chem. Eng. Res.*, **52**, 141-153(2014).
25. Moon, S., Ceyhan, E., Gurkan, U. A. and Demirci, U., "Statistical Modeling of Single Target Cell Encapsulation," *PloS one*, **6**, e21580 (2011).
26. Labanieh, L., Nguyen, T. N., Zhao, W. and Kang, D.-K., "Floating Droplet Array: An Ultrahigh-throughput Device for Droplet Trapping, Real-time Analysis and Recovery," *Micromachines*, **6**, 1469-1482(2015).
27. Shemesh, J., Ben Arye, T., Avesar, J., Kang, J. H., Fine, A., Super, M., Meller, A., Ingber, D. E. and Levenberg, S., "Stationary Nanoliter Droplet Array with a Substrate of Choice for Single Adherent/nonadherent Cell Incubation and Analysis," *PNAS*, **111**, 11293-11298(2014).
28. Taylor, D., Verdon, N., Lomax, P., Allen, R. J. and Titmuss, S., "Tracking the Stochastic Growth of Bacterial Populations in Microfluidic Droplets," *Phys. Bio.*, **19**, 026003(2022).
29. Nge, P. N., Rogers, C. I. and Woolley, A. T., "Advances in Microfluidic Materials, Functions, Integration, and Applications," *Chem. Rev.*, **113**, 2550-2583(2013).

#### Authors

**Jingyeong Kim:** Master, Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea; kjk971114@naver.com

**Jae Seong Kim:** Ph. D candidate, Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea; proljsk@naver.com

**Chang-Soo Lee:** Professor, Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea; rhadam@cnu.ac.kr