

컴퓨터 시각을 이용한 배양 세균의 자동 인식 및 계수

장지홍 · 황 현 · 강국희*

성균관대학교 생물기전공학과, *성균관대학교 낙농공학과

Automatic Recognition and Counting of Cultured Bacteria Using Computer Vision

Ji-Hong Chang, Heon Hwang and Kook-Hee Kang*

Department of Bio-Mechatronic Engineering, SungKyunKwan University

*Department of Dairy Science and Technology, SungKyunKwan University

Abstract

A computer vision system which extracts and counts the cultured bacteria in a petri dish was developed. The system was composed of a B/W CCD camera, a frame grabber, an illumination device, and an IBM PC/AT compatible pentium computer. A sequence of image processing algorithms such as automatic thresholding, morphology feature segmentation, object labeling and counting was developed. A sample of cultured bacteria was compared with a sample of non-cultured bacteria to assign the threshold value automatically. There was an average of 7.8% disparity in counting because of the irregular size of petri dishes and diffraction of lighting on the surface of the glass petri dish. Morphological processings such as the image erosion and subtraction were developed to separate the overlapped colonies. The proposed morphological separation algorithm worked successfully. To precisely count the cultured bacteria, a sequence of counting algorithms were developed. Counting algorithms were performed in three steps. First, the colonies which were smaller than the specified size were counted and erased from the input image. And colonies were recognized using the 2×2 mask. Then, morphological operations were performed to separate the overlapped colonies and counting was executed. The proposed counting algorithm worked perfectly for the thresholded images.

Key words: computer vision, colony extraction, counting, cultured bacteria, automatic thresholding

서 론

농산물 및 농산물 가공품 중에 존재하는 미생물의 개체 수를 정확하게 측정하는 것은 품질 유지 및 유통 과정에서의 식품 안전성 확보라는 측면에서 매우 중요하다. 미생물의 개체 수를 측정하기 위한 방법으로는 직접 계수에 의한 방법과 간접적인 계수에 의한 방법이 있는데 대부분 균은 1μ 전후의 미세한 생물이므로 간접적인 방법에 의해 얻어지는 정보량에는 한계가 있으며 이들 각 방법들은 각기 적용상 단점을 가지고 있다.

직접 검경법(Direct Microscopic Counts: Breed 법)은 현미경으로 직접 관찰하는 방법으로 간단하고 빠른 방법이나 측정오차가 크고, 원유내의 세균수가 적을

때는 적용할 수 없으며, 또한 생균수나 사균수를 모두 측정한다는 단점이 있다(Beck와 Hehir, 1982). DEFT(Direct Epifluorescence Filter Technique)은 세균을 염색한 후 형광 현미경하에서 형광하는 것을 계수 하는 방법으로 30 분내에 SPC와 유사한 결과를 얻을 수 있으나(Pettipher 와 Rodrigues, 1982) 우유중의 균수가 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^6$ /mL 일 때 가장 적합한 방법이다. ATP Assay는 세균수의 변화에 의한 ATP의 변화량을 측정하여 간접적으로 균수를 추정하는 방법(Botha et al., 1986)으로 낮은 균수에서의 결과에 대한 해석과 정확도가 좋지 않다고 알려져 있다(Theron et al., 1988). 이외에도 Microcalorimeter 방법(Gilchrist et al., 1973), Reflectance Colorimeter 방법(Richardson et al., 1988) 등이 있으나 SPC와의 상관계수가 그리 높지 않거나, 적용상의 단점을 가지고 있는것으로 알려져 있다. 이상과 같이 세균 수를 측정하는 방법은 각각의 장단점이 있으며 현재까지는 SPC 방법에 비해 오차가 많으

Corresponding author: Heon Hwang, Dept. of Bio-Mechatronic Engineering, Sung Kyun Kwan University, Kyungki-Do, Suwon-Si, Changan-Gu, 440-746, Republic of Korea

므로 표준 방법으로는 채택되지 않고 있는 실정이다.

표준 평판배양법(standard plate count, SPC)은 미국의 경우 32°C에서 48시간, 한국의 경우는 30°C에서 72시간 동안 미생물을 배양하여 집락을 계수하는 방법으로 긴 시간을 요하기는 하지만 정확한 계수가 가능하므로 표준 방법으로 사용되고 있다. 하지만 이 방법은 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 완료해야하는 제한조건을 부합시키기가 힘들다.

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 있는데 본 연구에서는 형태학적(morphology) 기법을 적용하여 겹쳐진 형태의 세균 군집체의 경계를 자동으로 인식하고 분리하며 계수 하는 알고리즘을 개발하고 그 측정장치를 구현하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 장치

우유 중에 포함된 세균의 총수를 측정하기 위하여 원유를 무균적으로 채취하여 0.1% peptone용액에 적당한 배수로 희석한 다음 희석시료 1 mL를 취하고 SPC agar를 pour plating 방법으로 접종, 30°C에서 72시간 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.

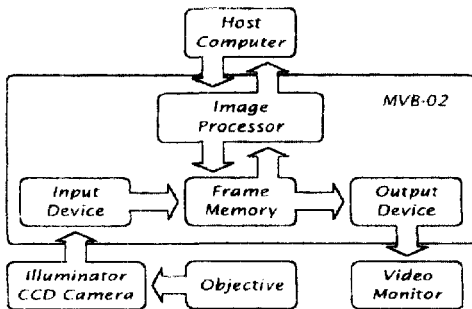


Fig. 1. Block diagram of image processing system.

영상처리 시스템은 카메라와 조명으로 구성되는 영상 입력부, 신호 입력처리부와 영상처리기, 프레임 메모리 등으로 구성되는 신호 처리부, 주 컴퓨터, 출력장치 등으로 구성되어 있다. 영상 입력장치로는 흑백 CCD 카메라에 가변초점렌즈(6~12 mm, Φ35.5)를 C-마운드로 부착하여 사용하였으며 입력영상의 품질을 좌우하는 조명은 원형 형광등을 사용하였다. RS-170 12.28 MHz의 아날로그 신호 값의 출력영상신호는 디지털 신호 값으로 변환되어 처리되는데 이와 같은 연산을 위하여 MVB-02 흑백 화상보드를 사용하였다. 이 장치는 CCD 카메라 인터페이스 모듈, A/D 변환기, 영상 데이터 기억장치, 영상 데이터 프로세서, D/A 변환기, Graphic Overlay Memory 등의 모듈들을 갖추고 있다. 이때 처리된 결과 값과 영상 출력결과는 별도의 흑백 폐쇄회로 모니터로 출력된다.

영상이치화 및 계수영역설정

이치화는 영상분할에 있어 가장 중요한 요소로서 원 영상이 갖는 다단계의 계조(intensity value)를 2단계의 계조 분포로 변환시키는 과정으로 연산시간을 단축시키고 효율적으로 대상체와 배경을 분리하기 위한 과정이다. 이치화를 위한 경계값을 산출하는 방법으로 히스토그램의 모드에 따른 분리도를 이용하는 방법(황헌 등, 1992), 단순 영상통계법(Pratt, 1991), 모멘트 보존법(Tsai, 1985), 최대 엔트로피법(Abutaleb, 1989), 그리고 배경 윈도우 확장법(Mezin, 1989) 등 여러 가지 방법이 알려져 있다. 사알레에 미생물을 배양한 경우 집락의 크기가 배지의 전체 면적에 비해 매우 작고, 유리에 의한 반사 영상과 조명의 회절 등으로 배지의 일부와 집락의 일부가 같은 계조로 나타나기도 하여 히스토그램의 분포가 단일 대상체와 배경으로 이루어진 경우와는 다르게 나타난다. 이와 같은 점

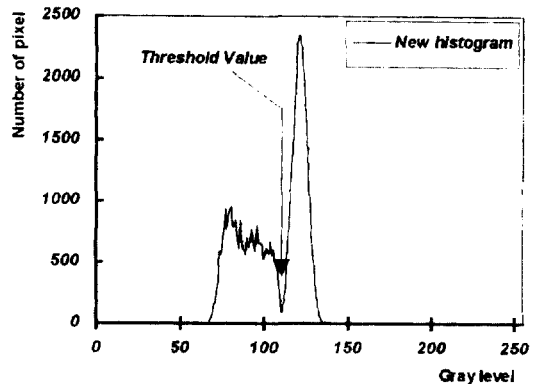


Fig. 2. New histogram after subtraction.

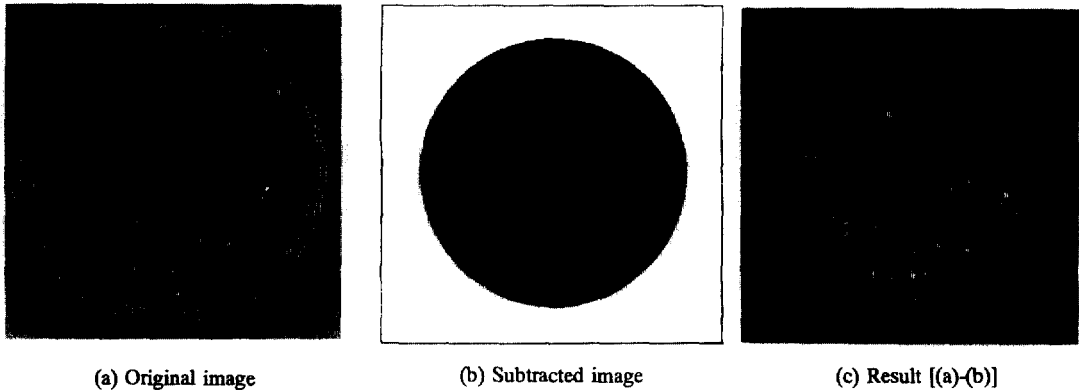


Fig. 3. Image Subtraction.

을 고려하여 본 연구에서는 다음과 같은 이치화 과정을 수행하였다.

미생물을 배양하지 않은 무균상태의 샘플을 미생물을 배양한 샘플과 동일한 과정에 의해 제작한 후 이것이 갖는 히스토그램을 구한다. 이와 더불어 미생물을 배양하여 제작한 샘플의 히스토그램을 구하여 무균 샘플의 히스토그램과 비교하여 그 차이를 얻는다. 이때 얻어진 제 3의 히스토그램에서 임의의 계조값이 갖는 총 화소수와 그 이전의 계조값이 갖는 총 화소수를 비교하였으며 이 때 사용한 조건식은 식 (1)과 같다.

$$|NP_i - NP_{i-1}| > 2 \times (NP_{i-1} - NP_{i-2}) \quad (1)$$

NP_i: Total no. of p ixel at the i_{th} gray level

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

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

f(x,y): Gray value of (x,y) i n 1st im age

g(x,y): Subtraction h(x,y) from f(x,y)

(g(x,y) < 0: g(x,y)=0)

집락 분리 및 경계검출 과정

미생물 군집체는 원 시료중의 미생물이 48~72시간 동안의 배양시간을 거쳐 증식하는 것으로 대개의 경우 원형에서 크게 벗어나지 않는 형태를 유지하고 있다. 그러나 미생물은 그 크기가 1μ 전후의 작은 생물

체이므로 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 사알레에 도말하는 과정에서 미생물은 눈에 보이지 않으므로 실험을 위한 작위적인 도말이 불가능하다. 따라서 배양 후 군집체가 겹쳐지거나 한쪽으로 몰려있는 경우도 발생하게 된다.

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 수학적 모폴러지의 도입이 필수적이라 할 수 있다. 본 실험에서는 겹쳐진 형태의 집락을 분리하기 위한 첫 번째 단계로 Fig. 4에서 보는 바와 같이 원영상에 계조값이 255인 3×3의 정방요소를 사용하여 식 (3)과 같이 정의되는 수축(erosion)과정을 수행하여 Fig. 4(c)와 같은 영상을 얻었다.

$$A \ominus B = \{x(B) \subseteq A\} \quad (3)$$

A, B: Set with components a=(a₁, a₂)

b=(b₁, b₂)

(B)_x: Translation of B by x=(x₁, x₂)

두 번째로 수축된 영상 Fig. 4(c)에서 원영상 Fig. 4(a)를 감산하여 원 영상에 대한 윤곽선 영상을 Fig. 4(d)와 같이 추출하였다. 이를 원영상과 비교하여 보면 원 영상에서 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 Fig. 4에서 보

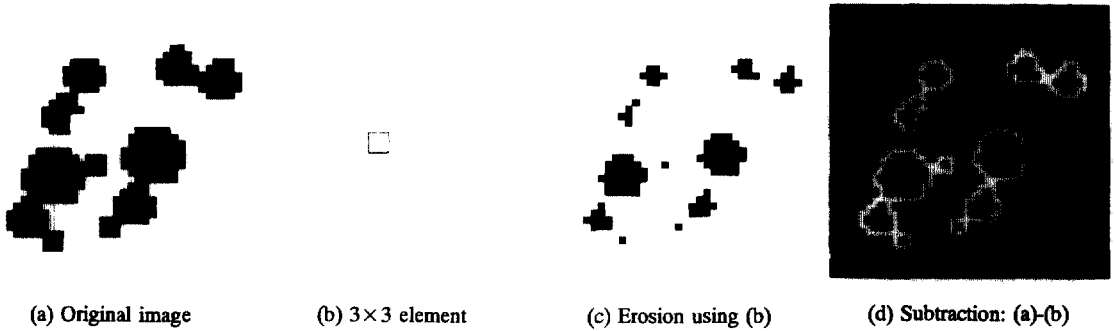


Fig. 4. Illustration of separating process.

는바와 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.

1차 계수 과정

집락 분리과정에서 사용되는 수축 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 수축을 수행하였다. 1차 계수 과정에서는 3×3 정방요소보다 작은 미생물 군집체를 계수하는데 Fig. 5와 같은 5×5 마스크를 사용하였다. 이 때 마스크 내에 미생물 군집체가 들어왔는지를 판별하는 논리 연산식은 (4)와 같다.

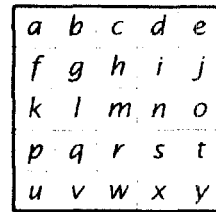


Fig. 5. 5×5 mask.

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

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 식 (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 하였다.

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

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.

2차 계수 과정

1차 계수과정 이후 수축에 의한 분리과정을 거친 미생물 군집체는 Fig. 4(c)와 같이 그 크기와 형태에 일정한 패턴이 없고 255의 배경에 둘러싸인 계조값 0의 폐곡선이라는 외형적 특징만을 가지고 있다. 이러한 미생물 군집체의 존재 여부를 검색하기 위해서 Fig. 6의 2×2 마스크와 논리 연산식 (6)을 이용하였다.

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

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 인식하고 미생물 군집체 내부의 계조값을 변환시켜주는 방법을 채택하였다. 미생물 군집체 내부에 다른 계조값을 설정해 주기 위하여 Fig. 6의 화소점 d로부터 x의 (+) 방향과 (-) 방향으로 계조값 255의 배경을 만날 때까지 탐색화소의 계조값 0을 127로 변환해주고 y의 (+) 방향으로 이동하는 방법을 사용하였다. 이와 같이 한개의 미생물에 대한 2차계수과정이 종료되

(a) Original image (b) Subtracted image (c) Result [(a)-(b)]
(a) Original image (b) 3×3 element (c) Erosion using (b) (d) Subtraction: (a)-(b)

면 다음의 목표화소로 탐색해나가는 과정을 되풀이하게 된다. 이와 같은 방법으로 이진 영상내의 미생물 군집체를 계수할 수 있다.

결과 및 고찰

영상 이치화의 정밀도

효과적인 영상 데이터를 얻는데 있어 가장 중요한 과정인 영상 이치화 과정의 정밀도를 검증하기 위해

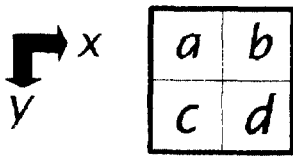


Fig. 6. 2×2 mask.

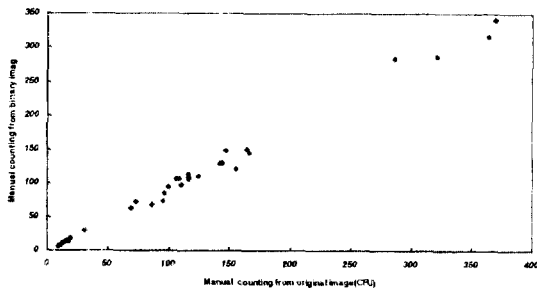


Fig. 7. Relation between original and binary images in manual counting.

원 영상에서의 실측치와 이진 영상에서의 실측치를 Table 1에서와 같이 비교해 보았다. 이 결과에 의하면 총 32개의 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.

계수 알고리즘의 정밀도

전처리 과정을 거쳐 얻어진 이진 영상에 대하여 겹쳐진 형태의 미생물 군집체를 분리하여 계수한 결과와 이진 영상에서의 실측 결과를 비교한 결과 의하면 미생물 군집체의 개수가 7개에서 342개까지 분포하는 32개의 시료에 대해 오차의 발생이 없는 것으로 나타났다.

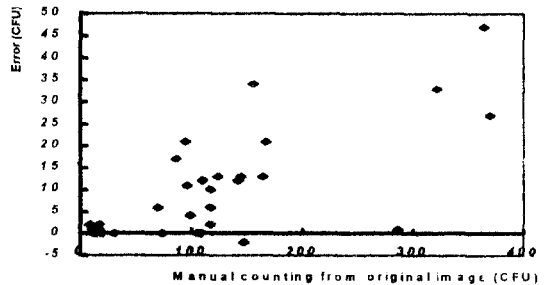


Fig. 8. Thresholding error.

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

Sample	Manual counting (8-bit image)	Manual counting (1-bit image)	Error	Error %	Sample	Manual counting (8-bit image)	Manual counting (1-bit 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

요 약

본 연구에서 개발된 배양 세균수 측정장치는 다계조(gray level) 영상을 사용하며, 시료의 공급 및 배출은 수동으로, 배양 세균의 자동 인식 및 계수는 자동으로 수행된다. 크기와 외형이 균일하지 않은 미생물 군집체를 계수하기 위한 영상처리 방법으로 영상 이치화, 영상감산, 수축, 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 사알레의 규격으로 인한 조명의 회절과 원형 형광 조명의 불균일성으로 인하여 이치화 이전의 실측치에 비해 7.8% 정도의 감소 오차가 발생하였다.

2. 미생물을 배양하는 용기로 사용되는 사알레의 규격이 일정하지 않아 규격화된 측정범위를 설정해주기 위하여 원 영상과 규격 영상간의 감산을 수행하였다. 규격영상의 외부에서 관찰되는 군집 개체는 영상 감산 과정에서 제거되므로 계수과정에서는 측정 대상에서 제외되었다.

3. 미생물 군집체의 정밀한 계수를 위해서는 겹쳐진 형태의 미생물 군집체를 분리해 주어야 하는데 이를 위해 수축과 영상감산에 의한 형태학적 분리 알고리즘을 사용하였다. 본 연구에 사용된 시료중의 겹쳐진 군집체에 대해 형태학적 분리 알고리즘을 적용해본 결과 겹쳐진 갯수와는 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 추출하여 해당 군집체가 갖는 제조값을 변환하여 계수하는 방법을 채택하였다. 이와같은 방법에 의한 계수과정에서 오차의 발생은 없는 것으로 나타났다.

문 헌

노상하, 이종환, 이승훈. 1992. 흑색영상처리장치를 이용한 과실선별기 개발에 관한 연구(I)-크기 및 색택 판정. 한국농업기계학회 17(4): 354-363.

- 이충호. 1995. 컴퓨터 시각에 의한 건표고의 외관 검색 및 자동 선별시스템 개발, 성균관대학교 농업기계공학과 박사학위 논문.
- 황헌, 이충호. 1992. 컴퓨터 시각에 의거한 측정기술 및 측정오차의 분석과 보정. 한국농업기계학회지 17(1): 65-78.
- Abutaleb, A.S. 1989. Automatic thresholding of gray level pictures using two dimensional entropy. *J. of Computer Vision, Graphics and Image Processing* 47: 22-32.
- Beck, C. G. and A. F. Hehir. 1982. The rapid fluorescence method for counting bacteria in milk. *Aust. J. Dairy Technol.* 37: 66-72.
- Botha, W. C., H. Luck and P. J. Jooste. 1986. Determination of bacterial ATP in milk the influence of adenosin triphosphate hydrolyzing enzyme from somatic cells and Ps. fluorescence. *J. Food Prot.* 49: 822-827.
- Davis, L. S. 1975. Survey of edge detection techniques. *J. of Computer Graphics and Image Processing* 6: 492-501.
- Gilchrist, J. E., J. E. Campbell, C. B. Donnelly, J. T. Peeler and J. M. Delaney. 1973. Spiral plate method for bacterial determination. *Appl. Microbiol.* 25: 244-249.
- Gonzalez, R. C. and R. E. Woods. 1993. *Digital Image Processing*. Addison-Wesley Publishing Company, USA.
- Hwang, H., C. H. Lee and Y. K. Lee. 1993. Automatic visual feature extraction and measurement of mushroom (*Lentinus Edodes L.*). *Proceedings of International Conference on Agricultural Machinery and Process Engineering(ICAMPE)*, 1993, pp1232-1243.
- Mezin, M. 1989. Image acquisition with thresholding. 제1차 한불 기술협력 컴퓨터비전 세미나 자료집.
- Pavlidis, T. 1978. A review of algorithm for shape analysis. *J. of Computer Graphics and Image Processing* 7: 243-258.
- Pettipher, G. L. and U. M. Rodrigues. 1982. Semi-automated counting of bacteria and somatic cells in milk using epifluorescence microscopy and television imaging analysis. *J. Appl. Bacteriol.* 36: 820-822.
- Pratt, W. K. 1991. *Digital Image Processing*. John Wiley & Sons Inc., USA.
- Richardson, G. H., R. Grapin and T. C. Yuan. 1988. A reflectance colorimeter instrument for measurement of microbial and enzymatic activities in milk and dairy products. *J. Food Prot.* 51: 778-785.
- Tamar, P. and M. David. 1982. A study of edge detection algorithm. *Computer Graphics and Image Processing* 20: 1-21.
- Theron, D. P., B. A. Prior and P. M. Lategan. 1986. Sensitivity and precision of bioluminescent techniques for enumeration of bacteria in skim milk. *J. Food Prot.* 49: 8-17.
- Tsai, W.H. 1985. Moment Preserving thresholding: a new approach. *J. of Computer Vision, Graphics and Image Processing* 29: 377-392.