

암모니아산화세균의 계수를 위한 영상분리기법

A Segmentation Method for Counting Ammonia-oxidizing Bacteria

김 학 경*, 이 선 희**, 이 명 숙***, 김 상 봉****

*부경대학교 메카트로닉스공학과(Tel : 82-051-620-1606; Fax : 82-051-621-1411;E-mail: hakkyong@dreamwiz.com)

**부경대학교 미생물학과(Tel : 82-051-620-6365; Fax : 82-051-611-6358; E-mail: lshee@woongbi.pknu.ac.kr)

***부경대학교 미생물학과(Tel : 82-051-620-6365; Fax : 82-051-611-6358; E-mail: mslee@dolphin.pknu.ac.kr)

**** 부경대학교 기계공학과(Tel : 81-051-620-1606; Fax : 81-051-621-1411;E-mail: memcl@dolphin.pknu.ac.kr)

Abstract : As a method to control the bacteria number in adequate level, a real time control system based on microscope image processing measurement for the bacteria is adopted. For the experiment, Ammonia-oxidizing bacteria such as *Acinetobacter* sp. are used. This paper proposed hybrid method combined watershed algorithm with adaptive automatic thresholding method to enhance segmentation efficiency of overlapped image. Experiments was done to show the effectiveness of the proposed method compared to traditional Otsu's method, Otsu's method with adaptive automatic thresholding method and human visual method.

Keywords : adaptitve automatic thresholding method, Otsu's method, watershed algorithm

1. 서 론

순환여과식 양어장에서 발생되는 암모니아는 수질악화 및 어류 수명에 악영향을 주기 때문에, 이것을 제거시키는 암모니아 산화세균을 이용하여 수질개선 및 어류의 수명을 연장시킴으로써 생산효율을 높일 수 있다. 암모니아 산화세균을 이용한 양어장 관리를 위해서는 암모니아 산화세균의 신속한 계수와 제어가 필요하게 된다. 이러한 세균수의 계측은 주로 생균수 계수법과 현미경 계측법으로 이루어지고 있는데 전자는 시간이 많이 걸리고 후자의 경우는 정확도가 결여되는 단점이 있다. 따라서 간편하고 실시간으로 계수하기 위해서는 디지털 영상처리법의 개발이 요구되고 있다^{[1]-[3]}. 일반적으로 미생물의 현미경화상은 무색투명하므로 디지털 영상처리를 위해서는 미생물의 형광염색이 필요하다. 그러나 형광염색은 급속히 색이 희미해지고 개체마다 염색되는 정도가 다를 뿐만 아니라 현미경의 배경화상은 구배를 가지므로 전체 화상에 대해 동일한 threshold값을 적용하기는 어렵다. 또한 이진영상에 2개 이상의 개체가 서로 결합된 형태로 주어지는 경우가 많아서 일반적인 segmentation기법이나 thresholding기법으로 그 정확한 개체의 수를 계수하는 데는 한계가 있다.

본 논문에서는 미생물의 현미경화상에서 계수의 정확성을 높이기 위해 Otsu's method에 기초한 적응 자동 문턱치 결정법(Adaptive automatic thresholding method)과 watershed 알고리즘을 적용한 계수 알고리즘을 제안하였다. 먼저 암모니아 산화세균의 일종인 *Acinetobacter* sp.를 배양하여 현미경 화상을 얻고, 화상의 크기를 32×32 화소로 나누어 적응 자동 문턱치 결정법을 적용하였다. 그리고, 중첩된 화상을 분리하는 watershed 알고리즘을 사용하여 산화세균을 계수하였다. 또한, 본 논문에서 제안된 미생물 계수 알고리즘의 유효성 검증을 위해 인간의 시각법(human visual method), 기존의 Otsu's method 및 적응 thresholding에 기초한 Otsu's method와 비교하였다. 그 결과, 본 논문에서의 제안한 미생

물 계수 알고리즘이 다른 방법들에 비해서 인간의 시각법에 의한 계수결과에 근접된 결과를 얻을 수 있었다.

2 배지의 실험조건 및 문제설정

2.1 배지의 실험조건

본 논문에서는 암모니아 산화세균인 *Acinetobacter* sp.를 대상으로 하여 실험을 행하였다. 실험은 2.5 l의 bioreactor속에 1.5 l Bacto Nutrient Broth(Difco)를 넣어 온도 121℃, 압력15lbs/in²의 상태에서 15분 동안 멸균한 후 암모니아산화 세균을 초기 접종량 10³CFU/ml로 하여 30℃에서 배양하였다. 이때 초기조건은 교반속도 7rpm, 공기공급량 0.4vvm, DO 0.1, pH 6.8로 하였다. 영상의 획득은 bioreactor에서 일정량의 샘플을 peristaltic 펌프 및 vacuum 펌프로 샘플링하여 샘플링된 시료와 염색시료(Syto13)를 window에 주입하고 nuclepore filter에 걸러서 CCD카메라 frame grabber card를 통해 현미경화상을 얻는다.

2.2 문제설정

미생물의 현미경화상은 대부분 무색투명하다. 따라서 디지털 영상처리를 위해서 샘플링된 시료를 형광염색하여 영상처리를 하게 된다. 형광염색된 미생물 화상은 Fig. 1에 보이는 바와 같이 배경화상이 구배를 가지고, 시간이 지남에 따라 형광색이 급속히 희미해진다. 또한, 개체마다 염색되는 정도가 다르므로, 전체 영상에 대해 동일한 threshold값을 적용하기 어렵다. 그리고, 현미경화상의 이진영상에서는 미생물의 개체가 Fig. 2와 같이 2개 이상 서로 중첩된 형태로 주어지는 경우가 많다. 따라서, 일반적인 segmentation기법이나 thresholding기법으로 그 정확한 미생물의 개체 수를 계수하