

콜로니 픽킹 로봇 시스템의 개발 (I)

- 콜로니 위치확인 영상처리 알고리즘 -

Development of Robot System for Colony Picking (I)

- Image processing algorithm for detecting position of colony -

이현동* 김기대* 김찬수** 나건영* 임용표***
정회원 정회원 정회원
H. D. Lee K. D. Kim C. S. Kim K. Y. Na Y. P. Yim

1. 서 론

인간 게놈 프로젝트가 지속적으로 진행됨에 따라 계속적으로 대량의 유전체 정보가 밝혀지고 있으며, 이미 밝혀진 유전체의 염기서열을 바탕으로 다양한 생물의 전체 유전자의 기능을 효율적으로 해석하는 기술의 개발이 요구되고 있다. 식물 게놈 프로젝트 또한 식량확보라는 단순하면서도 전략적인 차원에서 가장 절실히 요구되는 기본 과학기술 연구분야이다.

게놈(genome)은 유전자(gene)와 염색체(chromosome)의 합성어로 한 생물체가 지닌 모든 유전 정보의 집합체이고, 동종의 재결합 DNA 분자를 포함하는 동일 세포의 개체를 클론(clone)이라 하며, 클론의 집합체를 콜로니(colony)라 한다. 생물체의 모든 유전정보를 가진 게놈은 핵산(nucleotide acid)이라 불리는 염기로 이루어져 있으며, 이들은 서로 상보적인 쌍을 이루어 두 가닥으로 형성되어 있다. 이를 한 쌍의 base pair라 한다.

클론 되어질 유전자를 포함하고 있는 DNA 단편이 재조합 DNA 분자(recombinant DNA molecule)를 생산하기 위해 벡터(vector)라는 원형 DNA 분자속에 삽입된다. 벡터는 유전자를 숙주세포로 운반하는 운반체(vehicle) 역할을 하며, 숙주세포는 여러 형태의 세포가 있으며, 그 중에 박테리아가 일반적으로 사용된다. 숙주세포 속에서 벡터는 복제되어, 자신과 완전히 동일한 다량의 벡터뿐만 아니라 그것이 운반하는 유전자도 다량 복제된다.

숙주세포가 분열될 때, 재조합 DNA 분자의 복제물이 자손에게 전달되며 거기서 벡터 복제가 일어난다. 수많은 세포 분열이 일어난 후, 동일한 숙주세포의 콜로니(colony), 혹은 클론이 생성된다. 클론의 각 세포는 하나, 혹은 그 이상의 동일한 재조합 DNA 분자를 포함하며, 재조합 분자에 의해 운반되는 유전자를 소위 '클론'되었다고 한다.

이때 숙주세포의 분열은 배양액을 담은 용기(petri-dish)에서 이루어진다. 박테리아 속의 배양된 콜로니에 재조합 DNA가 포함되어 있지 않으면 푸른색을 띠고, 재조합 DNA가 포함되어 있으면 흰색을 띠게 된다. 이 흰색의 콜로니만을 추출해 내는 것이 바로 콜로니 픽킹(colony picking)이라 한다. 따라서, 본 연구는 현행 수작업으로 진행되는 콜로니 픽킹을 자동화하기 위해 콜로니 픽킹 로봇 시스템을 개발하기 위한 전단계 연구로서 콜로니의 판별 및 위치검출을 위한 시스템 구축 및 영상처리 알고리즘을 개발하는데 목적이 있으며, 그 구체적인 내용은 다음과 같다.

* 충남대학교 농업생명과학대학 농업기계공학과

** (주) 엔에스티

*** 충남대학교 농업생명과학대학 원예학과

- 1) 배양된 콜로니의 특징을 파악하며, 콜로니 픽킹 메카니즘을 설정하고
- 2) 시스템 구축 및 영상처리 알고리즘을 설정하여,
- 3) 성능시험을 통한 성능 및 문제점을 제시하고 향후 발전방향을 제시한다.

2. 재료 및 방법

가. 공시재료

본 연구에 사용된 재료는 종묘회사에서 사용하는 inbred 라인중 지부계 배추의 잎파리에서 추출한 배추 게노믹 DNA를 가지고 있는 BAC clone을 37℃ 암상태에서 18시간동안 배양한 콜로니를 대상으로 시험을 실시하였다. 배양된 콜로니의 특징을 살펴보면, 형태면에서 대부분 원형을 유지하고 있지만 크기는 다양하다. 또한 다른 DNA를 가진 콜로니가 몇 개씩 무리를 이루며 연결되어 있는 현상도 있다. 그림 1에 시험에 사용된 콜로니를 나타내었다.

나. 하드웨어 설계

본 연구에서의 하드웨어는 영상정보를 입력받는 저조도 Digital Color CCD 카메라 및 카메라 렌즈, 렌즈의 조리개 및 줌 기능을 제어하는 렌즈 콘트롤러, 영상정보를 PC에 전달하는 Frame grabber, 대상물체를 비추기 위한 조명부, PC, 3축 직교좌표형 로봇, 픽킹 헤드, 시스템 콘트롤러 등으로 구성하였다. 그림 2(a)에 본 시스템을, 그림 2(b)엔 픽킹 헤드부의 구성도를, 표 1에는 시스템의 사양을 나타내었다. 특히, 조명부는 배양액에 의한 빛의 반사현상, 인식하여야 할 콜로니의 색상, 투명 용기 등의 특성을 고려하여 역치값으로 확연히 구분될 수 있도록 후면조명이 가능하게 설계, 제작하였다. 광원은 확산시 빛의 분포가 고른 36W 주광색 삼파장 형광등을 사용하였고, 광원과 대상물체 사이에 2mm 반투명 흰색 아크릴을 삽입하여 직광에 의한 입력화상의 명암을 방지하였다. 로봇 시스템 본체는 X, Y, Z 3축 직교좌표형 매니퓰레이터를 사용하였으며, 픽킹 헤드는 상하부

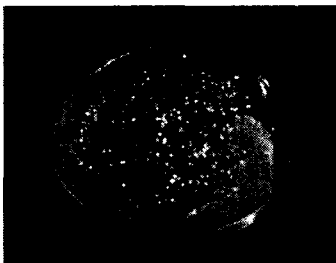
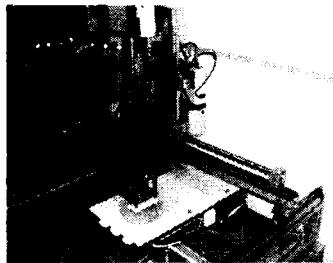
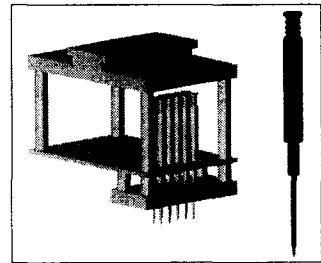


Fig. 1 The photo of cultivated colony used in performance test



(a) picking system



(b) picking head

Fig. 2 The image processing system for colony picking

Table 1 The specification of system for colony picking

Item	specification
Camera	Color CCD, NTSC, S/N ratio : -48 dB, 768×494 pixels
Lens	Focal length : 8.568 mm, Optical back focal length : 11.69 mm Flange back focal length : 17.526 mm
Frame grabber	NTSC/PAL RGB, 640×480 pixels, 30 frames/sec,
Light source	3 wavelength fluorescent lamp, 36W, 220V
PC	Pentium IV
solenoid	DC 24V, 32Ω, 98J
I/O board	16 I/O channel, DC 5-24V, Operate/Release Time : 5 msec

판을 4개의 지지대로 연결하고 픽킹 핀을 16개까지 장착할 수 있는 핀 지그와 핀 지그에 연결된 솔레노이드에 의해 상하운동을 할 수 있는 핀 등으로 구성되어있어 영상처리에 의해 검출된 콜로니 위치로 이동하여 솔레노이드의 작동에 의해 픽킹 핀이 콜로니를 문혀내는 동작을 수행한다.

다. 소프트웨어 설계

① 영상 축소설정

본 연구는 입력받은 영상정보를 통해 배양된 콜로니의 위치를 검출하는 것이 목적이며, 그에 따라 영상정보로부터 거리를 추출해 내야 한다. 이미 정해져 있는 높이에 카메라를 장착시키고 배양용기가 놓여질 위치에 가로세로 10mm의 정방형 격자가 그려진 도면을 위치시켜 영상 내에서 1화소당 실제 거리를 산출해 내었다.

② 이진영상 추출

영상입력 장치를 통하여 들어온 콜로니 영상 신호(그림 3(a))에는 R, G, B 3원색의 정보를 가지고 있으며, 이 3원색을 이용하여 재조합 DNA가 포함되어 있지 않은 푸른색 콜로니와 재조합 DNA가 포함된 흰색 콜로니를 분리하고, 식 (1)을 이용하여 칼라 영상을 흑백영상(휘도영상)으로 바꾼후 문턱값을 이용한 흰색 콜로니만의 이진영상을 추출한 후 가우시안 마스크를 이용하여 잡음 제거 및 smoothing을 실시하였다.

$$Ye = 0.3R + 0.59G + 0.11B \dots\dots\dots (1)$$

이진영상에서 얻어진 각 콜로니들을 순차적 알고리즘을 이용한 라벨링을 통해 연결된 화소들끼리 한 대 묶었다. 이때 전체 영상의 테두리 부분에 걸쳐 잘라져 보이는 콜로니들은 본 처리에서 제외시켰다. 영상내의 라벨링된 각 콜로니 부분들은 소벨 연산자를 이용한 윤곽선추출법으로 콜로니 부분을 폐곡선 형식으로 나타냈다. 그 후 Zhang Suen 세선화 알고리즘을 이용하여 윤곽선을 1화소의 연결된 폐곡선으로 표시하였다.

③ 콜로니 추출

콜로니의 추출은 이진영상에 의해 추출된 영상에서 각 라벨링된 콜로니의 원형도(R)를 계산하여 독립된 하나의 콜로니인지, 2개 이상의 콜로니가 붙어있는 것(이하 콜로니 집락)인지를 구별하여 추출하였다. 시행착오법으로 설정된 임계 R값이 85 이상이면 독립된 콜로니로, 85 이하면 콜로니 집락으로 인식하도록 하였다. R값이 85 이상인 콜로니는 하나의 콜로니로 인식하여 원 중심을 영상 축소설정에 의한 X, Y 좌표 값으로 위치를 나타내었다.

콜로니 집락은 그림 3(b)의 5×5 마스크를 이용하여 세선화된 영상에서 근접 테두리 화소를 찾아내어 화소의 위치를 차례로 입력받은 후 그림 3(c)에서처럼 임의의 한 점을 시작으로 나머지 화소끼리의 거리를 구하여 최소의 거리를 나타내는 두 점의 연결선이 콜로니가 붙어있는 경계로 인식하게 하였다. 여기서 임의의 한 점에서 다른 점까지의 거리가 전체 둘레길이의 1/25배 이내에 해당되는 점은 계산에서 제외시켜 최소거리로 인식하지 않도록 하였다.

다음으로, 그림 4(a)에서처럼 최소거리로 인식된 두 점 (x1, y1), (x2, y2)의 위치를 구하고 두 점을 지나는 직선을 구하였다. 이 직선에 의해 콜로니 집락은 두 부분으로 나누어지며 두 부분으로 나누어진 콜로니 집락은 각각 원형도를 계산하여 독립 콜로니임을 재차 인식해야 한다. 이때 한 콜로니 집락에 있는 각 점들은 직선과 비교하여 직선의 어느 편에 있는 것인지를 인식해야 한다. 그림 4(b),(c)에서 보듯이, 콜로니 집락안에 있는 임의의 한 점 (x, y)을 지나며 콜로니 집락을 둘로 나누는 직선에 수직인 또 다른 직선을 구한 후 두 직선이 만나는 점을 (x', y')라 한다. x, y 값이 콜로니를 둘로 나누는 직선의 기울기에 따라 x', y'와의 값 비교에서 식 (2)에 의해 위치가 정해진다. 콜로니 집락내의 모든 점의 위치가 정해지면 각 부분별 원형도를 계산하여 시행착오법

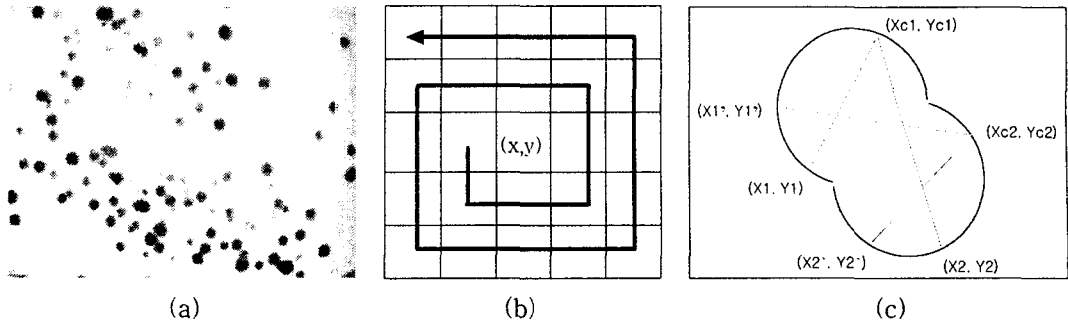


Fig. 3 The schematic diagram of colony detection algorithm
 (a) originally image, (b) 5×5 mask, (c) calculation of distance between two pixels

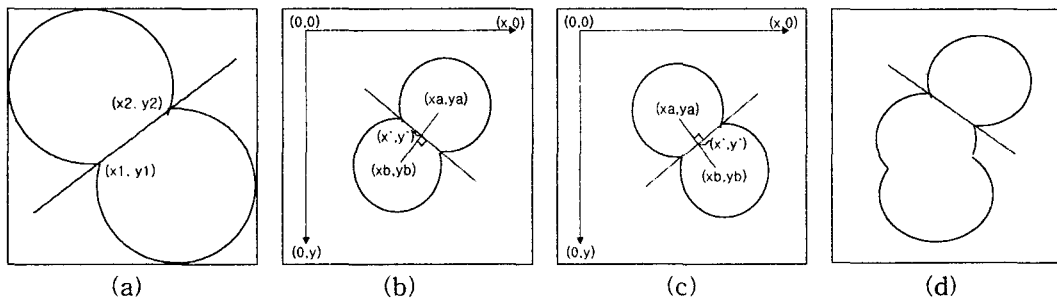


Fig. 4 The schematic diagram of image processing algorithm
 (a) detection of boundary, (b) slant > 0, (c) slant < 0, (d) colony group

으로 설정된 임계 R값이 70 이상이면 독립된 하나의 콜로니로 인식하고, 70 이하이면 그림 4(d)와 같이 제 3의 콜로니 집락인 것으로 인식하게 하였다.

$$\begin{array}{ll}
 \text{slant} > 0, & \text{if } x > x', y < y' \text{ then} \\
 & x = xa, y = ya \\
 \text{slant} < 0, & \text{if } x < x', y < y' \text{ then} \\
 & x = xa, y = ya
 \end{array}
 \quad
 \begin{array}{ll}
 \text{if } x < x', y > y' \text{ then} \\
 x = xb, y = yb \\
 \text{if } x > x', y > y' \text{ then} \\
 x = xb, y = yb
 \end{array}
 \dots \dots (2)$$

라. 콜로니 위치검출 성능시험

본 시험에서는 배양된 콜로니의 위치를 영상처리를 통하여 검출하기 위하여 배추 게노믹 DNA를 가지고 있는 BAC clone을 37℃ 암상태에서 18시간동안 배양한 콜로니를 대상으로 시험을 실시하였다. 우선 독립적인 콜로니 및 콜로니의 위치를 정확하게 인식하는가를 판단하는 시험을 실시하였고, 콜로니 추출 알고리즘을 통한 콜로니 집락을 독립된 콜로니로 나누어 인식하는지를 알아보고, 수작업에 의한 콜로니의 인식과의 비교를 통한 알고리즘의 신뢰성을 검증하였다. 마지막으로 영상처리에 의해 검출된 콜로니 위치에 정확하게 픽킹 헤드 가 이동하는지를 살펴보았다.

3. 결과 및 고찰

가. 영상 축소설정 결과

영상 축소설정 결과는 표 2 및 식 (3)과 같으며 영상평면(640×480)에서 비교적 영상의 왜곡현상이 적은 측정영역(X=50~590, Y=50~430)에서 유효하다.

Table 2 The distance befitting 1 pixel according to distance between camera and materials

distance between camera and materials (mm)	No. of pixels by 10mm (EA)	distance per 1 pixel (mm/pixel)	distance between camera and materials (mm)	No. of pixels by 10mm (EA)	distance per 1 pixel (mm/pixel)
70	95	0.1053	130	60	0.1667
90	80	0.1250	150	53	0.1887
110	68	0.1471	170	48	0.2083

$$Y = \frac{10}{0.003x^2 - 1.2038x + 163.7865} \dots \dots (3)$$

where, Y = The distance per 1 pixel, mm
 x = distance between camera and materials, mm

나. 성능시험 결과

본 시험에서는 배양된 콜로니가 들어있는 총 10개의 배양용기를 시험에 사용하였다. 독립된 콜로니의 크기는 최대 직경 3mm에서 최소 직경 0.3mm로 크기가 다양하였으며, 영상 전처리 과정에서 크기가 작은 콜로니는 노이즈로 인식되어 위치정보가 출력되지 않는 경우가 발생하였다. 그러나 크기가 작다 하더라도 콜로니의 밀도가 높아 위치정보를 추출할 수 있는 것도 있었다. 카메라와 대상체와의 사이거리가 70mm일 때 영상의 검출영역은 가로세로 약 70×50mm의 범위를 획득하므로 직경 140mm의 배양용기를 한번에 영상으로 획득할 수 없기에 4번에 걸쳐 영상을 획득하였다. 그림 5(a)는 원형도를 통한 콜로니 집락을 판별하는 영상이며, (b)는 콜로니 집락의 테두

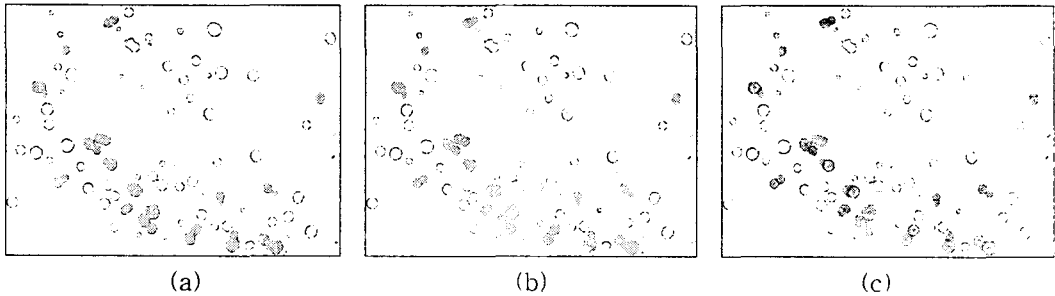


Fig. 5 The result of performance test of image processing algorithm

(a) detecting circularity, (b) detecting boundary colony group, (c) dividing colony group

Table 3 The results of distinguishing and detecting position of colony in performance test

No. of petri-dish	No. of individual colony			No. of two colony group and countable dividing colony			No. of over three colony group and countable dividing colony		
	by manual (EA)	by image processing (EA)	rate (%)	by manual (EA)	by image processing (EA)	rate (%)	by manual (EA)	by image processing (EA)	rate (%)
1	220	219	99.5	35 / 68	37 / 65	105.7 / 95.6	16 / 35	16 / 15	100 / 42.9
2	197	200	101.5	27 / 51	27 / 48	100 / 94.1	14 / 30	13 / 11	92.9 / 36.7
3	134	132	98.5	20 / 36	23 / 36	115 / 100	19 / 43	18 / 16	94.7 / 37.2
4	236	232	98.3	42 / 71	41 / 69	97.6 / 97.2	28 / 61	24 / 23	85.7 / 37.7
5	178	181	101.7	30 / 53	30 / 52	100 / 98.1	18 / 32	19 / 17	105.6 / 53.1
6	190	185	97.4	26 / 41	25 / 39	96.2 / 95.1	15 / 18	12 / 9	80.0 / 50.0
7	210	208	99.0	16 / 26	14 / 25	87.5 / 96.2	24 / 59	24 / 23	100 / 39.0
8	264	264	100	39 / 72	37 / 70	94.9 / 97.2	37 / 69	35 / 32	94.6 / 46.4
9	245	238	97.1	38 / 66	39 / 64	102.6 / 97.0	24 / 48	27 / 21	112.5 / 43.8
10	204	203	99.5	29 / 54	29 / 53	100 / 98.1	29 / 53	30 / 27	103.4 / 50.9

리 좌표를 입력받는 영상, 그리고 (c)는 콜로니 집락으로 부터의 위치를 검출하는 영상을 보여주고 있다.

영상처리 성능시험 결과는 표 3에 나타났다. 수작업에 의한 독립된 콜로니 및 콜로니 집락의 판별 및 위치검출과 영상처리에 의한 판별 및 위치검출을 비교한 결과, 독립된 콜로니의 인식은 수작업의 경우와 비교해 볼 때 97 ~ 100 %의 높은 인식률을 나타냈으며, 2개의 콜로니가 연결되어 있는 콜로니 집락의 경우도 수작업과 비교해 볼 때 95 ~ 100 %의 높은 인식률을 나타내었다. 그러나 3개 이상의 콜로니가 연결되어 있는 콜로니 집락의 위치 검출의 경우, 90% 대의 높은 판별률을 나타냈으나 위치검출은 50% 미만으로 나타났다.

비록 3개 이상의 콜로니가 연결되어있는 콜로니 집락의 위치검출이 50% 미만으로 나타났지만, 실제 수작업의 경우 3개 이상은 콜로니 픽킹시 인접 콜로니에 접촉되 오염될 수 있기에 오염이 될 확률이 적은 콜로니만 픽킹이 이루어지므로 계수한 콜로니 보다 적은 수를 픽킹한다. 따라서, 본 영상처리 알고리즘을 통해 90% 이상의 콜로니를 검출할 수 있는 것으로 사료된다.

영상 축소설정 결과에 따라 실제 콜로니의 위치를 검출하여 픽킹 헤드로 픽킹을 실시한 결과 영상의 왜곡현상이 적은 측정영역(X=50~590, Y=50~430)에서 정확한 위치에 픽킹 핀이 위치했다.

4. 요약 및 결론

게놈(genome)은 유전자(gene)와 염색체(chromosome)의 합성어로 한 생물체가 지닌 모든 유전 정보의 집합체이고, 동종의 재결합 DNA 분자를 포함하는 동일 세포의 개체를 클론(clone)이라 하며, 클론의 집합체를 콜로니(colony)라 한다.

본 연구는 현행 수작업으로 진행되는 콜로니 픽킹을 자동화하기 위해 콜로니 픽킹 로봇 시스템을 개발하기 위한 전단계 연구로서 콜로니의 판별 및 위치검출을 위한 영상처리 알고리즘을 개발하는 연구로 그 구체적인 연구결과는 다음과 같다.

1. 본 시스템은 저조도 Digital Color CCD 카메라 및 카메라 렌즈, 렌즈 콘트롤러, Frame grabber, 조명부, PC, 3축 직교좌표형 로봇, 픽킹 헤드, 시스템 콘트롤러 등으로 구성되었다.
2. 푸른색의 콜로니를 제외한 흰색의 콜로니 이진영상을 이용하여 원형도를 측정된 후 독립된 콜로니와 2개 이상의 콜로니가 연결된 콜로니 집락으로 나누어 판별하였으며, 콜로니 집락 분리 알고리즘을 이용하여 연결된 2개 이상의 콜로니의 위치를 검출하였다.
3. 콜로니 판별 및 위치검출 결과 90% 이상의 위치검출 능력이 있는 것으로 나타났으며, 측정 영역(X=50~590, Y=50~430)에서 정확한 위치에 픽킹 핀이 위치하였다.

5. 참고 문헌

1. 김성로, 강해석, 황순자, 김봉기, 김문현. 1997. Segment에 근거한 부분적으로 가려진 2차원 물체인식. 제 6회 영상처리 및 이해에 관한 워크샵 논문집 : 147-152
2. 손재룡, 강창호, 한길수, 정성립, 권기영. 2001. 칼라 영상처리에 의한 결주 및 불량묘 인식. 한국농업기계학회지 Vol.26(3) : 253-262
3. 최재완 외 5. 1998. 인공씨감자 생육상태 모니터링을 위한 화상처리 알고리즘 개발에 관한 연구. 한국농업기계학회지 Vol.23(4) : 373-380
4. 황 현, 장영창, 임동혁. 1998. 컴퓨터 시각과 레이저 구조광을 이용한 물체의 3차원 정보 추출. 한국농업기계학회지 Vol.23(4) : 381-390
5. Chang, J. H., H. Hwang and K. H. Kang. 1997. Automatic Recognition and Counting of Cultured Bacteria Using Computer Vision. Food Eng. Progress. Vol.1(1) : 65-70
6. Pavldis, T. 1978. A review of algorithm for shape analysis. J. of Computer Graphics and Image Processing 7 : 243-258