

컴퓨터 시각을 이용한 배양 세균의 인식 및 계수

Automatic Recognition and Counting of Cultured Bacteria Using Computer Vision

장지홍*
정회원
J.H.Chang

황 현*
정회원
H.Hwang

1. 서론

미생물에 의한 농산물 및 식품의 오염은 품질유지 및 식품 안정성의 측면에서 매우 중요하다. 농산물 및 농산물 가공품 중에 존재하는 미생물의 개체 수를 정확하게 측정하는 것은 유통과정에서의 식품 안정성 확보라는 측면에서도 절대적으로 필요하다. 미생물의 개체 수를 측정하기 위한 방법은 크게 미생물을 직접 계수 하는 방법과 간접적으로 계수 하는 두가지로 나눌 수 있다. 그러나 균은 대부분 1μ 전후의 미세한 생물이므로 간접적으로 관찰하여 얻어지는 정보량에는 한계가 있으므로 미생물을 배양하여 집단으로서의 작용을 관찰하는 것이 표준으로 채택되고 있다. 이러한 표준 평판배양법 (standard plate count, SPC)은 전적으로 검사자의 시각에 의존하므로 CFU(colony forming units)가 높을 경우 검사자의 숙련도, 감정, 건강상태 등에 의해 오차가 생길 소지가 많고 객관화되기 어려운 단점을 지니고 있다. 또한 검사의 반복수가 많을 경우 기준 시간을 초과하므로 짧은 시간 내에 검사를 완료해야한다는 제한조건을 만족시키기 어려운 실정이다.

본 연구의 목적은 컴퓨터 시각기술을 이용하여 신속하고 정확하게 우유에 존재하는 배양 세균 수를 측정할 수 있는 기초 기술을 개발하는 것이다. 일반적으로 세균 군집체가 갖는 외형적 특징은 크기, 형상, 색채, 운집형태 등으로 나타낼 수 있다. 본 연구에서는 이와 같은 광학적 특징들을 바탕으로 하여 세균 군집체를 자동으로 인식하여 계수 하는 알고리즘을 개발하고 그 측정장치를 구현하고자 한다. 본 연구의 목표를 요약하면 다음과 같다.

1. 효율적인 특징 추출을 위해 영상의 전처리 방법에 대한 연구를 수행한다.
2. 겹쳐진 형태의 세균 군집체를 분리해내기 위해 형태학적(morphology) 기법을 적용하여 효율적인 분리 알고리즘을 구현한다.
3. 형태학적 기법에 의한 분리 알고리즘의 정밀도를 평가한다.
4. 적합한 형태학적 기법을 채택한 후 이에 알맞은 계수 알고리즘을 개발한다.

2. 재료 및 방법

2.1 재료 및 장치

우유 중에 포함된 세균의 총수를 측정하기 위하여 원유를 무균적으로 채취하여 0.1% peptone용액에 적당한 배수로 희석한 다음 희석시료 1ml를 취하고 SPC agar를 pour plating 방법으로 접종, 30°C에서 72 시간 배양하여 배양된 세균의 집락을 계수하였다. 이들 집락의 계수를 위해 수동 계수기를 이용하여 시료당 5회 반복 측정하였으며 그 중 3회 이상 측정되는 측정값을 집락의 총수로 결정하였다.

* 성균관대학교 생명자원과학대학 생물기전공학과

$$|NOP_i - NOP_{i-1}| > 2 |(NOP_{i-1} - NOP_{i-2})| \dots \dots \dots (1)$$

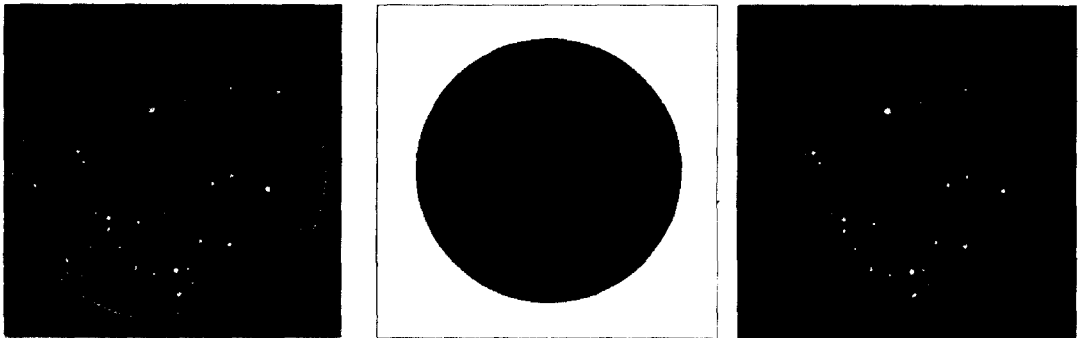
NOP_i : Total no. of pixel at the i_{th} gray level

배양된 시료는 용기의 재질이 유리이고 그 규격 또한 통일되어 있지 않으므로 빛의 회절현상으로 샤알레의 가장자리 부분에 불규칙한 띠 모양의 잡음성분이 나타나고 이로 인해 측정의 정밀도를 저하시킨다. 따라서 측정시 그 측정 위치를 고정시켜주고 동일한 계수영역을 설정해 주어야 하는데 이를 위해서 image subtraction 기법을 도입하였다. 이 방법은 두 영상간의 차를 계산하는 것으로 식 (2)와 같이 정의된다.

$$g(x, y) = f(x, y) - h(x, y) \dots \dots \dots (2)$$

$f(x, y), h(x, y)$: Gray value of (x, y) in 1st image & 2nd image

$g(x, y)$: Subtraction $h(x, y)$ from $f(x, y)$, ($g(x, y) < 0 : g(x, y) = 0$)



(a) Original image.

(b) Subtracted image.

(c) Result ((a)-(b)).

Fig. 4 Image Subtraction.

2.3 형태학적 기법에 의한 집락 분리과정

미생물 군집체는 원 시료중의 미생물이 48~72 시간 동안의 배양시간을 거쳐 증식하는 것으로 대개의 경우 원형에서 크게 벗어나지 않는 형태를 유지하고 있다. 그러나 미생물은 그 크기가 1μ 전후의 작은 생물체이므로 배양과정을 거친 후에도 군집체의 크기가 매우 작은 경우가 많아서 원 시료의 오염도가 높거나 회석배수가 낮을 경우 미생물 군집체는 검사자의 시각에 의해서도 판정이 어려운 경우가 많다. 또한 원 시료의 회석액을 샤알레에 도달하는 과정에서 미생물은 눈에 보이지 않으므로 실험을 위한 작위적인 도말이 불가능하므로 배양 후에 관찰하면 겹쳐지거나 군집체들이 한쪽으로 몰려 있는 경우도 발생하게 된다.

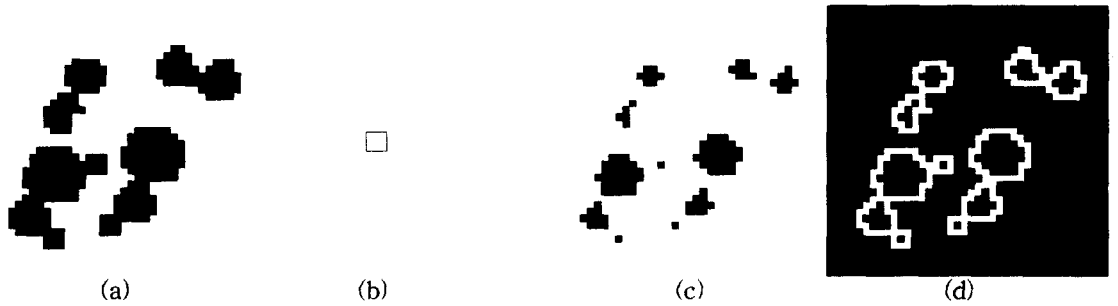
따라서 배양된 집락의 개수를 정확하게 계수하기 위해서는 이산적으로 분포된 집락의 경우보다 겹쳐진 형태의 집락을 분리하여 개별적으로 계수하는 과정이 필수적으로 요구되는데, 이와 같이 겹쳐진 형태의 세균 배양체를 효과적으로 분리하기 위해서는 영상처리 기법에서 대상체의 본질적 특성만을 추출해 내는 수학적 morphology의 도입이 필수적이라 할 수 있다. 본 실험에서는 겹쳐진 형태의 집락을 분리하기 위한 첫 번째 단계로 그림 (5)에서 보는 바와 같이 원영상에 계조값이 255 인 3×3 의 정방요소를 사용하여 erosion 하여 그림 (5.c)와 같은 영상을 얻었다. erosion은 식 (3)과 같이 정의되며 그 결과는 그림 (5.c)에서 보는바와 같이 밝은 부분을 강조해주는 것으로 나타난다.

$$A \ominus B = \{x | (B)_x \subseteq A\} \dots \dots \dots (3)$$

A, B : Set with components $a = (a_1, a_2)$ & $b = (b_1, b_2)$

$(B)_x$: Translation of B by $x = (x_1, x_2)$

이제 두 번째로 erosion된 영상 (5.c)에서 원영상 (5.a)를 subtraction하여 원 영상에 대한 윤곽선 영상을 그림 (5.d)와 같이 추출하였다. 이를 원영상 (5.a)와 비교하여 보면 원영상에서 겹쳐졌던 부분이 흰색의 윤곽선으로 완전히 분리됐음을 알 수 있다. 이렇게 분리된 미생물 군집체는 모두 계조값 255의 띠에 둘러싸인 계조값 0의 폐곡선이라는 외형적 특징을 가지고 있으며 그림 (5)에서 보는바와 같이 그 크기와 모양이 일정하지 않다. 또한 이러한 군집은 계조값 0의 배경 속에 놓여 있다. 본 실험에서는 분리된 미생물 군집체가 갖는 이와 같은 외형적 특징을 이용하는 알고리즘을 개발하였다.



(a) Original image. (b) 3×3 element. (c) Erosion (a) by (b). (d) Subtraction (a) from (c).

Fig. 5 Illustration of separating process.

2.4. 1차 계수 과정

집락 분리과정에서 사용되는 erosion 연산의 단점은 적용된 3×3 정방요소보다 크기가 작은 미생물 군집들이 제거된다는 것이다. 이와 같은 단점을 보완하기 위하여 전처리 과정을 거친 이진영상에서 그 개수를 계수한 후 erosion을 수행하였다. 1차 계수 과정에서는 3×3 정방요소보다 작은 미생물 군집체를 계수하는데 그림 (6)과 같은 5×5 mask를 사용하였다. 이 때 마스크 내에 미생물 군집체가 들어왔는지를 판별하는 논리 연산식은 (4)와 같다.

a	b	c	d	e
f	g	h	i	j
k	l	m	n	o
p	q	r	s	t
u	v	w	x	y

Fig. 6 5×5 mask.

$$(f(h)=0) \text{ OR } (f(l)=0) \text{ OR } (f(m)=0) \text{ OR } (f(n)=0) \text{ OR } (f(r)=0) \dots \dots \dots (4)$$

$f(h)$: gray level of pixel h

논리 연산식 (4)에 의해 5×5 마스크 내부에 미생물 군집체의 존재 여부가 판단되면 내부의 미생물 군집체가 3×3의 정방요소보다 작은지 아니면 5×5 마스크 외부의 다른 군집체와 연결되어 있는지를 판별해야 한다. 이와 같은 판별을 위해서 (5)와 같은 논리 연산식을 사용하였는데 이 논리 연산식을 만족하지 못하면 3×3 정방요소보다 큰 것으로 인식하고 다음의 군집체에 대해 논리 연산식 (4)를 사용하도록 프로그래밍 하였다.

$$(f(b)=255) \text{ AND } (f(c)=255) \text{ AND } (f(d)=255) \text{ AND } (f(f)=255) \text{ AND } (f(j)=255) \text{ AND } (f(k)=255) \text{ AND } (f(o)=255) \text{ AND } (f(p)=255) \text{ AND } (f(t)=255) \text{ AND } (f(v)=255) \text{ AND } (f(w)=255) \text{ AND } (f(x)=255) \dots \dots \dots (5)$$

$f(b)$: gray level of pixel b

이와 같은 방법으로 원영상의 좌상단 좌표부터 우하단 좌표까지 수평주사법에 의해 3×3 마스크보다 작은 군집체들을 검색하고 나면 1차 계수는 종료된다.

2.5 2차 계수 과정

1차 계수과정 이후에 형태학적 기법에 의한 분리과정을 거친 미생물 군집체는 그 크기와 형태에 일정한 패턴이 없고 255의 계조값을 갖는 때에 둘러싸인 계조값 0의 폐곡선이라는 외형적 특징만을 가지고 있으며, 이러한 외형적 특징은 계조값 0의 배경 속에 놓여 있게 된다. 이러한 미생물 군집체의 존재 여부를 검색하기 위해서 그림 (7)의 2×2 마스크와 논리 연산식 (6)을 이용하였다.

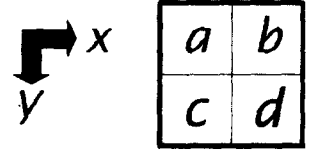


Fig. 7 2×2 mask.

$$(f(a)=255) \text{ AND } (f(b)=255) \text{ AND } (f(c)=255) \text{ AND } (f(d)=0) \dots \dots \dots (6)$$

$f(a)$: gray level of pixel a

전체 영상의 좌상단점부터 수평 주사법에 의한 추적을 수행하며 각 화소마다 논리 연산식 (6)을 만족하는 화소가 있으면 이를 미생물 군집체의 좌상단점으로 인식하게 된다. 그러나 이러한 인식 방법은 좌상단점이 아닌 경우도 좌상단점으로 인식하므로 미생물 군집체 내부의 계조값을 변환시켜주는 방법을 채택하였다. 그림 (8.b)에 보이는 것처럼 폐곡선으로 둘러싸인 미생물 군집체 내부에 다른 계조값을 설정해 주기 위하여 그림 (7)의 화소점 d로부터 x의 (+)방향과 (-)방향으로 계조값 255의 폐곡선을 만날 때까지 탐색화소의 계조값 0을 127로 변환해주고 y의 (+)방향으로 이동하는 방법을 사용하였다. 이와 같이 미생물 군집체의 내부의 계조값을 변환시켜주면 2×2 마스크에서 화소 d의 조건을 만족시키지 못하므로 그림 (8)과 같이 인식하고 내부의 계조값에 변화를 주게 된다. 그리고 오인식되는 경우를 제외하기 위해서 계조값이 변화되는 화소(i, j)의 -y방향 화소, 즉 (i, j-1)의 계조값을 검색하여 이 값이 논리 연산식 (7)을 만족하면 이것 또한 검색의 대상에서 제외시킨 후 변환된 계조값을 복원하고 수평 주사과정에서의 다음 화소로 이동한다. 이와 같은 방법으로 이진 영상내의 미생물 군집체를 계수할 수 있으며 그 결과는 그림 (8)과 같이 나타난다.

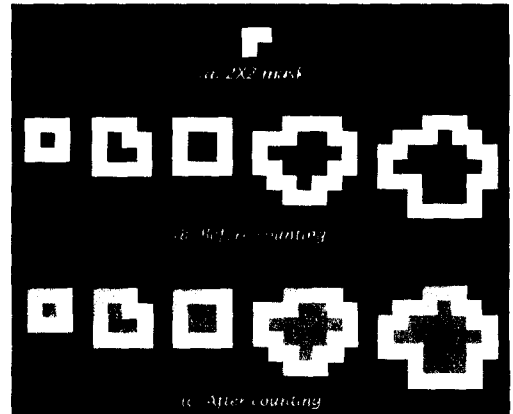


Fig. 8 Recognition and counting of the upper left pixel of colonies using 2×2 local mask.

$$(f(x,y)=127) \text{ AND } (f(x,y-1)=0) \dots \dots \dots (7)$$

$f(x,y)$: gray level of location (x,y)

$f(x,y-1)$: gray level of location (x,y-1)

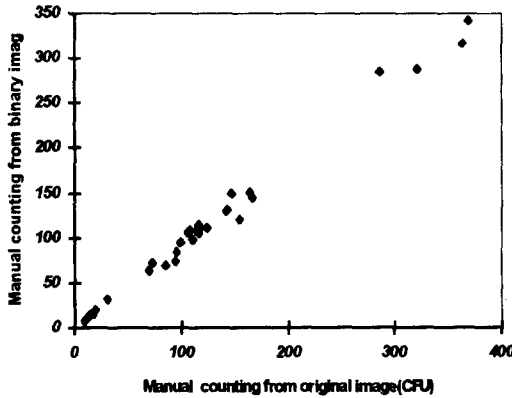
3. 결과 및 고찰

3.1 영상 이치화의 정밀도

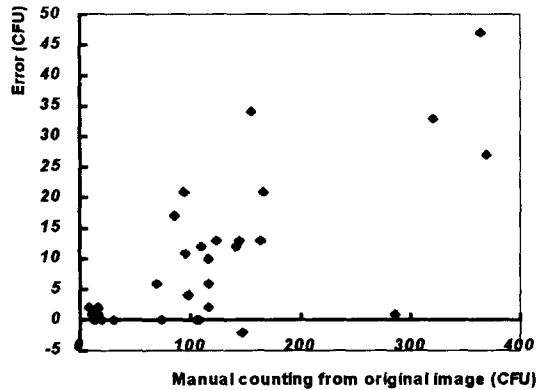
효과적인 영상 데이터를 얻는데 있어 가장 중요한 과정인 영상 이치화 과정의 정밀도를 검증하기 위해 원 영상에서의 실측치와 이진 영상에서의 실측치를 표 (1)에서와 같이 비교해 보았다. 이 결과에 의하면 총 32 개의 시료에 대해 시료당 평균 7.74%의 오차가 발생하였다. 오차의 분포는 1~47 개까지로 다양하게 나타났으며 CFU 증가와 오차의 발생은 비례하지 않는 것으로 나타났는데 이는 실험에서 사용된 조명의 영향으로 생각되어지며 계수의 정밀도를 향상시키기 위해서는 미생물 군집체만을 효율적으로 분리해 낼 수 있는 조명의 사용이 필요하다고 생각되었다.

Table 1 Manual counting from the original and the binary image.

Sample	Manual counting (8bit image)	Manual counting (1bit image)	Error	Error %	Sample	Manual counting (8bit image)	Manual counting (1bit image)	Error	Error %
1	9	7	2	22.22	17	108	108	0	0.00
2	11	10	1	9.09	18	110	98	12	10.91
3	12	12	0	0.00	19	116	106	10	8.62
4	14	14	0	0.00	20	116	110	6	5.17
5	16	15	1	6.25	21	116	114	2	1.72
6	17	15	2	11.76	22	124	111	13	10.48
7	17	16	1	5.88	23	142	130	12	8.45
8	19	19	0	0.00	24	144	131	13	9.03
9	31	31	0	0.00	25	147	149	-2	-1.36
10	69	63	6	8.70	26	155	121	34	21.94
11	73	73	0	0.00	27	164	151	13	7.93
12	86	69	17	19.77	28	166	145	21	12.65
13	95	74	21	22.11	29	286	285	1	0.35
14	96	85	11	11.46	30	321	288	33	10.28
15	99	95	4	4.04	31	364	317	47	12.91
16	106	106	0	0.00	32	369	342	27	7.32
-	-	-	-	-	Avg.	-	-	9.63	7.74



(a) Relation between original and binary image in manual counting.



(b) Thresholding error.

Fig. 9 Result of thresholding.

3.2 계수 알고리즘의 정밀도

전처리 과정을 거쳐 얻어진 이진 영상에서 겹쳐진 형태의 미생물 군집체를 분리하여 계수한 결과와 이진 영상에서의 실측 결과를 표 (2)에서와 같이 비교하여 보았다. 이 결과에 의하면 총 32개의 시료에 대해 시료당 평균 0.7%의 오차가 발생하였다. 오차의 분포는 최소 0개부터 최대 5개로 나타났으며 오차가 없는 경우를 제외한 순수한 오차의 크기는 CFU의 증가와 더불어 증가하는 것으로 나타났다. 이때의 오차는 그림 (10)에 나타난 바와 같이 연결된 집락에 의해 폐

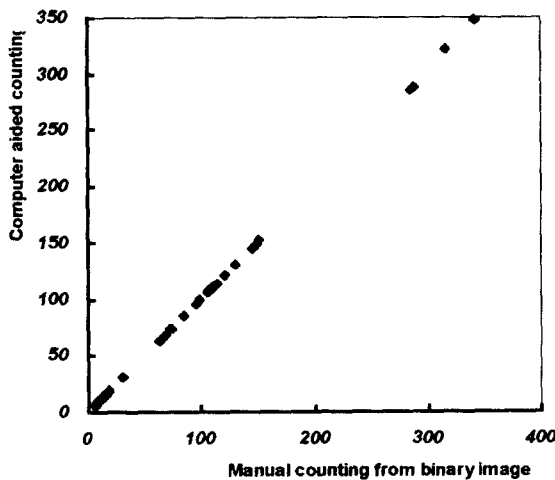


(a)Before (b)After
Fig. 10 Background to be closed curve by chained colonies.

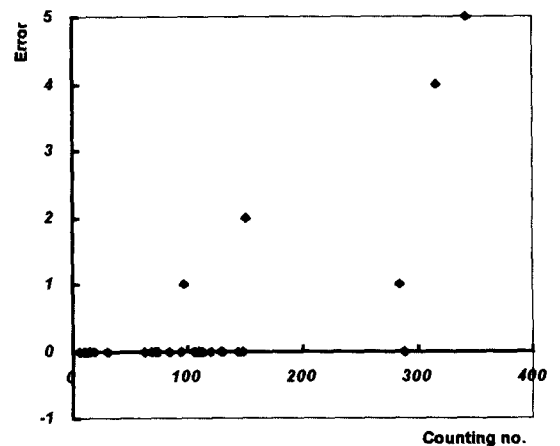
곡선을 이룬 회색의 배경 부분이 또하나의 집락으로 인식됨으로서 발생하는 것으로 판단되었다.

Table 2 Computer aided counting compared to manual counting from the binary image.

Sample	Manual counting (1bit image)	Computer aided counting (1bit image)	Error	Error %	Sample	Manual counting (1bit image)	Computer aided counting (1bit image)	Error	Error %
1	7	7	0	0.00	17	108	108	0	0.00
2	10	10	0	0.00	18	98	99	1	1.02
3	12	12	0	0.00	19	106	106	0	0.00
4	14	14	0	0.00	20	110	110	0	0.00
5	15	15	0	0.00	21	114	114	0	0.00
6	15	15	0	0.00	22	111	111	0	0.00
7	16	16	0	0.00	23	130	130	0	0.00
8	19	19	0	0.00	24	131	131	0	0.00
9	31	31	0	0.00	25	149	149	0	0.00
10	63	63	0	0.00	26	121	121	0	0.00
11	73	73	0	0.00	27	151	153	2	1.32
12	69	69	0	0.00	28	145	145	0	0.00
13	74	74	0	0.00	29	285	286	1	0.35
14	85	85	0	0.00	30	288	288	0	0.00
15	95	95	0	0.00	31	317	321	4	1.26
16	106	106	0	0.00	32	342	347	5	1.46
-	-	-	-	-	Avg.	-	-	0.41	0.17



(a) Relation between computer aided counting and manual counting from the binary image.



(b) Counting Error.

Fig. 11 Result of counting.

4. 요약 및 결론

본 연구에 의해 개발된 배양 세균수 측정장치는 gray level 영상을 사용하며, 시료의 공급 및 배출은 수동으로, 배양 세균의 자동 인식 및 계수는 자동으로 수행된다. 크기와 외형이 균일하지 않은 미생물 균집체를 계수하기 위한 영상처리 방법으로 영상 이치화, image subtraction, erosion, 마스크를

이용한 외형 특징 추출 및 계수 방법에 대한 연구를 수행하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 영상 이치화 과정에서는 미생물을 배양하지 않은 시료와 미생물을 배양한 시료를 비교하여 이치값을 결정하는 방법을 채택하였다. 불균일한 샤알레의 규격으로 인한 조명의 회절과 원형 형광 조명의 불균일성으로 인하여 이치화 이전의 실측치에 비해 7.8% 정도의 감소 오차가 발생하였다.

2. 미생물을 배양하는 용기로 사용되는 샤알레의 규격이 일정하지 않아 규격화된 측정범위를 설정해 주기 위하여 원 영상과 규격 영상간의 image subtraction을 수행하였다. 규격영상의 외부에서 관찰되는 군집 개체는 image subtraction 과정에서 제거되므로 계수과정에서는 측정 대상에서 제외되었다.

3. 미생물 군집체의 정밀한 계수를 위해서는 겹쳐진 형태의 미생물 군집체를 분리해 주어야 하는데 이를 위해 erosion과 image subtraction에 의한 형태학적 분리 알고리즘을 사용하였다. 본 연구에 사용된 시료중의 겹쳐진 군집체에 대해 형태학적 분리 알고리즘을 적용해본 결과 겹쳐진 개수와는 무관하게 모두 분리되는 것으로 나타났다.

4. 이진 영상 내부의 임의의 위치에 존재하는 미생물 군집체를 인식하기 위하여 2×2 마스크를 사용하였고, 이 마스크에 의해 미생물 군집체의 좌상단 화소를 추출하는 방법을 채택하였다. 이 방법은 좌상단 화소뿐 아니라 동일한 군집체에서 마스크의 조건을 만족하는 다른 화소를 모두 인식하므로 마스크에 의한 인식 후에 해당 군집체가 갖는 계조값을 바꾸어주는 방법을 채택하여 마스크의 조건과 일치하지 않도록 계조값을 변환하여 계수하는 방법을 채택하였다. 이러한 방법으로 계수한 결과와 이진 영상에 대한 실측 결과를 비교해 보면 사슬처럼 연결된 미생물 군집체들로 둘러싸인 배경을 군집체로 인식하기 때문에 평균 0.17%의 증가 오차가 발생하였다. 현재 제안한 계수 알고리즘의 결점을 보완하고 조명의 영향을 배제하는 향상된 알고리즘의 개발이 진행중이다.

5. 참고문헌

1. 강국희, 1993, 우유의 신속한 세균수 측정법, 한국유가공연구회, 11(1):1-16
2. 김성노, 1994, Segment에 근거한 부분적으로 가려진 2차원 물체 인식, 성균관대학교 정보공학과 석사학위 논문
3. 노상하, 이종환, 이승훈, 1992, 흑백영상처리장치를 이용한 과실선별기 개발에 관한 연구(I)-크기 및 색택 판정, 한국농업기계학회, 17(4):354-363
4. 이충호, 1995, 컴퓨터 시각에 의한 건 표고의 외관 검색 및 자동 선별시스템 개발, 성균관대학교 농업기계공학과 박사학위 논문
5. Brown, G. K. and J. A. Throop, 1986, Apple sorting with machine vision, Trans. of ASAE, 17(1):17-19.
6. Davis L. S., 1975, Survey of edge detection techniques, Computer Graphics and Image Processing, 6:492-501.
7. Hwang, H., C. H. Lee and Y. K. Lee, 1993, Automatic visual feature extraction and measurement of mushroom(Lentinus Edodes L.), ICAMPE '93, pp1232-1243.
8. Pavlidis, T., 1978, A review of algorithm for shape analysis, Computer Graphics and Image Processing, 7:243-258.
9. R.C.Gonzalez, R.E.Woods, 1993, Digital Image Processing, Addison-Wesley Publishing Company.
10. Robert J. Schilling, 1990, Fundamentals of Robotics, Prentice-Hall Inc.
11. Tamar, P. and M. David, 1982, A study of edge detection algorithm, Computer Graphics and Image Processing, 20:1-21.