

영상 처리방식 자동 미생물 콜로니 계수장비 개발

The development of automated colony counter using image processing

이 규 환* 오 영 택** 윤 주 형** 장 인 배***
Lee, Kyu-Hwan Oh, Young-Tack Yoon, Ju-Hyeong Chang, In-Bae

Abstract

A colony counting on a petri-dish is a laborious task in microbiology fields that automated counting systems are needed. But lots of such systems are high price that majorities of labs rely on the manual counting and it is a time consuming and laborious job.

In this study, an attempt was made to select the relative atmospheric correction method for the water quality factors extraction from the satellite image data. And also, the time-series analysis of the water quality factors was performed by using the multi-temporal image data. The result shows that the proposed method can be commercialized with low prices.

키워드 : 미생물, 콜로니, 계수
Keywords : *microbiology, colony, counting*

1. 서론

미생물학을 연구하는 과정에서 미생물을 분류하거나 특징을 분석하는 일을 생장곡선이라는 그래프를 만들어 실행하게 된다. 이러한 용도로 사용하는 생장곡선을 만드는 방법은 현재 미생물을 번식시켜 집락을 형성하고 그 집락에 수를 직접 계수하여 로그스케일에 그래프를 제작하는 방식이다.

집락에 개수를 카운팅하는 장비로는 펜 방식의 사용자가 직접적인 카운팅을 수행하는 방식이 있

고 자동으로 집락 샘플에 이미지를 처리하여 카운팅 하는 방식이 있다.

단안시를 시작으로 연구되기 시작한 비전 기술은 기하학적으로 명료하여 정확성을 요구하는 다양한 분야에 널리 응용되고 있다. 그러나 이러한 분야 중에도 이미지 인식분야에 이러한 비전 기술을 접목시킬 수 있도록 많은 발전을 해오고 있다.[1]

비전 기술에 발전으로 개발된 마크패턴기법을 이용하면 고성능의 카메라를 장비하지 않고도 집락 개수를 카운팅 할 수 있는 알고리즘을 설계할 수 있다.

본 논문에서는 국내에서 대부분 사용되고 있는 펜 방식의 카운팅 장비와 국외에서 사용되는 고성능 카메라 장비를 이용한 고가의 이미지 프로세싱 카운팅 장비에 비효율적인 면을 고려하여 가격면에서 저가에 웹카메라를 이용한 마크패턴 인식형 이미지 프로세싱 집락 카운팅 장비를 개발하였다.

* 강원대학교 대학원 기계메카트로닉스공학과 석사과정, 교신 저자
** 강원대학교 대학원 기계메카트로닉스공학과 석사과정
*** 강원대학교 메카트로닉스전공 교수, 공학박사

2. 이론적 배경

2.1 생물학적 배경

집락이란 고체표면에서 자라서 맨눈으로 볼 수 있는 미생물의 군집이다. 자연적인 서식지에서 미생물은 대개 여러 종류의 생물종이 섞인 복잡한 혼합 집단에서 자란다. 이러한 혼합배양(mixed culture)상태에서는 한 종의 미생물을 적절하게 연구할 수 없기 때문에 미생물학자들에게는 어려움이었다. 각각의 종의 특성을 연구하려면 단일 세포에서 자란 세포 집단인 순수배양체(pure culture)가 필요하다. 세포의 혼합액을 한천표면에 비교적 낮은 밀도로 도말하면 각세포가 자라서 완전하게 분리된 집락을 형성한다. 이런 집락은 하나의 세포로부터 만들어지기 때문에 각각의 집락은 순수배양체를 나타내고 이렇게 얻은 성장곡선은 그 미생물의 분류와 특징을 규명하는데 사용된다.

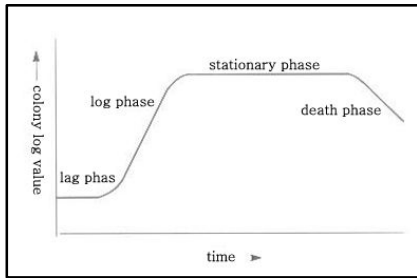


Fig.1 Close loop growth curve [2]

이러한 성장곡선을 얻는데 필요한 집락의 수는 너무 많지 않아야 한다. 너무 많은 세포를 사용할 경우 어떤 세포는 집락을 형성하지 못하게 되어 측정에 오차가 생길 수 있기 때문이다. 집락의 수가 너무 적어도 생균 측정의 통계학적 유의성이 낮아지기 때문에 적절한 집락이 형성될 수 있는 30~300개의 집락이 형성된 배양이 통계학적으로 가장 믿을 수 있다.[3]

생장률에 대한 연구는 기초적인 생리적, 생태적 연구를 수행하는 데 도움이 되며 산업에도 응용된다. 그러므로 성장곡선을 이용하여 얻는 미생물의 대수기 성장률을 알아야 한다. 대수기란 성장곡선을 이루는 지체기(lag phase), 대수기(log phase), 정체기(stationary phase), 사멸기(death phase)의 4가지 미생물의 성장시기이다.

대수기에는 각각의 미생물이 일정한 간격으로 분열한다. 그러므로 집단의 규모는 특정한 시기마다 두배로 증가하며 이시간을 세대시간(generation time)이라고 한다.[4]

세대시간을 방정식으로 나타내면 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$N_0 = \text{초기집단의 크기}$$

$$N_t = t\text{시간에서의 집단 크기}$$

$$n = t\text{시간동안의 세대수}$$

$$N_t = N_0 \times 2^n$$

이식을 세대수인 n에 대해 풀면 다음과 같고 이때 모든 대수는 아래가 10인 사용대수이다.

$$\log N_t = \log N_0 + n \cdot \log 2,$$

$$n = \frac{\log N_t - \log N_0}{\log 2} = \frac{\log N_t - \log N_0}{0.301}$$

희분배양에서 대수기의 성장률은 평균성장률 상수(mean growth rate constant, k)로 나타낼 수 있다. 이 상수는 단위시간당 세대수로 보통 한 시간 동안의 세대수로 나타낸다.

$$k = \frac{n}{t} = \frac{\log N_t - \log N_0}{0.301t}$$

집단의 규모가 두배로 되는 데 걸리는 시간인 평균세대시간(mean generation time, g)역시 계산 가능하다. 만약 집단의 규모가 두배가 되면(t=g), Nt는 다음과 같다.

$$N_t = 2N_0$$

$$k = \frac{\log(2N_0) - \log N_0}{0.301g} = \frac{\log 2 + \log N_0 - \log N_0}{0.301g}$$

$$k = \frac{1}{g}, \quad g = \frac{1}{k}$$

구해진 평균세대시간은 다음 표를 이용하여 그 집락형성의 미생물의 분류를 할 수 있다.[2]

미생물	온도(°C)	세대시간(분)
진정세균		
<i>Beneckea natrigens</i>	37	0.16
대장균(<i>Escherichia coli</i>)	40	0.35
고초균(<i>Bacillus subtilis</i>)	40	0.43
황색포도상구균(<i>Staphylococcus aureus</i>)	37	0.47
박농균(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	37	0.58
보툴리누스균(<i>Clostridium botulinum</i>)	37	0.58
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	25	4.6-5.3
<i>Anabaena cylindrica</i>	25	10.6
결핵균(<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	37	≈12
매독균(<i>Treponema pallidum</i>)	37	33
원생생물		
<i>Tetrahymena geleii</i>	24	2.2-4.2
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	25	5.9
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	25	7.75
<i>Asterionella formosa</i>	20	9.6
<i>Leishmania donovani</i>	26	10-12
<i>Paramecium caudatum</i>	26	10.4
<i>Euglena gracilis</i>	25	10.9
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30	11-12
<i>Giardia lamblia</i>	37	18
<i>Ceratium tripos</i>	20	82.8
진균		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30	2
<i>Monilia fructicola</i>	25	30

Fig.2 Generation time of microorganism

2.2 이미지 프로세싱

집락을 계수하는 장비를 콜로니 카운터(Colony counter)라 하는데 이 콜로니 카운터는 현재 국내에서는 펜형식으로 사용자가 직접 집락을 하나하나 페트리디쉬(petri dish)표면에 점을 찍으면 그 누르는 압력을 카운팅해주는 장비가 가장 많이 사용되고 있다. 하지만 적게는 30에서 크게는 300까지 이르는 집락을 일일이 카운팅 하는 것은 비효율적인 작업이다. 그래서 개발되고 있는 것이 비전 센서(Vision sensor)를 이용한 자동 집락 계수기이다.

현재 국외에서 개발되고 있는 자동집락계수기들은 카메라로부터 페트리디쉬의 이미지를 수집하여 밝기와 선명도를 조절하고 RGB값으로 배경색과 집락에 색을 분리한 후 색이 다른 부분들의 위치를 파악하고 그 개수를 카운팅 하는 방법을 사용하고 있다.

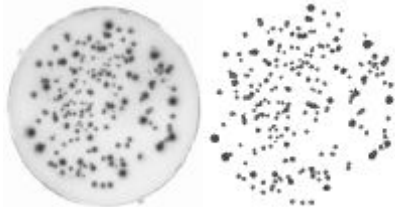


Fig.3 Existing auto colony counter image

이렇게 카운팅을 하는 과정에서 이미지를 처리하는 동안 정보의 손실이 많이 일어나게 된다. 이러한 점을 보완하기 위하여 고화질에 이미지 수집

을 필요로 하게 되고 장비의 가격 또한 올라가게 된다. 이러한 점을 보완하기 위하여 본 논문에서는 이미지처리 방식에 패턴인식 방법을 사용하였다.

패턴인식(pattern recognition)은 인지과학과 인공지능 분야에 속하는 문제 중 하나이다. 인지과학은 심리학, 컴퓨터 과학, 인공지능, 신경생물학과 언어학, 철학을 이용하여 지능과 인식의 문제를 다루는 포괄적인 학제적 과학 분야를 말한다. 이러한 패턴인식은 공학적 접근법을 이용하여 인공지능의 실제 구현 문제인 센싱된 대상을 인식하는 문제를 주로 다룬다.[4]

이러한 패턴인식의 응용분야에는 문자인식분야 생체인식과 인간행동패턴분석분야 진단시스템분야 예측 시스템분야 보안과 군사분야 등에 널리 쓰인다. 특히 문자인식분야에서 연구되고 있는 알고리즘들을 사용하면 집락을 계수하는 프로그램들에 구성이 가능하다.

문자인식분야에서 사용되고있는 패턴인식의 접근법에는 Fig.4와 같이 신경망 접근법과 통계적 접근법, 구조적 접근법 3가지가 있다. 통계적 접근법은 통계적 모델을 기반으로 하여 패턴을 분류하는 방법이다. 신경망 접근법은 패턴의 분류를 입력 패턴에 대한 처리단위로 이루어진 망의 응답과정으로 분류를 행하는 접근법이다. 이때, 패턴의 정보는 시냅스의 연결강도 가중치들로 저장된다. 신경망 접근법은 학습이 가능하고, 알고리즘적이지 않으며, 블랙박스과 같이 취급 가능하다.[5] 또한 사전지식을 최소화하고, 뉴런의 층이 충분하면 이론적으로 어떤 복잡한 결정 영역도 만들어 낼 수 있는 매우 매력적인 방법이다. 구조적 접근법은 패턴

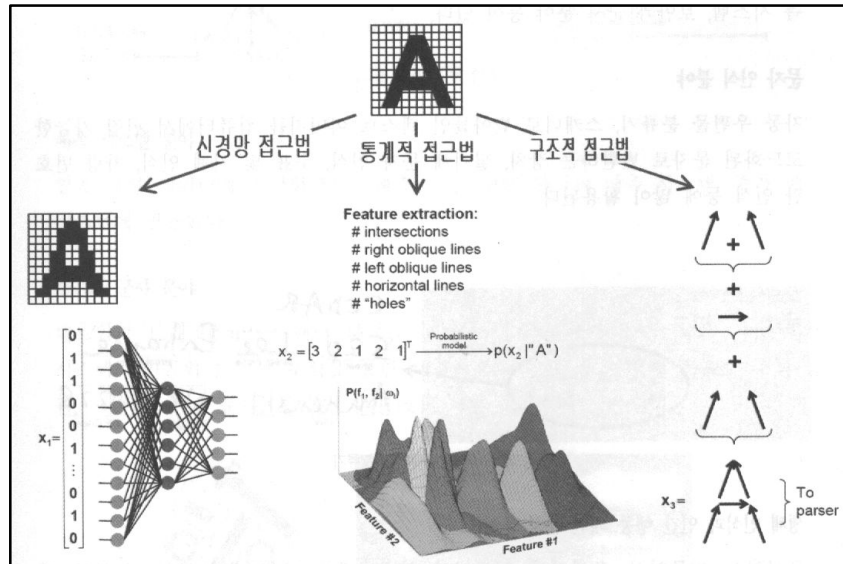


Fig.4 Approach method of pattern recognition [5]

의 구조적인 유사성을 조사하여, 이를 이용하여 분류를 행하는 방법이다. 유사한 부분패턴들로부터 구축된 복잡한 패턴들의 계층적 서술을 수식화하는 접근법이라 할 수 있다. 본 논문에서 사용한 접근법은 신경망 접근법으로 이미지를 픽셀로 받아 들여 픽셀에 정보들을 저장하고 그 정보와 같은 정보의 수를 찾아 개수로 인식하는 프로그램을 구현하였다.

3. 연구 방법

3.1 사용 DATA

카운팅에 사용된 집락 자료는 강원대학교 자연과학대학 생물학전공실험실에서 제공받았다. 대장균을 배양하여 집락이 형성된 페트리디쉬를 사용하였다. 자료를 받아 저온에서 관리하여 집락의 수를 100개 정도에서 유지시켰다. Fig.5

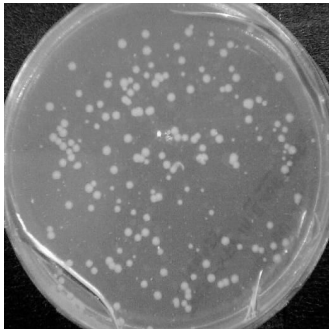


Fig.5 Coliform colony petri dish

3.2 영상수집장치구성

영상수집을 위하여 Fig.6 와 같이 웹카메라를 장착한 구조물을 제작하였다. 검은색으로 바닥을 꾸며 반대로 하얀 색으로 생성된 대장균 집락 페트리디쉬를 올려 영상을 캡춰 받는 방식을 택하였다.

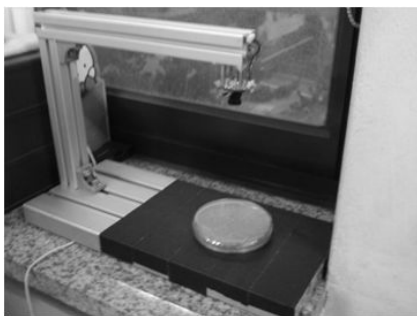


Fig.6 Auto colony counter hardware

3.3 이미지 처리

수집한 이미지를 처리하는 방법으로 NI(national instrument)사에 랩뷰(LabVIEW)라는 프로그램을 이용하여 프로세싱하였다. 화면구성을 Fig.7과 같이 구성하고 이미지 수집을 하여 디스플레이하였다.

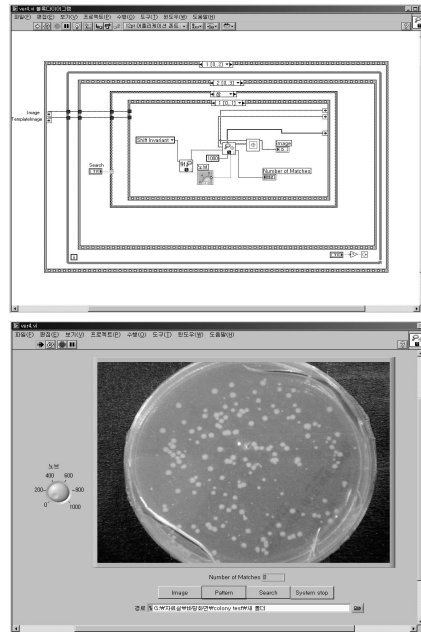


Fig.7 Auto colony counting system

Fig.7에서 이미지버튼과 패턴인식모드버튼 패턴서칭버튼과 시스템종료버튼으로 버튼들이 구성되어 있고 좌측으로는 신경망접근법에 의한 패턴의 픽셀에 정보들이 다른 정보들과에 비슷한 정도를 점수로 환산했을 때 그 정도를 임의로 설정할 수 있도록 하는 다이얼을 배치하였다.

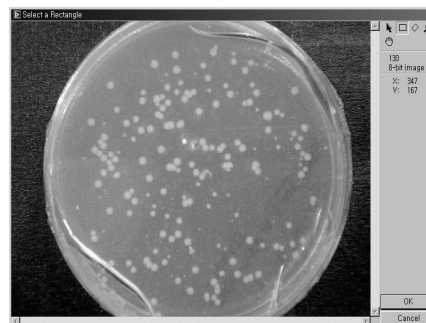
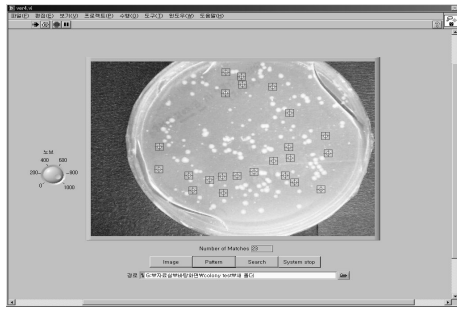


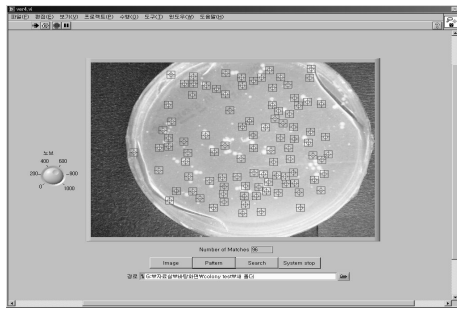
Fig. 8 Mode of pattern recognition

이미지 패턴을 설정하는 전환된 화면이다. 오른쪽 구석에 배치된 툴들을 이용하여 독립적으로 형성된 집락에 영역을 설정하여 저장한다.

그런 다음 메인모드로 돌아와서 서치버튼을 클릭하면 Fig.9과 같이 카운팅을 한다. 정보비교 점수를 높게 하면 카운팅된 개수가 줄어들고 점수가 낮으면 카운팅 개수가 늘어나는 것을 확인할 수 있다.



(a) score 980



(b) score 620



(c) score 420

Fig.9 Colony counting

이 카운터 점수를 이용하여 점수를 낮게하여 부정확 수량을 수동으로 제거하거나 점수를 높게하여 파악되지 않은 필요한 집락을 수동으로 카운팅하여 평균수치에 정보를 수집할 수 있고 적은 수의 오차에 인정이 가능한 수량과약이므로 집락이 증가하는 동안 같은 점수로 수량을 파악하게 되면

생장곡선을 작성 할 수 있다.

4. 결론

본 논문에서는 집락을 구성한 미생물을 분류하기 위해서 생장곡선을 만드는 과정에 하나 인 집락에 수를 카운팅 해주는 장비에 개발에 관하여 논하였다. 생물학적으로 집락에 수를 카운팅하여 생장곡선을 그리는 작업은 매우 중요하고 많이 수행되는 과정으로 이러한 작업을 자동으로 수행 가능하게 하여 효율성을 높이는 것은 생물학발전에 많은 도움이 될 것으로 추측된다.

그러나 본 논문에서는 단색에 대장균만을 판별하는 시스템을 구성하였으나 향후에는 컬러를 패턴에 한 부분으로 인식하여 색에 대한 정확도를 올리는 것도 필요할 것으로 고려되었다.

참 고 문 헌

- [1] 이민용 외 7명, "승용차 시트평가용 더미의 GUI 모니터링 시스템 개발", 한국자동차공학회 2007년도 추계학술대회논문집, 2007.11.
- [2] Willey, Joanne Sherwood, Linda M. Woolverton, Chris, "Prescott's Microbiology", McGraw-Hill College, pp.118~126, 2007.
- [3] Madigan, Michael T. Martinko, John, "Brock Biology Of Microorganisms And Student Companion Website Access Card", Prentice Hall, pp.144~148, 2005.
- [4] 오일석, 패턴인식(pattern recognition), 교보문고, pp.8~19, 2008.
- [5] 한학용, 패턴인식 개론:MATLAB실습을 통한 입체적 학습, 한빛미디어, pp.34~51, 2006.