

# Digitale Bildverarbeitung zur Beurteilung von biotechnologischen Prozessen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation  
von

Daniel Marquard, M. Sc.  
geboren am 12.12.1988 in Hannover

2017

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Koreferent: Prof. Dr. Bernd Hitzmann

Tag der Promotion: 24.11.2017

## Danksagung

Ich danke **Prof. Thomas Scheper** für die Möglichkeit zur Promotion am TCI und das entgegengebrachte Vertrauen. Insbesondere für die Auslandserfahrung und die große Freiheit bei der Ausgestaltung meines Themas. Bei **Prof. Bernd Hitzmann** bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats und bei **PD Dr. Ulrich Krings** für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

**Dr. Patrick Linder** möchte ich für die herausragende Betreuung während meiner Zeit am TCI danken. Du hattest immer ein offenes Ohr für mich und den richtigen Denkanstoß parat. Auch die Abende beim Brettspiele zocken und die gemeinsamen Dienstreisen waren großartig.

**Dr. Jürgen Koch** vom Laserzentrum Hannover e.v. danke ich für die Lasergravur meiner Saphirglasscheiben und die unkomplizierte Zusammenarbeit.

**Thorleife Hentrop** und **Kai Patzer** danke ich dafür, dass sie jedes elektronische Problem aus dem Weg geräumt haben. Ebenso möchte ich **Thorsten Stempel** und **Friedbert Gellermann** für den Bau und das Dichten allerhand mechanischer Teile und für das eine oder andere Stück Lebensweisheit danken.

Ich danke meinen Kollegen aus dem Büro 262 für die gute Arbeitsatmosphäre und die großartige gemeinsame Zeit. **Marcel von der Haar** und **Christian Lüder** aus dem „Team Bioinformatik“ danke ich für die vielen Stunden des codens und die vielen guten Ideen die dabei entstanden sind. Ein besonderer Dank geht an **Caroline Schneider-Barthold** für die vielen gemeinsamen Stunden am Reaktor und für ihre Geduld bei der Korrektur meiner Texte. Bei **allen Kollegen** des TCI möchte ich mich für die super Zeit bedanken, in der ich viel lernen durfte und immer sehr viel Spaß hatte.

**Ronja Reiners** möchte ich für ihren Rückhalt und ihre grenzenlose Geduld, besonders in der finalen Phase und beim Schreiben dieser Arbeit danken.

**Meinen Eltern** möchte ich ganz besonders danken für ihre immer währende Unterstützung während der Schulzeit, im Studium und auch in der Promotion. Ohne euren stetigen Glauben an mich wäre ich niemals soweit gekommen.

## Kurzfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt den Einsatz von Digitaler Bildverarbeitung zur Beurteilung von biotechnologischen Prozessen. Dabei liegt der Fokus auf dem Einsatz von Bildverarbeitungsalgorithmen für die Zelldichtebestimmung und Charakterisierung von Kultivierungsprozessen.

Zu Beginn wird ein Überblick über die verschiedenen Anwendungsbereiche der Bildverarbeitung in der Biotechnologie geben. Im Anschluss werden grundlegende Konzepte der digitalen Bildverarbeitung eingeführt und erklärt, gefolgt von einer kurzen Darstellung des verwendeten In-situ-Mikroskops (ISM).

Die nächsten drei Kapitel beschäftigen sich mit der In-situ-Mikroskopie. Dabei werden verschiedene Bildverarbeitungsalgorithmen vorgestellt, die es erlauben anhand von ISM-Bildern die Zelldichte in Hochzelldichtekultivierungen von *P. pastoris* und *E. coli* zu bestimmen. Dabei wurden Luftblasen in der Messzone als starke Störfaktoren erkannt und Konzepte zum Umgang mit diesen entwickelt. Als kritische Größe für die Reproduzierbarkeit der ISM Messungen konnte die Messzonenhöhe identifiziert werden. Das manuelle Einstellen der Messzonenhöhe ist ein schwieriges Verfahren, das zeitaufwendig ist und viel Erfahrung benötigt. Um diese kritische Größe verlässlich einstellen zu können, wurde ein automatisiertes Verfahren entwickelt, welches die Messzonenhöhe ohne zutun des Anwenders auf die richtige Höhe verfährt.

Des Weiteren wurde ein Bildverarbeitungsalgorithmus entwickelt, welcher es ermöglicht, die Mischzeiten von Lösungen anhand von Hochgeschwindigkeitsaufnahmen zu ermitteln. Dieser wurde zur Auswertung von Mischzeitexperimenten von 3D-gedruckten Mischkammern auf Schüttelplatten angewendet.

Im letzten Abschnitt dieser Arbeit wird ein Bildverarbeitungsalgorithmus vorgestellt, welcher koloniebildende Einheiten auf Bildern von Agarplatten zählt, welche mit dem Smartphone oder mit Smartglasses freihändig aufgenommen wurden. Der Algorithmus erkennt die Agarplatte auf dem Bild und zählt dann sowohl Einzelkolonien als auch Kolonien in Clustern. Dabei funktioniert der Algorithmus vollautomatisch und der Nutzer muss keine Einstellungen vornehmen.

**Schlagwörter:** Bildverarbeitung, In-situ-Mikroskopie, Bioprozessüberwachung, Zellkultivierung

## Abstract

The application of digital image processing to evaluate biotechnological processes is described in this thesis, with a main focus on image processing algorithms. These allow determination of cell densities and characterization of cultivation processes.

First, the application of image processing algorithms in biotechnology is reviewed. Subsequently, a short introduction to the principle of image processing and the used in situ microscope (ISM) is given.

The following chapters focus on in situ microscopy. Several image processing algorithms were developed to determine the cell density from ISM images of *P. pastoris* and *E. coli* high cell density cultivations. It was recognized that air bubbles have a major impact on the algorithm results, and a suitable solution to resolve this problem was introduced. The height of the ISM measurement zone was identified as a crucial factor for reproducible measurements. Since manual adjustment of the measurement zone is a time consuming and difficult procedure, a procedure to adjust the height automatically was developed.

In the next section, the development of an image processing algorithm is described, which determines the mixing time of solutions by using high speed camera images. The algorithm was applied to images of mixing time experiments of 3D-printed mixing chambers on shaking plates.

In the final section, an image processing algorithm for counting of colony-forming units in images of agar plates is described. The images were acquired by using smartphones or smart glasses without any additional stabilization systems. The algorithm is able to recognize the agar plate in the image, and to count both single colonies and colonies within clusters. The algorithm works fully automatically, and no adjustments from the user are required.

**Keywords:** Image processing, in situ microscopy, bioprocess monitoring, cell cultivation

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>Theorie</b>	<b>12</b>
3.1	Bildverarbeitung in der Biotechnologie . . . . .	12
3.2	Grundlagen der digitalen Bildverarbeitung . . . . .	17
3.2.1	Digitalbilder . . . . .	17
3.2.2	Kantendetektion . . . . .	18
3.2.3	Binarisierungsverfahren . . . . .	20
3.2.4	Objekte und Objekterkennung . . . . .	22
3.3	In-situ-Mikroskop-TT . . . . .	24
<b>4</b>	<b>In-situ-Mikroskopie zur Zelldichtebestimmung in <i>P.-pastoris</i>-Kultivierungen</b>	<b>27</b>
4.1	Algorithmen . . . . .	28
4.1.1	Cluster Recognition Algorithm (CRA) . . . . .	28
4.1.2	Pichia Counter Algorithm (PCA) . . . . .	29
4.2	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	30
4.2.1	Kultivierungen K1-K3 . . . . .	31
4.2.2	Kultivierungen K4-K5 . . . . .	36
4.2.3	Kultivierungen K6-K8 . . . . .	39
4.2.4	Kombinierter Algorithmus . . . . .	42
4.3	Fazit . . . . .	44
<b>5</b>	<b>Hochzelldichtemessungen in <i>E.-coli</i>-Kultivierungen mittels In-situ-Mikroskopie</b>	<b>46</b>
5.1	Algorithmus . . . . .	47
5.2	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	48
5.3	Fazit . . . . .	53
<b>6</b>	<b>Automatisierte Bestimmung der Messzonenhöhe beim In-situ-Mikroskop-TT</b>	<b>55</b>
6.1	Messkonzept und Algorithmus . . . . .	55
6.1.1	Algorithmus . . . . .	57

6.2	Validierung . . . . .	58
6.3	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	59
6.4	Fazit . . . . .	63
<b>7</b>	<b>Entwicklung eines Algorithmus zur Mischzeitbestimmung</b>	<b>64</b>
7.1	Algorithmus . . . . .	65
7.2	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	67
7.3	Fazit . . . . .	72
<b>8</b>	<b>Automatisiertes Zählen von Bakterienkolonien auf Agarplatten mit Handheld Devices</b>	<b>73</b>
8.1	Algorithmus . . . . .	74
8.2	Bildaufnahme und Validierung . . . . .	80
8.3	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	81
8.3.1	Validierung . . . . .	81
8.3.2	Optimierungsansätze . . . . .	83
8.3.3	Weitere Anwendungen . . . . .	86
8.4	Fazit . . . . .	88
<b>9</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>90</b>
<b>A</b>	<b>Anhang: Material und Methoden</b>	<b>97</b>
A.1	In-situ-Mikroskopie zur Zelldichtebestimmung in <i>P.-pastoris</i> -Kultivierungen .	97
A.2	Hochzelldichtemessungen in <i>E.-coli</i> -Kultivierungen mittels In-situ-Mikroskopie	101
A.3	Automatisierte Bestimmung der Messzonenhöhe beim In-situ-Mikroskop-TT	104
A.4	Entwicklung eines Algorithmus zur Mischzeitbestimmung . . . . .	105
A.5	Automatisiertes Zählen von Bakterienkolonien auf Agarplatten mit Handheld Devices . . . . .	108
<b>B</b>	<b>Anhang: Zusätzliche Informationen</b>	<b>110</b>
B.1	In-situ-Mikroskopie zur Zelldichtebestimmung in <i>P.-pastoris</i> -Kultivierungen .	110
B.1.1	Bubble Analyzer . . . . .	110
B.1.2	Daten des Turbidity Algorithm (TA) für <i>P. pastoris</i> -Kultivierungen . .	114
B.2	Hochzelldichtemessungen in <i>E.-coli</i> -Kultivierungen mittels In-situ-Mikroskopie	115
B.3	Automatisierte Bestimmung der Messzonenhöhe beim In-situ-Mikroskop-TT	115
B.4	Entwicklung eines Algorithmus zur Mischzeitbestimmung . . . . .	116
B.5	Automatisiertes Zählen von Bakterienkolonien auf Agarplatten mit Handheld Devices . . . . .	118
	<b>Verzeichnisse</b>	<b>119</b>
	Abkürzungsverzeichnis . . . . .	119

Abbildungsverzeichnis . . . . .	120
Tabellenverzeichnis . . . . .	127
Literaturverzeichnis . . . . .	130
Online Quellen . . . . .	135
Liste der an dieser Arbeit beteiligten Personen und Institutionen . . . . .	136
<b>Curriculum Vitae</b>	<b>137</b>
Publikationsliste . . . . .	138

# 1 Einleitung

Im Jahr 2015 konnten beim Landeskriminalamt München 45 Verbrechen dank des Einsatzes von Bildverarbeitungs-Algorithmen zur Gesichtserkennung aufgeklärt werden. Die Täter konnten hierbei anhand von Smartphone- und Überwachungskameraaufnahmen identifiziert werden. Die Gesichtserkennung gilt schon heute, neben dem Fingerabdruck und der DNA, als drittes Standbein der Kriminaltechnik ([sueddeutsche.de](http://sueddeutsche.de)).

Die Bildverarbeitung ist ein Teilgebiet der Informatik, das Algorithmen nutzt, mit denen digitale Bilder modifiziert und interpretiert werden können. In Zukunft werden in immer mehr Bereichen des alltäglichen Lebens Bildverarbeitungs-Algorithmen zum Einsatz kommen. Ein Beispiel hierfür ist die Erkennung und Interpretation von Straßenschildern und Verkehrshindernissen bei autonom fahrenden Autos. Aber auch schon heute werden Bildverarbeitungs-Algorithmen in vielen Bereichen eingesetzt. In der Autoindustrie werden Bauteile mit Hilfe von Kamerasystemen und Bildverarbeitungs-Algorithmen auf Schäden und Unregelmäßigkeiten untersucht. Bei der Kontrolle der Reinigung von Mehrwegflaschen werden Bildverarbeitungs-Algorithmen eingesetzt, um die verbleibende Stabilität der Flaschen zu beurteilen und Fremdkörper in Flaschen zu erkennen. Auch in der Medizin werden Ärzte bei der Auswertung von pathologischen Schnitten und MRT-Aufnahmen von Bildverarbeitungs-Algorithmen unterstützt, die sie auf Unregelmäßigkeiten in den Bilddaten aufmerksam machen.

Auch für die Entwicklungen in der Biotechnologie werden Bildverarbeitungs-Algorithmen immer wichtiger. Die Biotechnologie gilt als eine der Schlüsseltechnologien, um die kommenden Herausforderungen des 21. Jahrhunderts zu bewältigen. Sei es bei der Herstellung von Lebensmitteln für eine immer weiter wachsende Weltbevölkerung, Gewinnung von chemisch komplexen Pharmazeutika oder der Energiespeicherung in Form von Biotreibstoffen ([acatech.de](http://acatech.de)).

Damit diese biotechnologischen Verfahren effektiv nutzen werden können, ist es von entscheidender Bedeutung, verwendete Organismen und Vorgänge im Detail zu verstehen. Kaum ein anderes Verfahren hat einen so großen Erkenntnisgewinn in der Biologie ermöglicht wie die Mikroskopie. Die ersten Licht-Mikroskope wurden Ende des 16. Jahrhunderts

gebaut. Diese Mikroskope ermöglichten eine Vergrößerung um den Faktor 10 und wurden zur Erforschung von Insekten eingesetzt. Im Laufe der Zeit wurden immer höhere Vergrößerungen erzielt und ermöglichten damit neue Erkenntnisse, wie die Entdeckung der Bakterien 1676 durch Antoni van Leeuwenhoek oder die Entdeckung der Brownschen Molekularbewegung 1827 durch Robert Brown.

Diese Entwicklungen halten bis heute an und bringen immer neue Mikroskopietechniken hervor, die sogar unterhalb der von Ernst Abbe formulierten Auflösungsgrenze von  $0,2\ \mu\text{m}$  Beobachtungen ermöglichen. Besonders in den letzten 20 Jahren konnten große Fortschritte im Bereich der optischen bildgebenden Verfahren erzielt werden. Diese neuen Verfahren, wie z. B. die 3D-SIM-Mikroskopie oder die 4Pi-Mikroskopie, ermöglichen das Beobachten von hoch komplexen biologischen Vorgängen an lebenden Organismen mit einer Auflösung unterhalb von  $0,2\ \mu\text{m}$ . Viele dieser neuen, oft multidimensionalen, bildgebenden Verfahren beruhen auf einer Kombination aus optischer Bildgebung und Bildverarbeitungsalgorithmen. Dabei werden mehrere Bilder aufgenommen und mithilfe eines Bildverarbeitungsalgorithmus zu einem Bild zusammengefügt. Hierbei sind die Bildverarbeitungsalgorithmen in vielen Fällen mindestens genau so wichtig, wie die optischen Verfahren. Dies gilt nicht nur bei den Bildaufnahmen, sondern vor allem auch beim Visualisieren und beim Interpretieren der gewonnenen Bilddaten (Eliceiri *et al.* 2012).

## 2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist es neue Bildverarbeitungsalgorithmen für die Beobachtung, Charakterisierung und Optimierung von biotechnologischen Prozessen und Verfahren zu entwickeln.

Der Fokus lag hierbei auf Kultivierungsprozessen. Deshalb sollten neue Bildverarbeitungskonzepte entwickelt werden, die es ermöglichen mittels In-situ-Mikroskopie Zelldichten in Kultivierungen von *P. pastoris* und *E. coli* bis in den Hochzelldichtebereich zu bestimmen. Die entwickelten Algorithmen sollten dann anhand von Reaktorkultivierungen validiert und Limitierungen ermittelt werden. Des weiteren war ein Verfahren zu entwickelt, welches automatisch die Messzonehöhe des verwendeten In-situ-Mikroskopes ermittelt.

Für die Charakterisierung von 3D-gedruckten Mischkammern sollte ein Konzept entwickelt werden, welches die Auswertung von Mischzeitexperimenten ermöglicht. Dafür sollte ein Bildverarbeitungsalgorithmus programmiert werden, der Aufnahmen einer Geschwindigkeitskamera von den Mischzeitexperimenten auswertet.

Bei der Entwicklung einer App zur Bestimmung der Anzahl von Bakterienkolonien auf Agarplatten sollte ein Bildverarbeitungsalgorithmus entwickelt werden, welcher freihändig aufgenommene Smartphonebilder von Agarplatten auswertet. Ziel war es dabei, dass der Algorithmus zuerst die Agarplatte im Bild erkennt und dann die Kolonien auf der Platte zählt.

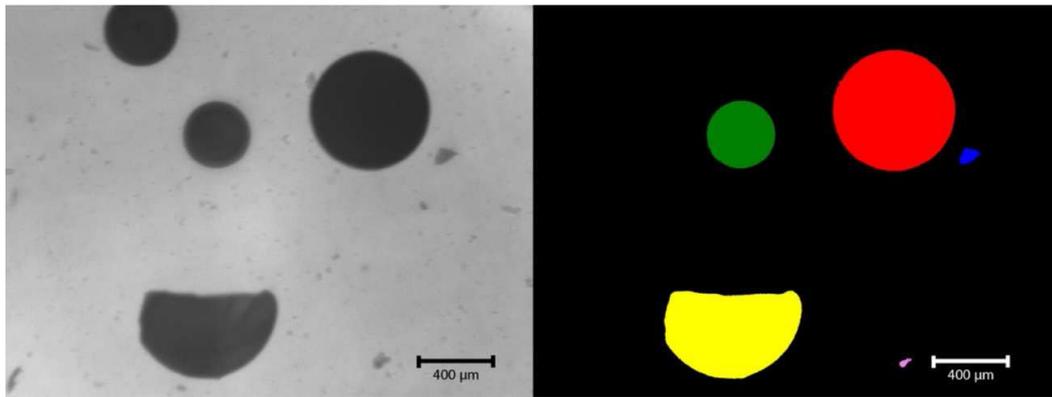
## 3 Theorie

### 3.1 Bildverarbeitung in der Biotechnologie

In den Biowissenschaften sind die Mikroskopie und andere bildgebende Verfahren mit die wichtigsten Techniken um Prozesse in biologischen Systemen zu untersuchen. Dabei werden immer neue Techniken entwickelt die immer bessere, aber komplexere Bilddaten erzeugen. Für die Auswertung solcher Daten kommen Bildverarbeitungsalgorithmen zum Einsatz die es erlauben komplexe Experimente auszuwerten und große Mengen an Bilder zu analysieren (Eliceiri *et al.* 2012). Durch die fortschreitende Laborautomatisierung werden gerade bei der Suche nach neuen Wirkstoffen oder bei der Untersuchung von zellbiologischen Vorgängen Hochdurchsatzverfahren angewandt. Dabei erfolgt die Kultivierung und Untersuchung der Zellen in vielen Fällen vollautomatisch durch den Pipettierroboter und automatische Mikroskope. Die Auswertung der Bilder erfolgt durch zuvor entwickelte Bildverarbeitungsalgorithmen und wäre von Hand nicht zu leisten (Shariff *et al.* 2010).

Ein anderes Beispiel bei dem sehr viele Bilder in kurzer Zeit ausgewertet werden müssen ist die In-situ-Mikroskopie in der Bioprozesstechnik. Bei diesem Verfahren wird das In-situ-Mikroskop (ISM) direkt in einem Prozess installiert und nimmt dort Bilder auf. Bei normalen ISM-Experimenten werden mehrere hundert Bilder pro Messpunkt aufgenommen. Da keine Verdünnungen durchgeführt werden können, dies hat zur Folge, dass bei hohen Zelldichten Bilder mit mehreren 1000 Zellen auftreten können, was den Einsatz von Bildverarbeitungsalgorithmen unverzichtbar macht (Marquard *et al.* 2016).

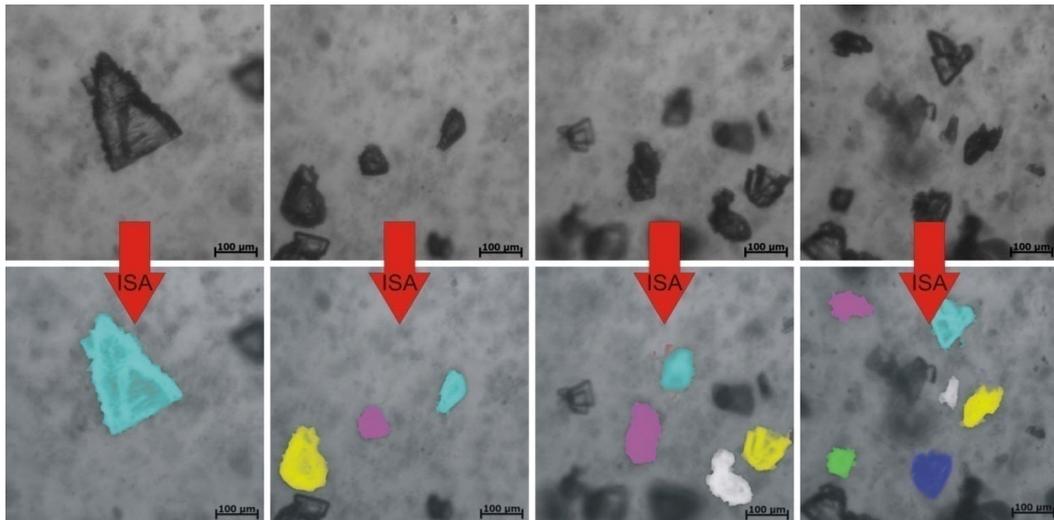
Die Kombination aus Bildverarbeitungsalgorithmen und In-situ-Mikroskopie bietet ein weites Anwendungsfeld. Prediger *et al.* (2011) untersuchten die mechanische Stabilität und die Größenverteilung von kugelförmigen Enzymträgern mit dem ISM (Abbildung 3.1). Der verwendete Bildverarbeitungsalgorithmus bestimmt anhand der Fläche, die die Enzymträger auf dem Bild einnehmen, die Größe. Die Rundheit der Enzymträger auf dem Bild entscheidet, ob es sich um einen intakten Enzymträger oder um ein Bruchstück handelt. Rudolph *et al.* (2007) überwachten den Bedeckungsgrad von Microcarrier in Fibroblasten-Kultivierungen. Hierbei werden im ersten Schritt die Partikel auf den Bildern über eine



**Abbildung 3.1** ISM-Bilder von Lewatit-Partikeln (links) und Ergebnisbild nach der Auswertung mit dem Bildverarbeitungsalgorithmus *ParticleAnalyzer*. Aus dem Bild wurden zwei intakte Partikel und drei Partikelbruchstücke erkannt (Prediger, 2013).

Kantenerkennung identifiziert. Im Anschluss werden Histogramminformationen der Partikelpixel mit zuvor trainierten Neuronalen Netzen ausgewertet, um den Bedeckungsgrad der Microcarrier zu bestimmen. Eine weitere Anwendung ist die Überwachung des Kristallwachstums in Kristallisationsprozessen (Bluma *et al.* 2009). Hierbei werden die Kristalle auf den ISM-Bildern durch Verwendung des Sobel-Operators hervorgehoben, gefolgt von einem Binarisierungsschritt und einer Objekterkennung (Abbildung 3.2). Anhand der Objektgröße kann nun die Größe der beobachteten Kristalle berechnet werden. Bei der Überwachung von Hydrolyseprozessen von Cellulose wird ein sehr ähnlicher Algorithmus eingesetzt (Opitz *et al.* 2013). Im ersten Schritt, wird ein Medianfilter auf die Bilder angewendet. Dann wird eine Binarisierung der Bilder durchgeführt und im nächsten Schritt eine Objekterkennung. Die Größe der Cellulosefasern kann anhand der Objektgröße berechnet werden.

Ein wichtiges Verfahren um den Einfluss von Substanzen auf die Wundheilung zu untersuchen sind Wundheilungsassays. Für diese Assays wird eine Oberfläche verwendet, die mit adhären Zellen konfluent bewachsen ist. Ein Teil der Zellen auf der Oberfläche werden entfernt, dies simuliert die Verletzung. Das Entfernen kann z. B. durch Abkratzen der Zellen mit einer Pipettenspitze oder durch Verbrennen der Zellen mit einem Laser erzeugt werden (Stamm *et al.* 2016). Im Anschluss wird beobachtet wie schnell die Zellen wieder eine konfluente Oberfläche bilden. Diese Auswertungen werden anhand von Mikroskopaufnahmen und Bildverarbeitungsalgorithmen durchgeführt. Matsubayashi *et al.* 2011 fügten ihren Zellen eine längliche Verletzung zu und nutzten ein Phasenkontrastmikroskop zur Beobachtung des Heilungsprozesses. Die Bildaufnahme erfolgte im Abstand von 15 min. Für die Auswertung der Bilder wurde die „White-Wave-Methode“ entwickelt, bei dieser werden die Bilder im ersten Schritt binarisiert. Im Anschluss wurde für jede Bildzeile parallel zur Verletzung die Summe aller weißen Pixel in dieser Zeile bestimmt. Hierbei zeigt sich, dass die meisten weißen Pixel an der Kante zur Verletzung sind. Je weiter die Bildzeile von der

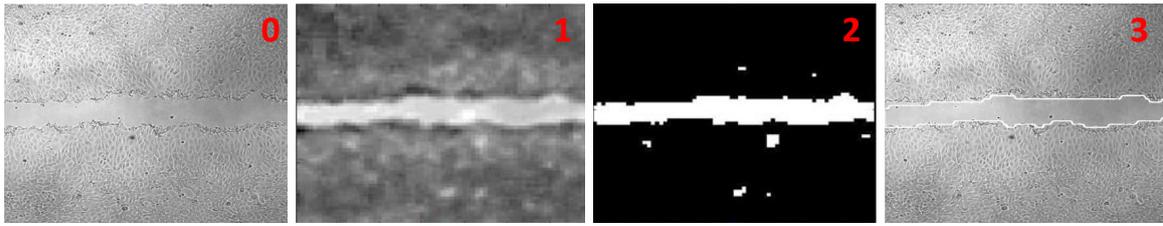


**Abbildung 3.2** ISM-Bilder von Lactose-Kristallen und Auswertung der Bilder mit einem Bildverarbeitungsalgorithmus. Die erkannten Kristalle sind farbig dargestellt. Kristalle die den Rand berühren werden ignoriert (Bluma, 2009).

Wundkante entfernt ist, desto weniger weiße Pixel sind vorhanden. Mit dieser Methode kann so die Verschiebung der Wundkante beim Heilungsprozess verfolgt werden.

Zordan *et al.* 2011 nutzten einen Laserpuls, um eine rundliche Verletzung bei ihren Zellen zu erzeugen. Der Heilungsprozess wurde im Anschluss mit einem Durchlicht-Hellfeld-Mikroskop beobachtet. Um den Bildbereich der Verletzung zu erkennen wurde ein Entropiefilter verwendet. Im Bildbereich der Verletzung sind nur noch wenig Zellen vorhanden, daher ist die Entropie der Bildpixel niedrig und der verwendete Filter verdunkelt den Bildbereich. Anhand der Veränderung des dunklen Bereiches auf den Bildern kann die Wundheilung verfolgt werden. Zaritsky *et al.* (2011) nutzen einen Klassifizierungsansatz um den Heilungsprozess auf den Bildern zu verfolgen. Dafür wurden die Bilder in  $20 \times 20$  Pixel große Felder unterteilt und manuell ausgewertet. Mit diesen Daten wurde eine Support Vector Machine trainiert. Mit dieser konnten nach dem Training bewachsene Bildbereiche von zellfreien Bereichen unterschieden werden (Abbildung 3.3). Eine Übersicht mit weiteren Verfahren zur Analyse von Wundheilungsassays mit Bildverarbeitungsalgorithmen ist bei Stamm *et al.* (2016) zu finden.

Handheld Devices wie Smartphones, Tablets oder Smartglasses finden immer häufiger einen Einsatz in biotechnologischen Laboren. Hierbei werden sie zum Anzeigen von Versuchsvorschriften oder zur Dokumentation und Visualisierung von Daten verwendet (Gan und Poon, 2016). Immer öfter sind Handheld Devices auch direkt in die Experimente involviert oder werden zur Auswertung verwendet. Die Aufnahme der Daten erfolgt dabei im Allgemeinen über die Kamera und wird im Anschluss mit einem Bildverarbeitungsalgorithmus analysiert.



**Abbildung 3.3** Wundheilungsassay mit DA3-Zellen. (0) Mikroskopaufnahme der verletzten Zellen. (1) Durchführung der Klassifizierung der  $20 \times 20$  Pixel großen Abschnitte. Je heller die Bildbereiche, desto wahrscheinlicher handelt es sich um zellfreie Bereiche. (2) Binärbild des klassifizierten Bildes. (3) Ergebnisbild: Der weiß umrandete Bereich in der Mitte des Bildes wurde als verletzter Bereich erkannt. Modifiziert nach Zaritsky *et al.* (2011).

Die densitometrische Analyse von Protein- und DNA-Gelbildern ist ein weitverbreitetes Verfahren zur Bestimmung der Konzentration der einzelnen Banden. Dabei wird die Konzentration anhand der Intensität bzw. Helligkeit der jeweiligen Bande im Vergleich zu einer Standardreihe bestimmt. Sim *et al.* (2015) ermöglichten diese Analyse direkt mit dem Smartphone durchzuführen und entwickelten dafür die „GelApp“. Bei dieser App wird ein Bild mit dem Smartphone aufgenommen und direkt ausgewertet. Die Gelbanden werden dabei durch ein Segmentierungsverfahren unter Verwendung des Gaborfilters erkannt und ihre Intensität bestimmt.

Die Messung einer Chlorophyllkonzentration ist eine weitverbreitete Methode um den Gesundheitszustand der Pflanze zu bewerten. Cortazar *et al.* (2015) entwickelten ein Verfahren um die Chlorophyllkonzentration mit Smartglasses zu bestimmen. Dafür wurde das zu untersuchende Blatt erst mit weißem Licht und dann mit rotem Licht bestrahlt. Bei jeder Beleuchtung wurde ein Bild aufgenommen. Beide Bilder wurden dann mit einem Bildverarbeitungsalgorithmus ausgewertet und die Chlorophyllkonzentration des Blattes von Kalibrationskurven berechnet.

In den letzten Jahren wurden immer mehr Bioassays entwickelt, welche direkt mit Handheld Devices gemessen und ausgewertet wurden. Dadurch können diese Assays quasi überall und bei einfacher Handhabung, auch von jeder beliebigen Person durchgeführt werden. Ein Beispiel hierfür ist das Messen von Biomarkern in Milch durch ein Smartphone Bioassay (Abbildung 3.4). Das Bioassay basiert auf einem Microarray-Fluoreszenz-Immunoassay, dieses wird über die Smartphone-Kamera ausgelesen. Im Anschluss erfolgt die Auswertung durch einen Bildverarbeitungsalgorithmus, anhand der Intensität der jeweiligen Bereiche (Coskun *et al.* 2013).

Neben dem Einsatz im akademischen Bereich werden Bildverarbeitungsalgorithmen auch in kommerziellen Systemen genutzt. Das *ProtoCOL3* wurde entwickelt um Kolonien auf Agarplatten zu erkennen und zu zählen. Dafür wird die Agarplatte in das *ProtoCOL3* gestellt, dann wird ein Bild unter definierten Bedingungen vom System aufgenommen. Die

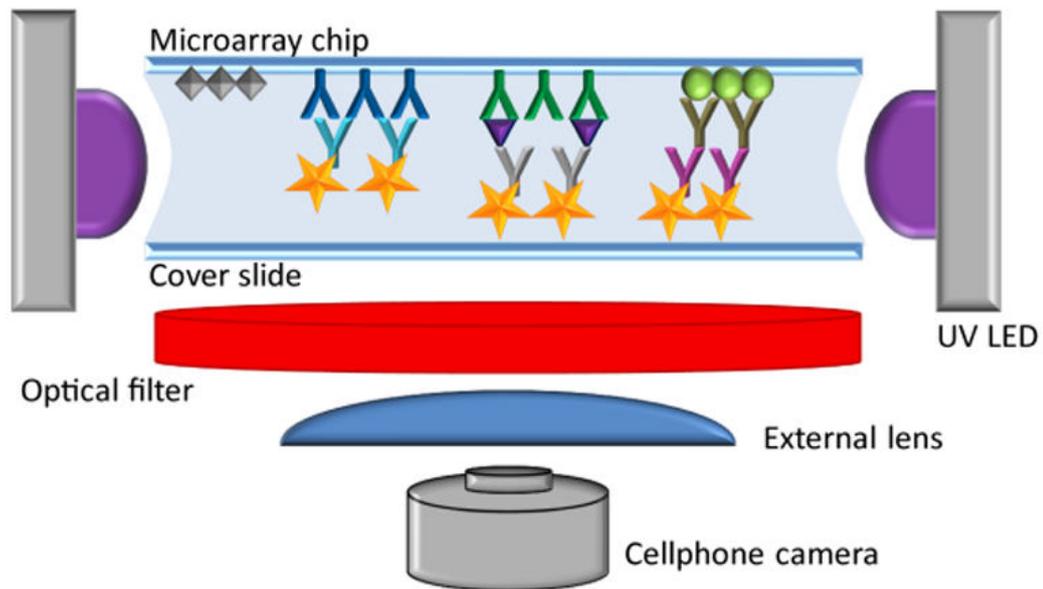
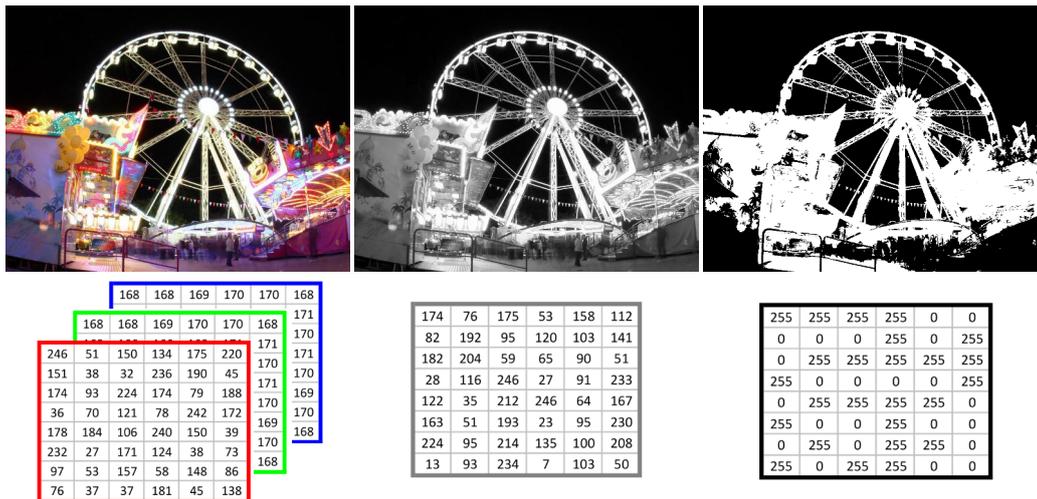


Abbildung 3.4 Aufbau einer Smartphone basierten Biomarkerdetektionsplattform (Coskun *et al.* 2013) .

Auswertung des Bildes erfolgt über einen Bildverarbeitungsalgorithmus der Kolonien von zehn verschiedenen Organismen von einander differenzieren kann (Pridmore, 2012). Mit dem *Cedex HiRes Analyzer* können die Gesamt- und Lebendzellzahl in Tierzellkultivierungen bestimmt werden. Die zu untersuchende Probe wird ins System gegeben und die Zellen werden automatisch vom System mittels Trypan-Blau eingefärbt, was eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen ermöglicht. Im Anschluss wird ein Bild der Zellprobe mittels CCD-Scanner erzeugt. Bei der Auswertung des Bildes zählt der Bildverarbeitungsalgorithmus die Zellen, zerteilt Zellcluster in Einzelzellen und erkennt anhand der Farbe der Zelle ob sie lebendig oder tot ist (Roche Diagnostics, 2012).

Das *IncuCyte*-System der Firma Essen Bioscience besteht aus einem Inkubatorschrank in dem ein Mikroskop integriert ist. Dieses System ermöglicht es Zellen in Wellplatten oder Zellkulturflaschen über einen längeren Zeitraum in Echtzeit zu beobachten. Die gewonnenen Bilder können mit verschiedenen Bildverarbeitungsalgorithmen ausgewertet werden. So kann anhand des Bedeckungsgrades die Zelldichte bestimmt werden. Des weiteren ist es möglich die Position über die Zeit zu verfolgen, aus dieser Kombination ergibt sich ein weiterer Einsatzbereich. So kann z. B. das Wachstumsverhalten von Zellen oder die chemotaktische Migration in Echtzeit verfolgt werden (O'Clair *et al.* 2017).

Wie die zuvor beschriebenen Beispiele zeigen, ist der Einsatz von Bildverarbeitungsalgorithmen bereits heute ein essentieller Bestandteil in der biotechnologischen Forschung und wird in den kommenden Jahren noch weiter an Bedeutung gewinnen (Eliceiri *et al.* 2012).



**Abbildung 3.5** Bild in drei verschiedenen Bildformaten und schematischer Darstellung der zugehörigen Pixel-Datenmatrix: Farbbild (links), Graustufenbild (Mitte), Binärbild (rechts). Quelle des Farbbildes (bilder.n3po.com).

## 3.2 Grundlagen der digitalen Bildverarbeitung

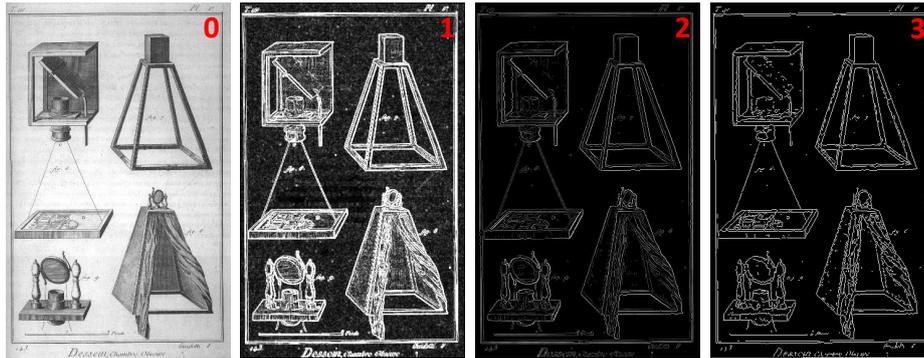
Die digitale Bildverarbeitung ist ein Gebiet der Informatik bzw. der Elektrotechnik, welches sich damit beschäftigt Informationen aus Bildern zu gewinnen oder diese Bilder zu modifizieren. Im Folgenden werden grundlegende Konzepte der Bildverarbeitung eingeführt und erklärt. Die Ausführungen haben dabei keinen Anspruch auf absolute Vollständigkeit, sondern sollen ein grundlegendes Verständnis der wichtigsten Konzepte vermitteln. Für weiterführende Informationen können verschiedene Lehrbücher herangezogen werden z. B. Süße und Rodner (2014), Nischwitz *et al.* (2011) und Steinbrecher (2005).

### 3.2.1 Digitalbilder

Digitale Bilder bestehen aus einer Pixelmatrix. Die Kodierung der Pixel entscheidet darüber was für ein Bild vorliegt. Im Wesentlichen werden drei Typen von Bildern unterschieden: Farbbilder, Graustufenbilder und Binärbilder (Abbildung 3.5). Prinzipiell gibt es verschiedene Möglichkeiten die drei Bildtypen zu kodieren. Im Folgenden werden die Kodierungen vorgestellt, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

$$H = 0,3R + 0,59G + 0,11B \quad (3.1)$$

Für die Farbbilder wurden 24-bit RGB-Bilder verwendet. Bei dieser Kodierung hat jeder Pixel drei Werte: Einen für den Rotanteil, einen für den Grünanteil und einen für den Blauanteil (Abbildung 3.5). Der Wert für jeden Farbkanal kann zwischen 0 und 255 liegen. Je höher der



**Abbildung 3.6** Ergebnisbilder Kantendetektionsalgorithmen; (0) Originalbild (wikimedia.org); (1) Sobel-Operator; (2) Canny-Algorithmus; (3) SUSAN-Algorithmus.

Wert des Farbkanals, desto intensiver ist der Anteil des Farbkanals. Die Farbe des Pixels ergibt sich durch die additive Überlagerung der drei Farbwerte. Bei 8-bit Graustufenbildern hat jeder Pixel nur einen Wert. Dieser Wert gibt die Helligkeit des Pixels an, wobei 255 weiß und 0 schwarz entspricht. Werte zwischen 0 und 255 stellen verschiedene Grautöne dar. Farbbilder lassen sich eindeutig in Graustufenbilder umwandeln. Dazu kann die Formel 3.1 verwendet werden, wobei  $H$  für die Helligkeit des resultierenden Pixels steht und  $R$ ,  $G$  und  $B$  für die jeweilige Farbe. Die Gewichtung der einzelnen Farben entspricht hierbei der Helligkeitswahrnehmung des menschlichen Auges für die jeweilige Farbe (Steinbrecher, 2005). Die Pixel von Binärbildern können nur schwarz oder weiß sein. Diese werden hierbei ebenfalls durch die Pixelwerte 0 und 255 abgebildet, allerdings gibt es bei Binärbildern nur diese beiden Werte. Binärbilder werden häufig durch Anwendung von Binarisierungsverfahren aus Graustufenbildern erzeugt (Abschnitt 3.2.3). Da Binärbilder die einfachste Form der Bilddarstellung sind, werden sie in vielen Fällen zur Analyse von Geometrien im Bild und als Grundlage für komplexere mathematische Algorithmen verwendet.

### 3.2.2 Kantendetektion

Die Kantendetektion ist ein wichtiges Werkzeug in der Bildverarbeitung. In vielen Fällen ist es schwer zusammenhängende Bereiche in Bildern von einander abzugrenzen, da sie häufig ähnliche Pixel enthalten. Allerdings kann der Übergang zwischen zwei Bildbereichen durch die Kantendetektion gefunden werden. Die im Folgenden beschriebenen Verfahren lassen sich nur auf Graustufenbilder anwenden. Eines der einfachsten aber auch eins der am häufigsten verwendeten Verfahren ist die Kantenerkennung mit dem Sobel-Operator (Abbildung 3.6, Nr. 1).

Beim Sobel-Operator handelt es sich um eine Filteroperation im Ortsbereich. Bei Filteroperationen werden Filtermasken auf Eingangsbilder angewendet. Hierbei wird ein Verfahren

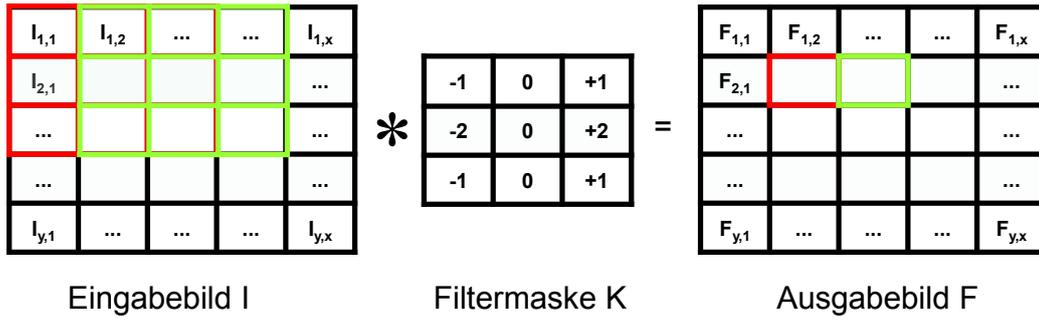


Abbildung 3.7 Anwendung von Filteroperation auf digitale Bilder (Lindner, 2017).

verwendet das Faltung im Ortsbereich genannt wird (Nischwitz *et al.* 2011). In diesem Verfahren wird ein Ausgabebild erzeugt indem jeder Pixel im Eingabebild und seine Nachbapixel mit der Filtermaske nach Formel 3.2 verrechnet werden. Hierbei ist  $I$  das Eingabebild,  $K$  die Filtermaske und  $F$  das Ausgabebild. Bei dieser Rechnung wird jeweils ein Pixel im Ausgabebild erzeugt (Abbildung 3.7).

$$F(y, x) = \sum_{z=1}^M \sum_{s=1}^N I(y + z - 2, y + s - 2) * K(z, s) \quad (3.2)$$

Beim Sobel-Operator werden durch Verwendung der beiden Filtermasken aus Gleichung 3.3 zwei Gradientenbilder erzeugt. Eines davon gibt die Gradienten in x-Richtung, das andere die Gradienten in y-Richtung an. Im Anschluss werden die beiden Gradientenbilder addiert und somit ein Bild erzeugt das die Gesamtgradienten angibt (Formel 3.4). Der Sobeloperator verwendet eine Binomial-Filtermaske (1 2 1). Diese Maske enthält dadurch eine diskrete Approximation der Gauß-Verteilung, was zu einer Glättung in Differenzierungsrichtung führt. Die Idee bei diesem Verfahren ist, dass an Kanten, also am Übergang von hell zu dunkel oder von dunkel zu hell die Gradienten sehr groß sind. Dadurch werden Kantenbereiche im Ausgabebild hell dargestellt und Bereiche ohne Kanten dunkel (Steinbrecher, 2005).

$$G_x = S_x * I = \begin{pmatrix} 1 & 0 & -1 \\ 2 & 0 & -2 \\ 1 & 0 & -1 \end{pmatrix} * I \quad G_y = S_y * I = \begin{pmatrix} 1 & 2 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1 & -2 & -1 \end{pmatrix} * I \quad (3.3)$$

$$G(y, x) = \text{Min}(|G_x(y, x)| + |G_y(y, x)|, 255) \quad (3.4)$$

Ein weiterer wichtiger Algorithmus für die Kantendetektion ist der Canny-Algorithmus (Abbildung 3.6, Nr. 2). Dieser Algorithmus besteht aus vier Schritten. Im Ersten wird ein Gaußfilter auf das Bild angewendet um Bildrauschen zu reduzieren. Im nächsten Schritt wird, der oben beschriebene Sobel-Operator auf das Bild angewendet um die Kantenstärke im Bild zu bestimmen. Zusätzlich wird noch die Ausrichtung der Kanten bestimmt. Im dritten Schritt werden die gefundenen Kanten ausgedünnt. Dafür wird jede Kante entlang ihrer Ausrichtung abgelaufen und an jeder Position bleibt nur der Pixel mit der höchsten Kantenstärke erhalten, die schwächeren Pixel werden verworfen. Im letzten Schritt wird eine Hysterese Thresholding durchgeführt um Kanten die durch Bildrauschen entstanden sind zu entfernen. Bei diesem Verfahren wird ein oberer und ein unterer Grenzwert benötigt. Hierbei wird das Bild solange durchsucht bis ein Pixel gefunden wurde dessen Kantenstärke oberhalb des oberen Grenzwertes liegt. Ausgehend von diesem Pixel wird die Kante in beide Richtungen abgeschritten und alle Pixel oberhalb des unteren Grenzwertes werden als Kanten markiert. Im Ausgabebild werden nur Pixel verwendet die als Kanten markiert wurden alle anderen werden verworfen (Canny, 1986).

Einer der fortgeschrittensten Kantendetektionsalgorithmen ist der SUSAN-Algorithmus (Abbildung 3.6, Nr. 3). „SUSAN“ steht für „Smallest Univalued Segment Assimilating Nucleus“. Hierbei wird die Ähnlichkeit des Grauwertes eines Pixel zu seinem Nachbarn als Klassifizierungskriterium genutzt um Kanten zu detektieren. Im Anschluss an die Kantenerkennung kann eine Ausdünnung der Kanten erfolgen (Smith und Brady, 1995).

### **3.2.3 Binarisierungsverfahren**

Binarisierungsverfahren werden dazu verwendet um aus Graustufen- oder Farbbildern Binärbilder zu erzeugen. Im Folgenden wird nur auf Verfahren zur Umwandlung von Graustufenbildern eingegangen.

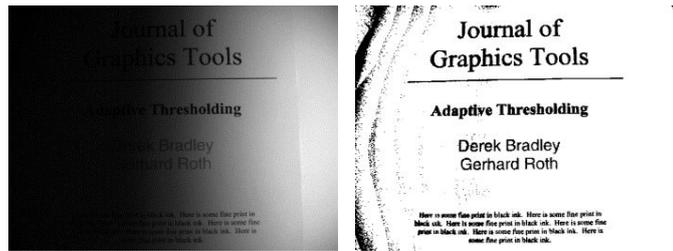
Das einfachste Verfahren ist das einfache Schwellenwertverfahren (engl.: Thresholding). Bei diesem Verfahren wird ein bestimmter Grauwert als Schwellenwert festgelegt. Alle Pixel unterhalb dieses Schwellenwertes werden auf 0 (schwarz) und alle Pixel oberhalb dieses Schwellenwertes auf 255 (weiß) gesetzt. Eine Erweiterung dieses Verfahrens ist das iterative Schwellenwertverfahren. Bei diesem Verfahren wird ausgehend von einem Startschwollenwert dieser Wert schrittweise variiert. Aus jedem neuen Schwellenwert wird ein Binärbild generiert. Im Anschluss wird eine Objekterkennung (Abschnitt 3.2.4) auf dem Binärbild durchgeführt und gewünschte Eigenschaften der Objekte, wie Größe oder Rundheit, gespeichert. Anhand dieser Objektdaten kann dann der optimale Schwellenwert ermittelt werden.



**Abbildung 3.8** Binärbilder generiert unter Verwendung verschiedener Schwellenwerte. (0) Originalbild (wikipedia.org2); (1) Schwellenwert: 40; (2) Schwellenwert: 70, (3) Schwellenwert: 110, (4) Schwellenwert: 160; (5) Automatischer Schwellenwert nach Otsu-Verfahren.

Neben den einfachen Binarisierungsverfahren, bei denen der Schwellenwert händisch bzw. durch ein iteratives Verfahren ermittelt wird, gibt es auch Binarisierungsverfahren die den optimalen Schwellenwert automatisch ermitteln (Abbildung 3.8, rechts). Ein solches Verfahren wurde von Otsu (1979) entwickelt und ist als Otsu-Verfahren bekannt. Dabei werden alle Pixel des Bildes in zwei Klassen eingeteilt. Die beiden Klassen werden durch einen Schwellenwert getrennt, alle Pixel die einen Grauwert unterhalb des Schwellenwertes haben gehören zur Klasse 0 und die anderen zur Klasse 1. Im nächsten Schritt werden die Varianz innerhalb der zwei Klassen und die Varianz zwischen den beiden Klassen berechnet. Der Schwellenwert wird im Anschluss variiert, dabei ist es das Ziel die Varianz innerhalb der Klassen zu minimieren und die Varianz zwischen den Klassen zu maximieren. Der Schwellenwert, der bei dieser Optimierung die besten Werte erzielt wird verwendet.

Bei den bisher vorgestellten Binarisierungsverfahren handelt es sich um globale Verfahren. Dabei gilt, dass ein Schwellenwert für alle Pixel des Bildes verwendet wird. Eine alternative hierzu sind lokale Binarisierungsverfahren. Dabei wird anhand der direkten Umgebung eines Pixels entschieden, ob dieser Pixel auf schwarz oder weiß gesetzt wird. Ein solches lokales Verfahren ist das Bradley-local-Thresholding. Bei diesem Verfahren wird ein Pixel auf schwarz gesetzt, wenn sein Grauwert um einen bestimmten Prozentsatz niedriger ist als der mittlere Grauwert der Pixel in seiner Umgebung. Hierbei müssen vom Anwender, sowohl der Prozentsatz als auch die Größe der Umgebung für die Mittelwertberechnung,



**Abbildung 3.9** Anwendung des Bradley-local-Thresholding: Originalbild (links) und erzeugtes Binärbild (rechts). Modifiziert nach Bradley und Roth (2007).

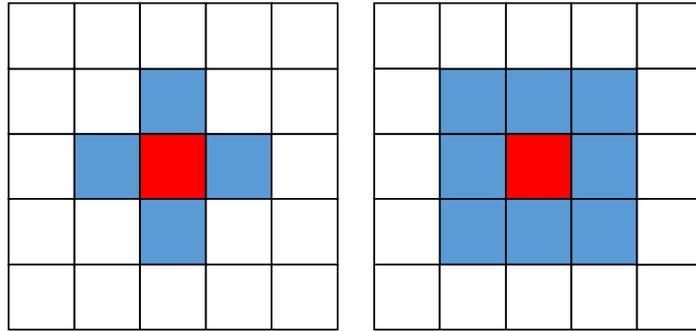
fest gelegt werden. Die lokalen Binarisierungsverfahren finden vor allem auf Bildern mit Helligkeitsgradienten Anwendung (Abbildung 3.9). Bei diesen Bildern würden globale Binarisierungsverfahren versagen (Bradley und Roth, 2007).

Bei der Binarisierung von Bildern kann es zur Artefaktbildung kommen, hierbei kann es sich um einzelne Pixel oder Pixelgruppen handeln, welche eigentlich nicht beim Binarisieren erkannt werden sollten. Diese entstehen z. B. durch Bildrauschen, Reflexionen oder unterschiedliche Helligkeitsgradienten auf den Bildern. Da diese Artefakte keine Bildinformationen enthalten, aber von Folgealgorithmen trotzdem verwendet werden, erzeugen sie in vielen Fällen Probleme. Daher sollte nach Möglichkeit von Beginn an ein Binarisierungsverfahren ausgewählt werden, welches möglichst wenig Artefakte erzeugt. Ein Beispiel für eine Solche Artefaktbildung bei der Binarisierung stellen die schwarzen Streifen auf der linken Seite des rechten Bildes in Abbildung 3.9 dar. Solche Artefakte können in vielen Fällen anhand ihrer Objekteigenschaften, wie z. B. ihrer Größe, geometrischen Form oder ihrer Lage im Bild, erkannt und aussortiert werden.

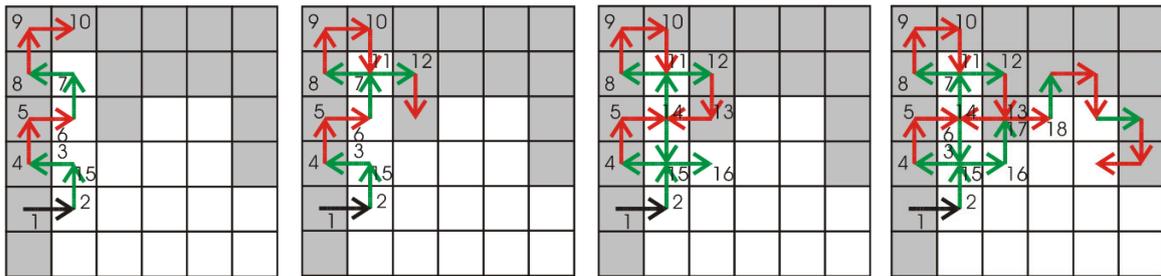
### 3.2.4 Objekte und Objekterkennung

In der Bildverarbeitung werden benachbarte Pixel zu einem Objekt zusammengefasst. Hierfür muss entschieden werden, welche Pixel als benachbart gelten sollen. Bei der Von-Neumann-Nachbarschaft werden nur Pixel an den horizontalen und vertikalen Seiten als Nachbarn betrachtet. Bei der Moore-Nachbarschaft hingegen auch Pixel die über Eck mit dem Pixel verbunden sind (Abbildung 3.10).

Um Objekte auf einem Bild zu finden wird eine Objekterkennung durchgeführt. In den meisten Fällen wird die Objekterkennung auf einem Binärbild durchgeführt. Dabei wird das Binärbild zeilenweise durchlaufen bis ein weißer Pixel gefunden wurde. Ausgehend von diesem Pixel wird der Border-Tracing-Algorithmus (deutsch: Randerkennung) gestartet. Dieser Algorithmus läuft schrittweise alle Randpixel des späteren Objektes ab. Dabei wird nach jedem Schritt die Laufrichtung um  $90^\circ$  gedreht. Die Drehrichtung hängt davon ab, ob



**Abbildung 3.10** Links: Von-Neumann-Nachbarschaft. Rechts: Moore-Nachbarschaft. Die blauen Pixel werden jeweils als benachbart zum roten Pixel gezählt.



**Abbildung 3.11** Schematischer Ablauf des Border-Tracing-Algorithmus (von links nach rechts). Die weißen Pixel stellen Objektpixel dar und die grauen Pixel nicht Objektpixel. Bei grünen Pfeilen wurde zuvor links herum und bei roten Pfeilen rechts herum gedreht. Modifiziert nach Krabichler (2005).

man sich in einem Objektpixel (weiß) oder einem nicht Objektpixel (schwarz) befindet. In einem Objektpixel erfolgt die Drehung links herum und in einem nicht Objektpixel rechts herum (Abbildung 3.11). Im nächsten Schritt werden alle Pixel die innerhalb der gefunden Randpixel liegen zeilenweise durchgegangen und alle weißen Pixel dem Objekt hinzugefügt. Alle schwarzen Pixel werden ignoriert und führen dadurch zu Löchern innerhalb des Objektes.

Die erzeugten Objekte verfügen über geometrische Eigenschaften. Diese Eigenschaften können genutzt werden, um sie nach gewünschten Kriterien zu selektieren. Jedes Objekt hat eine Größe, welche sich aus der Anzahl der im Objekt enthaltenen Pixel ergibt. Diese wird häufig verwendet um Binarisierungsartefakte, die durch Bildrauschen entstehen zu entfernen. Diese Artefakte erzeugen in den meisten Fällen sehr kleine Objekte, welche dann anhand ihrer Größe erkannt und gelöscht werden können. Eine weitere wichtige Eigenschaft ist die Rundheit der Objekte. Diese kann anhand der Exzentrizität oder Kompaktheit der Objekte bestimmt werden. Die Exzentrizität berechnet sich aus dem Verhältnis zwischen minimaler und maximaler Polarstrecke (Gleichung 3.5). Bei der Kompaktheit wird das Verhältnis zwischen Umfang und Fläche berechnet (Gleichung 3.6). Für beide Größen ergibt sich für einen idealen Kreis der Wert von 1, für alle anderen Geometrien wird ein Wert

größer 1 erzielt (Steinbrecher, 2005). Eine wichtige Eigenschaft von Objekten ist ihre Position im Bild, da diese oft schon für die Klassifizierung entscheidend ist. Weitere geometrische Eigenschaften von Objekten sind der Schwerpunkt, der Durchmesser, der Radius und die Ausrichtung (Steinbrecher, 2005).

$$\text{Exzentrizität} = \frac{\text{maximale Polarstrecke}}{\text{minimale Polarstrecke}} \quad (3.5)$$

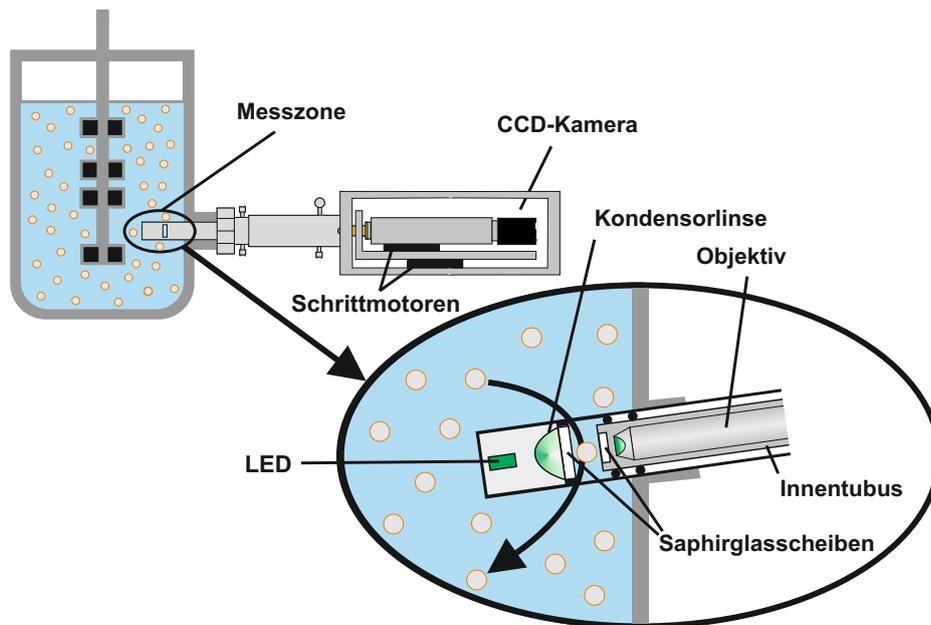
$$\text{Kompaktheit} = \frac{\text{Umfang}^2}{4\pi \cdot \text{Flächeninhalt}} \quad (3.6)$$

Der Umgang mit Objekten ist in der Bildverarbeitung sehr weit verbreitet, da diese es ermöglichen Bildinhalte anhand ihrer geometrischen Eigenschaften zu identifizieren und zu klassifizieren.

### 3.3 In-situ-Mikroskop-TT

Als Teil dieser Arbeit wurden Bildverarbeitungsalgorithmen entwickelt, die neue Messverfahren und einen vereinfachten Umgang mit dem In-situ-Mikroskop-TT (ISM-TT) ermöglichen. Das ISM-TT wurde von Prediger (2013) entwickelt. Die Abkürzung TT steht hierbei für Tisch auf Tisch. Beim ISM-TT handelt es sich um ein Durchlicht-Hellfeld-Mikroskop das über einen 25 mm-Port in einen Bioreaktor integriert werden kann (Abbildung 3.12).

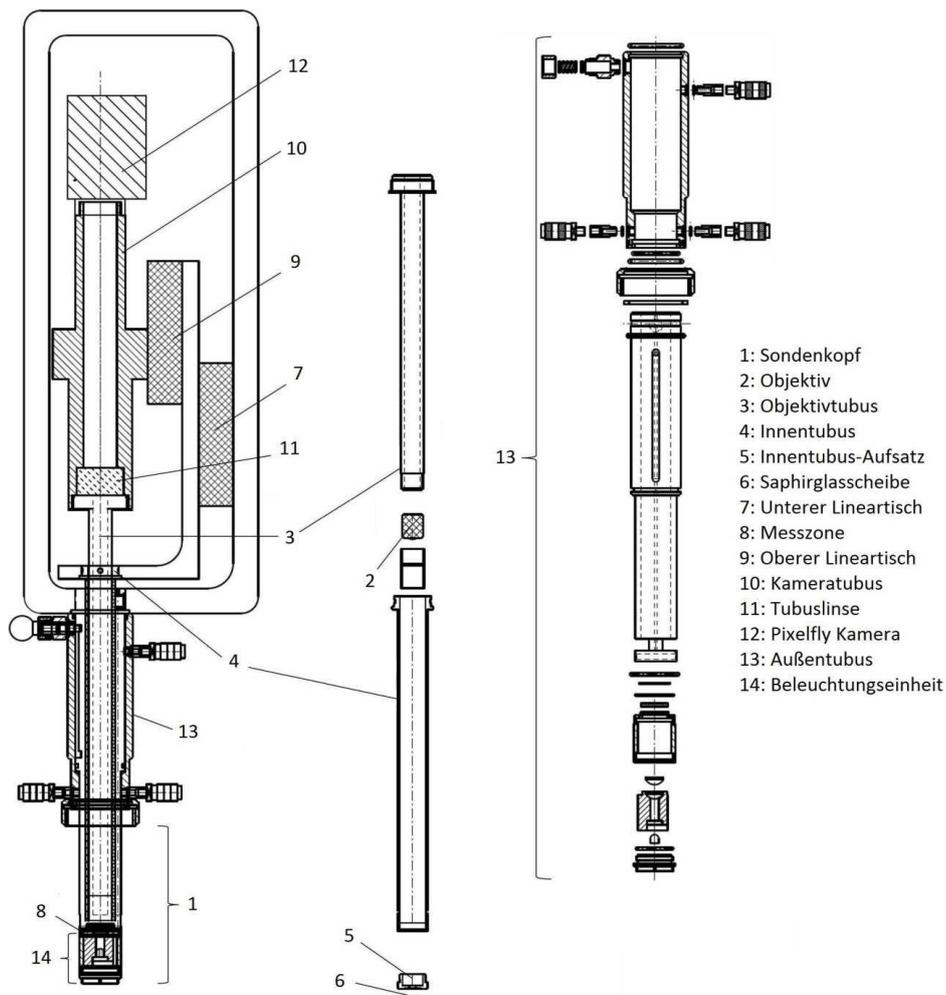
Das ISM-TT besteht aus einem Außentubus und einem Innentubus. Der Außentubus wird fix in den 25 mm-Port integriert und beinhaltet die LED, welche als Lichtquelle dient. Der Innentubus kann über einen Schrittmotor verfahren werden und beinhaltet das Objektiv. Die beiden Tubi haben jeweils eine Saphirglasscheibe, die die LED und das Objektiv vom Prozessmedium trennen. Der Bereich zwischen den beiden Saphirglasscheiben in dem sich das Prozessmedium befindet wird als Messzone bezeichnet (Abbildung 3.12) und der Abstand zwischen den beiden Saphirglasscheiben als Messzonenhöhe. Diese kann durch das Verfahren des Innentubus variiert werden. Das ISM-TT kann mit verschiedenen Objektiven ausgerüstet werden. Die Standardobjektive bieten eine 10-fach oder 4-fach Vergrößerung. Genau wie der Innentubus kann auch das Objektiv über einen Schrittmotor verfahren werden, dies ist notwendig da die verschiedenen Objektive unterschiedliche Arbeitsabstände haben. Des weiteren werden so auch Aufnahmen mit unterschiedlichen Fokussierungen möglich. Dies findet z. B. Anwendung beim Zählen von tierischen Zellkulturen (Lüder



**Abbildung 3.12** Messprinzip des verwendeten ISM. Das ISM ist ein Durchlicht-Hellfeld-Mikroskop mit einer Unendlich Optik. Die Hintergrundbeleuchtung ist über eine LED realisiert. Die Messzone zwischen Innen- und Außentubus wird von von zwei Saphirscheiben begrenzt. Der Innentubus und das Objektiv werden über Schrittmotoren bewegt. Durch das Verfahren des Innentubus kann die Höhe der Messzone variiert werden. Modifiziert nach Marquard *et al.* 2016.

*et al.* 2014). Die Bildaufnahme erfolgt mit einer sehr lichtempfindlichen CCD-Kamera. Das ISM-TT wird im Allgemeinen in gerührten Prozessen eingesetzt und das zu beobachtende Prozessmedium fließt besonders bei hohen Rührergeschwindigkeiten sehr schnell durch die Messzone. Die hohe Lichtempfindlichkeit der Kamera ermöglicht Bildaufnahmen mit Belichtungszeiten im Mikrosekundenbereich, so dass auch sich schnell bewegende Objekte gut erfasst werden.

Wie bereits erwähnt steht die Abkürzung TT für Tisch auf Tisch, dies bezieht sich auf die beiden Lineartische bzw. Schrittmotoren des ISM-TT. Der Schrittmotor des Objektivs ist fix auf der Innentubushalterung montiert (Abbildung 3.13). Dies führt dazu, dass beim Verfahren des Innentubus das Objektiv mitverfahren wird. Dies hat zur Folge, dass die Messzonenhöhe variiert werden kann ohne dass sich die Objektivposition in Bezug auf den Innentubus verändert. Das hat unter anderem den Vorteil, dass die Messzone zwischen zwei Messzyklen zum Spülen aufgefahren werden kann, ohne dass im Anschluss neu fokussiert werden muss, da sich die Objektivposition nicht verändert hat. Die verwendeten Schrittmotoren sind sehr präzise und ermöglichen eine mikrometergenaue reproduzierbare Positionierung. Allerdings müssen vor jeder Messung die Messzonenhöhe und die optimale Objektivposition manuell neu bestimmt werden. Der Grund dafür ist, dass das ISM-TT aus mehreren Einzelteilen besteht, die vor jedem Experiment neu zusammengesetzt werden müssen. Damit die Einzelteile sich zusammenbauen lassen muss es ein mechanisches Spiel



**Abbildung 3.13** Abb. 18: Schematische Seitenansicht des ISM-TT (links) mit Explosionszeichnungen vom Innentubus (Mitte, unten) und Objektivtubus (Mitte, oben) und vom Außentubus (rechts) (Prediger, 2013).

geben. Dies führt dazu, dass sich die Position der einzelnen Bauteile zueinander zwischen zwei Experimenten um mehrere hundert Mikrometer unterscheiden kann. Dies ist eine Schwachstelle des ISM-TT, die als Teil dieser Arbeit behandelt wird.

## 4 In-situ-Mikroskopie zur Zelldichtebestimmung in *P.-pastoris*-Kultivierungen

Die methyloprohe Hefe *Pichia pastoris* (syn. *Komagataella pastoris*) bietet ein großes Potential als mikrobielle Zellfabrik, dabei bietet sie eine herausragende Kombination an prokaryotischen und eukaryotischen Eigenschaften, die sie zu einem sehr guten Proteinexpressionssystem machen. Zu diesen Eigenschaften zählen einfache genetische Veränderbarkeit und sehr schnelles Zellwachstum auf kostengünstigen Kultivierungsmedien, vergleichbar zu *E. coli*. Weitere Vorteile von *P. pastoris* sind die Fähigkeit Proteine zu Glykosilieren und Disulfidbrücken einzufügen (G. P. L. Cereghino *et al.* 2002; Li *et al.* 2007; Macauley-Patrick *et al.* 2005). Diese Eigenschaften führen, im Vergleich zur Expression in *E. coli*, zu einer höheren Wahrscheinlichkeit aktive Proteine zu erhalten (Wriessnegger *et al.* 2009). Des Weiteren verfügt *P. pastoris* über den Methanol induzierbaren Promoter AOX1, dieser ist unter Abwesenheit von Methanol stark unterdrückt und ermöglicht so auch die Produktion von stark toxischen Proteinen (G. P. L. Cereghino *et al.* 2002). Zusätzlich kann *P. pastoris* sehr hohe Zelldichten von über 100 g/L Biotrockenmasse (BTM) erreichen (J. L. Cereghino und Cregg, 2000).

Durch diese Eigenschaften ist *P. pastoris* einer der vielversprechendsten Organismen für die Bioprozesstechnik. Allerdings stellen die hohen Zelldichten von über 100 g/L BTM eine Herausforderung für die Online-Prozessüberwachung dar. Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Techniken beschrieben. Beispiele hierfür sind Trübungssonden, 2D-Fluoreszenzspektroskopie, Infrarotspektroskopie und dielektrische Spektroskopie (Luttmann *et al.* 2015; Surribas *et al.* 2006; Crowley *et al.* 2005; Fehrenbach *et al.* 1992). Keine dieser Techniken deckt den vollen Zelldichtebereich von *P.-pastoris*-Kultivierungen ab, daher gibt es immer noch Bedarf an neuen Techniken zur online Zelldichtebestimmung.

In diesem Kapitel wird ein neues online Messverfahren zur Zelldichtebestimmung in *P.-pastoris*-Kultivierungen vorgestellt. Dabei wurden acht Kultivierungen durchgeführt und die Zelldichte mittels ISM überwacht. Dafür wurden zwei Bildverarbeitungsalgorithmen zur Ermittlung der Zelldichte aus den ISM-Bildern entwickelt.

## 4.1 Algorithmen

Zur Bestimmung der Zelldichte in *P.-pastoris*-Kultivierungen anhand von ISM-Bildern wurden zwei Bildverarbeitungsalgorithmen entwickelt. Der erste Algorithmus ist der CRA, dieser nutzt die Clusterbildung der *P.-pastoris*-Zellen aus um die Zelldichte zu bestimmen. Dafür wird die Größe aller im Bild detektierten Cluster aufsummiert. Der Vorteil dieses Algorithmus ist, dass er auch funktioniert wenn nicht mehr alle *P.-pastoris*-Zellen im Bild aufgelöst werden können. Dies kann bei starker Clusterbildung der *P.-pastoris*-Zellen oder bei sehr hohen Zelldichten auftreten. Der zweite Algorithmus ist der PCA. Dieser Algorithmus zählt die *P.-pastoris*-Zellen in den ISM-Bildern zur Bestimmung der Zelldichte. Dieser Algorithmus funktioniert bei Einzelzellen und kleineren Zellclustern.

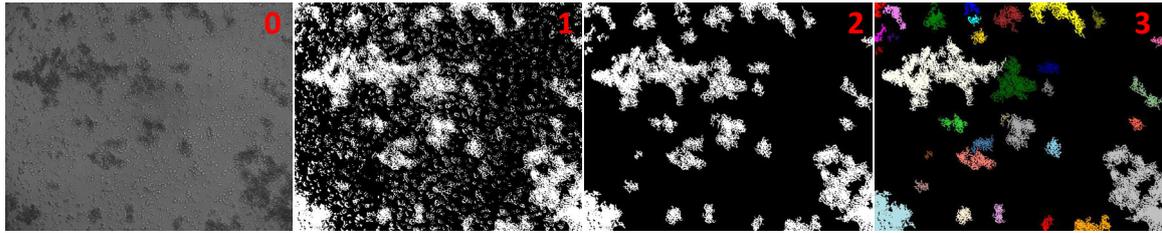
Für beide Algorithmen werden defokussierte aufgenommen ISM-Bilder verwendet. Die defokussierte Aufnahmeweise führt dazu, dass der Mittelpunkt der *P.-pastoris*-Zellen auf den Bildern hell erscheint und der Randbereich der Zellen dunkel (Abbildung 4.4, Nr. 0). Diese Eigenschaft ist wichtig für die Funktionsweise des PCA.

### 4.1.1 Cluster Recognition Algorithm (CRA)

Der Ablauf des CRA ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Im ersten Schritt wird das Originalbild binarisiert. Dabei werden alle Pixel die unterhalb eines bestimmten Grauwertes liegen auf 255 und alle Pixel die einen höheren Grauwert haben auf 0 gesetzt. Dadurch entsteht ein Binärbild (Abbildung 4.2, Nr. 1). Nun wird eine Objekterkennung unter Verwendung einer Moore-Nachbarschaft durchgeführt. Dabei werden alle benachbarten Pixel zu einem Objekt zusammengefasst. Bei diesem Verfahren wird zeitgleich die Größe dieser Objekte bestimmt. Im nächsten Schritt werden nun alle Objekte deren Größe kleiner als 200 Pixel ist gelöscht (Abbildung 4.2, Nr. 2). Die verbleibenden Objekte repräsentieren die *P.-pastoris*-Cluster (Abbildung 4.2, Nr. 3). Im letzten Schritt werden die Pixel aller Objekte aufsummiert. Die Pixel (Einheit: Megapixel (MP)) pro Bild können mit der BTM oder der optischen Dichte (OD) korreliert werden.



Abbildung 4.1 Fließschema des Cluster Recognition Algorithm (CRA)

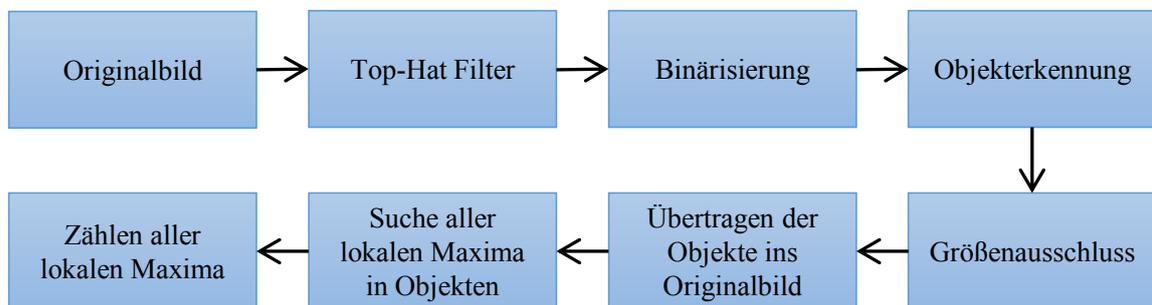


**Abbildung 4.2** Ergebnisbilder der Einzelschritte des Cluster Recognition Algorithm (CRA): (0) Originalbild; (1) Binärisierung; (2) Größenausschluss; (3) Finale Objekte. Die Summe aller Objektpixel bildet den Ausgabewert des CRA.

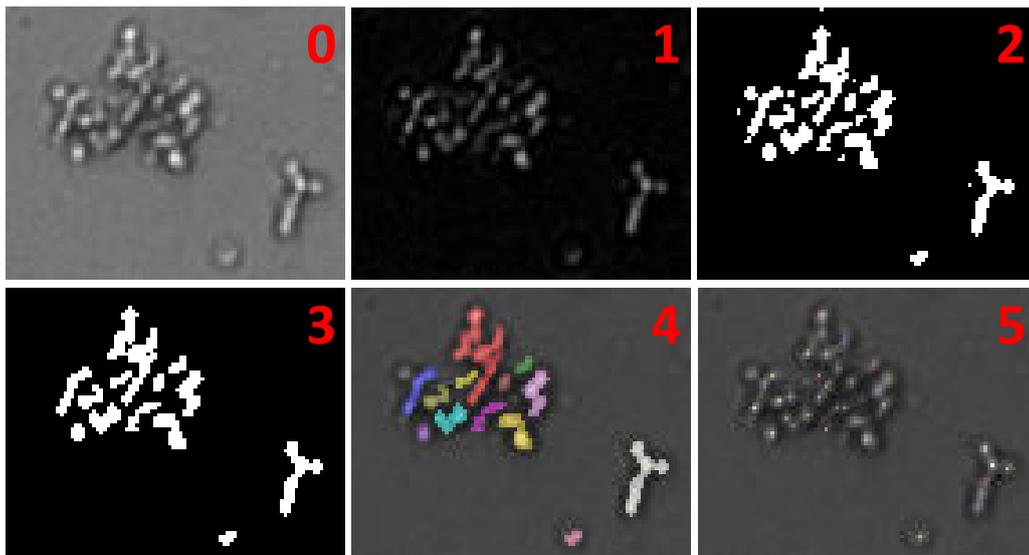
### 4.1.2 Pichia Counter Algorithm (PCA)

Der Ablauf des PCA ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Im ersten Schritt wird ein Top-Hat Filter auf das Originalbild angewandt. Dieser Filter hebt Bildbereiche hervor in denen helle Bereiche mit dunklen Rändern liegen, was genau den defokussierten Aufnahmen der *P. pastoris*-Zellen entspricht (Abbildung 4.4, Nr. 0). Andere Bildbereiche die nicht dem Schema entsprechen bleiben dunkel, dies führt dazu, dass Bereiche mit *P. pastoris*-Zellen deutlich heller sind als Bereiche ohne (Abbildung 4.4, Nr. 1). Im nächsten Schritt wird das Bild binarisiert. Dafür werden alle Pixel unterhalb eines bestimmten Grauwertes auf 0 und alle Pixel oberhalb des definierten Grauwertes auf 255 gesetzt (Abbildung 4.4, Nr. 2). Im Anschluss wird eine Objekterkennung unter Verwendung einer Von-Neumann-Nachbarschaft durchgeführt. Dabei werden alle benachbarten Pixel zu einem Objekt zusammengefasst. Die Von-Neumann-Nachbarschaft wird verwendet, da bei ihr die Wahrscheinlichkeit geringer ist, dass Einzelzellen zu Zellclustern zusammengefasst werden. Bei diesem Verfahren wird zeitgleich die Größe dieser Objekte bestimmt. Im nächsten Schritt werden nun alle Objekte deren Größe kleiner als 12 Pixel ist gelöscht (Abbildung 4.4, Nr. 3).

Die verbleibenden Objekte können sowohl Einzelzellen als auch kleinere Zellcluster darstellen. Eine sichere Aussage darüber kann nicht anhand der geometrischen Eigenschaften der Objekte getroffen werden. Daher ist ein einfaches Zählen der Objekte zur Bestimmung der



**Abbildung 4.3** Fließschema des Pichia Counter Algorithm (PCA)



**Abbildung 4.4** Ergebnisbilder der Einzelschritte des Pichia Counter Algorithm (PCA): (0) Originalbild; (1) Top-Hat Filter; (2) Binärisierung; (3) Bild nach Größenausschluss; (4) Originalbild überlagert mit detektierten Objekten; (5) Gefundene lokale Maxima des Originalbildes innerhalb der Objektgrenzen. Das Ergebnis des PCA ist die Summe der gefundenen lokalen Maxima.

Anzahl der Zellen im Bild nicht möglich. Um dieses Problem zu lösen werden die Objekte in das Originalbild projiziert (Abbildung 4.4, Nr. 4). Nun werden die Grauwerte der Pixel die sich innerhalb der Objektgrenzen im Originalbild befinden verwendet und die lokalen Maxima in diesen Bereichen gesucht. Für die Identifizierung der lokalen Maxima wird der Algorithmus von Breen und Jones (1996) verwendet. Dabei wird angenommen, dass ein lokales Maximum pro *P.-pastoris*-Zelle gefunden wird, unabhängig davon ob sich diese Zelle im Zellcluster befindet oder als Einzelzelle vorliegt (Abbildung 4.4, Nr. 5). Daher entspricht die Anzahl der *P.-pastoris*-Zellen im Bild der Anzahl der lokalen Maxima. Die Summe der lokalen Maxima pro Bild kann zur Bestimmung der Zelldichte mit der BTM oder der OD korreliert werden.

## 4.2 Ergebnisse und Diskussion

Zur Untersuchung des entwickelten Messverfahrens wurden acht *P.-pastoris*-Kultivierungen durchgeführt. Die ISM-Bilder dieser Kultivierungen wurden mit beiden entwickelten Algorithmen ausgewertet. Die Kultivierungen können hierbei, aufgrund von Experimentparametern und Wachstumsverhalten der *P.-pastoris*-Zellen, in drei Gruppen zusammengefasst werden.

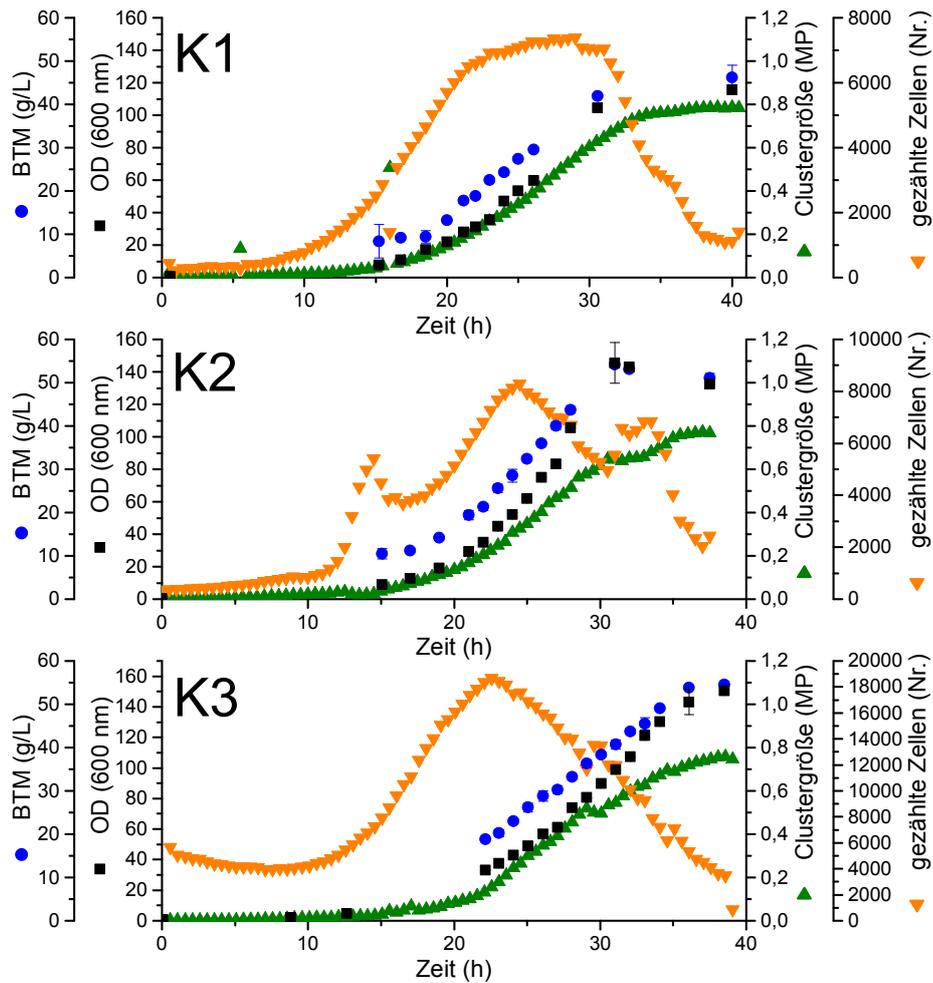
Die Kultivierung K1-K3 unterscheiden sich von den anderen Kultivierungen, da die Messzonenhöhe auf 40 µm eingestellt wurde. Bei den anderen fünf Kultivierungen wurde die Messzonenhöhe auf 20 µm eingestellt. Die Kultivierungen K4-K5 wurden als Fed-Batch-Kultivierungen durchgeführt und die *P.-pastoris*-Zellen zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten wie bei K1-K3. Bei den Kultivierungen K6-K8 wuchsen die *P.-pastoris*-Zellen deutlich langsamer als in den anderen fünf Kultivierungen und bildeten dabei quasi keine Zellcluster. Eine Übersicht der unterschiedlichen Kultivierungsparameter ist in Tabelle A.3 (S. 99) dargestellt.

#### 4.2.1 Kultivierungen K1-K3

In den Kultivierungen K1-K3 zeigten die *P.-pastoris*-Zellen ein schnelles exponentielles Wachstumsverhalten. Die Daten der Offline-Proben und die Ergebnisse der beiden Algorithmen zeigten ein ähnlichen Verlauf (Abbildung 4.5). In allen drei Kultivierungen begann die exponentielle Phase nach ca. 10 h. Nach 30 h hatten die drei Kultivierungen eine BTM zwischen 40 g/L und 50 g/L erreicht, während die OD zwischen 100 und 110 lag. Für Kultivierung K1 betrug die finale BTM 40 g/L, die Kultivierungen K2 und K3 erreichten am Ende eine BTM von 54 g/L. Dieser Unterschied ist auf die verschiedene Glycerolkonzentration zu Beginn der Kultivierungen zurückzuführen (Tabelle A.3).

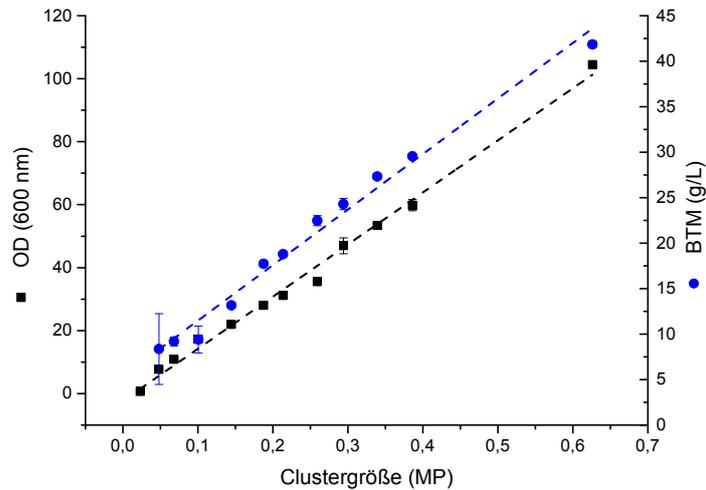
In diesen drei Kultivierungen zeigen die Ergebnisse des CRA den gleichen Trend wie die BTM und OD Daten. In K1 zeigt der Graph des CRA bei 5 h und 15 h zwei Ausreißer. Diese Ausreißer sind auf Luftblasen zurückzuführen, welche sich in der Messzone des ISM festgesetzt hatten. Ein Verfahren zum Umgang mit solchen Luftblasen in ISM-Bildern wird im Anhang in Abschnitt B.1.1 (S. 110) beschrieben.

Für alle Kultivierungen wurden die jeweiligen Ergebnisse des CRA mit den BTM und den OD Daten korreliert und eine lineare Regressionen durchgeführt. Diese Regression wird durchgeführt, um zu untersuchen, ob ein linearer Zusammenhang zwischen den Ergebnissen des CRA und den Offline-Daten besteht und um diesen Zusammenhang durch eine Formel mathematisch zu beschreiben. Die mathematische Beschreibung kann später prinzipiell genutzt werden, um die Zelldichte anhand der Daten des CRA zu bestimmen. Eine solche lineare Regression ist beispielhaft an Kultivierung K1 in Abbildung 4.6 dargestellt. Alle Y-Achsenabschnitte und Steigungen der linearen Regressionen sind in Tabelle 4.1 gezeigt. Die Standardabweichung der Steigungen dieser Regression ist unterhalb von 12,5 %. Dies spricht für eine gute Reproduzierbarkeit des Messverfahrens. Die Y-Achsenabschnitte haben mit 50 % eine deutlich höhere Standardabweichung. Diese ist vermutlich auf kleine Unterschiede in der Mediumszusammensetzung und wie gut die Medienbestandteile zu



**Abbildung 4.5** Offline-Daten und Algorithmenresultate der Kultivierungen K1-K3. Als Offline-Daten wurden die BTM in g/L und die OD bei 600 nm bestimmt. Alle Offline-Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung dieser Messungen. Die Ergebnisse des CRA in MP und des PCA in gezählten Zellen wurden anhand der ISM-Bilder bestimmt. Die Messzonenhöhe des ISM für diese Kultivierungen wurde auf 40  $\mu\text{m}$  eingestellt.

Beginn der Kultivierung gelöst waren zurückzuführen. Insgesamt sind die Werte der Y-Achsenabschnitte aber relativ klein im Vergleich zu den Steigungen und haben daher auch einen geringen Einfluss auf die Messung.



**Abbildung 4.6** Korrelation der Ergebnisse des CRA mit der offline bestimmten OD und der BTM für die Kultivierung K1. Alle Offline-Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt und Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung dieser Messungen. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  der linearen Regression beträgt für die BTM 0,987 und für die OD 0,993.

**Tabelle 4.1** Werte der linearen Regressionen der Clustergröße des CRA mit der OD und BTM für die Kultivierungen K1-K3. Der Parameter  $m$  ist die Steigung,  $b$  der Y-Achsenabschnitt und  $R^2$  das Bestimmtheitsmaß der Regression. Das  $\sigma$  bezeichnet die Standardabweichung der Regressionsparameter. Der OD-Bereich und der BTM-Bereich geben den niedrigsten und höchsten Wert an, welcher für die Regression noch verwendet wurde.

Parameter	K1	K2	K3	Mittelwert	$\sigma$	$\sigma$ [%]
OD						
$m_{OD}$ [1/MP]	165,47	210,94	189,08	188,5	22,74	12,06
$b_{OD}$ []	-2,36	-5,434	-2,5	-3,431	1,73	50,6
$R^2$	0,993	0,976	0,971	0,98	0,0117	1,2
OD-Bereich []	7,6-104,5	0,45-145,3	2,05-150,3			
BTM						
$m_{DCM}$ [g/(MP L)]	61,04	72,7	59,1	64,28	7,36	11,44
$b_{DCM}$ [g/L]	5,37	6,75	8,65	6,93	1,64	26,65
$R^2$	0,987	0,998	0,982	0,989	0,0078	0,8
BTM-Bereich [g/L]	9,2-41,85	10,5-54,15	18,8-54,5			

Die Bestimmtheitsmaße  $R^2$  aller linearen Regressionen liegen oberhalb von 0,97. Diese Werte lassen darauf schließen, dass eine lineare Korrelation zwischen den beiden Referenzwerten und der Clustergröße besteht. Aus diesem Grund können die OD und BTM anhand der vom

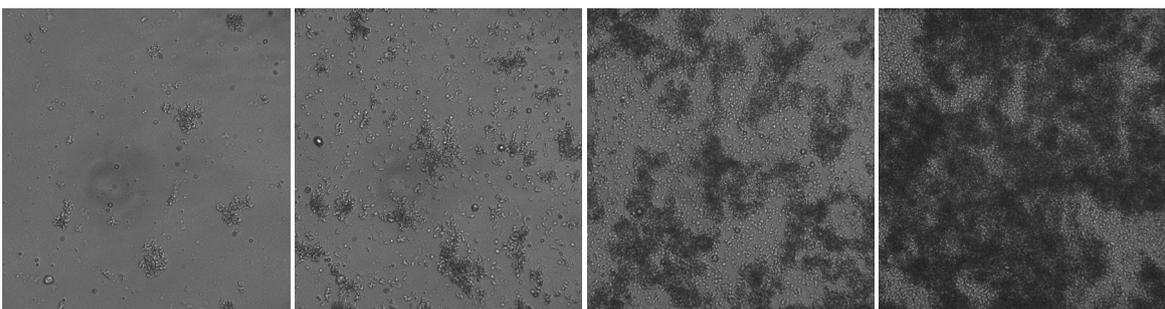
CRA bestimmten Clustergröße mit den Gleichungen (4.1) und (4.2) beschrieben werden. Die Parameter der beiden Gleichungen können aus den Mittelwerten der linearen Regressionen der Kultivierungen K1-K3 bestimmt werden (Tabelle 4.1).

$$OD_{600} = m_{OD} \cdot \text{Clustergröße} + b_{OD} \quad (4.1)$$

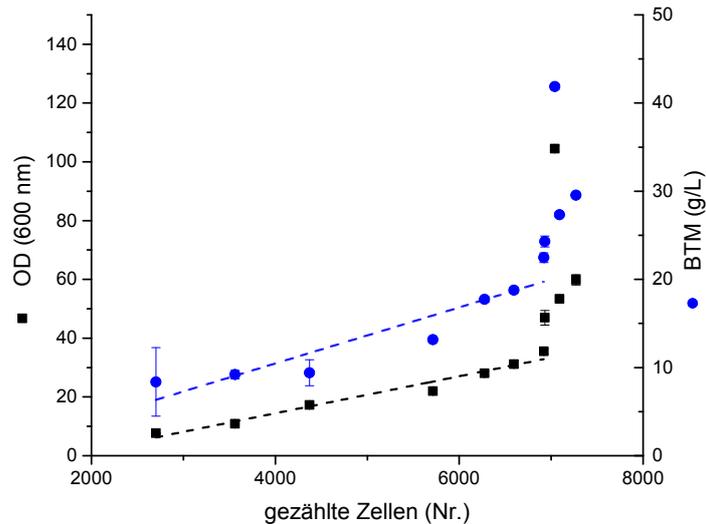
$$BTM = m_{BTM} \cdot \text{Clustergröße} + b_{BTM} \quad (4.2)$$

Für die Kultivierungen K1-K3 kann über den gesamten untersuchten Kultivierungsbereich die Zelldichte mit dem CRA bestimmt werden.

Der andere entwickelte Algorithmus ist der PCA, dieser zählt die Zellen auf dem ISM-Bildern zur Bestimmung der Zelldichte. Die Ergebnisse des PCA zeigen in den Kultivierungen K1-K3 ein anderes Verhalten als die übrigen gemessenen Werte. Zu Beginn aller drei Kultivierungen steigen die Werte des PCA an. Nach etwa 20 h bis 25 h bleiben die Werte des PCA konstant oder beginnen abzunehmen, während die OD und die BTM weiter steigen (Abbildung 4.5). Zum Ende der drei Kultivierungen nehmen die PCA Werte ab. Der Grund für diesen Verlauf der PCA Daten ist die Clusterbildung der *P.-pastoris*-Zellen: Zu Beginn der Kultivierung gibt es noch sehr viele Einzelzellen und die bereits vorhandenen Zellcluster sind sehr dicht (Abbildung 4.7). Später in der Kultivierung gibt es immer mehr Zellcluster und diese sind auch deutlich dichter, sodass es nicht mehr möglich ist mit dem PCA alle Zellen in diesen Clustern verlässlich zu zählen. In den späten Phasen der Kultivierung nehmen die Zellcluster fast das gesamte Bild ein und sind so dicht, dass quasi keine Einzelzellen mehr vom PCA detektiert werden können. Dies führt zu dem Abfall der PCA Werte am Ende der Kultivierungen. Aus diesem Grund kann der PCA nur für niedrigere Zelldichten zu Beginn der drei *P.-pastoris*-Kultivierungen angewandt werden.



**Abbildung 4.7** ISM-Bilder der Kultivierung K2 nach 5 h, 16 h, 25 h, 32,5 h (von links nach rechts) Kultivierungszeit.



**Abbildung 4.8** Korrelation der Ergebnisse des PCA mit der offline bestimmten OD und der BTM für die Kultivierung K1. Alle Offline-Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt und die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung dieser Messungen. Die lineare Regression wurde nur über den nicht gesättigten Teil der PCA Ergebnisse durchgeführt. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  der linearen Regression beträgt für die BTM 0,87 und für die OD 0,968.

In der Kultivierung K2 sind zwei Spitzen bei 15 h und 35 h zu sehen in denen die Werte des PCA stark ansteigen und dann wieder abfallen. Hierbei handelt es sich um Zellen, die in der Messzone haften geblieben sind. Diese haben sich dort erst gesammelt und wurden dann wieder heraus gewaschen.

Für niedrigere Zelldichten können die Ergebnisse des PCA mit den Offline-Daten korreliert und eine lineare Regression durchgeführt werden. Für die Kultivierung K1 geht dieser Bereich bis zu einer OD von 37,5 und einer BTM von 22,46 g/L (Abbildung 4.8). Die Parameter aller drei linearen Regressionen und ihr Gültigkeitsbereich sind in Tabelle 4.2 dargestellt. Die Parameter der linearen Regression weisen eine hohe Streuung der Werte auf. Die Steigung und der Y-Achsenabschnitt variieren um mehr als 54 % für die Korrelation zwischen PCA Ergebnissen und OD. Für BTM konnten nur lineare Regressionen für K1 und K2 durchgeführt werden. Bei der Kultivierung K3 wurden nicht genug Offline-Messungen für BTM durchgeführt bevor die PCA Ergebnisse die Sättigung erreicht hatten. Die Ursache für die starken Abweichungen der PCA Parameter zwischen den Kultivierungen könnte unterschiedliches Verhalten in der Clusterbildung sein, welches durch unterschiedliches Wachstumsverhalten der *P.-pastoris*-Zellen zustande kommen könnten. Zusätzlich könnten zu Beginn der Kultivierung noch nicht gelöste Medienbestandteile vom Algorithmus fälschlicherweise als Zellen erkannt werden.

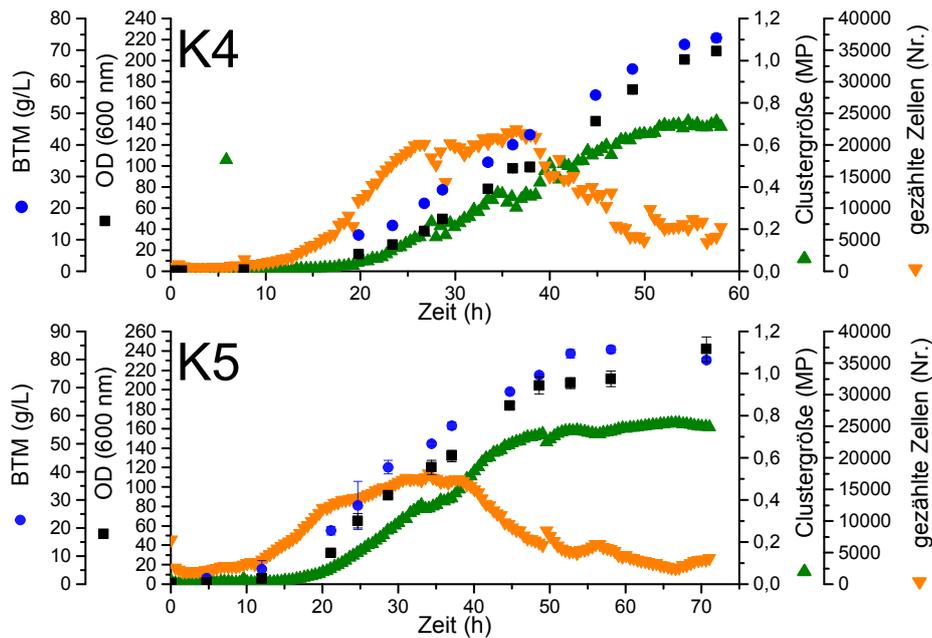
**Tabelle 4.2** Werte der linearen Regressionen der gezählten Zellen des PCA mit der OD und BTM für die Kultivierungen K1-K3. Der Parameter  $m$  ist die Steigung,  $b$  der Y-Achsenabschnitt und  $R^2$  das Bestimmtheitsmaß der Regression. Das  $\sigma$  bezeichnet die Standardabweichung der Regressionsparameter. Der OD-Bereich und der BTM-Bereich geben den niedrigsten und höchsten Wert an, welcher für die Regression noch verwendet wurde.

Parameter	K1	K2	K3	Mittelwert	$\sigma$	$\sigma$ [%]
<b>OD</b>						
$m_{OD}$ [1/Nr.]	0,0063	0,0086	0,0024	0,0058	0,003	54,35
$b_{OD}$ []	-10,78	20,76	-9,9	-13,81	6,03	43,67
$R^2$	0,968	0,98	0,979	0,965	0,012	1,25
OD-Bereich []	7,6-35,48	12,73-55	0,5-37,48			
<b>BTM</b>						
$m_{DCM}$ [g/(Nr. L)]	0,0032	0,0038	-	0,0035	0,00042	12,12
$b_{DCM}$ [g/L]	-2,24	-3,38	-	-2,818	0,8	28,6
$R^2$	0,87	0,987	-	0,928	0,083	8,91
BTM-Bereich [g/L]	8,36-22,46	11,15-32,43				

#### 4.2.2 Kultivierungen K4-K5

Die Kultivierungen K4 und K5 wurden als Fed-Batch Kultivierungen durchgeführt und die Messzonenhöhe des ISM war auf 20  $\mu\text{m}$  eingestellt. Die *P. pastoris*-Zellen gingen in beiden Kultivierungen nach etwa 10 h in die exponentielle Wachstumsphase über (Abbildung 4.9). In K4 wurde nach 28 h die Zufütterung mit 0,2 mL/min gestartet und nach 50 h auf 0,4 mL/min erhöht. In der Kultivierung K5 wurde die Zufütterung nach 34 h mit 0,2 mL/min begonnen und ab Stunde 44 auf 0,6 mL/min erhöht. In Kultivierung K4 konnte so eine finale BTM von 73,8 g/L und in K5 eine finale BTM von 83,5 g/L erreicht werden. Die höhere Zelldichte in K5 ist auf stärkere Zufütterung und eine längere Kultivierungsdauer zurückzuführen.

Der Verlauf der Daten der Bildverarbeitungsalgorithmen zeigt den gleichen Trend wie bei K1-K3. Die Ergebnisse des CRA verhalten sich in beiden Kultivierungen wie die gemessenen OD und BTM Werte. Die Korrelation der beiden Referenzmessungen mit den CRA Ergebnissen, zeigen einen linearen Zusammenhang über den gesamten Kultivierungsverlauf in beiden Kultivierungen (Abbildung 4.10). Das Bestimmtheitsmaß der linearen Regressionen liegt bei allen Korrelationen oberhalb vom 0,96. Die Standardabweichung der Steigung liegt bei der BTM bei 2,81 % und bei der OD bei 0,48 % (Tabelle 4.3). Die Y-Achsenabschnitte weisen mit 38,08 % und 416,96 % eine deutlich größere Streuung auf. Da diese Y-Achsenabschnitte aber auch bei diesen linearen Regressionen klein im Vergleich zur Steigung sind, ist dies für die Bestimmung der Zelldichte anhand der Ergebnisse des CRA in späteren Messungen nicht entscheidend. Daher kann die Zelldichte bei *P. pastoris*-Kultivierungen mit einer Messzonen-

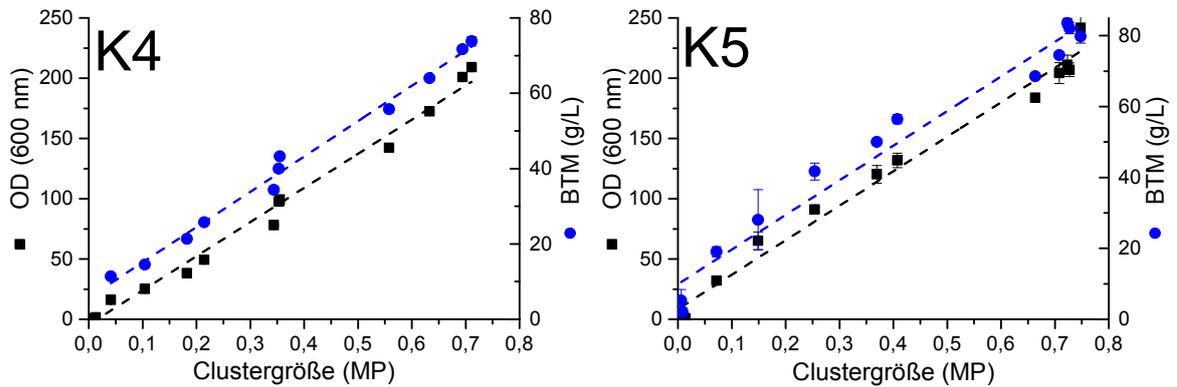


**Abbildung 4.9** Offline-Daten und Algorithmenergebnisse der Kultivierungen K4 und K5. Als Offline-Daten wurden die BTM in g/L und die OD bei 600 nm bestimmt. Alle Offline-Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung dieser Messungen. Die Ergebnisse des CRA in MP und des PCA in gezählten Zellen wurde anhand der ISM-Bilder bestimmt. Die Messzonenhöhe des ISM für diese Kultivierungen wurde auf 20  $\mu\text{m}$  eingestellt.

höhe von 20  $\mu\text{m}$  unter Verwendung der Gleichungen (4.1) und (4.2) berechnet werden. Als Parameter können die Mittelwerte aus Tabelle 4.3 verwendet werden.

Im Vergleich zeigt sich, dass die Parameter der Kultivierungen K4 und K5 (Tabelle 4.3) um etwas 30 % höher liegen als die Parameter der Kultivierungen K1-K3 (Tabelle 4.1). Der wesentliche Unterschied zwischen diesen Messungen ist die Messzonenhöhe, welche bei K1-K3 auf 40  $\mu\text{m}$  und bei K4-K5 auf 20  $\mu\text{m}$  eingestellt wurde. Dies zeigt, dass die Messzonenhöhe einen großen Einfluss auf die Ergebnisse des CRA hat, um eine Vergleichbarkeit von Messungen zu gewährleisten konstant gehalten werden muss. Auch lassen die Daten erkennen, dass die Reproduzierbarkeit der Messungen des CRA bei kleineren Messzonenhöhen besser ist.

Die Ergebnisse des PCA für die Kultivierungen K4 und K5 zeigen einen ähnlichen Verlauf wie bei den Kultivierungen K1-K3. Zu Beginn steigen die vom PCA gezählten Zellen an, nach etwa 25 h bleiben die Werte konstant und fallen dann nach ca. 35 h wieder ab. In K4 liegt die Obergrenze des linearen Bereiches bei 21 g/L BTM und einer OD von 38, für K5 bei 19 g/L BTM und einer OD von 32. Auch bei der Messzonenhöhe von 20  $\mu\text{m}$  können nur die niedrigen Zelldichten zu Beginn der Kultivierung durch den PCA bestimmt werden.



**Abbildung 4.10** Korrelation der Ergebnisse des CRA mit der offline bestimmten OD und der BTM für die Kultivierung K4 und K5. Alle Offline-Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt und Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung dieser Messungen. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  der linearen Regression beträgt bei K4 für die BTM 0,991 und für die OD 0,988. Bei K5 liegt dieser Wert für die BTM bei 0,968 und für die OD bei 0,987.

**Tabelle 4.3** Werte der linearen Regressionen der Clustergröße des CRA mit der OD und BTM für die Kultivierungen K4 und K5. Der Parameter  $m$  ist die Steigung,  $b$  der Y-Achsenabschnitt und  $R^2$  das Bestimmtheitsmaß der Regression. Das  $\sigma$  bezeichnet die Standardabweichung der Regressionsparameter. Der OD-Bereich und der BTM-Bereich geben den niedrigsten und höchsten Wert an, welcher für die Regression noch verwendet wurde.

Parameter	K4	K5	Mittelwert	$\sigma$	$\sigma$ [%]
$m_{OD}$ [1/MP]	283,4	282,26	282,82	0,77	0,28
$b_{OD}$ []	-4,37	11,09	3,36	10,93	325,74
$R^2$	0,988	0,985	0,987	0,0017	0,17
OD-Bereich []	0,54-209	0,9-241,8			
BTM					
$m_{DCM}$ [g/(MP L)]	93,8	96,42	95,1	1,85	1,94
$b_{DCM}$ [g/L]	5,7	10,77	8,24	3,58	43,45
$R^2$	0,9905	0,967	0,979	0,016	1,7
BTM-Bereich [g/L]	11,4-73,8	2,1-83,5			

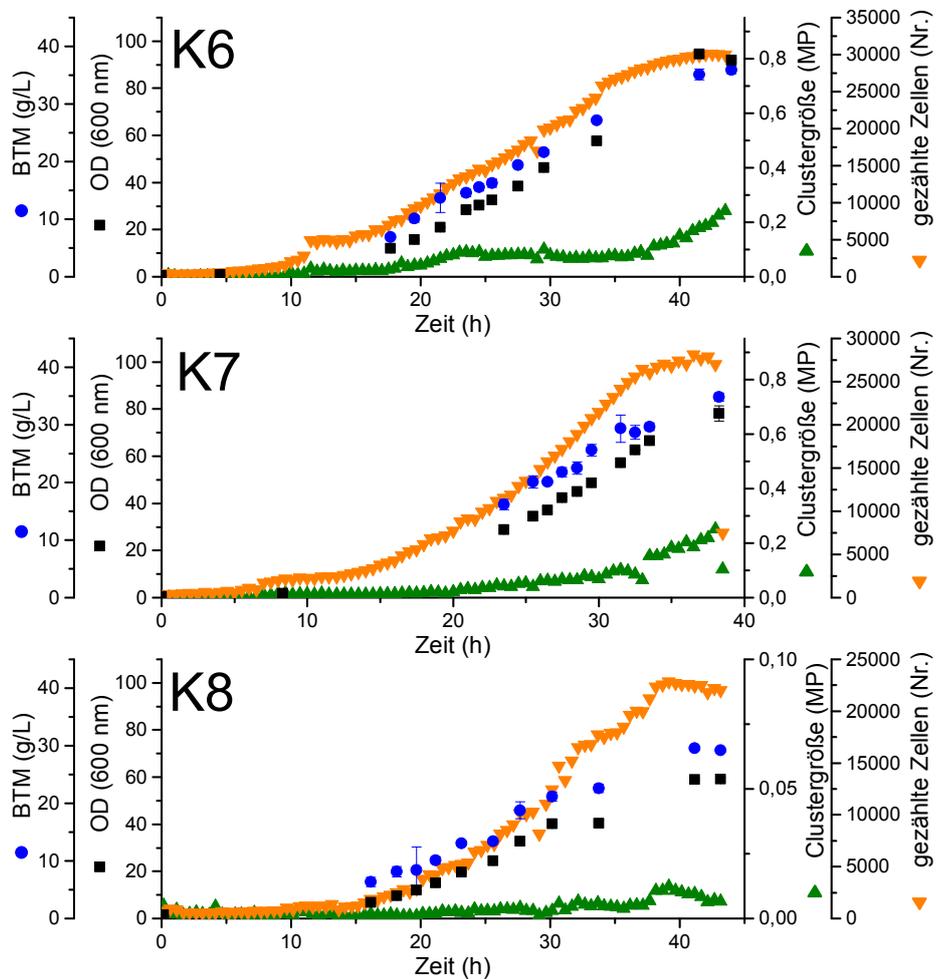
### 4.2.3 Kultivierungen K6-K8

In den Kultivierungen K6-K8 wurde eine Messzonenhöhe von 20 µm verwendet. Die drei Kultivierungen K6-K8 sind sich von ihrem Verlauf sehr ähnlich, unterscheiden sich aber deutlich von den anderen fünf Kultivierungen. Die Zelldichte steigt wesentlich langsamer an, so dass die BTM nach 30 h einen Wert zwischen 20 g/L und 25 g/L erreicht hat (Abbildung 4.11). Die finale Zelldichte von K6-K8 liegt zwischen 28 g/L und 35 g/L, was sogar niedriger ist als bei K1 in der eine Zelldichte von 41,8 g/L erreicht wurde, obwohl bei K1 weniger Glycerol im Medium enthalten war (Tabelle A.3, S. 99). Eine Ursache für das schwache Wachstum der *P.-pastoris*-Zellen in diesen drei Kultivierungen konnte nicht identifiziert werden. Alle Parameter der Kultivierungsprozesse waren identisch zu den anderen fünf Kultivierungen.

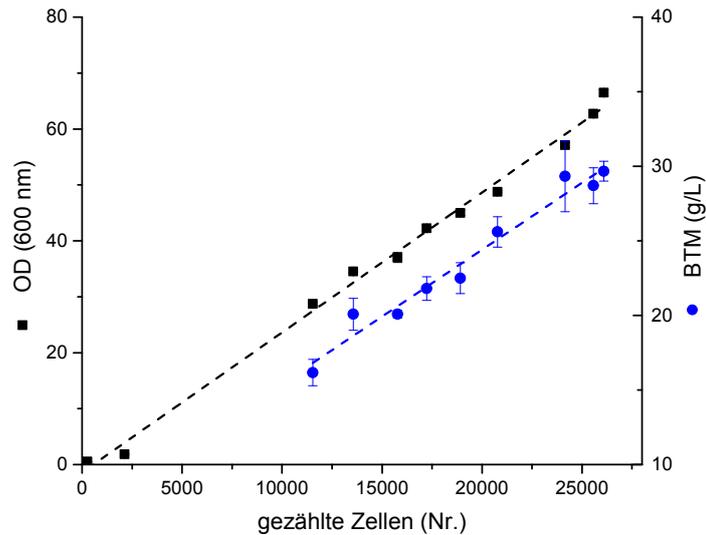
Für die Kultivierungen K6-K8 sind die Werte des CRA bei gleicher Zelldichte deutlich niedriger als bei den Kultivierungen K4-K5. Bei einer BTM von ca. 21 g/L ergeben sich CRA Werte von ca. 0,066 MP für die Kultivierungen K6 und K7 sowie eine 0,0029 MP für K8. Für die gleiche Zelldichte wurde in K4 und K5 mit 0,182 MP und 0,122 MP mindestens doppelt so hohe CRA Werte erreicht. Dies zeigt eine sehr schwache Clusterbildung der *P.-pastoris*-Zellen in den Kultivierungen K6-K8. Eine mögliche Ursache für die geringe Clusterbildung könnte das langsame Wachstum der Zellen sein. Ein solcher Effekt ist allerdings nicht in der Literatur beschrieben, dort wird nur gezeigt, dass die Clusterbildung bei Limitierung der Kohlenstoffquelle auftritt (Garcia-Ortega *et al.* 2013). Eine Limitierung der Kohlenstoffquelle ist in den Kultivierungen K6-K8 nicht gegeben. Aufgrund der schwachen Clusterbildung der Kultivierungen kann keine sinnvolle Korrelation zwischen CRA Ergebnissen und der Zelldichte aufgestellt werden.

Die Ergebnisse des PCA unterscheiden sich ebenfalls deutlich von den anderen fünf Kultivierungen. Die Werte des PCA steigen in K6-K8 über den gesamten Zeitraum zusammen mit der Zelldichte an. Der Hauptgrund für diesen veränderten Verlauf ist die geringere Clusterbildung der *P.-pastoris*-Zellen während der drei Kultivierungen. Wie oben beschrieben, ist die Clusterbildung der Hauptgrund für das Versagen des PCA.

Für alle drei Kultivierungen kann eine lineare Regression in der Korrelation zwischen PCA Daten und den beiden Referenzmessungen OD und BTM durchgeführt werden. Als Beispiel ist die Korrelation für K7 in Abbildung 4.12 dargestellt, dabei zeigt sich, dass die Ergebnisse des PCA über die gesamte Kultivierung die Zelldichte abbilden. Vergleicht man die Steigungen der linearen Regressionen für die OD der drei Kultivierungen zeigt sich eine sehr niedrige Standardabweichung von 2,34 % (Abbildung 4.12). Die Steigung der Regressionen für die BTM ist mit einer Standardabweichung von 13,96 % deutlich höher. Die Ursache für die Abweichungen könnten die deutlich höheren Messfehler bei den BTM



**Abbildung 4.11** Offline-Daten und Algorithmenresultate der Kultivierung K6-K8. Als Offline-Daten wurden die BTM in g/L und die OD bei 600 nm bestimmt. Alle Offline-Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung dieser Messungen. Die Ergebnisse des CRA in MP und des PCA in gezählten Zellen wurde anhand der ISM-Bilder bestimmt. Die Messzonenhöhe des ISM für diese Kultivierungen wurde auf 20  $\mu\text{m}$  eingestellt.



**Abbildung 4.12** Korrelation der Ergebnisse des PCA mit der offline bestimmten OD und der BTM für die Kultivierung K7. Alle Offline-Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung dieser Messungen. Die lineare Regression wurde nur über den nicht gesättigten Teil der PCA Ergebnisse durchgeführt. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  der linearen Regression beträgt für die BTM 0,933 und für die OD 0,961.

Messungen sein, welche besonders bei geringeren Zelldichten auftreten können. Die Y-Achsenabschnitte weisen sowohl bei der OD mit 4194 % als auch bei der BTM mit 115 % eine sehr hohe Standardabweichung auf. Auch hier können unterschiedlich gut gelöste Medienbestandteile zu Beginn der Kultivierungen zu Fehlerkennungen des PCA führen. Da aber auch hier der Y-Achsenabschnitt im Vergleich zur Steigung klein ist, hat dieser nur einen geringen Einfluss.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass für die Kultivierungen K6-K8 eine lineare Korrelation zwischen den PCA Ergebnissen und der Zelldichte vorliegt, welche für die gesamte Kultivierung angewandt werden kann. Somit lassen sich sowohl OD als auch BTM mit den Gleichungen (4.1) und (4.2) beschreiben. Wobei hier anstatt der Clustergröße des CRA die gezählten Zellen des PCA verwendet werden. Als Parameter der Gleichungen sollten auch hier die Mittelwerte der linearen Regressionen verwendet werden (Tabelle 4.4).

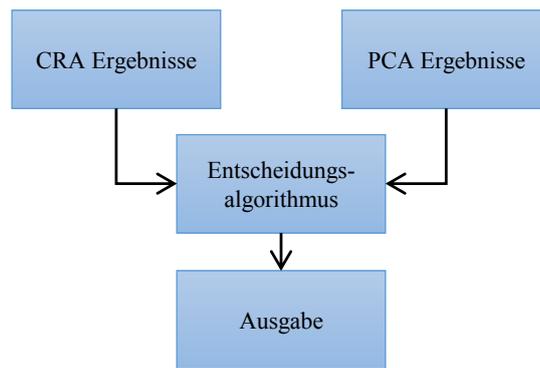
**Tabelle 4.4** Werte der linearen Regressionen der gezählten Zellen des PCA mit der OD und BTM für die Kultivierungen K6-K8. Der Parameter  $m$  ist die Steigung,  $b$  der Y-Achsenabschnitt und  $R^2$  das Bestimmtheitsmaß der Regression. Das  $\sigma$  bezeichnet die Standardabweichung der Regressionsparameter. Der OD-Bereich und der BTM-Bereich geben den niedrigsten und höchsten Wert an, welcher für die Regression noch verwendet wurde.

Parameter	K6	K7	K8	Mittelwert	$\sigma$	$\sigma$ [%]
OD						
$m_{OD}$ [1/Nr.]	0,0024	0,0025	0,00247	0,00252	0,00000577	2,34
$b_{OD}$ []	-3,17	-1,399	4,29	-0,0929	3,9	4194,6
$R^2$	0,984	0,9942	0,9679	0,982	0,013	1,34
OD-Bereich	0,5-57,6	0,5-66,5	1,52-59			
BTM						
$m_{DCM}$ [g/(Nr. L)]	0,00119	0,0009	0,0011	0,00106	0,000148	13,96
$b_{DCM}$ [g/L]	-1,25	6,46	5,93	37,1	4,3	115,9
$R^2$	0,993	0,968	0,973	0,978	0,013	1,32
BTM-Bereich	6,9-35,1	16,2-29,7	6,3-29,6			

#### 4.2.4 Kombierter Algorithmus

Das Wachstumsverhalten der *P.-pastoris*-Zellen hat einen enormen Einfluss auf die Ergebnisse des entwickelten Messverfahrens. Zwei Arten von Kultivierungen konnten identifiziert werden: Schnell wachsende (K1-K5) und langsam wachsende Kultivierungen (K6-K8). In schnell wachsenden Kultivierungen zeigen die *P.-pastoris*-Zellen eine starke Clusterbildung, was zu guten Ergebnissen des CRA führt. Der PCA hingegen wird durch diese Clusterbildung stark gestört. In langsam wachsenden Kultivierungen gibt es quasi keine Clusterbildung, so dass die Zelldichte der Kultivierung nicht durch den CRA bestimmt werden kann. Bei diesen Kultivierungen funktioniert der PCA Algorithmus aber sehr gut. Da sich die Messergebnisse bei beiden Algorithmen je nach Wachstumsverhalten der *P.-pastoris*-Zellen deutlich unterscheiden wird für jedes Wachstumsverhalten eine eigene Kalibration für den PCA bzw. CRA benötigt.

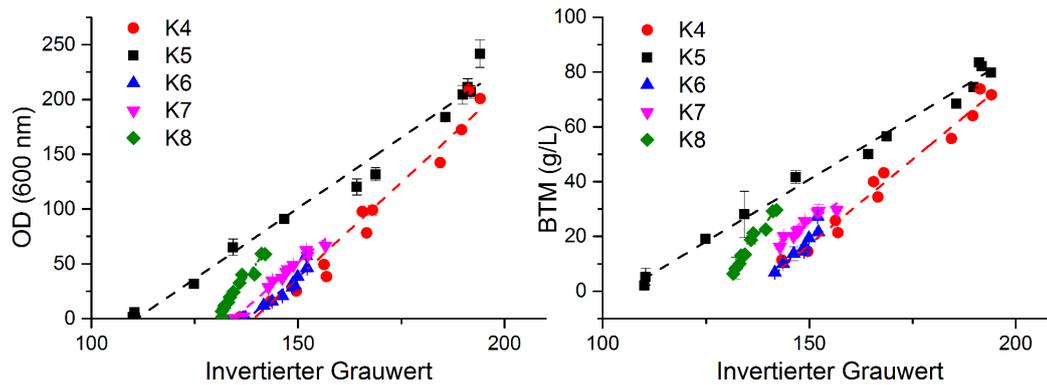
Wenn die Kalibrationen für beide Wachstumsverhalten vorhanden sind, muss immer noch entschieden werden in welchem Wachstumstyp sich die Kultivierung befindet. Eine Möglichkeit wäre es dies anhand von Offline-Messungen zu tun, wie in dieser Arbeit. Allerdings würde das der eigentlichen Idee von Online-Messungen widersprechen und ist daher nicht sinnvoll. Eine andere Alternative ist es einen kombinierten Algorithmus zu entwickeln. Dieser wertet die ISM-Bilder mit beiden Algorithmen aus und nutzt dann die Ergebnisse und weitere Entscheidungskriterien um auszuwählen in welchem Wachstumstyp sich die Zellen befinden (Abbildung 4.13).



**Abbildung 4.13** Konzept des kombinierten Algorithmus aus CRA und PCA unter Verwendung eines erweiterten Entscheidungskriteriums.

Die einfachste Möglichkeit für ein solches Entscheidungskriterium wäre z. B. die Änderung der CRA Werte zu beobachten. Sollte die Änderung unterhalb eines bestimmten Wertes bleiben, dann wird der PCA verwendet. Hierbei gibt es einige Sonderfälle die nicht abgedeckt würden z. B. wenn die Zellen eine Lagphase haben und deshalb keine Änderung auftritt. Damit eine sichere Aussage getroffen werden kann, muss ein Kriterium gefunden werden, dass direkt mit der Zelldichte korreliert und unabhängig von dem Wachstumsverhalten der Zellen ist. Solche Eigenschaften bietet der in Kapitel 5.1 beschriebene Turbidity Algorithm (TA). Dieser Algorithmus hat unter beiden Wachstumsverhalten der *P.-pastoris*-Zellen eine lineare Korrelation zwischen den Ergebnissen des Algorithmus und der Zelldichte (Abbildung 4.14). Dieser Algorithmus kann somit als Entscheidungskriterium verwendet werden. Steigen die Werte des TA an, aber die Werte des CRA bleiben gleich, wird der PCA für die Auswertung verwendet. Steigen sowohl CRA als auch TA Werte an, liegt Clusterbildung vor und die Werte des CRA können zur Zelldichtebestimmung verwendet werden. Der TA ist nicht zur Bestimmung der Zelldichte in *P.-pastoris*-Kultivierungen geeignet. Obwohl in jeder Messung eine lineare Korrelation zwischen Zelldichte und den Ergebnissen des TA besteht, sind die Messungen untereinander nicht reproduzierbar. Daher müsste für jede Messung eine eigene Kalibration mit Offline-Werten durchgeführt werden. Der TA kann somit nicht das Algorithmenpaar CRA und PCA zwecks Zelldichtebestimmung ersetzen, wohl aber als Entscheidungskriterium für den kombinierten Algorithmus dienen.

Mit der Kombination von ISM und den beiden entwickelten Algorithmen konnten die Zelldichte von *P.-pastoris*-Kultivierungen über die gesamte Kultivierung online gemessen werden. Sogar bei Zelldichten von 84 g/L BTM waren keine Anzeichen von Sättigungseffekten in der Messung zu erkennen. Dies ist vergleichbar mit anderen in der Literatur beschriebenen Methoden wie Infrarotspektroskopie (80 g/L BTM) und dielektrischer Spektroskopie (84 g/L BTM) (Crowley *et al.* 2005; Fehrenbach *et al.* 1992). Darüber hinaus bietet die Kombination aus ISM und Bildverarbeitungsalgorithmen noch einige weitere potenti-



**Abbildung 4.14** Korrelation zwischen den Ergebnissen des Turbidity Algorithm (TA) und den Offline-Zelldichtemessungen OD (links) und BTM (rechts) für die Kultivierungen K4-K8. Die Parameter der linearen Regressionen sind in Tabelle B.2 (S. 114).

elle Vorteile. So können Störeinflüsse wie Luftblasen oder kristalline Medienbestandteile durch weitere Bildverarbeitungsalgorithmen wie den Bubble Analyzer (BA) erkannt und aus der Messung entfernt werden. Des Weiteren ist eine Art Metaanalyse für *P.-pastoris*-Kultivierungen denkbar. Wird für die Herstellung eines Produktes ein schnelles Wachstum der *P.-pastoris*-Zellen benötigt, so kann anhand der Clusterbildung der Zellen vorhergesagt werden, ob dieses eine schnell wachsende Kultivierung ist oder nicht.

### 4.3 Fazit

Zur Ermittlung der Zelldichte in *P.-pastoris*-Kultivierungen wurden zwei Bildverarbeitungsalgorithmen entwickelt und auf ISM-Bilder dieser Kultivierungen angewandt. Der Cluster Recognition Algorithm (CRA) erzeugt reproduzierbare Ergebnisse und zeigt sogar bei hohen Zelldichten (OD 240, BTM 84 g/L) keine Sättigungseffekte. Bei niedrigen Wachstumsraten der *P.-pastoris*-Zellen wurde keine Clusterbildung beobachtet, daher konnte der CRA für diese Kultivierungen nicht angewandt werden.

Der Pichia Counter Algorithm (PCA) zählt die *P.-pastoris*-Zellen und wird stark durch deren Clusterbildung gestört. Er kann auf *P.-pastoris*-Kultivierungen mit einer Zelldichte von weniger als 35 g/L BTM angewandt werden. Bei Kultivierungen ohne Clusterbildung konnte mit dem PCA eine gute Reproduzierbarkeit der Messungen erzielt werden. Die Zelldichte in *P.-pastoris*-Kultivierungen kann, abhängig vom Wachstumsverhalten der *P.-pastoris*-Zellen, mit einem der beiden Algorithmen bestimmt werden, solange eine Kalibration für das Wachstumsverhalten existiert. Um die In-situ-Mikroskopie als online Messverfahren für *P.-pastoris*-Kultivierung zu etablieren muss ein kombinierter Algorithmus entwickelt werden, der anhand eines Entscheidungsverfahrens das Wachstumsverhalten der *P.-pastoris*-Zellen

erkennt und zwischen CRA und PCA wechselt. Als eine solche Entscheidungshilfe kann der Turbidity Algorithm (TA) fungieren, welcher in Kapitel 5.1 beschrieben ist.

Um die Stabilität der Messungen zu erhöhen, könnten zusätzliche Bildverarbeitungsalgorithmen auf die ISM-Bilder angewandt werden um Luftblasen und kristalline Medienbestandteile auf den Bildern zu erkennen und herauszurechnen. Des Weiteren könnten in zukünftigen Arbeiten weitere Bildinformationen wie die Grauwertverteilung der ISM-Bilder verwendet werden, um die Stabilität und Genauigkeit des Messverfahrens noch weiter zu verbessern.

Insgesamt konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass die In-situ-Mikroskopie in Kombination mit passenden Bildverarbeitungsalgorithmen ein geeignetes Werkzeug zur online Zelldichtebestimmung in *P.-pastoris*-Kultivierungen ist, sogar im Hochzelldichtebereich.

## 5 Hochzelldichtemessungen in *E.-coli*-Kultivierungen mittels In-situ-Mikroskopie

Das gram-negative Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) gehört zu den bestuntersuchten Organismen in der Biotechnologie. Es wird sowohl für die meisten molekularbiologischen Arbeiten im Labor als auch als Organismus zur heterologen Proteinexpression in der Bioprosesstechnik verwendet. So werden ca. 30 % der heterolog hergestellten, zugelassenen therapeutischen Proteine in *E. coli* produziert (Baeshen *et al.* 2015).

*E. coli* wächst auf günstigen Medien und erreicht hohe Wachstumsraten. Hierbei können sehr hohe Zelldichten von bis zu 190 g/L BTM erreicht werden (Shiloach und Fass, 2005). Des Weiteren können sehr hohe Proteinlevel in *E. coli* erreicht werden. Dabei kann das Zielprotein bis zu 30 % des gesamten Zellproteins sein (Rodríguez *et al.* 2014). Aufgrund der vielen kommerziell verfügbaren Vektoren lassen sich *E.-coli*-Zellen schnell genetisch modifizieren (Baeshen *et al.* 2015). Durch genetische Modifikationen konnten *E.-coli*-Stämme erzeugt werden, die postrtranslationale Modifikationen wie Glykolysierung durchführen können (Wacker, 2002). Valderrama-Rincon *et al.* (2012) konnten einen *E.-coli*-Stamm so modifizieren, dass dieser ein eukariotisches Glykolysierungsmuster erzeugt.

Die hohen Zelldichten von über 190 g/L BTM, die von *E. coli* erreicht werden können, stellen eine Herausforderung für die Online-Prozessüberwachung dar. Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Techniken beschrieben. Beispiele hierfür sind Trübungssonden, 2D-Fluoreszenzspektroskopie, Infrarotspektroskopie, dielektrische Spektroskopie und Softsensoren (Yamane *et al.* 1992; Marose *et al.* 1998; Arnold *et al.* 2002; Siano, 1997; Jenzsch *et al.* 2006). Jede dieser Methoden bringt Vor- und Nachteile mit sich und keine bietet eine perfekte Lösung für alle Kultivierungsbedingungen. Daher besteht immer noch Bedarf an neuen Online-Messmethoden für die Zelldichtebestimmung in *E.-coli*-Kultivierungen.

In diesem Kapitel wird die Kombination aus In-situ-Mikroskopie und Bildverarbeitungsalgorithmen eingesetzt, um die Zelldichte in Hochzelldichtekultivierungen von *E. coli* online zu messen.

## 5.1 Algorithmus

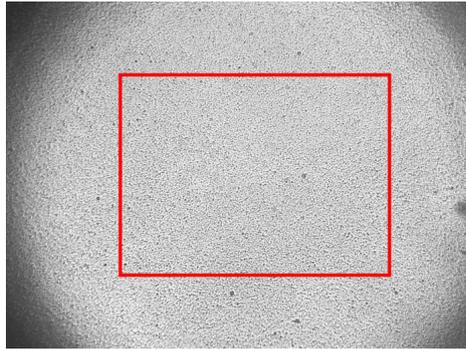
Um die Zelldichte in *E.-coli*-Kultivierungen anhand von ISM-Bildern zu bestimmen, wurde der Turbidity Algorithm (TA) entwickelt. Mit ihrer Größe von ca.  $1\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$  sind die *E.-coli*-Zellen zu klein, um vom 10x Objektiv des ISM aufgelöst zu werden (Reshes *et al.* 2008). Deshalb ist das direkte Zählen der *E.-coli*-Zellen nicht möglich. Um dennoch die Zelldichte anhand der ISM-Bilder bestimmen zu können, nutzt der TA die Helligkeits- bzw. Grauwertverteilung der ISM-Bilder (Abbildung 5.1).



Abbildung 5.1 Fließschema des Turbidity Algorithm (TA).

Im ersten Schritt wird das ISM-Bild in ein Graustufenbild umgewandelt, falls dieses nicht schon als solches aufgenommen wurde. Im nächsten Schritt wird das Bild zugeschnitten. Dies geschieht aufgrund des Beleuchtungsgradienten in den Bildern, welcher dazu führt, dass die Bilder am Rand deutlich dunkler sind als in der Mitte (Abbildung 5.2). Für die weiteren Berechnungen wird nur der homogene Bereich in der Mitte des Bildes verwendet. Nun wird aus allen Pixeln innerhalb dieses Bereiches der mittlere Grauwert berechnet. Im letzten Schritt wird der mittlere Grauwert in den invertierten Grauwert überführt, unter Verwendung von Formel 5.1. Dies hat zur Folge, dass ein hoher Wert für einen dunklen Pixel steht und nicht mehr für einen hellen wie es vor der Invertierung der Fall war. Dieser Schritt wird durchgeführt, um eine positive Korrelation zwischen dem Ergebnis des TA und der Zelldichte zu erhalten. Ein höherer invertierter Grauwert ist gleich bedeutend mit einer höheren Zelldichte.

$$\text{invertierter Grauwert} = 255 - \text{mittlerer Grauwert} \quad (5.1)$$

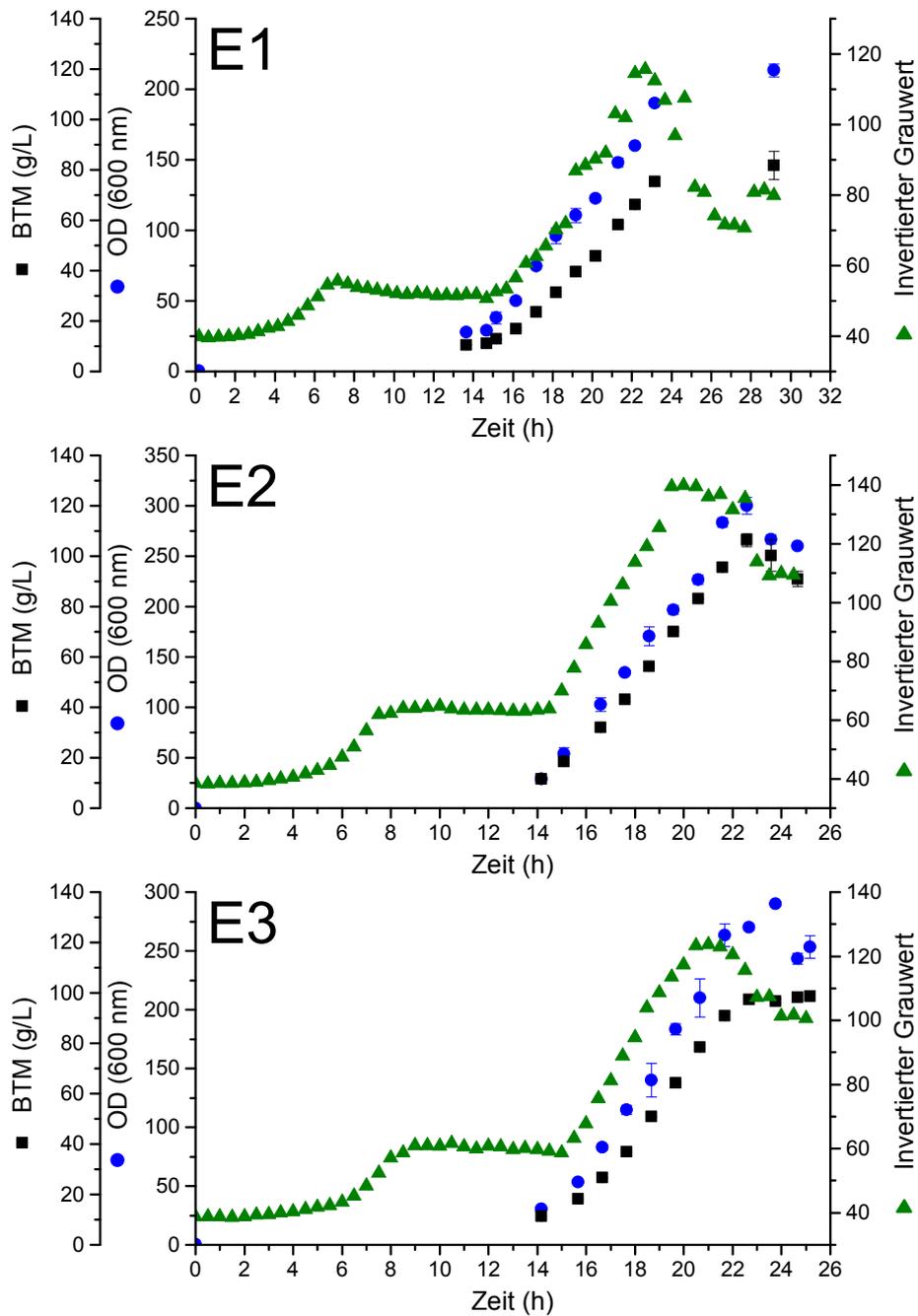


**Abbildung 5.2** ISM-Bild aus Kultivierung E1. Das rote Viereck markiert den Bereich der für die weiteren Berechnungen des TA verwendet wird.

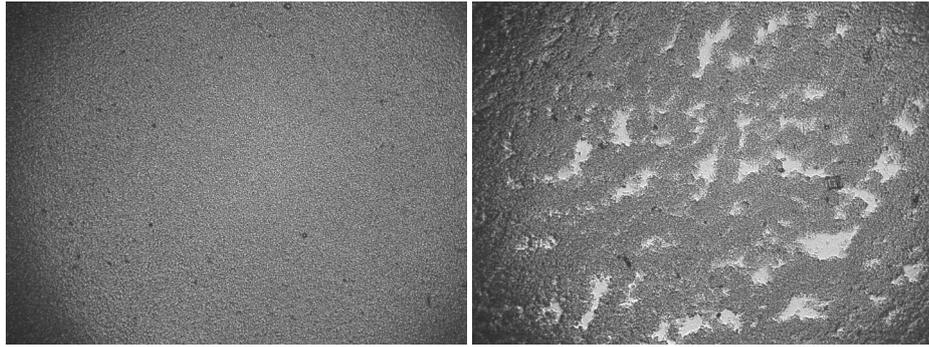
## 5.2 Ergebnisse und Diskussion

Zur Validierung des entwickelten Turbidity Algorithm (TA) wurde dieser auf drei *E.-coli*-Fed-Batch-Kultivierungen angewandt. Dafür wurde bei drei Kultivierungen das ISM verwendet und die Zelldichte anhand der aufgenommen ISM-Bilder mit dem TA bestimmt. Als Referenz wurden anhand von Offline-Proben die optische Dichte (OD) und die Biotrockenmasse (BTM) in den Kultivierungen bestimmt. Die Offline-Daten und die Ergebnisse des TA der *E.-coli*-Kultivierungen E1-E3 sind in Abbildung 5.3 dargestellt..

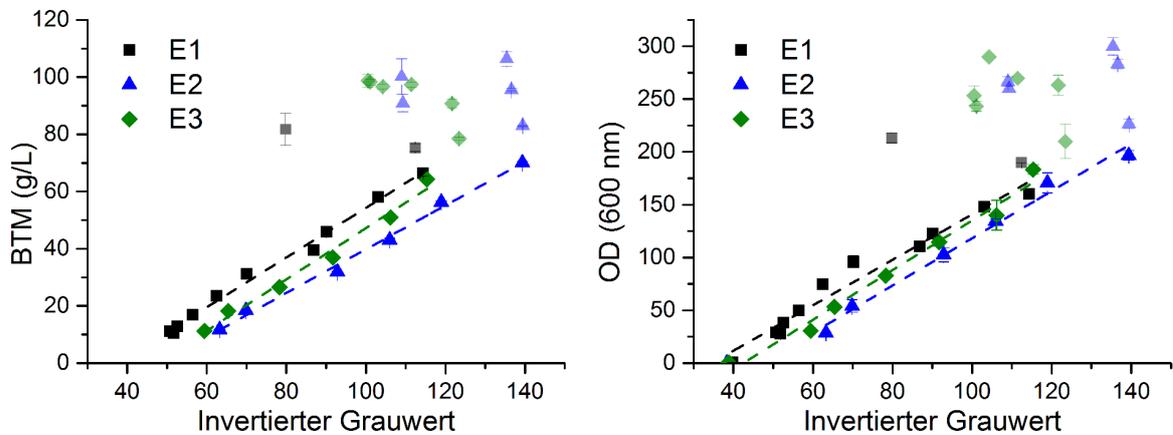
Betrachtet man den Verlauf der invertierten Grauwerte in allen drei Kultivierungen, bilden sie den typischen Verlauf einer Bakterienkultivierung ab. Zu Beginn der Kultivierung befinden sich die Zellen in der Lag-Phase und der invertierte Grauwert bleibt quasi konstant. Nach ca. 3 h erreichen die *E.-coli*-Zellen die exponentielle Wachstumsphase. Bei ca. 8 h gehen die Zellen in eine stationäre Phase über. Zu diesem Zeitpunkt ist die Glukose im Medium vollständig verbraucht. Die stationäre Phase endet nach 14 h, sobald die Zugabe des Feed-Mediums gestartet wurde. Die *E.-coli*-Zellen beginnen erneut zu wachsen und der invertierte Grauwert steigt wieder. In dieser Phase zeigt der invertierte Grauwert den gleichen Verlauf wie die OD und BTM Messungen. Nach 19 h bis 22 h bleiben die invertierten Grauwerte konstant, wohingegen die gemessene OD und BTM in allen drei Kultivierungen weiter steigt. Dies ist ein klares Zeichen für einen Sättigungseffekt des verwendeten Messverfahrens. Zum Ende der drei Kultivierungen beginnen die invertierten Grauwerte des TA wieder zu sinken. Der Grund dafür ist eine starke Blasenbildung in der Messzone, welche durch die erhöhte Viskosität des Mediums bei den hohen Zelldichten verursacht wird (Abbildung 5.4). Am Ende der Kultivierung E2 und E3 nehmen nicht nur die invertieren Grauwerte ab, sondern auch die gemessenen OD und BTM Werte. Hierbei handelt es sich vermutlich um Messfehler, die beim Pipettieren der stark viskosen Zellbrühe entstanden sind.



**Abbildung 5.3** Offline-Daten und Algorithmenergebnisse der *E.-coli*-Kultivierungen E1-E3. Als Offline-Daten wurden die BTM in g/L und die OD bei 600 nm bestimmt. Alle Offline-Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung dieser Messungen. Die Ergebnisse des TA wurden anhand der ISM-Bilder der Kultivierungen berechnet.



**Abbildung 5.4** Beispielbilder aus der Kultivierung E2. Links: ISM-Bild nach 19,5 h mit einer BTM von 70,1 g/L und einem invertierten Grauwert von 126. Rechts: ISM-Bild nach 23,5 h mit einer BTM von 100,2 g/L und einem invertierten Grauwert von 116. Die hellen Bereiche sind Luftblasenblasen und führen trotz höherer Zelldichte zu einem niedrigeren invertierten Grauwert. Die Blasen entstehen vermutlich durch die hohe Viskosität des Mediums zu diesem Zeitpunkt.



**Abbildung 5.5** Korrelation der Ergebnisse des TA mit der offline gemessenen BTM (links) und OD (rechts) für die Kultivierungen E1-E3. Alle Offline-Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt und die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung dieser Messungen. Die lineare Regression wurde nur über den nicht gesättigten Teil der TA Ergebnisse durchgeführt (Tabelle 5.1).

Für alle drei Kultivierungen wurden Korrelationen zwischen den Ergebnissen des TA und den beiden offline gemessenen Größen OD und BTM durchgeführt (Abbildung 5.5). Hierbei zeigt sich, dass bis zu einer OD von ca. 200 bzw. einer BTM von etwa 70 g/L ein ähnlicher Verlauf zwischen diesen beiden Größen und den Ergebnissen des TA vorliegt. Für höhere Zelldichte kann aufgrund der Sättigungseffekte und der Luftblasenbildung kein Zusammenhang zwischen den Ergebnissen des TA und den Offline-Daten hergestellt werden. Für die Datenpunkte bis 70 g/L BTM bzw. OD bis 200 wurde für jede Kultivierung eine lineare Regression durchgeführt (Tabelle 5.1).

Die Bestimmtheitsmaße  $R^2$  der linearen Regressionen liegen bei der BTM bei allen drei Kultivierungen bei 0,99 und bei der OD zwischen 0,965 und 0,983. Dies ist ein klarer Indikator dafür, dass ein linearer Zusammenhang zwischen den Ergebnissen des TA und

**Tabelle 5.1** Werte der linearen Regressionen des invertierten Grauwertes des TA mit der OD und BTM für die Kultivierungen E1-E3. Der Parameter  $m$  ist die Steigung,  $b$  der Y-Achsenabschnitt und  $R^2$  das Bestimmtheitsmaß der Regression. Das  $\sigma$  bezeichnet die Standardabweichung der Regressionsparameter. Der OD-Bereich und der BTM-Bereich geben den niedrigsten und höchsten Wert an, welcher für die Regression noch verwendet wurde.

Parameter	E1	E2	E3	Mittelwert	$\sigma$	$\sigma$ [%]
OD						
$m_{OD}$ []	2,15	2,1	2,36	2,2	0,13	5,90
$b_{OD}$ []	-74,43	-90,22	-99,58	-88,08	12,71	14,43
$R^2$	0,965	0,986	0,983	0,978	0,0112	1,16
OD-Bereich []	0,39-160	0,17-196,7	0,5-183			
BTM						
$m_{DCM}$ [g/L]	0,87	0,77	0,9	0,84	0,068	8,04
$b_{DCM}$ [g/L]	-32,48	-36,82	-42,46	-37,25	5	13,43
$R^2$	0,99	0,99	0,99	0,99	0	0
BTM-Bereich [g/L]	10,55-66,33	11,67-70,1	11,23-64,27			

beiden Offline-Referenzen BTM und OD besteht. Die Standardabweichungen zwischen den einzelnen Steigungen liegen für die OD bei 5,9 % und für die BTM bei 8,04 % und deuten damit auf eine gute Reproduzierbarkeit der Messungen hin. Dies zeigt sich auch bei den Y-Achsenabschnitten, diese zeigen eine Standardabweichung von 14,42 % bzw. 13,43 %. Der Grund dafür könnten kleine Variationen in der Medienzusammensetzung sein. Eine andere Möglichkeit könnte ein verändertes Wachstumsverhalten der *E.-coli*-Zellen sein. Insgesamt kann bis zu einer OD von 200 und einer BTM von 70 g/L von einem linearen Zusammenhang zwischen diesen Größen und dem berechneten invertierten Grauwert ausgegangen werden. Daher kann der invertierte Grauwert des TA mit den Gleichungen (5.2) und (5.3) verwendet werden um die OD und die BTM mittels ISM online zu bestimmen. Die Parameter der beiden Gleichungen können aus den Mittelwerten der linearen Regressionen der Kultivierungen E1-E3 bestimmt werden (Tabelle 5.1).

$$OD_{600} = m_{OD} \cdot \text{invertierter Grauwert} + b_{OD} \quad (5.2)$$

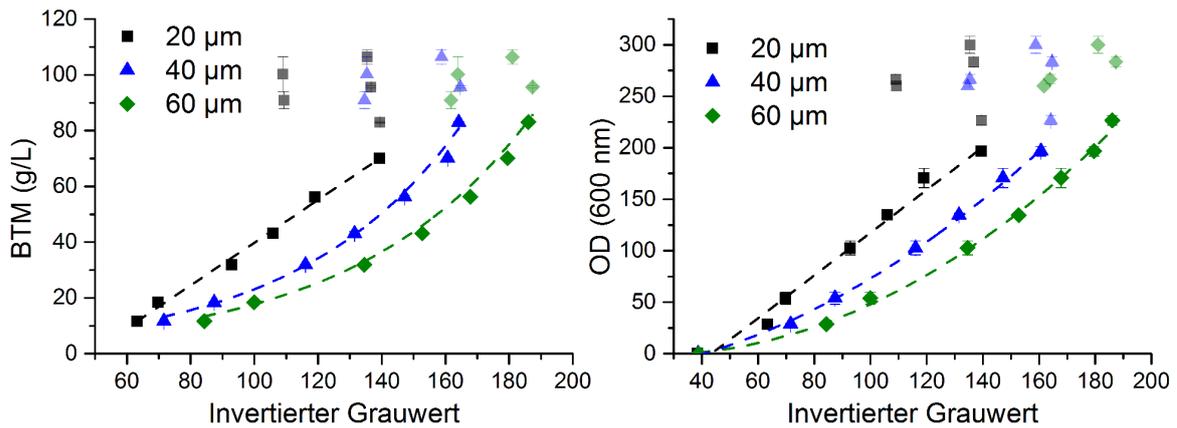
$$BTM = m_{BTM} \cdot \text{invertierter Grauwert} + b_{BTM} \quad (5.3)$$

Die Sättigung bei 70 g/L BTM kommt vermutlich nicht durch die Bildaufnahme und auch nicht durch die Auswertung der ISM-Bilder durch den TA zustande. Der invertierte Grauwert ist in allen drei Kultivierungen bei 70 g/L BTM erst bei 140, was ca. 55 % des maximalen Messwertes entspricht. Aus diesem Grund wird angenommen, dass die Sättigungseffekte

auf andere Effekte zurückzuführen sind. Eine Möglichkeit wäre, dass Zellcluster den Eingang zur Messzone blockieren. Ein anderer Grund könnte das hydrodynamische Verhalten des stark viskosen Mediums zum Ende der Kultivierung sein. Dies könnte dazu führen, dass sich ein Nebenstrom um die schmale Messzone herum bildet.

Um zu testen, ob eine größere Messzonenhöhe die Messung höherer Zelldichten ermöglicht und um den generellen Einfluss der Messzonenhöhe zu untersuchen, wurden in der Kultivierung E2 neben der Messzonenhöhe von 20  $\mu\text{m}$  noch zusätzlich Messungen mit einer Messzonenhöhe von 40  $\mu\text{m}$  und 60  $\mu\text{m}$  durchgeführt. Die Korrelationen mit den Offline-Messungen zeigen, dass die Messzonenhöhe einen großen Einfluss auf die invertierten Grauwerte hat (Abbildung 5.6). Bei gleicher Zelldichte steigt der invertierte Grauwert mit der Messzonenhöhe. Der Grund dafür ist, dass sich bei größerer Messzonenhöhe mehr Zellen in der Messzone befinden und dadurch mehr Licht absorbiert bzw. gestreut wird. Auch bei der mathematischen Beschreibung zeigen sich Unterschiede sowohl zwischen den Messzonenhöhen als auch zwischen OD und BTM. Der Verlauf der BTM lässt sich für die Messzonenhöhe von 40  $\mu\text{m}$  und 60  $\mu\text{m}$  am besten mit einer Exponentialfunktion beschreiben. Die OD hingegen kann bei diesen Messzonenhöhen am besten mit einem Polynom 2. Grades beschrieben werden. Bei der OD-Messung gibt es einen zusätzlichen Datenpunkt zu Beginn der Kultivierung bei dem die Zelldichte noch sehr niedrig ist. Dieser Datenpunkt existiert bei der BTM-Messung nicht und könnte der Grund dafür sein, dass eine polynomische Regression den Verlauf der OD-Daten besser beschreibt als die exponentielle Regression. Alle Regressionsfunktionen und ihre Parameter sind in Tabelle B.3 (S. 115) dargestellt. Zusätzlich ermöglichen die größeren Messzonenhöhen einen größeren Messbereich. Bei einer Messzonenhöhe von 60  $\mu\text{m}$  wird die Sättigung der Messung erst bei einer BTM von 83 g/L und einer OD von 226,7 erreicht, dies ist in beiden Fällen eine Erhöhung des Messbereiches von ca. 20 %.

Insgesamt zeigt dies, dass die Messzonenhöhe einen großen Einfluss auf die Messungen hat und daher für reproduzierbare Messungen immer konstant gehalten werden muss. Zusätzlich sollten noch weitere Messzonenhöhen und deren Einfluss auf die mathematische Beschreibung der Messungen untersucht werden. Eine zusätzliche Verbesserung der Messgenauigkeit und des Messbereichs könnte durch Verwendung eines Algorithmus, welcher Luftblasen detektiert und die Bildbereiche mit den Luftblasen aus der Berechnung ausschließt, erreicht werden. Dieser könnte ähnlich zum entwickelten Bubble Analyzer (BA) (S. 110) aufgebaut werden, mit dem Unterschied, dass er helle und nicht wie bisher, dunkle Bereiche detektiert.



**Abbildung 5.6** Korrelation der Ergebnisse des TA mit der offline gemessenen BTM (links) und OD (rechts) für die Kultivierungen E2 bei drei verschiedenen Messzonenhöhen. Alle Offline-Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt und die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung dieser Messungen. Es wurden verschiedenen Regressionen für die einzelnen Datenreihen durchgeführt (Tabelle B.3 S. 115).

### 5.3 Fazit

Um die Zelldichte in *E.-coli*-Kultivierungen anhand von ISM-Bildern zu ermitteln, wurde der Turbidity Algorithm (TA) entwickelt. Dieser Algorithmus bestimmt die Zelldichte anhand der Grauwertverteilung der ISM-Bilder, was den Vorteil hat, dass eine Auflösung einzelner *E.-coli*-Zellen auf den Bildern nicht notwendig ist.

Das entwickelte Messverfahren wurde auf drei *E.-coli*-Kultivierungen angewandt. Hierbei konnte eine gute Reproduzierbarkeit zwischen den drei Messungen festgestellt werden. Die Standardabweichung der Steigungen der linearen Regressionen betrug 8% für die BTM und 5,9% für die OD. Insgesamt konnte bei den verwendeten ISM-Einstellungen eine obere Messgrenze von 70 g/L BTM und einer OD von 200 ermittelt werden. Bei höheren Zelldichten stellte sich eine Sättigung der Ergebnisse des TA ein.

Zusätzlich wurde der Einfluss der Messzonenhöhe des ISM auf die Messungen untersucht. Hierbei wurde gezeigt, dass bei größerer Messzonenhöhe noch höhere Zelldichten von bis zu 83,5 g/L BTM und einer OD von 226,7 mit dem System erfasst werden können. Allerdings liegt bei einer größeren Messzonenhöhe keine lineare Korrelation zwischen den Ergebnissen des TA und den Offline-Messungen vor, sondern eine Exponentialfunktion für die BTM und eine Polynomfunktion 2. Grades für die OD.

Zum Ende der Kultivierungen bilden sich Luftblasen in der Messzone, welche die Messungen stören und zu einem Abfall der Messergebnisse führen. Diese Blasenbildung ist vermutlich auf die Kombination aus starker Begasung und hoher Viskosität der Zellbrühe zurückzuführen. Ein Algorithmus zur Blasenerkennung ähnlich zum BA könnte diesen Störfaktor reduzieren.

Insgesamt konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass die In-situ-Mikroskopie in Kombination mit dem entwickelten Turbidity Algorithm (TA) eine geeignete Messmethode ist, um die Zelldichte in Hochzelldichtekultivierungen von *E. coli* zu beobachten.

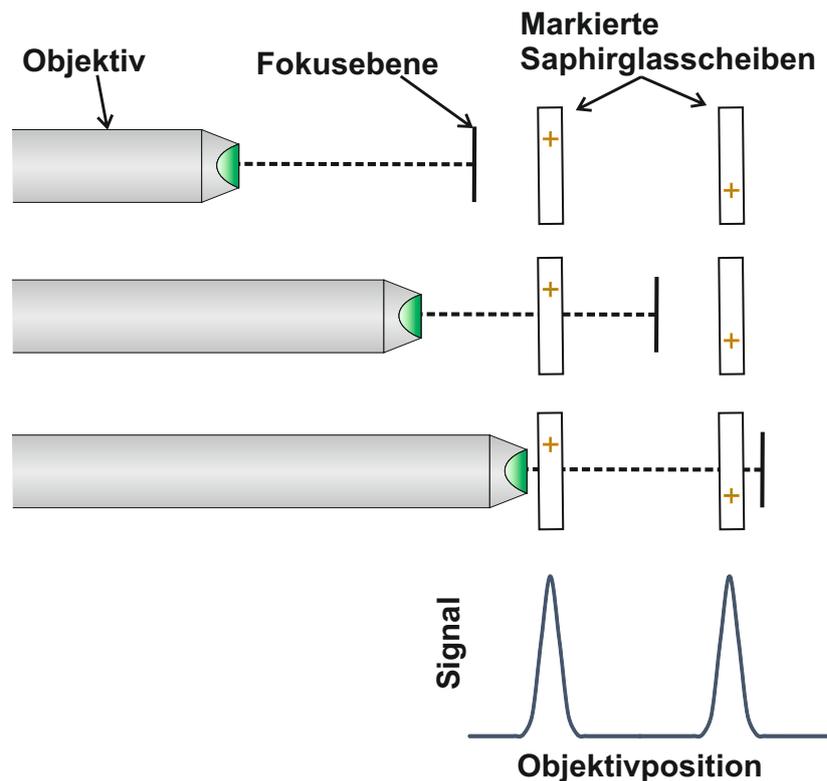
## **6 Automatisierte Bestimmung der Messzonenhöhe beim In-situ-Mikroskop-TT**

Wie in den vorherigen Kapiteln gezeigt, hat die Messzonenhöhe einen großen Einfluss auf die Ergebnisse von Messungen mit dem ISM. Daher ist eine exakte Einstellung der Messzonenhöhe notwendig um reproduzierbare Messungen zu gewährleisten. Die im ISM-TT verwendeten Schrittmotoren ermöglichen das exakte Anfahren von Positionen mit einer Genauigkeit von  $1\ \mu\text{m}$ . Da allerdings sowohl der Innentubus als auch der Außentubus mittels Klemmschrauben mit den Schrittmotoren verbunden werden, gibt es ein mechanisches Spiel. Dieses Spiel wird benötigt damit sich die Teile verbinden lassen und kann aus technischen Gründen nicht vermieden werden. Das mechanische Spiel sorgt dafür, dass sich die Messzonenhöhe bei gleichen Motorpositionen um mehrere  $100\ \mu\text{m}$  unterscheiden kann. Daher ist es notwendig vor jeder Messung die tatsächliche Messzonenhöhe zu ermitteln. Dies erfolgte bisher immer manuell indem durch Verschiebung der Fokusebene die Saphirglasscheiben der beiden Tubi gesucht wurden. Dieses Verfahren ist sehr zeitaufwendig und benötigt viel Training um es reproduzierbar umzusetzen. Zusätzlich ist bei diesem manuellen Verfahren notwendig, dass sich kleinere Verunreinigungen auf den Saphirglasscheiben befinden, da es sonst nicht möglich ist den Übergang von Saphirglasscheibe zu Medium zu erkennen.

Um den Prozess der MesszonenhöhenEinstellung zu erleichtern und zu automatisieren, wurde ein neues Einstellverfahren entwickelt. Das Verfahren nutzt Markierungen die mittels Laser auf das Saphirglas aufgebracht wurden und einen Bildverarbeitungsalgorithmus um den Abstand zwischen den beiden markierten Saphirglasscheiben zu bestimmen. Aus diesem Abstand kann dann die Messzonenhöhe berechnet werden.

### **6.1 Messkonzept und Algorithmus**

Das entwickelte Messkonzept basiert auf der gleichen Idee wie die zuvor beschriebene manuelle Einstellung der Messzonenhöhe. Die Position der Saphirglasscheiben wird ebenfalls durch das Verfahren des Objektivs und dessen Fokusebene ermittelt. Im Unterschied zum manuellen Verfahren wurden Markierungen auf den Saphirglasscheiben eingebracht, welche

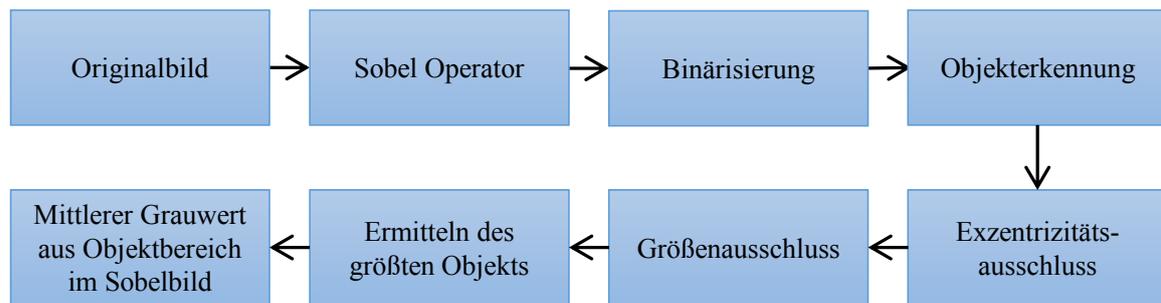


**Abbildung 6.1** Messprinzip zur Ermittlung des Abstandes zwischen den beiden Saphirglasscheiben. Das Objektiv des ISM wird schrittweise auf die Saphirglasscheiben zubewegt. Sobald die Markierungen auf den Scheiben in der Fokusebene liegen, werden sie vom Algorithmus erkannt und dieser liefert ein Signal. Anhand der Signalstärke und Objektivposition kann nun der Abstand zwischen beiden Saphirglasscheiben berechnet werden.

über einen Bildverarbeitungsalgorithmus detektiert werden können. Dies hat zur Folge, dass das Verfahren vollautomatisch ablaufen kann (Abbildung 6.1).

Zu Beginn des Verfahrens verfährt der Schrittmotor das Objektiv in die Startposition. In dieser Position liegt die Fokusebene des Objektivs vor der Saphirglasscheibe des Innentubus. Dann wird die Bildaufnahme gestartet, dafür wird das Objektiv schrittweise näher zur Saphirglasscheibe bewegt. In jedem Schritt wird ein Bild aufgenommen und mit dem Bildverarbeitungsalgorithmus ausgewertet. Das Ergebnis des Bildverarbeitungsalgorithmus und die dazugehörige Position des Objektivschrittmotors wird gespeichert. Dieser Vorgang wird solange wiederholt bis das Objektiv seine Endposition kurz vor der Saphirglasscheibe des Innentubus erreicht hat. Im letzten Schritt werden nun die beiden Maxima der gespeicherten Algorithmenergebnisse gesucht. Der Abstand der beiden Saphirglasscheiben ergibt sich dann aus der Differenz der Schrittmotorpositionen der beiden Maxima.

Die Genauigkeit dieses Verfahrens ist stark von der Positionsgenauigkeit der verbauten Schrittmotoren abhängig. Diese liegt bei den Schrittmotoren des ISM-TT bei  $0,1 \mu\text{m}$  (Physik Instrumente GmbH & Co. KG, 2015). Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Markierung auf



**Abbildung 6.2** Fließdiagramm des entwickelten Algorithmus zur Verarbeitung von Scheibenmarkierungen.

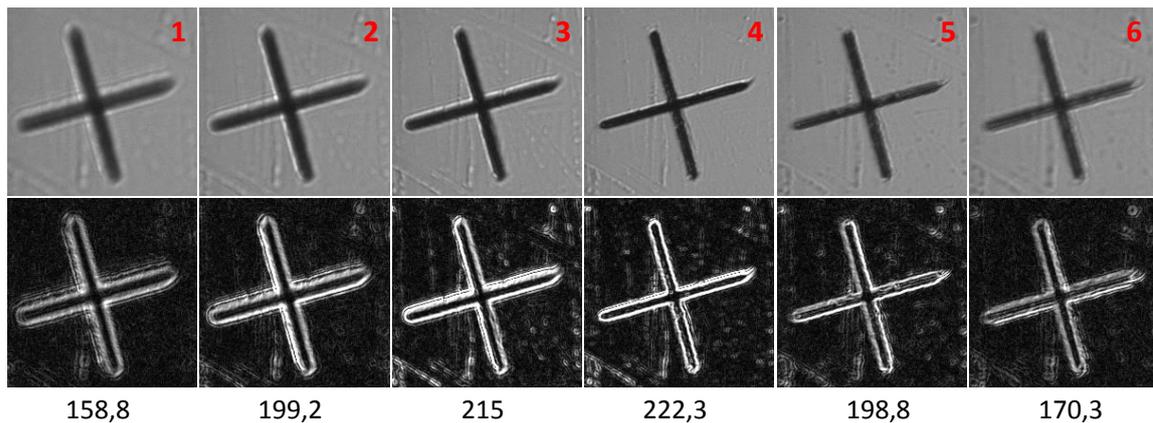
den Saphirglasscheiben. Diese sollte für den Window Marker Analyzer (WMA) auf den ISM-Bildern gut detektierbar sein, damit eine Auswertung möglich ist. Allerdings darf sie nicht so stark sein, dass die eigentliche Messung beeinträchtigt wird, indem die Markierung z. B. einen Großteil des Bildes verdunkelt. Deshalb sollte die Markierung auf der Seite der Saphirglasscheibe aufgebracht werden, die keinen Kontakt mit dem Prozessmedium hat und somit die Markierung während der eigentlichen ISM-Messungen weit außerhalb der Fokusebene liegt.

Die Markierung auf den Saphirglasscheiben wurde mittels Lasergravur aufgebracht. Das finale Gravurmuster wurde in Kooperation mit Dr. Jürgen Koch vom Laser Zentrum Hannover e.V. entwickelt und von diesem auf die Scheiben aufgebracht.

### 6.1.1 Algorithmus

Für die Detektion der Scheibenmarkierungen wurde der Algorithmus WMA entwickelt. Dieser Algorithmus bestimmt die Kantenschärfe der Lasermarkierung auf der Scheibe. Je mehr die Markierung im Fokus des Objektivs liegt, desto größer ist die Kantenschärfe. So kann die Position der Markierung bestimmt werden. Die einzelnen Schritte des Algorithmus sind in Abbildung 6.2 dargestellt.

Im ersten Schritt wird ein Sobel-Operator auf das Originalbild angewandt, um die Kanten in diesem Bild hervorzuheben. Je deutlicher die Kante, also je schärfer der Übergang von hell zu dunkel ist, desto heller wird der Bereich im Sobelbild. Im nächsten Schritt wird auf dieses Sobelbild ein Schwellenwertverfahren angewandt. Dadurch wird das Bild von einem Graustufenbild in ein Binärbild umgewandelt. Auf diesem Binärbild wird nun eine Objekterkennung unter Verwendung der Moore-Nachbarschaft durchgeführt. Dabei werden alle benachbarte Pixel zu einem Objekt zusammengefügt. Im Anschluss werden Objekte anhand ihrer Größe und ihrer Kompaktheit eliminiert. Objekte die kleiner als 10 Pixel sind können nicht die Markierung sein. Objekte die rund sind, also eine Kompaktheit unter 6 haben, fallen eben so raus wie Objekte die sehr länglich sind und dadurch eine

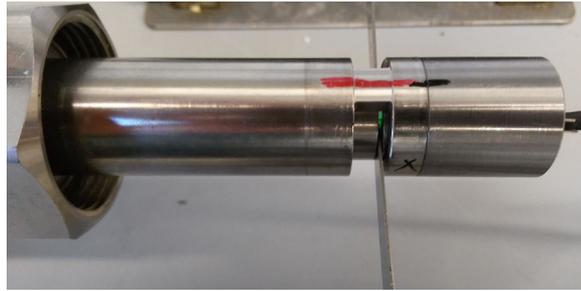


**Abbildung 6.3** In der oberen Reihe sind Bilder der Scheibenmarkierung mit verschiedenen Fokusebenen dargestellt. Zwischen den Bildern wurde die Fokusebene jeweils um  $20\ \mu\text{m}$  in Richtung Außentubus verschoben. Die Reihe darunter zeigt die dazugehörigen Sobelbilder. Die Zahlen unterhalb der Bilder sind die vom Algorithmus berechneten mittleren Grauwerte. Das schärfste Bild (Nr. 4) hat den höchsten mittleren Grauwert.

Kompaktheit von über 512 haben. Bei Objekten die durch diese beiden Kriterien eliminiert werden handelt es sich im wesentlichen um Partikel und Schlieren die sich auf der Scheibe befinden können. Im nächsten Schritt wird das größte verbleibende Objekt ermittelt. Im Anschluss werden im Sobelbild die Grauwerte der Pixel ausgelesen, welche eine Position innerhalb des größten Objektes haben. Aus diesen Grauwerten wird der Mittelwert gebildet. Dieser ist der Ausgabewert des Algorithmus und kann verwendet werden um die Position der Markierung zu bestimmen. Denn je höher der Mittelwert der Grauwerte ist, desto mehr liegt die Markierung in der Fokusebene (Abbildung 6.3).

## 6.2 Validierung

Für die Validierung des Messverfahrens wurden unter Verwendung von Abstandshaltern definierte Messzonenhöhen eingestellt. Als Abstandshalter für die Messungen wurden Fühlerlehren mit Stärken von  $50\ \mu\text{m}$  bis  $700\ \mu\text{m}$  verwendet. Jeweils eine Fühlerlehre der gleichen Stärke wurde links und rechts in der Messzone des ISM positioniert. Im Anschluss wurde die Messzone soweit zugefahren, dass die Fühlerlehren in der Messzone klemmten und nicht mehr bewegt werden konnten (Abbildung 6.4). Die tatsächliche Stärke der Fühlerlehren wurde mittels Mikrometerschraube (Mitutoyo Produkt-Nr. 102-301) bestimmt (Tabelle B.4, S. 115). Sollten die beiden Fühlerlehren unterschiedliche Stärken aufweisen, wurde die dickere Fühlerlehre als Abstand für die Berechnungen verwendet. Die Validierungsmessungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. In einer Messreihe wurden alle Stärken der Fühlerlehren einmal durchgemessen. Zwischen zwei Messreihen wurde das ISM auseinander und wieder zusammengebaut. Dies wird im normalen Gebrauch auch vor

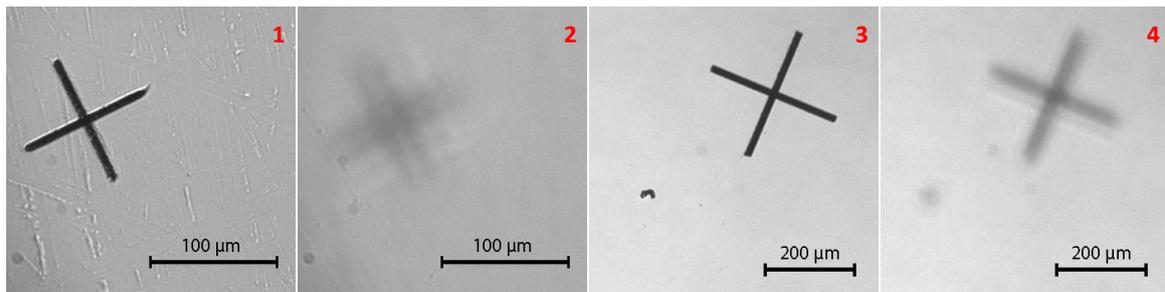


**Abbildung 6.4** Fühlerlehren in der Messzone des ISM zur Bestimmung von definierten Abständen.

und nach jeder ISM-Messungen durchgeführt, um das ISM zu reinigen. Beim Auseinander- und wieder Zusammenbauen verändern sich, durch das mechanische Spiel, die Positionen der einzelnen Bauteile zu einander. Dies kann einen Einfluss auf die Abstandsbestimmung haben und soll damit auch untersucht werden.

### 6.3 Ergebnisse und Diskussion

Für das automatisierte Einstellen der Messzonenhöhe werden Saphirglasscheiben mit einer Markierung benötigt. Diese Markierungen wurden mittels Lasergravur auf die Scheiben aufgebracht. Die Markierungen sind kreuzförmig da es so keine Richtungseffekte gibt und sich die Markierung klar von Schlieren und Partikeln auf der Saphirglasscheibe abhebt (Abbildung 6.5). Da das automatisierte Einstellen der Messzonen sowohl mit dem 10x Objektiv als auch mit dem 4x Objektiv möglich sein soll, wurden die Saphirglasscheiben mit unterschiedlich großen Markierungen hergestellt. Der Grund dafür ist, dass die beiden Objektive durch ihre unterschiedlichen Vergrößerungen unterschiedliche Auflösungen erzielen, sodass eine genaue Einstellung der Messzonenhöhe mit der Markierung für das 10x Objektiv mit dem 4x Objektiv nicht möglich wäre. Zusätzlich sollten die Markierungen auf der Scheibe so klein wie möglich sein, damit der Einfluss auf die eigentlichen ISM Messungen gering ist. Im Idealfall sind sie auf der Rückseite der Saphirglasscheiben nicht mehr erkennbar. Dieses Ziel konnte mit den aktuellen Markierungen nicht erreicht werden (Abbildung 6.5, Nr. 2 & 4). Insbesondere beim 4x Objektiv ist die Markierung noch deutlich auf der anderen Seite zu erkennen. Für die meisten ISM-Messungen wird nur ein bestimmter Ausschnitt des Bildes verwendet. Dieser Bereich wird als Region von Interesse (RVI) bezeichnet und liegt zumeist in der Mitte des ISM-Bildes. Durch eine Platzierung der Markierung außerhalb der RVI, also im Randbereich des Bildes, könnte eine negative Beeinflussung der Messung verhindert werden. Alternativ könnten auch andere Geometrien für die Markierung, z. B. kreisförmige, getestet werden. Diese könnten prinzipiell auch mittels Lasergravur aufgebracht werden.

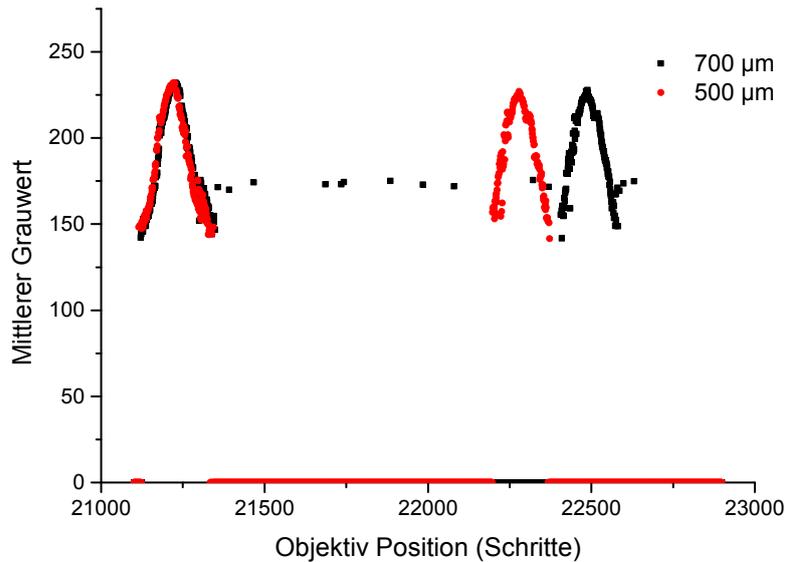


**Abbildung 6.5** Markierung der Innentubussaphirglasscheiben für das 10x Objektiv (Bild 1–2) und für das 4x Objektiv (Bild 3–4). Für die jeweiligen Objektive wurden verschiedene Scheibenmarkierungen verwendet. Die Bilder 1 und 3 zeigen jeweils die Fokussierung auf die markierte Seite der Saphirglasscheiben die Bilder 2 und 4 die Fokussierung auf die nicht markierte Seite der Scheibe.

Während einer Messung zur Bestimmung der Scheibenposition wird das Objektiv schrittweise verfahren. In jedem Schritt wird ein Bild aufgenommen und vom Algorithmus ausgewertet. Der typische Verlauf einer solchen Messung ist beispielhaft anhand von zwei Messungen mit dem 10x Objektiv in Abbildung 6.6 dargestellt. Solange die Markierung komplett außerhalb der Fokusebene liegt, gibt es kein Objekt, welches vom Algorithmus detektiert wird und der zurückgegebene mittlere Grauwert ist 0. Sobald die Markierung anfängt in die Fokusebene des Objektivs zu kommen wird ein Objekt detektiert und der ermittelte mittlere Grauwert steigt sprunghaft an. Je weiter sich die Fokusebene der Markierung nähert, desto höher ist der mittlere Grauwert. Sobald die Fokusebene die Markierung passiert hat, nimmt der mittlere Grauwert wieder kontinuierlich ab, bis der Abstand der Fokusebene zur Markierung wieder so groß ist, dass kein Objekt mehr detektiert werden kann und der mittlere Grauwert wieder sprunghaft auf 0 fällt.

Die Ursache für diesen Verlauf liegt beim Anwenden des Sobeloperators. Dieser verstärkt Gradienten im Bild, also Übergänge von hellen zu dunklen Bereichen wie sie bei den Kanten der Markierungen vorkommen. Solange die Markierung außerhalb der Fokusebene liegt ist keine definierte Kante zu erkennen und es gibt keine Verstärkung durch den Sobeloperator. Sobald die Markierung nahe der Fokusebene liegt, werden langsam Kanten sichtbar, diese sind aber noch relativ unscharf (Abbildung 6.3, Nr. 1). Mit jedem Schritt werden die Kanten schärfer und damit steigt auch die Verstärkung durch den Sobeloperator, bis die maximale Kantenschärfe erreicht ist (Abbildung 6.3, Nr. 4). Sobald die Fokusebene sich über den Punkt mit den schärfsten Kanten hinweg bewegt hat, werden die Kanten wieder unschärfer. Dadurch nimmt auch die Verstärkung durch den Sobeloperator ab und somit auch der mittlere Grauwert.

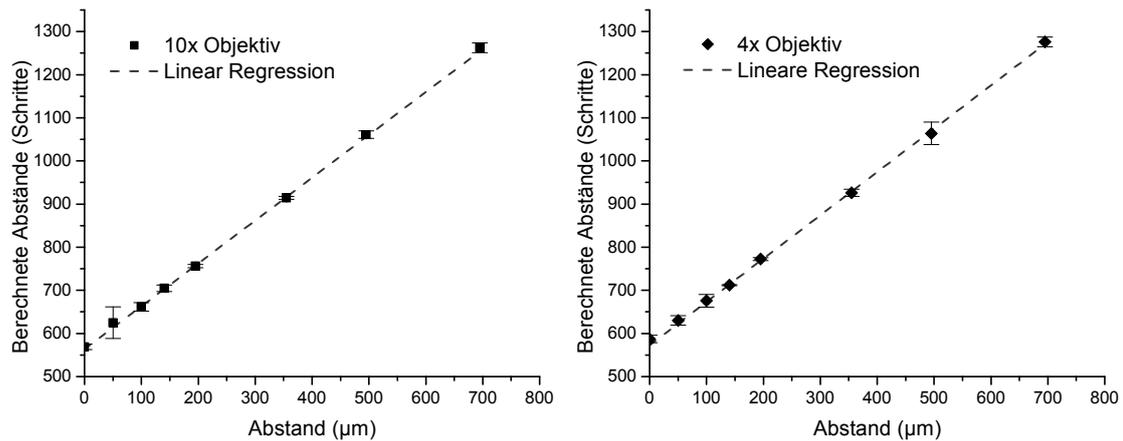
Innerhalb der 700 µm Messung sind auch zwischen den einzelnen Hauptpeaks immer wieder vereinzelt Bilder zu erkennen, in denen Objekte vom Algorithmus erkannt wurden (Abbildung 6.6). Diese sind auf Verunreinigungen auf den Saphirglasscheiben zurückzuführen,



**Abbildung 6.6** Ergebnisse des entwickelten Messverfahrens bei definierten Messzonenhöhen von 500  $\mu\text{m}$  und 700  $\mu\text{m}$  unter Verwendung eines 10x Objektivs. Die jeweiligen Maxima des mittleren Grauwertes geben die Position der Saphirglasscheiben an.

welche vermutlich beim Einsetzen der Abstandshalter aufgebracht wurden. Diese Verunreinigungen bilden ausreichend starke Kanten und werden nicht von den Selektionskriterien des Algorithmus aussortiert. Da der mittlere Grauwert dieser Objekte allerdings deutlich kleiner ist als die mittleren Grauwerte der Maxima hat dies keinen Einfluss auf das Ergebnis der Messung. Allerdings zeigt dies eine Schwachstelle des Systems auf. Sobald sich in der Messzone Partikel befinden die deutliche Kanten haben, kann dies potentiell zum Versagen des entwickelten Verfahrens führen. Eine solche Anwendung wären z. B. Kristallisationsprozesse wie bei Bluma *et al.* (2009) beschrieben. In diesem Fall müsste die Messzonenhöhe vor Beginn der Kristallisation eingestellt werden oder der Suchbereich manuell so begrenzt werden, dass der eigentliche Messspalt ausgeschlossen wird.

Der Abstand der beiden Saphirglasscheiben zueinander kann nun Anhand der Objektiveposition der beiden Maxima berechnet werden. Korrelationen zwischen dem eingestellten Abstand und den vom entwickelten Verfahren berechneten Abständen sind sowohl für das 10x Objektiv als auch für das 4x Objektiv in Abbildung 6.7 dargestellt. Auffällig sind hierbei die 50  $\mu\text{m}$  Messung beim 10x Objektiv und die 500  $\mu\text{m}$  Messungen bei 4x Objektiv. Beide weisen ein relativ große Streuung der Messwerte auf. Die Ursache hierfür könnte eine verkantete Fühlerlehre in der Messzone bei einer der drei Messungen sein. Alternativ könnte auch es beim Verfahren des Objektivs zu Sprüngen gekommen sein, dies ist allerdings unwahrscheinlich, da alle andere Punkte der Messungen exakt vom Objektiv angefahren wurden. Für beide Datenreihen wurde eine lineare Regression durchgeführt. Sowohl bei dem 4x Objektiv als auch beim 10x Objektiv liegt das Bestimmtheitsmaß der Regression oberhalb



**Abbildung 6.7** Korrelation der definierten Abstände zu den berechneten Abständen aus dem entwickelten Verfahren für ein 10x Objektiv (links) und ein 4x Objektiv (Rechts). Die Daten der beiden linearen Regressionen sind in Tabelle 6.1 dargestellt. Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Fehlerbalken geben das 95 % Konfidenzintervall der Messung an.

von 0,999 unit commands (Tabelle 6.1). Darüber hinaus liegt die Steigung der beiden Regressionen nahe bei 1. Dies lässt drauf schließen, dass die Schrittweite des Schrittmotors von  $1\ \mu\text{m}$  pro Schritt vom Messverfahren gut abgebildet wird. Der Y-Achsenabschnitt liegt mit 566,47 Schritten für das 10x Objektiv und 578,47 Schritten für das 4x Objektiv deutlich über 0. Der Grund hierfür ist, dass die Markierung auf der Saphirglasscheibe des Innentubus auf der Innenseite lag. Dadurch musste die Stärke der Saphirglasscheibe noch auf den Abstand hinzugerechnet werden. Die unterschiedlichen Y-Achsenabschnitt bei den Regressionen des 4x Objektivs und des 10x Objektivs kann darauf zurückgeführt werden, dass für jedes der beiden Objektive eine eigene Saphirglasscheibe mit einer anderen Markierung verwendet wurde. Zum einem kann die Stärke der Saphirglasscheibe variieren. Alternativ könnten auch die unterschiedlichen Gravuren vom Algorithmus anders erkannt werden und somit diese kleine Abweichung zustande kommen.

Da der Y-Achsenabschnitt von der Beschaffenheit der Saphirglasscheibe abhängt, sollte dieser bei jeder verwendeten Scheibe eigens bestimmt werden. Dies lässt sich einfach umsetzen indem die Messzone soweit es geht zugefahren wird und dann der Abstand der beiden Markierungen zu einander bestimmt wird. Da dafür keine Hilfsmittel benötigt werden kann dies sogar im Prozess vorgenommen werden.

**Tabelle 6.1** Ermittelte Parameter der linearen Regression aus den Messungen mit definierten Abständen. Der Parameter  $m$  ist die Steigung der linearen Regression,  $b$  der Y-Achsenabschnitt und  $R^2$  das Bestimmtheitsmaß der Regression.

Objektiv	$m$	$b$	$R^2$
10x	0,9962	566,47	0,9996
4x	0,9921	578,75	0,9994

Generell lassen die linearen Regressionen drauf schließen, dass das entwickelte Verfahren geeignet ist, um die Messzonenhöhe zu bestimmen. Die tatsächliche Messzonenhöhe kann unter Verwendung der berechneten Abstände nach der Formel 6.1 bestimmt werden. Als Parameter für die Rechnung können die ermittelten Werte der linearen Regression verwendet werden (Tabelle 6.1).

$$\text{Messzonenhöhe} = \frac{1}{m} * \text{berechneter Abstand} + \frac{b}{m} \quad (6.1)$$

## 6.4 Fazit

In diesem Abschnitt wurde die Entwicklung eines Verfahrens zur automatisierten Einstellung der Messzonenhöhe des In-situ-Mikroskops (ISM) beschrieben. Dafür wurden in die Saphirglasscheiben des ISM mittels Lasergravur Markierungen eingefügt, welche vom Bildverarbeitungsalgorithmus Window Marker Analyzer (WMA) detektiert werden können. Für die Bestimmung der Scheibenposition wird das Objektiv schrittweise verfahren, dabei wird in jeder Position ein Bild aufgenommen. Diese Bilder werden dann mit dem WMA ausgewertet. Anhand der Ergebnisse des Algorithmus und der dazugehörigen Objektivpositionen kann die Messzonenhöhe ermittelt werden.

Durch Messungen mit definierten Abständen konnte gezeigt werden, dass das entwickelte Verfahren sowohl für das 4x als auch das 10x Objektiv sehr gute Ergebnisse erzielt und die Messzonenhöhe zuverlässig bestimmt werden kann. Die linearen Regressionen beider Messungen hatten jeweils ein Bestimmtheitsmaß von über 0,999.

Da die Markierungen der Saphirglasscheibe auch noch zu erkennen sind, wenn der Fokus des Objektivs auf der anderen Seite der Scheibe liegt, könnte es besonders beim 4x Objektiv zu Beeinträchtigungen von Messungen kommen. Daher sollte die Scheibenmarkierung so positioniert werden, dass sie am Rand des Bildes ist und nach Möglichkeit außerhalb der RVI liegt.

Generell bietet das entwickelte Verfahren zur Messzonenhöheneinstellung entscheidende Vorteile. Die Position der Saphirglasscheiben kann nun auch ohne Partikelablagerungen auf den Scheiben sicher bestimmt werden. Das entwickelte Verfahren ist vollautomatisch und ermöglicht es unerfahrenen ISM Anwendern die Messzonenhöhe zuverlässig einzustellen. Des Weiteren kann so der zeitaufwendige Prozess der Messzonenhöheneinstellung deutlich verkürzt werden.

## 7 Entwicklung eines Algorithmus zur Mischzeitbestimmung

Der 3D-Druck ist ein Verfahren bei dem ein am Computer gezeichneter Körper additiv hergestellt wird. Der erste 3D-Drucker wurde Mitte der achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts entwickelt. Dieser funktionierte nach dem Verfahren der Stereolithographie. Dabei wird mittels Laser selektiv eine Flüssigkeit auspolymerisiert und so schichtweise der zu druckende Körper aufgebaut. In den folgenden Jahren wurden weitere Druckverfahren entwickelt. Allerdings waren alle Druckverfahren streng patentrechtlich geschützt und blieben auf Grund der hohen Kosten und schweren Zugänglichkeit ein Nischenprodukt. Mit dem Auslaufen vieler Patente wurden 3D-Drucker verfügbarer, günstiger und damit auch interessant für Anwendungen in der Biotechnologie (Raddatz *et al.* 2017).

Eine interessante Anwendung für den 3D-Druck in der Biotechnologie sind individuell designte Mischkammern auf Schüttelplatten (Abbildung 7.1). So kann der Sauerstoffeintrag verbessert oder der Scherstress für Zellen reduziert werden. Funke *et al.* 2009 zeigte, dass durch optimierte Geometrien der Sauerstoffeintrag im Vergleich zur normalen, runden Mischkammer verdoppelt werden konnte. Die verwendeten Platten wurden noch konservativ mittels Laserschnitt- und Laserschweißverfahren hergestellt. Die ersten 3D-gedruckten Platten wurden von Lücking, Sambale, Beutel *et al.* 2015 vorgestellt und darauf folgend auch deren Biokompatibilität bestätigt (Lücking, Sambale, Schnaars *et al.* 2015).

Nach dem Design und dem Druck einer neuen Mischkammer ist es notwendig diese zu charakterisieren. Ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung der Eigenschaften einer Mischkammer ist die Mischzeit. Diese kann anhand von Mischzeitexperimenten, welche mit Hilfe von Farbstoffen und einer Hochgeschwindigkeitskamera durchgeführt werden, bestimmt werden. Die manuelle Auswertung von solchen Mischexperimenten anhand von Videos oder Bilderserien ist sehr subjektiv und schwierig. Dies führte dazu, dass die manuelle Auswertung wenig aussagekräftig und quasi nicht reproduzierbar ist. Daher wurde in dieser Arbeit ein Algorithmus entwickelt, welcher die Auswertung von Mischzeitexperimenten anhand von Videos und Bilderserien ermöglicht.

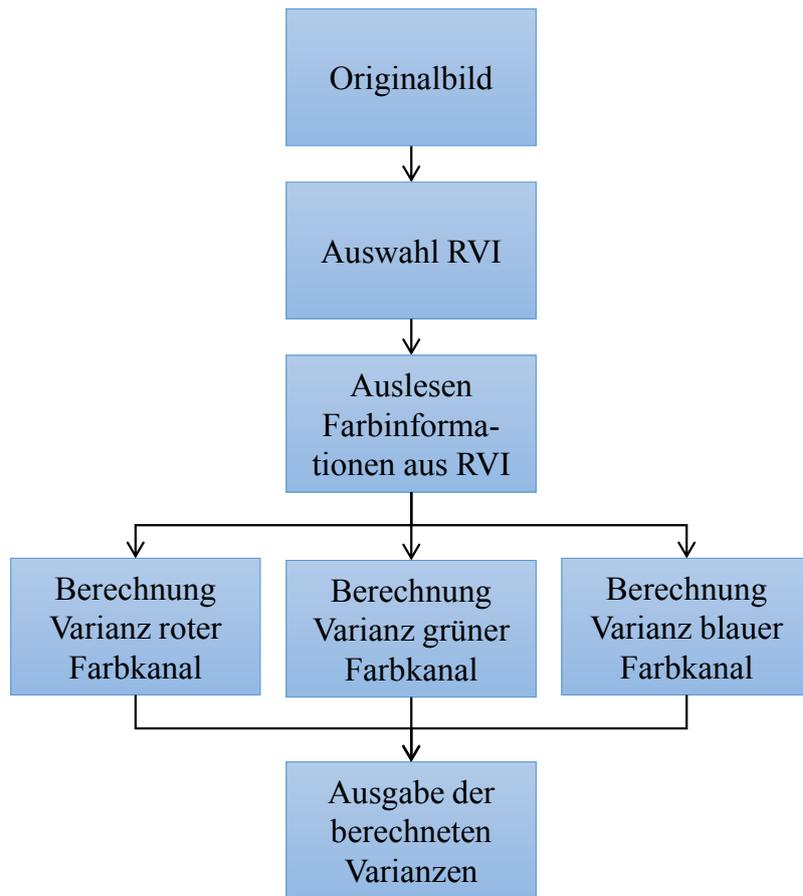


Abbildung 7.1 Schüttelplatte mit verschiedenen Mischkammergeometrien (Raddatz *et al.* 2017).

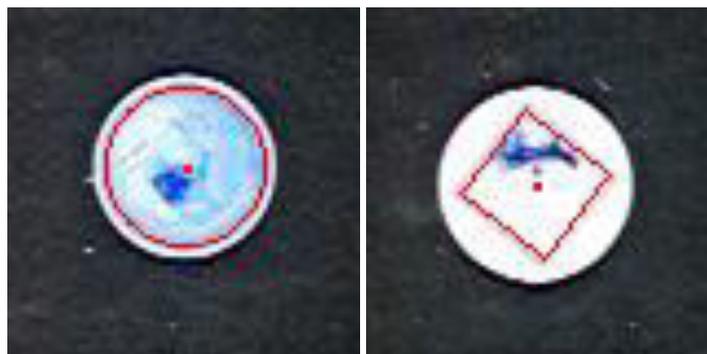
## 7.1 Algorithmus

Der in diesem Abschnitt beschriebene Algorithmus ist für die Auswertung von Bilderserien und Videos von Mischzeitexperimenten entwickelt worden, welche von Hochgeschwindigkeitskameras aufgenommen wurden. Die primäre Anwendung dieses Algorithmus ist die Bestimmung der Mischzeiten in den 3D-gedruckten Schüttelplatten. Bei diesem Algorithmus handelt es sich um einen semiautomatischen Algorithmus, dies bedeutet, dass der Anwender des Algorithmus bei jedem Experiment bestimmte Parameter neu von Hand an das entsprechende Experiment anpassen muss. In diesem Fall ist es die geometrische Form der Mischkammer auf der Platte und die Position der zu untersuchenden Mischkammer auf dem Bild. Eine Auswahl verschiedener Mischkammern für Schüttelplatten ist in Abbildung 7.1 dargestellt.

Der entwickelte Algorithmus basiert auf der Ermittlung der Varianz der Farbinformationen aller Pixel im Auswahlbereich und wird daher im Weiteren als Varianzalgorithmus (VA) bezeichnet (Abbildung 7.2). Im ersten Schritt des VA muss durch den Nutzer die RVI ausgewählt werden. Hierbei sollte die geometrische Form der Mischkammer berücksichtigt und auch nur der Bereich ausgewählt werden, der Flüssigkeit enthält (Abbildung 7.3). Im nächsten Schritt werden die Farbinformationen aller Pixel innerhalb der RVI ausgelesen. Alle Pixel außerhalb der RVI werden ignoriert. Welcher Farbkanal für die Auswertung relevant ist kann je nach verwendetem Farbstoff variieren. Daher werden alle drei Farbkanäle ausgewertet. Wendet man diesen Algorithmus auf eine Sequenz von Bildern aus einem Mischexperiment an, so kann anhand der Varianzen die Durchmischung bestimmt werden. Je kleiner die Varianz, desto besser ist die Flüssigkeit in der RVI durchmischt. Damit ist die Varianz innerhalb der RVI ein direktes Maß für die Homogenität der Lösung.



**Abbildung 7.2** Fließschema des entwickelten Varianzalgorithmus (VA)

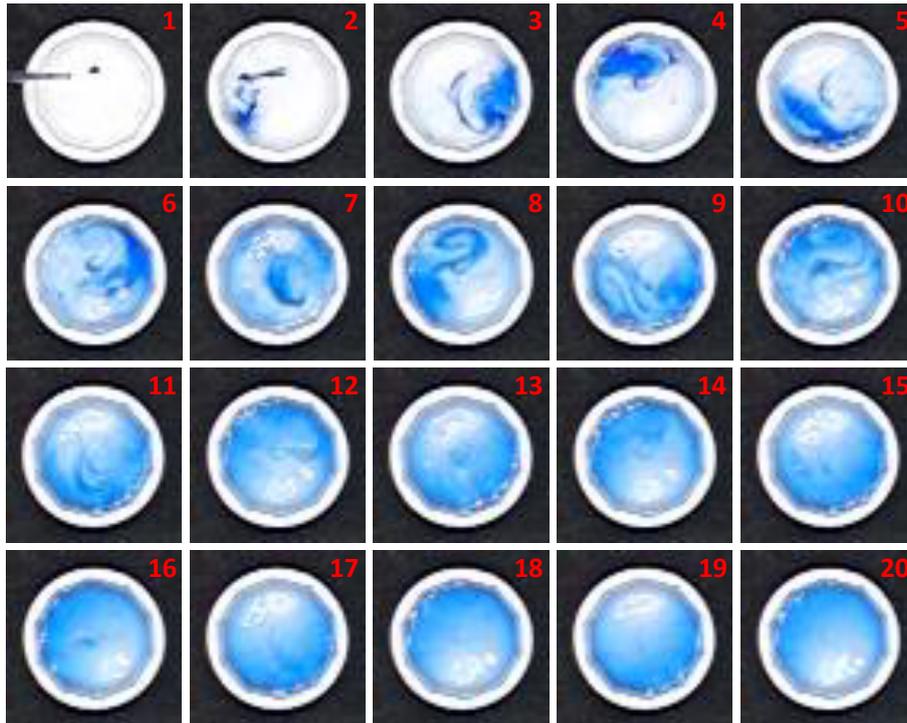


**Abbildung 7.3** Auswahl der Region von Interesse (RVI) durch den Benutzer für eine runde (links) und eine viereckige Mischkammer (rechts). Der Rote Punkt in der Mitte der Mischkammern ist der Mittelpunkt der Auswahl und soll das Zielen für den Nutzer erleichtern. Die rote Umrandung begrenzt die RVI.

## 7.2 Ergebnisse und Diskussion

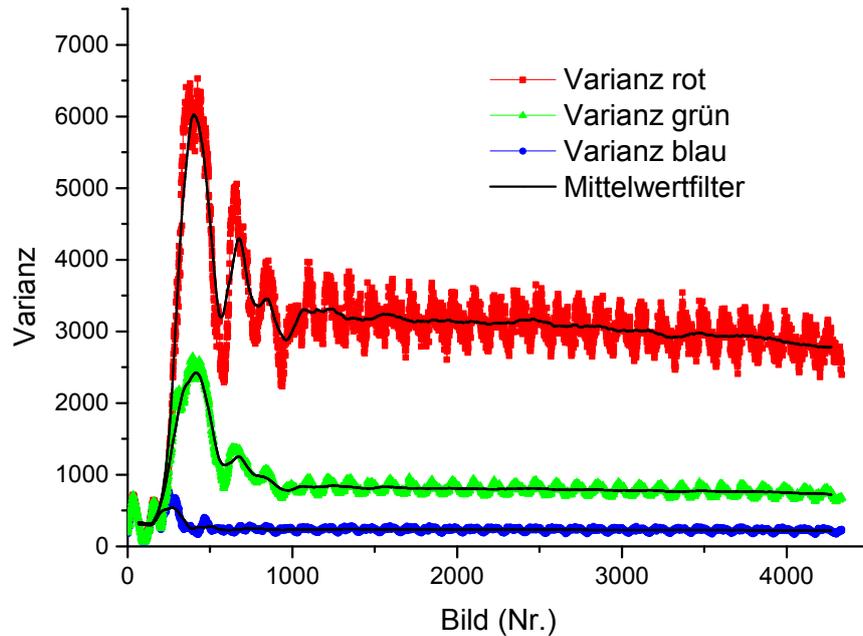
Zur Testung des Varianzalgorithmus (VA) wurde dieser auf Bilderserien von Mischexperimenten von verschiedenen 3D-gedruckten Mischkammern angewendet. Beispielhaft wird im Folgenden die Auswertung einer Mischkammer mit einer zehneckigen Geometrie dargestellt (Abbildung 7.4). Die Varianzen der drei Farbkanäle unterscheiden sich deutlich in ihrer Intensität (Abbildung 7.5). Der rote Farbkanal weist die höchste Intensität auf, gefolgt vom Grünen, welcher ca. um den Faktor drei geringer ist. Die Intensität der Varianz des blauen Farbkanals ist sehr klein. Der Grund für die unterschiedlichen Intensitäten ist der blaue Farbstoff, welcher für die Experimente verwendet wurden. Um die Farbe blau in einem Bild abzubilden werden die Intensitäten des roten und grünen Farbkanals erniedrigt, sodass der Blaufarbkanal überwiegt und auf dem Bild die Farbe blau zu sehen ist. Daher erzeugt der blaue Farbstoff kaum Änderungen im blauen Farbkanal. Der rote Farbkanal liefert zwar das stärkste Signal, weist aber in einigen Experimenten eigenartige Verläufe auf (Abbild B.5, S. 117). Daher wird für die weitere Auswertung die Varianz des grünen Farbkanals verwendet, da dieser unter den gegebenen Versuchsbedingungen die stabilsten Signale liefert. Mit anderen Farbstoffen und Experimentbedingungen kann sich dies jedoch ändern, daher sollten immer zu Beginn einer Versuchsreihe alle drei Farbkanäle betrachtet und der beste ausgesucht werden.

Die Varianz des grünen Farbkanals, weist genau wie die anderen beiden Farbkanäle eine periodische Schwingung auf. Damit eine sinnvolle Aussage über die Homogenität des untersuchten Systems getroffen werden kann, muss diese Schwingung aus den Daten entfernt werden. Hierfür wird ein Mittelwertfilter mit einer Fensterbreite von 126 Bildern verwendet (Abbildung 7.6). Die Mittelung über 126 Bilder ist äquivalent zur Mittelung über 0,3 s. Dies ist wiederum genau die Zeit, welche der Kreisschüttler bei 200 rpm für eine Umdrehung benötigt. Für die weitere Untersuchung der Homogenität werden nun ausschließlich die mittelwertgefilterten Daten verwendet. Die mittelwertgefilterten Daten zeigen einen typischen Verlauf eines Mischexperiments. Zu Beginn ist die Varianz niedrig, sobald der Farbstoff in Bild 214 hinzugegeben wird steigt die Varianz schnell an und fällt danach wieder ab bis sie ein konstantes Level erreicht. Im stationären Bereich, welcher in Abbildung 7.6 ca. ab Bild 1200 erreicht ist, findet noch eine leichte kontinuierliche Abnahme der Varianz statt. Dies lässt darauf schließen, dass der Farbstoff sich immer noch weiter verteilt. Kleinere Zwischenanstiege bzw. Abfälle wie sie in Abbildung 7.6 ca. bei Bild 750 und Bild 1000 zu erkennen sind, sind auf den Einfluss von Reflexionen zurückzuführen. Diese entstehen durch die direkte Beleuchtung mit dem LED-Ring. Durch diese Reflexionen sind die betroffenen Bereiche überbelichtet und werden von der Kamera als Weiß wahrgenommen, da sämtliche Farbkanäle gesättigt sind.



**Abbildung 7.4** Mischprozess in einer zehneckigen Mischkammer. In Bild Nr. 1 wird die Tinte hinzugefügt. Alle weiteren Bilder sind im Abstand von 0,3 s aufgenommen, was einer Rotation des Kreisschüttlers entspricht. Nach dem entwickelten Kriterium ist in Bild Nr. 19 die Homogenität erreicht.

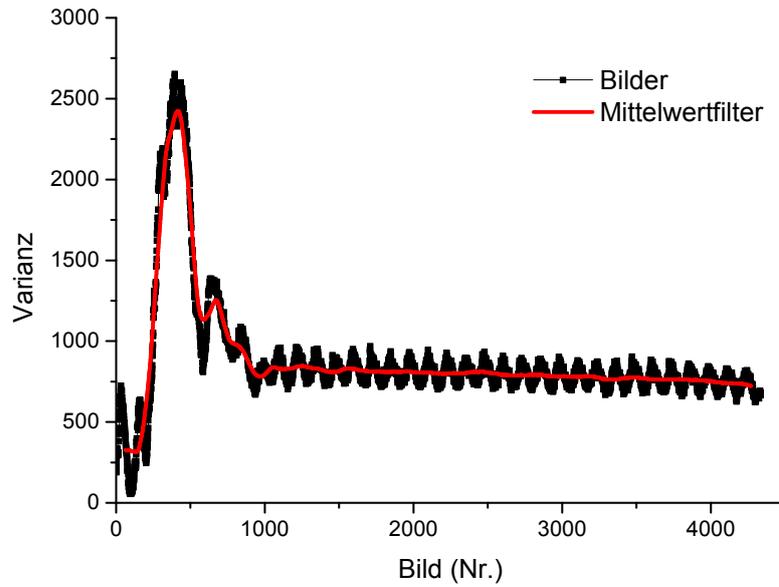
Im nächsten Schritt muss nun ein Kriterium festgelegt werden, ab wann die Homogenität in den Experimenten erreicht ist. Ein mögliches Kriterium wäre den Zeitpunkt zu verwenden, an dem die Varianz nur noch um einen bestimmten Prozentsatz von der Endvarianz abweicht (Mayr *et al.* 1992). Dieses Kriterium lässt sich für diese Experimente nicht anwenden. Das Problem ist, dass es auch am Ende noch einen leichten Abfall der Varianz gibt und da alle Experimente unterschiedlich lang sind, ist es nicht möglich einen einheitlichen Endpunkt festzulegen. Dieser Endpunkt würde aber für eine vergleichbare Auswertung benötigt. Des weiteren könnte ein lokales Minimum, welches z. B. durch eine Reflexion entsteht, das Kriterium zu früh auslösen. Deshalb wurde ein alternatives Kriterium entwickelt. In diesem neuen Kriterium ist die Homogenität erreicht sobald die Varianz innerhalb eines bestimmten Bereiches stabil ist. Hierfür wird zu jeden Zeitpunkt überprüft, wie stark die Varianz der folgenden 504 Messpunkte bzw. Bilder von diesem Bild abweicht. Wenn weniger als 2 % dieser 504 Messpunkte in ihrer Varianz um mehr als 5 % von der Varianz des Ausgangsbildes abweichen, ist die Homogenität erreicht. Die 504 Messpunkte entsprechen genau 4 Umdrehungen des Kreisschüttlers bei 200 rpm. Es werden 2 % an Ausreißern akzeptiert, also Werte mit mehr als 5 % Abweichung. Diese Ausreißer entstehen z. B. durch Reflexionen. Mit diesem Kriterium können die oben beschriebenen Probleme umgangen werden.



**Abbildung 7.5** Varianz der drei Farbk채n채le f체r Bilder einer Mischkammer mit 10 Ecken. Die Mittelwertfilter haben alle eine Fensterbreite von 126 Bilder, diese entspricht der Anzahl an Bildern die w채hrend einer Rotation des Kreissch체tters aufgenommen werden. Der Farbstoff wurde in Bild 215 dazu geben.

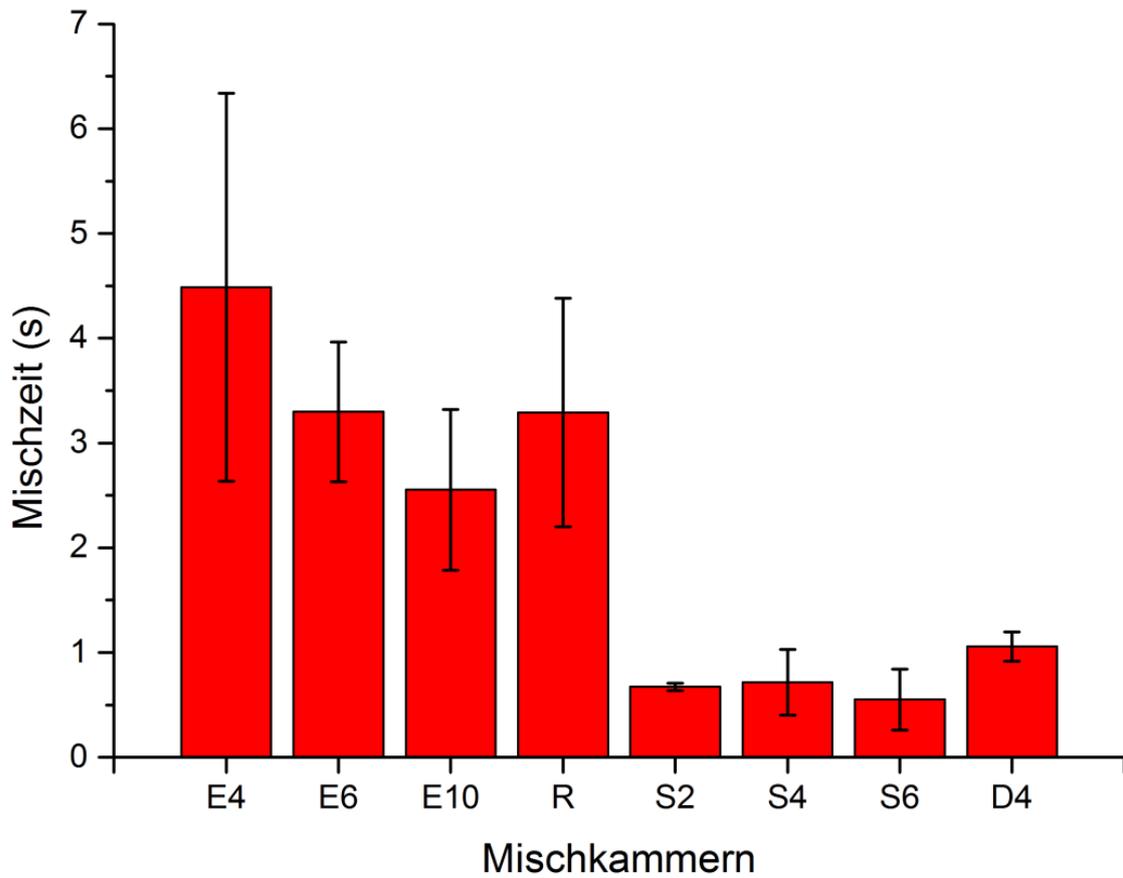
Die ermittelten Mischzeiten der verschiedenen Mischkammergeometrien weisen deutliche Unterschiede auf (Abbildung 7.7). Die l채ngste Mischzeit zeigt sich bei der viereckigen Geometrie mit 4,49 s. Mit zunehmender Eckenanzahl sinkt die Mischzeit bis sie bei 10 Ecken bei 2,55 s liegt. Die runde Mischkammer weist mit 3,29 s die gleiche Mischzeit wie die Mischkammer mit 6 Ecken auf. Die Mischzeiten f체r die drei Kammern mit Schikanen liegen unterhalb einer Sekunde. Die schnellste Durchmischung wurde nach 0,55 s bei der Mischkammer mit 6 Schikanen erreicht. Die anderen beiden Kammern hatten Mischzeiten von 0,71 s f체r 4 Schikanen und 0,67 s mit 2 Schikanen. Die Mischkammer mit der Deltaform liegt mit einer Mischzeit von 1,1 s etwas hцhere als die der Mischkammern mit vollwertigen Schikanen.

Fast alle durchgef체hrten Messungen weisen eine starke Streuung innerhalb der Dreifachbestimmung auf (Tabelle B.5). Diese Abweichungen zwischen einzelnen Messungen lassen sich vermutlich auf die manuelle Zugabe des Farbstoffs iber eine Pipette zur체ckf체hren. Durch die Zugabe mittels Pipette ist es sehr schwer immer exakt die gleiche Position innerhalb der sich bewegenden Mischkammer zu treffen. Hinzu kommt noch, dass es bei schneller Zugabe mittels Pipette vorkommen kann, dass sich der Tropfen im Flug in mehrere kleine Tropfen aufteilt und es so zu einer deutlich schnelleren Durchmischung kommt. Um diesen Effekt auf die Messungen zu minimieren sollte in Zukunft der Farbstoff iber eine Vorrichtung hinzugegeben werden die sich, genau wie die Kamera, station채re auf dem Kreis-



**Abbildung 7.6** Varianz des grünen Farbkanals für Bilder einer Mischkammer mit 10 Ecken. Der Mittelwertfilter hat eine Fensterbreite von 126 Bilder, diese entspricht der Anzahl an Bildern die während einer Rotation des Kreisschüttlers aufgenommen werden. Der Farbstoff wurde in Bild 215 dazu geben.

schüttler befindet und somit eine definierte Zugabe des Farbstoffes ermöglicht. Aufgrund einer fehlenden Möglichkeiten für Referenzmessungen können der Algorithmus und das Homogenitätskriterium nicht sicher als Ursache für die große Streuung ausgeschlossen werden.



**Abbildung 7.7** Bestimmte mittlere Mischzeiten für verschiedene Mischkammergeometrien (Viereckig (E4), Sechseckig (E6), Zehneckig (E10) Rund (R), 2 Schikanen (S2), 4 Schikanen (S4), 6 Schikanen (S6), Deltaform mit 4 Schikanen (D4)). Die Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt und unabhängig von einander mit dem VA und dem entwickelten Homogenitätskriterium ausgewertet. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Dreifachbestimmung dar.

## 7.3 Fazit

Der entwickelte Varianzalgorithmus (VA) ermittelt in einem ausgewählten Bildbereich die Varianz der verschiedenen Farbkanäle, was ein Maß für die Homogenität dieses Bereiches ist. Dieser Algorithmus wurde auf Hochgeschwindigkeitsaufnahmen von Mischexperimenten angewandt. Es konnte gezeigt werden, dass die Algorithmenergebnisse in Kombination mit einem geeigneten Homogenitätskriterium die Bestimmung der Mischzeit anhand der Hochgeschwindigkeitsaufnahmen ermöglichen.

Die Ergebnisse des VA sind mit periodischen Schwingungen überlagert. Diese können und müssen mittels Mittelwertfilter vor dem Ermitteln der Homogenität entfernt werden. Des Weiteren ist eine hohe Streuung innerhalb der Mehrfachmessungen für die einzelnen Mischkammern erkennbar. Dieses lässt sich vermutlich auf die manuelle Zugabe des Farbstoffes zurückführen. Damit eine bessere Reproduzierbarkeit der Experimente erreicht wird, sollte der Farbstoff in der Zukunft mittels Pumpe, welche sich ebenfalls auf dem Kreisschüttler befindet, hinzugegeben werden. Durch eine indirekte Beleuchtung könnten Reflexionen auf der Oberfläche vermieden werden, was eine stabilere Auswertung ermöglichen würde. Des Weiteren könnte der Mittelwertfilter und verschiedene Homogenitätskriterien in den VA implementiert werden, so wäre eine direkte Bestimmung der Mischzeit ohne die Verwendung von anderer Software möglich.

Trotz der großen Streuung zwischen den einzelnen Messungen kann ein deutlicher Einfluss der Mischkammergeometrie auf die Mischzeiten, durch den Einsatz des VA, beobachtet werden.

## 8 Automatisiertes Zählen von Bakterienkolonien auf Agarplatten mit Handheld Devices

Die meist verwendete Methode, um die Anzahl der lebenden Mikroorganismen in einer Probe zu bestimmen, ist das Wachstum auf Agarplatten und anschließende Auszählen der Bakterienkolonien (koloniebildende Einheiten (KBE)). Das Zählen von KBEs auf Agarplatten ist ein wichtiger Bestandteil der Qualitätssicherung in der Lebensmittelindustrie und von Laboren die sich mit Wasserqualität beschäftigen (Hallas und Monis, 2015). Darüber hinaus wird diese Methode auch in vielen wissenschaftlichen Bereichen verwendet. Beispiele hier für sind die Suche nach Bodenbakterien für landwirtschaftliche Anwendungen oder die Entwicklung neuer Antibiotika (Alves und Cruvinel, 2016; Doorn *et al.* 2000). Auch die Transformationseffizienz beim Einbringen von DNA in Mikroorganismen wird über das Wachstum auf Agarplatten ermittelt (Invitrogen, 2013).

Das manuelle Zählen von KBEs auf Agarplatten ist eine monotone, zeitaufwendige und fehleranfällige Beschäftigung. Die Platten werden in Bereiche unterteilt und nur einer der Bereiche wird ausgezählt. Dies kann bei ungleicher Verteilung der Kolonien auf der Platte zu erheblichen Fehlern führen. Des Weiteren ist es schwer die Anzahl von Kolonien in einem Koloniecluster reproduzierbar zu bestimmen (Geissmann, 2013). Deshalb wurden verschiedene Systeme entwickelt, um diese Arbeit zu automatisieren. All dieses Systeme bestehen aus einer Bildaufnahmeinheit und einem Bildverarbeitungsalgorithmus, der die Bilder auswertet. Ein einfaches System wurde von Brugger *et al.* (2012) vorgestellt. Dieses besteht nur aus einer Beleuchtungseinheit und einer Kamera. Es ermöglicht die Aufnahme einzelner Platten aus einem fixen Winkel mit definierter Beleuchtung. Ein anderes System nutzt einen Flachbettscanner, um bis zu 12 Platten gleichzeitig auszuwerten (Barber *et al.* 2000). Das *PetriJet* System kann vollkommen eigenständig das Wachstum in bis zu 20 Agarplatten über einen beliebigen Zeitraum überwachen (Vogel *et al.* 2015). Neben den Entwicklungen aus dem akademischen Umfeld gibt es auch kommerzielle Systeme. Ein Beispiel hierfür ist das *ProtoCOL3* System. Dieses kann nur eine Platte messen, dafür aber zwischen 10 verschiedenen Typen von Bakterien und Pilzkolonien unterscheiden (Pridmore, 2012).

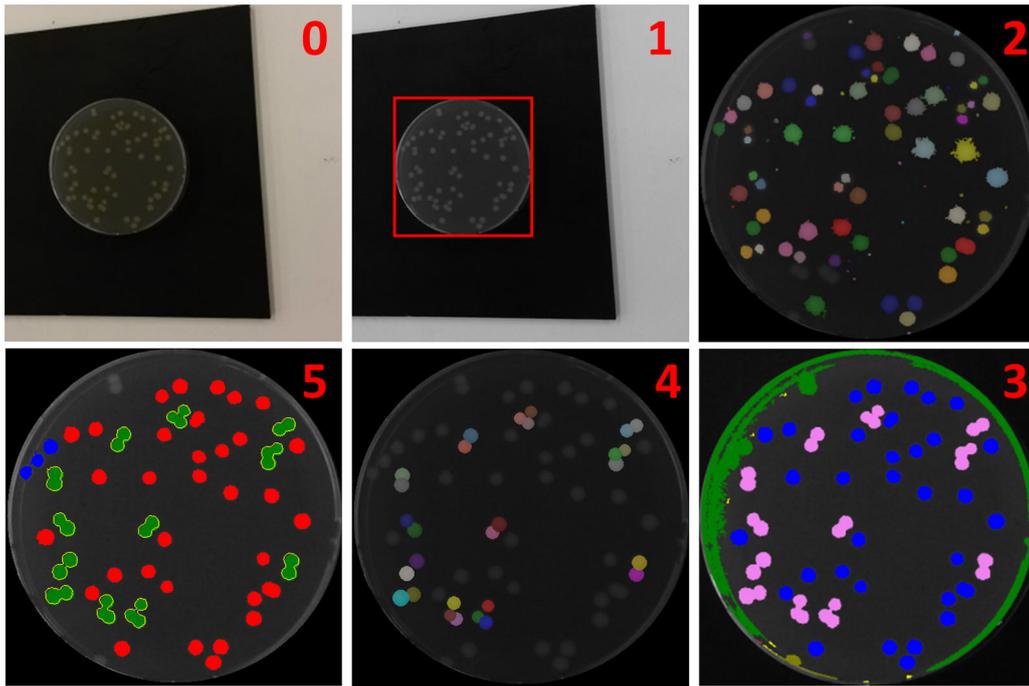
Alle vorgestellten Systeme verwenden eine Bildaufnahmestation oder komplexere Aufbauten um eine passende Bildqualität für ihren speziellen Bildverarbeitungsalgorithmus zu erreichen. In der Zukunft werden Handheld Devices wie Smartphones, Tablets und Smartglasses ein fester Bestandteil von biotechnologischer und biomedizinischer Forschung sein (Gan und Poon, 2016). Genau in diesem Bereich soll der im folgenden beschriebene Algorithmus Anwendung finden und das Zählen von Kolonien auf Agarplatten mit Handheld Devices ermöglichen.

## 8.1 Algorithmus

Der Colony Counter Algorithm (CCA) wurde entwickelt, um Kolonien auf Bildern von Agarplatten zu zählen, welche mit Smartphones oder Smartglasses aufgenommen wurden. Die Bilder können freihand aufgenommen werden und es ist keine zusätzliche Stabilisierungs- oder Belichtungseinheit notwendig. Damit gute Ergebnisse erzielt werden können, sollte sich die Agarplatte bei der Bildaufnahme auf einem homogenen, nicht reflektierenden Untergrund befinden. Im Allgemeinen sollten starke Reflexionen auf der Platte vermieden werden. Wichtige Schritte des CCA sind in Abbildung 8.1 dargestellt.

Der CCA kann in fünf wesentliche Abschnitte eingeteilt werden (Abbildung 8.2). Im ersten Abschnitt wird die Platte auf dem Bild erkannt. Im zweiten Abschnitt wird der optimale Binarisierungsschwellenwert (Threshold) ermittelt. Im darauf folgenden dritten Abschnitt werden die Kolonien in Einzelkolonien und Koloniecluster eingeteilt. In Abschnitt vier werden die Koloniecluster in Einzelkolonien zerteilt. Im fünften und letzten Abschnitt werden die in dem Schritten zuvor übersehenen Einzelkolonien gesucht und hinzugefügt.

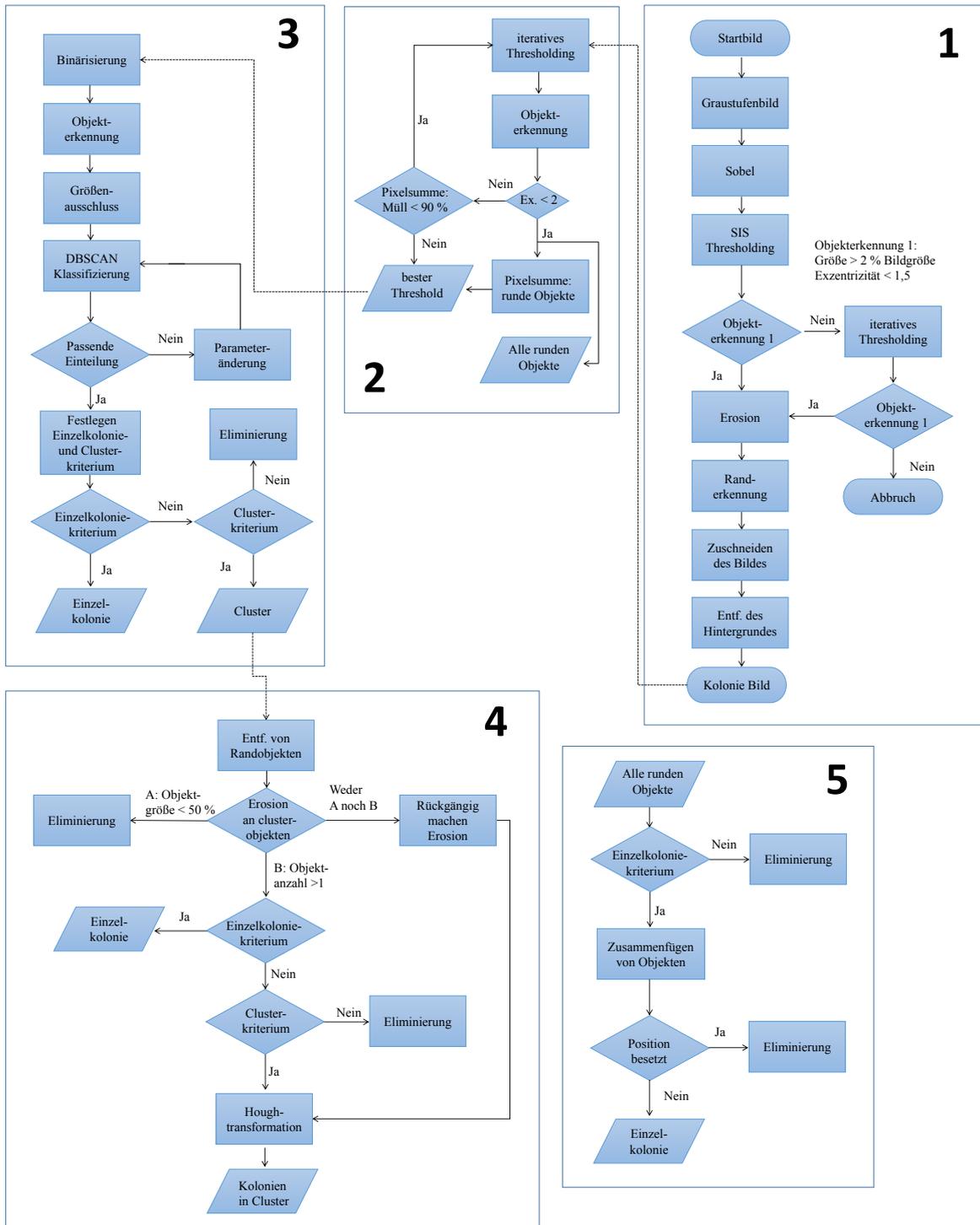
Im Folgenden werden nun die einzelnen Algorithmenabschnitte im Detail dargestellt. Im ersten Schritt wird das Eingangsbild in ein Graustufenbild umgewandelt und ein Sobeloperator auf das Graustufenbild angewendet, um die Kanten der Agarplatte hervorzuheben (Abbildung 8.2, Nr. 1). Dann wird ein simple image statistics (SIS) Thresholding durchgeführt, um aus dem Graustufenbild ein Binärbild zu erhalten. Im Anschluss wird eine Objekterkennung auf das Binärbild angewandt. Bei dieser werden Pixel in einer Moore-Nachbarschaft zu Objekten zusammengefasst. Im nächsten Schritt werden alle Löcher innerhalb von Objekten entfernt bzw. aufgefüllt. Gibt es nun ein Objekt, welches mindestens 2 % der Gesamtbildgröße ausmacht und eine Exzentrizität kleiner 1,5 hat, wird dieses Objekt als Platte anerkannt. Wenn mehr als ein Objekt dieses Kriterium erfüllt, wird das größte Objekt verwendet. Sollte kein Objekt das Kriterium erfüllen wird das iterative Thresholding gestartet. Dafür wird wiederholt eine Binarisierung mit einem festen Schwellenwert durchgeführt. Zu Beginn beträgt dieser Schwellenwert 40 und wird dann in jeder Iteration um 1 erniedrigt. In jeder



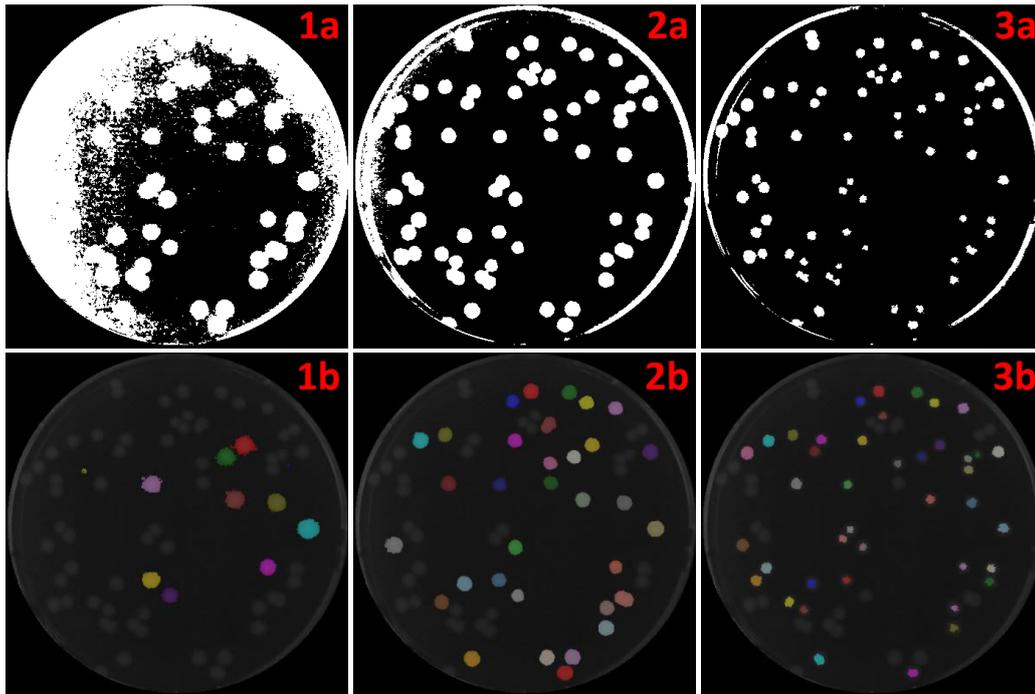
**Abbildung 8.1** Beispielbilder der wichtigen Algorithmenschritte des Colony Counter Algorithm (CCA): (0) Ausgangsbild; (1) Bild umgewandelt in Graustufenbild und in der Plattenerkennung ermittelter Ausschnitt; (2) Überlagerung aller im iterativen Thresholding gefunden runden Objekten; (3) Gruppierung mittels DBSCAN Algorithmus. Die blauen Einzelkolonien werden für die weitere Prozessierung verwendet; (4) Teilung der Koloniecluster mittels Circular Hough-Transformation; (5) Ergebnisbild: rot: Einzelkolonien, blau: Einzelkolonien gefunden im Randbereich, grün: Kolonien in Clustern.

Iteration wird eine Objekterkennung, eine Eliminierung der Löcher und eine Bewertung der Objekte nach den zuvor beschriebenen Kriterien durchgeführt. Sobald ein passendes Objekt gefunden wurde wird das iterative Thresholding beendet. Sollte am Ende des iterativen Thresholdings kein passendes Objekt gefunden worden sein, wird der Algorithmus beendet. Im nächsten Schritt wird eine Erosion mit einer Fenstergröße von 3 auf das Plattenobjekt angewandt, um Binarisierungsartefakte zu entfernen. Als nächstes werden die Grenzen des Plattenobjektes bestimmt und der Bereich innerhalb der Grenzen aus dem ursprünglichen Graustufenbild ausgeschnitten (Abbildung 8.1, Nr. 1). Im letzten Schritt dieses Abschnittes wird der Hintergrund entfernt. Dafür werden alle Pixel im zugeschnittenen Graustufenbild, die außerhalb des Plattenobjektes liegen, auf 0 (schwarz) gesetzt. Das resultierende Bild wird als Koloniebild bezeichnet.

Im zweiten Abschnitt des Algorithmus wird ein iteratives Thresholding auf das Koloniebild angewendet (Abbildung 8.2, Nr 2). Der Wert des hellsten Pixels des Koloniebildes wird als Startwert verwendet. Nach jeder Iteration wird der Wert um 1 erniedrigt. Auf die entstehenden Binärbilder wird eine Objekterkennung angewandt (Abbildung 8.3). Alle Objekte mit einer Exzentrizität kleiner 2 werden als „runde Objekte“ und alle anderen



**Abbildung 8.2** Fließschema des Colony Counter Algorithm (CCA): (1) Vorbearbeitung des Bildes, Plattendetektion, Zuschneiden des Bildes, Hintergrundeliminierung; (2) Ermitteln des optimalen Binärisierungsschwellenwertes; (3) Erkennung von Einzelkolonien und Kolonieclustern; (4) Aufteilen der Koloniecluster in Einzelkolonien; (5) Finden fehlender Einzelkolonien.



**Abbildung 8.3** Beispiel für das verwendete iterative Thresholding. Obere Reihe: Binärbilder bei den Binarisierungsschwellenwerten 39, 48 und 60 von links nach rechts. Untere Reihe: Runde Objekte aus dem darüberliegenden Bild. Alle Objekte mit einer Exzentrizität größer als 2 wurden entfernt. Pixelsumme der runden Objekte 4500, 10 800 und 5100 von links nach rechts

Objekte als „Müllobjekte“ klassifiziert. In jeder Iteration werden alle runden Objekte, die Pixelsumme aller runden Objekte und die Pixelsumme aller Müllobjekte gespeichert. Das iterative Thresholding wird abgebrochen, sobald die Pixelsumme der Müllobjekte 90 % der Pixel des Plattenobjekts erreicht hat. Die gespeicherten runden Objekte werden später in Abschnitt 5 des Algorithmus verwendet, um fehlende Kolonien zu finden. Ein überlagertes Bild aller gefundenen runden Objekte ist in Abbildung 8.1 (Nr. 2) dargestellt. Im letzten Schritt dieses Abschnittes wird der beste Schwellenwert definiert. Dafür wird der Schwellenwert ausgewählt, bei dem die Pixelsumme in runden Objekten maximal ist.

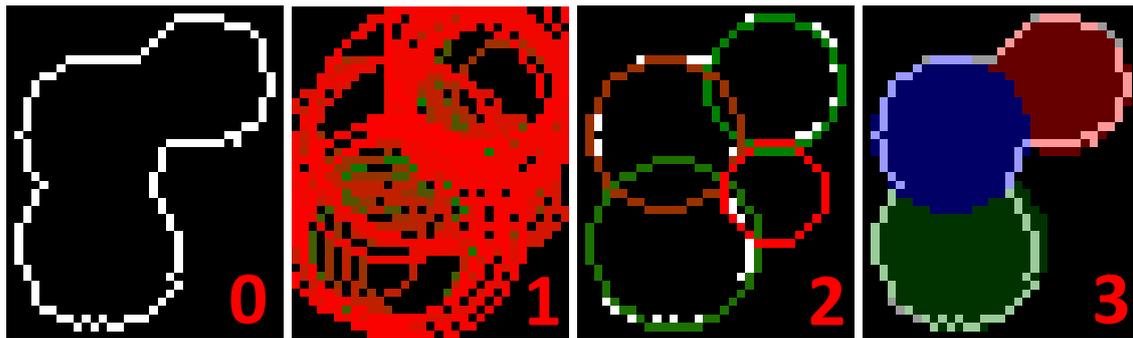
Zu Beginn des dritten Abschnittes des Algorithmus wird der beste Threshold, welcher im vorherigen Abschnitt ermittelt wurde, zur Binarisierung des Koloniebildes verwendet (Abbildung 8.1, Nr. 3). Im nächsten Schritt wird eine Objekterkennung gefolgt von einem Größenausschluss durchgeführt. Dabei werden alle Objekte, die kleiner als 10 Pixel sind, eliminiert. Dieser Schritt dient dazu Binarisierungsartefakte zu entfernen. Darauf folgend wird der DBSCAN Algorithmus verwendet um die Objekte anhand ihrer Größe und Exzentrizität in Gruppen einzuteilen (Ester *et al.* 1996). Ziel dieser Gruppierung ist es Objekte zu identifizieren, die Einzelkolonien repräsentieren und deren Größe zu bestimmen. Die Größe der Einzelkolonien kann je nach Wachstumsgrad, Aufnahmedistanz und Auflösung

des Bildes sehr stark variieren. Die Gruppierung ist erfolgreich, wenn es eine Gruppe gibt, die die gesetzten Spezifikationen erfüllt. Eine solche Gruppe bilden die blauen Objekte in Abbildung 8.1 (Nr. 3). Für den ersten Gruppierungsdurchgang werden die folgenden Spezifikationen verwendet: Die mittlere Exzentrizität muss kleiner als 2,5 sein und die Standardabweichung der Größe darf 30 % der mittleren Größe nicht überschreiten. Wenn keine passende Gruppe gefunden wird, wird die Gruppierung neu gestartet. Dabei wird der Wert für die Exzentrizität um 0,5 und die maximale Standardabweichung um 2 % erhöht.

Sobald eine passende Gruppe gefunden wurde, werden zwei Eigenschaften dieser Gruppe für die weiteren Schritte genutzt. Die erste Größe ist die mittlere Objektgröße (MOG) der Gruppe und die Zweite ist die mittlere Objektexzentrizität (MOE). Anhand dieser beiden Eigenschaften werden nun die Kriterien festgelegt, die ein Objekt erfüllen muss, um als Einzelkolonie oder als Koloniecluster zu zählen. Für Einzelkolonien muss die Größe des Objektes zwischen 30 % und 300 % der MOG liegen. Des Weiteren muss die Exzentrizität des Objektes kleiner sein als die Summe aus MOE und der Standardabweichung der MOE. Damit ein Objekt als Koloniecluster betrachtet wird, muss die Größe des Objektes oberhalb des MOG liegen. Alle Objekte, die weder den Einzelkolonien noch den Kolonieclustern zugeordnet werden können, werden verworfen.

Im vierten Abschnitt werden die Koloniecluster genauer untersucht (Abbildung 8.2, Nr. 4). Im ersten Schritt werden alle Objekte, bei denen mehr als 70 % ihrer Pixel im Randbereich liegen, ausgeschlossen. Bei diesen Objekten kann nicht sicher entschieden werden, ob es sich um Kolonien oder um Artefakte auf Grund von Reflexionen und inhomogenen Lichtverhältnissen handelt. Der Randbereich ist definiert als die äußeren 10 % der Platte, welche dem Rand am nächsten sind. Im nächsten Schritt wird eine Erosion mit der Fenstergröße von 3 auf die einzelnen Objekte angewandt und drei mögliche Ergebnisse werden abgehandelt. Ergebnis A ist, dass sich die Pixelsumme des Objektes durch die Erosion um mehr als 50 % verringert. In diesem Fall handelt es sich bei dem Objekt um Rauschen und es wird verworfen. Ergebnis B tritt ein, wenn das Objekt in mehrere Objekte zerfällt. In diesem Fall werden die entstandenen Objekte darauf überprüft, ob sie nun die Kriterien für Einzelkolonien oder Koloniecluster erfüllen. Ist weder A noch B erfüllt, wird der Erosionsschritt rückgängig gemacht. Im nächsten Schritt wird auf alle Koloniecluster eine Circular Hough-Transformation auf diese angewandt, um die Anzahl der Kolonien innerhalb dieser Koloniecluster zu bestimmen (Illingworth und Kittler, 1987).

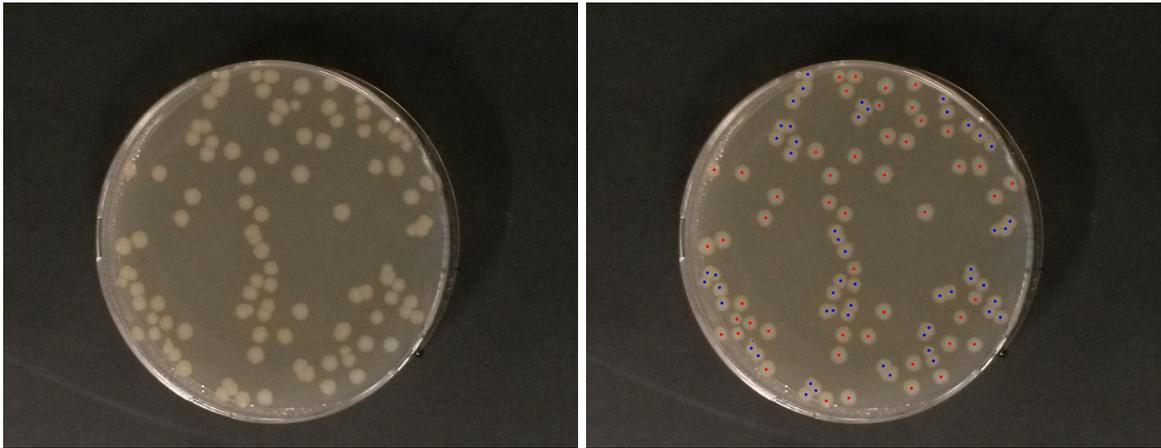
Zur Vorbereitung der Circular Hough-Transformation wird der mittlere Radius anhand der MOG errechnet. Dafür wird angenommen, dass es sich bei den gefunden Einzelkolonien um ideale Kreise handelt. Für die Circular Hough-Transformation werden nur die Randpixel der Objekte verwendet (Abbildung 8.4, Nr. 0). Im ersten Durchgang der Circular Hough-Transformation wird der Suchradius auf ein Drittel des mittleren Radius gesetzt.



**Abbildung 8.4** Schritte der Circular Hough-Transformation: (0) Randpixel des Koloniecluster Objektes; (1) Alle gefunden Kreise in Abhängigkeit ihrer prozentualen Stärke (je grüner desto Stärker, je röter desto schwächer); (2) Verbleibende beste Kreise nach Entfernung von überlappenden Kreisen; (3) Finale Kreise, nach Entfernung von Kreisen außerhalb des Objektes.

In jeder folgenden Iteration wird der Suchradius um 1 erhöht. Sobald der Suchradius dem mittleren Radius entspricht wird die Suche beendet. In jeder Iteration werden alle detektierten Kreise gespeichert (Abbildung 8.4, Nr 1). Im nächsten Schritt werden die Kreise nach ihrer prozentualen Stärke sortiert. Dieser Wert gibt an wie viele Pixel zwischen dem Kreis und dem Randpixeln des Objektes übereinstimmen. Im Endeffekt ist dies die Qualität der Kreisanpassung. Darauf folgend werden drei Selektionsschritte durchgeführt, um die Plausibilität der Kreise zu prüfen. Im ersten Schritt wird für jeden Kreis untersucht, ob der Mittelpunkt eines anderen Kreises innerhalb des Kreisradius liegt. Ist dies der Fall, so wird der schlechtere der beiden Kreise verworfen. Im zweiten Schritt wird getestet, ob ein Kreis mehr als 50 % seiner Pixel mit anderen Kreisen teilt. Ist dies der Fall, so wird der Kreis verworfen (Abbildung 8.4, Nr. 2). Zuletzt werden Kreise aussortiert, bei denen mehr als 50 % ihrer Pixel außerhalb des Objektes liegen (Abbildung 8.4, Nr. 2). Die übrigen Kreise repräsentieren Kolonien innerhalb des Clusters (Abbildung 8.1, Nr. 4).

Im letzten Abschnitt des CCA werden die in Abschnitt 2 gesammelten runden Objekte verwendet, um übersehene Einzelkolonien zu suchen, besonders solche im Randbereich der Platte (Abbildung 8.2, Nr. 5). Zu Beginn werden alle runden Objekte, die nicht die in Abschnitt 3 fest gelegten Einzelkoloniekriterien erfüllen, verworfen. Im nächsten Schritt werden alle Objekte die an der gleichen Position auf der Platte liegen zu einem Objekt zusammengefügt. Dadurch bleiben nur die größten Objekte erhalten. Dass eine Position mehrfach besetzt ist, liegt daran, dass die Objekte aus verschiedenen Iterationen stammen, aber die gleiche Kolonie abbilden. Im letzten Schritt wird untersucht, ob die Position des zusammengeführten Objektes bereits von einer Einzelkolonie oder einem Koloniecluster belegt ist. Wenn dies der Fall ist, wird das Objekt verworfen. Alle übriggebliebenen Objekte werden der Liste der Einzelkolonie hinzugefügt. Ein Beispiel für solche Kolonien stellen die blauen Kolonie in Abbildung 8.1 (Nr. 5) dar.



**Abbildung 8.5** Links: Mit dem Smartphone aufgenommenes Bild, welches so in den CCA eingespeist wird; Rechts: Validierungsbild in dem Einzelkolonien rot und Kolonien in Koloniecluster blau markiert wurden.

## 8.2 Bildaufnahme und Validierung

Für die Bildaufnahme wurden die Platten auf einem homogenen möglichst nicht reflektierenden Untergrund platziert. Dafür wurde eine matt schwarze Platte verwendet (Abbildung 8.5, links). Die Aufnahme wurde mit einem Smartphone, ohne zusätzliche Belichtungs- oder Stabilisierungseinrichtung, durchgeführt.

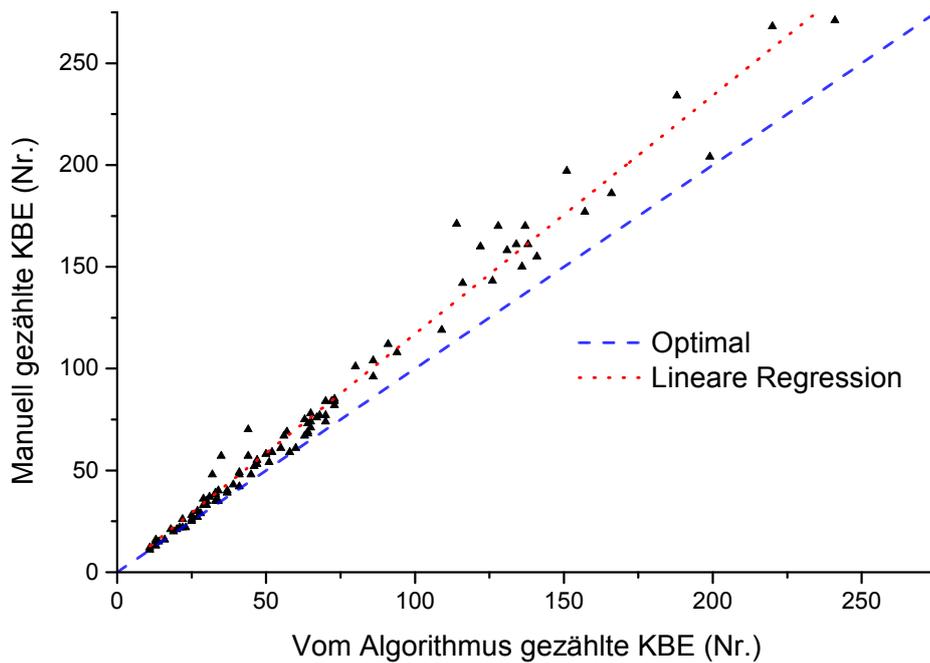
Zur Validierung des CCA wurden die Agarplatten mit der Hand ausgezählt. Um die Genauigkeit dieser Zählung zu verbessern und zusätzliche Informationen zu erhalten, wurden die manuellen Zählungen ebenfalls anhand der Bilder durchgeführt. Dafür werden per Hand alle Kolonien auf den Bildern mit einem farbigen Punkt markiert. Rote Punkte stehen für Einzelkolonien und blaue Punkte für Kolonien in Koloniecluster (Abbildung 8.5, rechts). Diese markierten Bilder werden dann mit dem Computer ausgezählt. Zusätzlich kann die Auszählung im sogenannten Vergleichsmodus erfolgen. Dabei werden das Originalbild und das Bild mit den Markierungen zusammen vom CCA ausgewertet. Dadurch können neben der Anzahl der Kolonien auch die Positionen der Kolonien verglichen werden. Dieser Positionsvergleich ermöglicht es, eine Aussage zu machen, ob der Algorithmus wirklich Kolonien zählt, die der Mensch als solche erkennt.

## 8.3 Ergebnisse und Diskussion

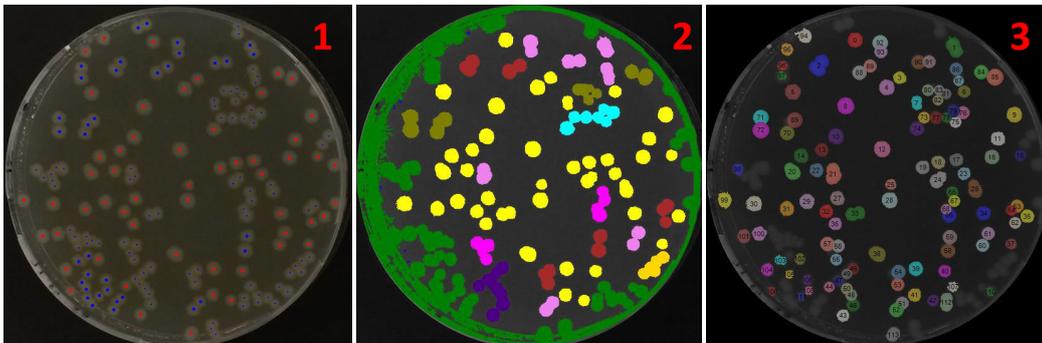
### 8.3.1 Validierung

Für die Validierung des CCA wurden 100 Bilder sowohl manuell als auch mit dem Algorithmus ausgewertet und verglichen. Dieser Vergleich ist in Abbildung 8.6 dargestellt. Platten mit weniger als 50 KBEs sind nahe an der Optimaline. Je höher die Zahl der KBEs ist, desto größer ist die Abweichung zwischen den beiden Ergebnissen. Die mittlere Abweichung zwischen Algorithmenergebnissen und manueller Zählung über alle Platten beträgt 11,88 % (Tabelle 8.1). Die mittlere Abweichung ist abhängig davon, wie stark die Platte bewachsen ist. Für Platten mit weniger als 50 KBEs beträgt die mittlere Abweichung 8,07 %, zwischen 50 und 150 KBEs 14,2 % und bei Platten mit mehr als 150 KBEs 16,99 %. In fast allen Fällen ist die Zahl der manuellen Zählung höher als die Algorithmenergebnisse. Dies ist auf das Unvermögen des CCA zurückzuführen Koloniecluster in dem Randbereich der Platte zu detektieren. Ein Extrembeispiel hier für ist in Abbildung 8.7 gezeigt. In dieser Platte sind viele Koloniecluster im Randbereich zu finden. Darüber hinaus ist auch noch am grünen Objekt in Abbildung 8.7 (Nr. 2) zu erkennen, dass einige Koloniecluster, welche nur zu einem kleinen Teil im Randbereich liegen, zu diesem dazu gezählt werden. Dies geschieht, weil die Koloniecluster mit dem Objekt im Randbereich verbunden sind und daher als Teil dieses Objektes betrachtet werden. Im Randbereich gibt es viele Artefakte, die durch Reflexionen oder inhomogene Belichtung entstehen. Da Koloniecluster, im Gegensatz zu Einzelkolonien, sehr stark variierende geometrische Eigenschaften haben, ist es schwer diese von Artefakten zu unterscheiden. Noch schwieriger ist es, wenn Artefakte und Koloniecluster zusammengewachsen sind. Daher werden die Koloniecluster im Randbereich vom Algorithmus aussortiert und die Kolonien darin gehen nicht mit in das Ergebnis des Algorithmus ein. Dies ist auch der Hauptgrund dafür, dass die mittlere Abweichung zwischen Handzählung und CCA bei höherer Koloniedichte größer ist. Denn je höher die Koloniedichte ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass Koloniecluster im Randbereich auftreten. Möglichkeiten diesem Problem entgegen zu wirken, werden im nächsten Abschnitt diskutiert.

Neben der korrekten Anzahl an KBEs sollte auch überprüft werden, ob der CCA wirklich nur Kolonien erkennt oder auch andere Gebilde. Um diese Untersuchung zu durchzuführen, wurden die Originalbilder und die ausgezählten Bilder im Vergleichsmodus des CCA ausgewertet (Abbildung 8.5). Dabei wurde überprüft, ob jede Kolonie die vom Algorithmus gefunden wurde, eine handgezählte Kolonie an der gleichen Position im Bild hat. Bei der Auswertung aller 100 Bilder ergibt sich ein Übereinstimmungsrate von 99,46 %. Für Bilder mit mehr als 100 KBEs beträgt die Übereinstimmung 98,61 %. Die meisten dieser Abweichungen zwischen CCA und Handzählung entstehen durch das unterschiedliche Positionieren



**Abbildung 8.6** Vergleich zwischen CCA und manueller Zählung von 100 Agarplatten. Die blau gestrichelte Linie stellt die optimalen Ergebnisse dar, d. d. die Algorithmenzählung und die manuelle Zählung stimmen über ein. Die rot gepunktete Linie ist die lineare Regression zwischen den beiden Werten. Die Regression hat eine Steigung von 1,17 und ein  $R^2$  von 0,98.



**Abbildung 8.7** Defizite in der Erkennung von Kolonieclustern im Randbereich. (1) Bild der manuellen Zählung mit 171 gezählten Kolonien. Einzelkolonien sind rot und Kolonien innerhalb von Kolonieclustern sind blau markiert. (2) Ergebnisbild der Gruppierung. Das grüne Objekt am Rand der Platte ist Teil des Randbereiches und wird verworfen. Dies bedeutet, dass auch alle Koloniecluster innerhalb des Objektes verworfen werden, auch wenn sie selbst nicht teil des Randbereichs sind. (3) Ergebnisbild CCA mit 110 gezählten Kolonien. Die farblosen Kolonien auf dem Bild wurden nicht vom Algorithmus gezählt.

**Tabelle 8.1** Mittlere Abweichung zwischen manueller Zählung und Ergebnissen des Algorithmus. Die Normierung des prozentualen Anteils erfolgt auf Basis der manuellen Zählung.

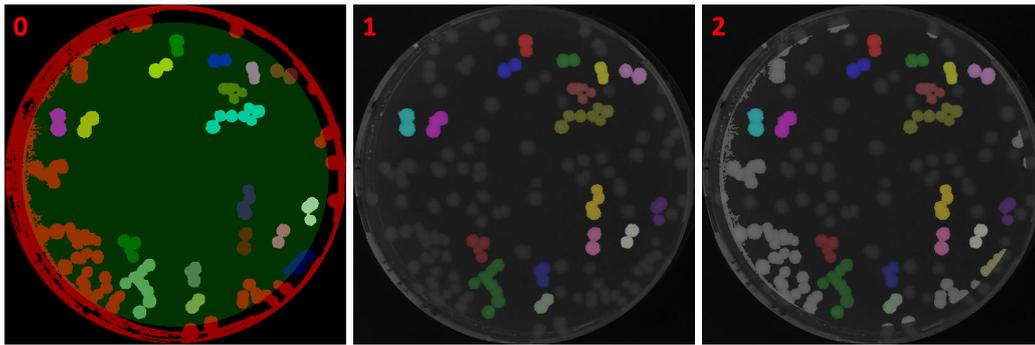
KBEs pro Platte	Mittlere Abweichung [%]	Mittlere Abweichung bei Randpixeleliminierung [%]	Mittlere Abweichung mit Korrekturfaktor [%]
Gesamt	11,88	36,89	8,4
< 50	8,07	68,33	10,35
50-150	14,2	13,01	6,77
> 150	16,99	10,75	7,16

von Kolonien in Kolonieclustern. Diese Werte zeigen, dass der CCA sehr selektiv Kolonien auf den Agarplatten erkennt und es kaum Fehlerkennungen gibt.

Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Qualität des CCA ist die für die Auswertung der Bilder benötigte Zeit. Dafür wurde bei dem Auswerten von 50 Platten die Zeit gemessen, die für die manuelle Zählung benötigt wurde. Diese Zeiten wurden mit der Rechenzeit des CCA verglichen, die für die Auswertung desselben Bildes benötigt wurde. Dabei benötigte der CCA im Mittel 2 Sekunden pro Bild, wohingegen die manuelle Auswertung im Mittel 2 Minuten dauerte. Die Zeit die für die Berechnungen benötigt wird ist zudem von einigen Faktoren abhängig, wie z. B. Auflösung der Bilder und auch deren Aufnahmequalität. Je schlechter die Aufnahmequalität desto mehr zusätzlich Schritte müssen gemacht werden um ein verwertbares Ergebnis zu erhalten, besonders bei der Plattenerkennung.

### 8.3.2 Optimierungsansätze

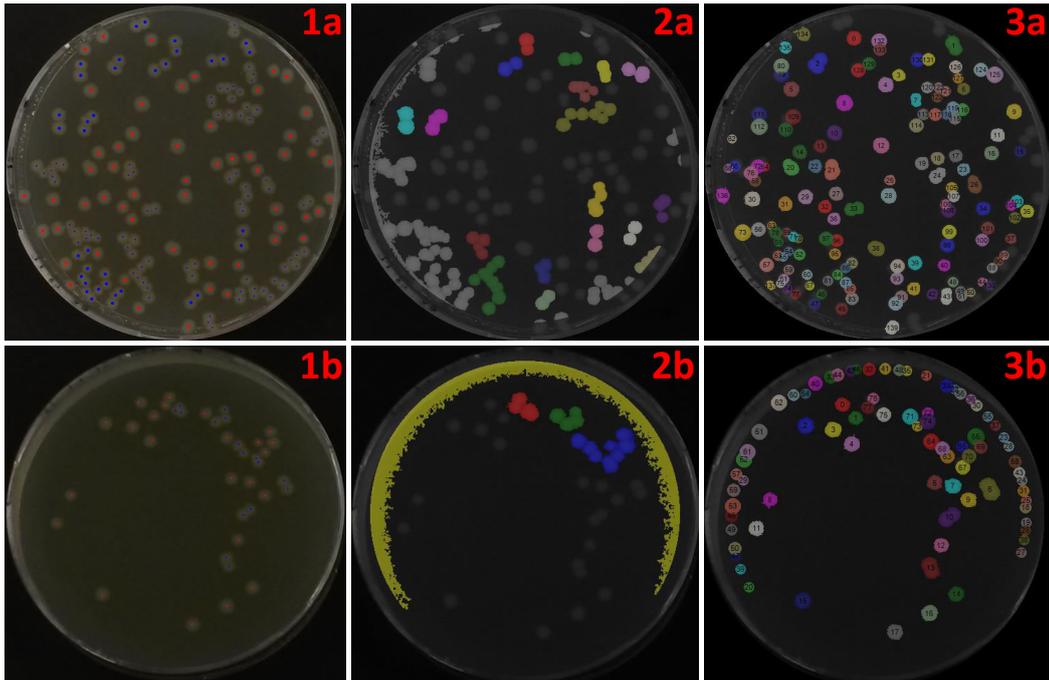
Neben den Kolonieclustern im Randbereich werden Fehler auch durch Koloniecluster verursacht, die zwar nicht im Randbereich liegen, aber mit diesem verbunden sind (Moore-Nachbarschaft) und daher ebenfalls eliminiert werden (Abbildung 8.7, Nr. 2-3). Eine verbesserte Erkennung dieser Koloniecluster würde die Genauigkeit des CCA verbessern. Eine mögliche Lösung ist es, nicht die ganzen Randobjekte zu löschen, sondern nur die Randpixel innerhalb dieser Objekte. Hierbei wird die Position jedes Objektpixels untersucht. Liegt er im Randbereich wird nur dieser Pixel gelöscht und nicht wie zuvor das ganze Objekt. Dies führt dazu, dass Objekte die Randpixel beinhalten kleiner werden und in mehrere Objekte zerfallen können (Abbildung 8.8). Dieses Verfahren wird auf das Beispiel aus Abbildung 8.7 angewendet. Dadurch erhöht sich die Anzahl der durch den CCA detektierten Kolonien von 110 auf 140 (Abbildung 8.9, Nr 1-3a). Wird dieser Ansatz auf alle 100 Bilder angewandt, zeigt sich, dass es die mittlere Abweichung bei Platten mit hoher Koloniedichte verbessert. Bei Platten mit niedriger Koloniedichte wird die mittlere Abweichung deutlich verschlechtert (Tabelle 8.1). Für Platten mit weniger als 50 Kolonien verschlechtert sich die mittlere



**Abbildung 8.8** Vergleich von Randobjektlöschung und Randpixellöschung. (0) Ausgangsbild mit allen als Clustern definierten Objekten. Alles außerhalb des grünen unterlegten Bereiches in der Mitte wird als Randbereich betrachtet. (1) Objekte nach Randobjektlöschung. Objekte mit mehr als ein Drittel Pixel im Randbereich werden als Randobjekte betrachtet und gelöscht. (2) Objekte nach Randpixellöschung. Die Definition von Randobjekten ist identisch, allerdings wird nicht das Ganz Objekt gelöscht, sondern nur die Pixel, welche im Randbereich liegen

Abweichung von 8,03 % auf 68,33 %. Der Hauptgrund für diese deutlichen Abweichungen zwischen Manueller- und Algorithmenzählung ist die nicht ausreichende Entfernung von Binärsierungsartefakten im Randbereich der Platte (Abbildung 8.9, Nr. 2b). Auf Platten mit einer niedrigeren Koloniedichte ist es wahrscheinlicher weniger oder keine Einzelkolonien im Randbereich der Platte zu haben. Deshalb wird als bester Schwellenwert ein niedriger Binärsierungsschwellenwert ausgewählt, weil weniger Kolonien bzw. runde Objekte in der Randregion mit Binärsierungsartefakten verschmelzen. Diese Binärsierungsartefakte sind nur sehr schwer zu erkennen und zu entfernen. Daher ist dieser Ansatz für den allgemeinen Fall nur schwer anwendbar. In Spezialfällen, wie z. B. bei sehr hoher Koloniedichte, kann mit diesem Ansatz eine deutliche Verbesserungen erzielt werden. Hier könnte ein Entscheidungsalgorithmus eingeführt werden, der festlegt wie mit den Randobjekten verfahren wird. Dieser könnte analog zu dem im Kapitel 4.2.4 beschriebenen Entscheidungskonzept zwischen PCA und CRA aufgebaut sein. Ein mögliches Entscheidungskriterium wäre hier die Koloniedichte im Zentrum der Platte.

Ein alternativer Ansatz zur Verbesserung der Algorithmenenergebnisse ist die Einführung eines Korrekturfaktors. Das Bestimmtheitsmaß von 0,98 der linearen Regression zwischen manueller Zählung und Algorithmenenergebnissen lässt darauf schließen, dass diese systematische Abweichung mit einem Korrekturfaktor behoben werden kann (Abbildung 8.6). Als Korrekturfaktor kann die Steigung der linearen Regression verwendet werden, welche dann mit den Algorithmenenergebnissen multipliziert wird (Tabelle 8.1). Für Platten mit mehr als 50 KBEs führt dies zu einer deutlichen Verbesserung der mittleren Abweichung. Bei Platten zwischen 50 und 150 KBEs verbessert sich die mittlere Abweichung von 14,2 % auf 6,77 % und bei Platten mit mehr als 150 KBEs von 16,99 % auf 7,16 %. Für Platten mit weniger als 50 KBEs zeigt sich eine Verschlechterung der mittleren Abweichung von 8,07 %



**Abbildung 8.9** Alternativer Ansatz bei dem nur Pixel im Randbereich gelöscht werden und nicht das ganze Objekt. (1a) Manuell gezählte Kolonie mit 171 gezählten Kolonien. Einzelkolonien sind rot und Kolonien innerhalb von Kolonieclustern sind blau markiert. (2a) Koloniecluster nach der Eliminierung von Pixeln im Randbereich. (3a) Ergebnisbild CCA mit 140 gezählten Kolonien. Die farblosen Kolonien auf dem Bild wurden nicht vom CCA gezählt. (1b) Manuell gezählte Kolonie mit 39 gezählten Kolonien. (2b) Koloniecluster nach der Eliminierung von Pixeln im Randbereich. (3b) Ergebnisbild CCA mit 78 gezählten Kolonien. Alle Kolonien die im Randbereich der Platte gefunden wurden sind Fehlerkennungen, die auf die nicht ausreichende Entfernung von Binarisierungsartefakten im Randbereich zurückzuführen ist.

auf 10,35 %. Dies lässt darauf schließen, dass eine Überkorrektur auf diesen Platten stattfindet. Der Hauptgrund für die Abweichungen bei Platten mit hoher Koloniedichte sind nicht erkannte Koloniecluster im Randbereich der Platte. Bei Platten mit niedriger Koloniedichte treten weniger Koloniecluster auf und damit auch weniger Koloniecluster im Randbereich. Daher sollte auch hier der Korrekturfaktor nur für Platten mit mehr als 50 KBEs angewandt werden.

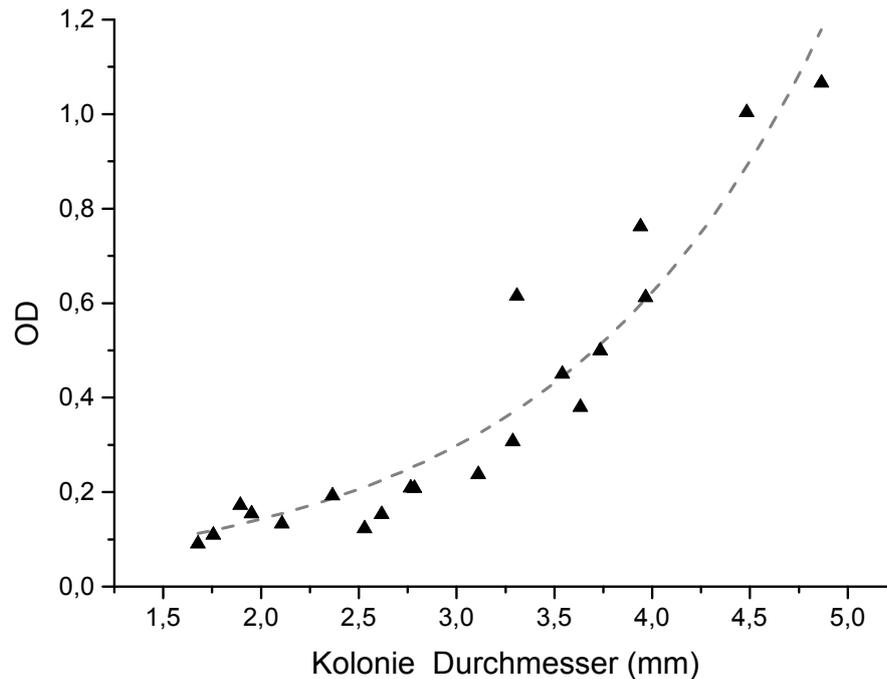
Der Korrekturfaktor ist ein gutes Werkzeug, um die Genauigkeit des CCA zu verbessern. Allerdings ist es wichtig, dass die Kolonien auf der Platte gleichmäßig verteilt sind, was nur der Fall ist, wenn die Platte sorgfältig hergestellt wurde. Darüber hinaus muss der Korrekturfaktor vermutlich für jede Art von Experiment neu ermittelt werden. Daher ist es langfristig gesehen sinnvoll die Erkennung von Kolonieclustern in der Randregion zu verbessern. Ein mögliche Strategie hier für wurde von Chiang *et al.* (2015) vorgestellt, dabei wird der Randbereich der Platten separat mit gesonderten Algorithmen ausgewertet. Das Einfügen eines Algorithmenschrittes, welcher das Entfernen von Reflexionen ermöglicht (Xue *et al.* 2015), könnte ebenfalls die Erkennung der Koloniecluster im Randbereich verbessern und zusätzlich die Bildaufnahme erleichtern.

### 8.3.3 Weitere Anwendungen

Eine weitere potentielle Anwendung für den CCA ist die Vorhersage der OD, wenn diese Kolonie in einem definierten Volumen eines Mediums suspendiert würde. Diese Vorhersage soll anhand der Koloniegröße gemacht werden. Da die Bilder freihändig aufgenommen werden kann die Koloniegröße in Pixeln auf dem Bild stark variieren. Sie ist sowohl von der gewählten Auflösung als auch vom Abstand zwischen Platte und Kamera abhängig. Als Referenz werden daher die Umrisse der Agarplatte verwendet. Die Größe der verwendeten Agarplatte muss für die Berechnungen bekannt sein.

Um diese Anwendung zu testen, wurden Kolonien von Agarplatten gepickt und in einem definierten Volumen suspendiert. Im Anschluss wurde die OD gemessen. Es wurden Platten mit einem Alter zwischen einem und vier Tagen verwendet. Für die ersten 24 h wurden die Platten bei 37 °C inkubiert und dann danach bei 8 °C gelagert. Diese Ergebnisse wurde mit den berechneten Koloniegrößen des Algorithmus korreliert.

Beispielhaft ist eine solche Messung in Abbildung 8.10 dargestellt. Der Zusammenhang zwischen Koloniedurchmesser und OD lässt sich durch eine Exponentialfunktion beschreiben. Die Messung weist starke Streuungen auf, daher kann durch die exponentielle Regression auch nur ein Bestimmtheitsmaß von 0,9 erzielt werden. Dieser Effekt ist auch bei allen anderen Messungen zu erkennen (Tabelle B.6, S. 118). Durch diesen Effekt weisen die Messungen eine geringe Reproduzierbarkeit auf. Selbst gleich alte Platten unterscheiden sich deutlich in

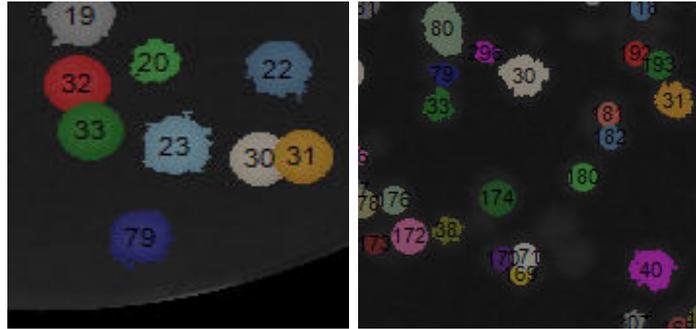


**Abbildung 8.10** Korrelation zwischen Koloniedurchmesser und OD für Kolonien von einer drei Tage alten Platte. Die Regression erfolgte mit der Formel  $y = a \cdot e^{b \cdot x}$  mit  $a = 0,027$ ,  $b = 0,784$  und einem  $R^2$  von 0,9.

ihren Regressionsparametern. Die starke Streuung der Messungen hat zwei Gründe. Der erste ist, dass es sehr schwer ist eine Kolonie vollständig von einer Platte zu entnehmen, gerade bei großen Kolonien. Der zweite Grund ist, dass der CCA die Umrisse der Kolonie in vielen Fällen nicht exakt erkennt. Hierbei kann es passieren, dass die berechnete Koloniegröße entweder zu groß oder zu klein ist (Abbildung 8.11). Der Hauptgrund für zu große Kolonien sind Binarisierungsartefakte am Rand der Kolonie. Ist die bestimmte Koloniegröße kleiner als die eigentliche Kolonie, dann wurde das iterative Thresholding abgebrochen bevor die volle Größe der Kolonie abgebildet wurde (Abbildung 8.2, Nr. 2).

In den meisten Messreihen konnte folgendes beobachtet werden: Je älter die Platte ist, desto höher ist die OD bei gleichem Koloniedurchmesser. Dieser Effekt kann dadurch begründet werden, dass die Bakterienkolonien dreidimensional wachsen und nicht nur in die Breite. Die Höhe der Kolonie kann bisher nicht durch den CCA bestimmt werden und daher sollte das Alter der Platte als Parameter in die Berechnung eingehen. Alternativ könnte auch versucht werden über die Helligkeit bzw. die Farbverteilung der Kolonie auf der Platte, das Alter der Kolonie zu ermitteln.

Obwohl die Anwendung noch einige Schwachstellen aufweist, zeigt sie viel Potential. Damit sie im Laboralltag eingesetzt werden kann, muss der CCA optimiert werden, damit die Koloniegröße exakt durch den Algorithmus bestimmt werden kann. Dies ist beim Zählen



**Abbildung 8.11** Links: Kolonien zeigen deutliche Auswüchse am Rand. Diese entstehen durch Binarisierungsartefakte. Rechts: Helle Umrandungen der markierten Kolonien zeigen, dass die erkannte Koloniegröße deutlich kleiner ist als die tatsächliche Kolonie

der Kolonien nicht notwendig und in vielen Fällen vermutlich sogar kontraproduktiv. Eine Möglichkeit wäre es einen zweiten Modus für den CCA zu entwickeln, dessen Fokus es ist die Größe der Kolonie exakt abzubilden.

## 8.4 Fazit

In diesem Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass der entwickelte Colony Counter Algorithm (CCA) im Stande ist, Bilder von Agarplatten, welche mit dem Smartphone aufgenommen wurden, auszuwerten und die Kolonien auf diesen Platten zu zählen. Für die Auswertung der Bilder benötigt der CCA im Mittel 2 Sekunden. Der Vergleich mit manuellen Zählungen der Platten ergab eine mittlere Abweichung von 11,88%. Die Abweichungen sind allerdings stark von der Koloniedichte auf der Platte abhängig und variieren zwischen 8,07% bei Platten mit weniger als 50 Kolonien und 16,99% bei Platten mit mehr als 150 Kolonien. Zusätzlich wurde noch überprüft, ob es sich bei den vom CCA gezählten Kolonien wirklich um Kolonien handelt. Die mittlere Übereinstimmungsrate betrug 99,46%. Dies zeigt, dass der CCA sehr selektiv ist und es quasi keine Fehlerkennungen gibt.

Der Hauptgrund für die Abweichungen zwischen den Ergebnissen des CCA und der manuellen Zählung sind Koloniecluster im Randbereich der Platte, welche vom Algorithmus nicht erkannt werden. Um diesen Fehler auszugleichen wurde ein Korrekturfaktor eingeführt, welcher auf einer linearen Regression beruht. Durch diesen Korrekturfaktor konnte die mittlere Abweichung bei hohen Koloniedichten deutlich verbessert werden. Allerdings wurde bei niedrigen Koloniedichten eine Überkorrektur festgestellt. Daher sollte der Korrekturfaktor nur bei Platten mit mehr als 50 Kolonien angewandt werden.

Eine weitere potentielle Anwendung des CCA ist das Auswählen einer Kolonie, um eine Flüssigkulturen mit einer definierten OD zu inokulieren. Dabei wird die verwendete Kolonie

direkt von der Agarplatte entnommen. Dafür wurde mittels CCA die Größe der Kolonie auf der Agarplatte und die daraus resultierende OD nach dem resuspendieren dieser Kolonie bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass die Koloniegröße vom CCA nicht genau abgebildet wird und daher exakte Vorhersagen der OD anhand der Algorithmenenergebnisse bisher nicht möglich ist.

Der Korrekturfaktor bietet nur eine Annäherung an die wirkliche Koloniezahl und ist vermutlich stark vom Aufbau des Experiments abhängig. Daher sollte die Erkennung der Koloniecluster im Randbereich verbessert werden. Darüber hinaus sollte ein zweiter Modus im CCA implementiert werden, welcher es erlaubt die Größe von Kolonien auf der Agarplatte exakt zu bestimmen. Ein weiterer wichtiger Schritt um den CCA im Labor sinnvoll einsetzen zu können ist die Integration des Algorithmus in eine App. Eine Umsetzung dieser Integration ist bei Austerjost *et al.* (2017) dargestellt.

## 9 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Anwendung von Bildverarbeitungsalgorithmen für die Entwicklung und Optimierung von Messverfahren in biotechnologischen Prozessen präsentiert. Dabei wurden das Potential dieser Algorithmen anhand der In-situ-Mikroskopie, der Charakterisierung von 3D-gedruckten Mischkammern und beim Einsatz von Handheld Devices zum Zählen von Kolonien auf Agarplatten dargestellt.

### In-situ-Mikroskopie

Die Online-Zelldichtebestimmung in *P.-pastoris*-Kultivierungen ist aufgrund der hohen Zelldichten die erreicht werden können immer noch eine Herausforderung für die Prozessüberwachung. Ein neues Verfahren bietet die Kombination aus ISM und Bildverarbeitungsalgorithmen. Hierfür wurden zwei Bildverarbeitungsalgorithmen entwickelt, die anhand von ISM-Bildern die Zelldichte in *P.-pastoris*-Kultivierungen bestimmen können. Der Cluster Recognition Algorithm (CRA) nutzt die Clusterbildung der *P.-pastoris*-Zellen, um anhand der Clustergrößen die Zelldichte der Kultivierung zu bestimmen. Dieser Algorithmus erzielt eine gute Reproduzierbarkeit, so betrug die maximale Standardabweichung bei gleichen Mess- und Kultivierungsbedingungen 11,64 %. Der CRA zeigte auch bei hohen Zelldichten (84 g/L BTM, OD 240) keine Sättigungseffekte und ist damit vom Messbereich vergleichbar mit in der Literatur beschriebenen Verfahren wie Infrarotspektroskopie (80 g/L BTM) und dielektrischer Spektroskopie (84 g/L BTM) (Crowley *et al.* 2005; Fehrenbach *et al.* 1992). Ein Störfaktor des CRA sind Luftblasen, welche sich in der Messzone des ISM festsetzen. Um den Einfluss solcher Luftblasen zu reduzieren wurde der Bubble Analyzer (BA) entwickelt. Dieser Algorithmus erkennt Luftblasen und entfernt sie aus den Ergebnissen des CRA. In einigen Kultivierungen wuchsen die *P.-pastoris*-Zellen deutlich langsamer und bildeten keine Cluster, bei diesen Kultivierungen konnte die Zelldichte mit dem CRA nicht bestimmen werden

Der zweite entwickelte Algorithmus ist der Pichia Counter Algorithm (PCA) dieser Algorithmus zählte die *P.-pastoris*-Zellen auf den ISM-Bildern und bestimmte anhand der Zellzahl die Zelldichte der Kultivierung. Dieser Algorithmus wird jedoch stark durch die Clusterbildung der *P.-pastoris*-Zellen gestört. Gerade am Ende der Kultivierungen sind die Cluster so dicht,

dass quasi keine Zellen mehr erkannt werden können. Deshalb lässt sich der PCA nur bis zu einer Zelldichte von 35 g/L BTM verwenden und zeigt dabei eine schlechte Reproduzierbarkeit zwischen gleichen Kultivierungen. Bei Kultivierungen ohne Clusterbildung hingegen ist die Reproduzierbarkeit des PCA sehr gut. Die Standardabweichungen zwischen Messungen mit gleichen Mess- und Kultivierungsbedingungen betragen maximal 10,4 %. Eine wichtige Größe für die Reproduzierbarkeit von Messungen ist die Messzonenhöhe des ISM, diese sollte für vergleichbare Messungen konstant gehalten werden.

Das Wachstumsverhalten der *P.-pastoris*-Zellen hat einen großen Einfluss auf das entwickelte Messsystem, allerdings ist bei jedem Wachstumsverhalten entweder der CRA oder der PCA im Stande die Zelldichte zu bestimmen. Für eine Anwendung in der Praxis muss diese Entscheidung, welches Wachstumsverhalten die *P.-pastoris*-Zellen haben bzw. welcher Algorithmus aktiv sein soll, automatisch erfolgen. Dafür wird ein kombinierter Algorithmus aus CRA und PCA vorgeschlagen, welcher die Bilder mit beiden Algorithmen auswertet und anhand von weiteren Entscheidungskriterien beurteilt, welcher Algorithmus aktiv sein soll. Ein solches zusätzliches Kriterium kann der Turbidity Algorithm (TA) darstellen. Potentiell können diese Informationen über das aktuelle Wachstumsverhalten der Zellen genutzt werden, um die Prozessführung zu optimieren oder Prozesse bei Bedarf frühzeitig zu stoppen.

Insgesamt bietet die Kombination aus In-situ-Mikroskopie und den zwei entwickelten Bildverarbeitungsalgorithmen CRA und PCA ein geeignetes Werkzeug zur Online-Zelldichtebestimmung von *P.-pastoris*-Kultivierungen.

Eine weitere Anwendung der Kombination aus In-situ-Mikroskopie und Bildverarbeitungsalgorithmen ist die Zelldichtebestimmung von *E.-coli*-Kultivierungen. Da die *E.-coli*-Zellen selbst von der stärksten Optik des verwendeten ISM nicht einzeln aufgelöst werden können, mussten andere Bildinformationen verwendet werden. Der entwickelte Turbidity Algorithm (TA) nutzt die Grauwertverteilung und berechnet den mittleren Grauwert der ISM-Bilder, um die Zelldichte zu bestimmen. Dabei nutzt der Algorithmus nur den homogen ausgeleuchteten Bereich in der Mitte der ISM-Bilder. Anhand von drei *E.-coli*-Kultivierungen konnte gezeigt werden, dass das entwickelte Verfahren eine gute Reproduzierbarkeit hat. Die Standardabweichung der Messungen der drei Kultivierungen betrug 8 % bei den Korrelationen mit der OD und 5,9 % bei den Korrelationen mit der BTM. Bei den verwendeten ISM-Einstellungen war die Messobergrenze bei 70 g/L BTM bzw. einer OD von 200 erreicht.

Durch die Verwendungen einer größeren Messzonenhöhe konnte die Messobergrenze auf 83,5 g/L BTM bzw. auf eine OD von 226,7 verschoben werden. Durch die größere Messzonenhöhe änderte sich aber auch der mathematische Zusammenhang zwischen den Ergebnissen des TA und der BTM bzw. OD. Der Zusammenhang war nicht mehr linear sondern lies sich

für die BTM durch eine Exponentialfunktion und für die OD durch ein Polynom 2. Grades beschreiben. Zum Ende der *E.-coli*-Kultivierungen kann eine starke Blasenbildung in der Messzone auf den ISM-Bildern beobachtet werden. Diese Blasen stören die Messung und sorgen dafür, dass die Ergebnisse des TA abnehmen, obwohl die Zelldichte konstant bleibt oder weiter zunimmt. Die Blasenbildung ist vermutlich auf die Kombination aus starker Begasung und hoher Viskosität der *E.-coli*-Zellbrühe bei hohen Zelldichten zurückzuführen. Für diese Anwendung könnte auch ein Zusatzalgorithmus nach dem Vorbild des BA entwickelt werden, um den Einfluss der Blasenbildung auf die Messung zu reduzieren.

Die Kombination aus der In-situ-Mikroskopie und TA ermöglicht eine stabile Messung der Zelldichte in *E.-coli*-Kultivierungen bis zu einer BTM von 70 g/L.

Die Messzonenhöhe des ISM hat einen großen Einfluss auf die Messungen, besonders für die Reproduzierbarkeit ist es in vielen Fällen entscheidend die gleiche Messzonenhöhe zu verwenden. Bisher musste die Messzonenhöhe immer manuell vom Nutzer eingestellt werden. Das dafür verwendete Verfahren ist zeitaufwendig und erfordert Erfahrung. Um die Einstellung der Messzonenhöhe zu erleichtern und damit das ISM auch unerfahrenen Nutzern zugänglich zu machen, wurde ein automatisiertes Verfahren zur Bestimmung der Messzonenhöhe entwickelt. Dafür wurde in die Saphirglasscheiben des ISM mittels Lasergravur eine kreuzförmige Markierung eingebracht. Diese Markierungen können durch den entwickelten Bildverarbeitungsalgorithmus Window Marker Analyzer (WMA) detektiert werden. Um die Position der Saphirglasscheibe zu ermitteln, wird das Objektiv schrittweise verfahren und in jeder Position ein Bild aufgenommen. Diese Bilder werden mit dem WMA ausgewertet. Anhand der Ergebnisse des Algorithmus und der dazu gehörigen Objektivposition kann die Messzonenhöhe berechnet werden.

Zur Validierung dieses Verfahrens wurden Messungen mit definierten Abständen durchgeführt. Diese wurden durch Einklemmen von Abstandshaltern mit definierter Stärke in der Messzone des ISM eingestellt. Bei diesen Messungen konnte gezeigt werden, dass sowohl beim 4x als auch beim 10x Objektiv die Messzonenhöhe zuverlässig ermittelt werden konnte. Das Bestimmtheitsmaß der linearen Regressionen liegt bei beiden Messungen oberhalb von 0,999. Neben der guten Detektierbarkeit durch den WMA sollten die Markierungen auf den Saphirglasscheiben so wenig wie möglich mit der eigentlichen Messung interferieren. Da die Markierung auf den Saphirglasscheiben immer noch deutliche Schatten im Bild erzeugen, selbst wenn die Fokusebene auf der anderen Seite der Saphirglasscheibe liegt, könnten hier Störungen der eigentlichen Messungen auftreten. Um diese zu vermeiden, sollten die Lasermarkierungen so auf den Scheiben ausgerichtet werden, dass sie am Bildrand liegen und damit außerhalb der RVI der eigentlichen Messung. Alternativ könnten weitere Geometrien für Markierungen getestet werden, welche zu einer geringeren Schattenbildung führen.

Insgesamt bietet das entwickelte Verfahren großes Potential um die Arbeit mit dem ISM für Nutzer zu erleichtern und zu beschleunigen.

### **Charakterisierung von 3D-gedruckten Mischkammern**

Der 3D-Druck macht individuelle Designs von Mischkammern für Schüttelplatten verfügbar und erlaubt es dem Wissenschaftler optimale Bedingungen für seine Organismen zu erzeugen. Um die optimale Mischkammer zu finden, müssen diese charakterisiert werden. Eine wichtige Eigenschaft ist die Mischzeit, welche anhand von Mischzeitexperimenten mit einem Farbstoff und Aufnahmen einer Hochgeschwindigkeitskamera ermittelt werden können. Für die Auswertung dieser Aufnahmen wurde der Varianzalgorithmus (VA) entwickelt. Zu Beginn der Auswertung muss der Nutzer die Region von Interesse (RVI) auswählen, also den Bereich, der für das Mischzeitexperiment relevant ist. Dann wird für alle drei Farbkanäle des Bildes die Varianz innerhalb der RVI bestimmt. Die Varianz ist dabei indirekt proportional zur Durchmischung der Lösung. Je geringer die Varianz, desto besser ist der Inhalt der Mischkammer durchmischt. Zusätzlich wurde noch ein geeignetes Kriterium entwickelt, ab wann die Homogenität erreicht ist.

Bei der Auswertung der Mischzeitexperimente zeigt sich, dass die Ergebnisse des VA mit periodischen Schwingungen überlagert sind. Diese Schwingungen entsprechen der Dauer einer Umdrehung des verwendeten Kreisschüttlers. Diese können mit einem Mittelwertfilter dessen Fensterbreite ebenfalls der Dauer einer Umdrehung entspricht entfernt werden. Bei den Mehrfachmessungen der einzelnen Mischkammern konnten große Abweichungen zwischen den Mischzeiten beobachtet werden. Diese sind vermutlich auf die manuelle Zugabe des Farbstoffes mit einer Pipette zurückzuführen. Bei dieser kommt es vor, dass die Zugabe des Farbstoffes in mehreren Tropfen erfolgt und die Position, in der der Farbstoff auf die Wasseroberfläche der Mischkammer trifft, stark variiert. Um eine bessere Reproduzierbarkeit der Mischzeitexperimente zu erreichen, sollte die Zugabe des Farbstoffes über eine Pumpe erfolgen, welche auf dem Kreisschüttler fixiert ist und so eine feste Position zur Mischkammer hat. Ein weiteres Problem für die Auswertung stellen Reflexionen auf der Wasseroberfläche der Mischkammer da. Diese führen zu überbelichteten Bereichen auf den Bildern der Hochgeschwindigkeitskamera, welche dann die Auswertung mit dem VA stören. Durch die Verwendung einer indirekten Beleuchtung könnten diese Reflexionen vermutlich vermieden werden.

Die Auswertung von Hochgeschwindigkeitsaufnahmen von Mischzeitexperimenten mittels Bildverarbeitungsalgorithmen bietet eine gute Möglichkeit um die Mischzeit von 3D-gedruckten Mischkammern zu bestimmen. Durch optimierte Durchführung der Mischzeit-

experimente könnte die Verlässlichkeit der Mischzeitbestimmung noch deutlich gesteigert werden.

### **Handheld Devices zum Zählen von Kolonien auf Agarplatten**

In Zukunft werden Handheld Devices wie Smartphones und Smartglasses fester Bestandteil der Laborarbeit sein (Gan und Poon, 2016). Eine mögliche Anwendung für diese Systeme ist das Zählen von koloniebildenden Einheiten (KBEs) auf Agarplatten. Deshalb wurde der Colony Counter Algorithm (CCA) entwickelt. Dieser Algorithmus erkennt Agarplatten auf Bildern, welche mit Handheld Devices aufgenommen wurden und zählt im Anschluss alle KBEs auf dieser Platte. Dabei werden sowohl Einzelkolonien als auch Kolonien in Clustern gezählt. Koloniecluster werden vom Algorithmus in Einzelkolonien zerteilt. Der CCA funktioniert voll automatisch und benötigt keine Eingabe von Parametern durch den Nutzer. Für die Erkennung der Agarplatte durch den CCA ist es wichtig, dass sich diese auf einem homogenen Untergrund befindet.

Für die Validierung des CCA wurden 100 Platten sowohl manuell als auch vom Algorithmus ausgewertet. Um die Verlässlichkeit der manuellen Auswertung zu verbessern erfolgte diese auch anhand der Bilder der Agarplatten. Hierbei wurden alle vom Menschen erkannten Kolonien auf den Bildern farblich markiert und dann ebenfalls mit einem Algorithmus ausgezählt. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahren ist, dass die Positionen der manuell gezählten Kolonien mit den Positionen der vom Algorithmus gezählten Kolonien verglichen werden können. Dadurch kann überprüft werden, ob die vom Algorithmus erkannten Kolonien auch vom Menschen als solche erkannt werden. Beim Vergleich zwischen den manuellen Zählungen und den Ergebnissen des CCA ergab sich eine mittlere Abweichung 11,88 %, wobei die Abweichungen stark von der Koloniedichte auf der Platte abhängen. Die Abweichungen variierte zwischen 8,07 % bei Platten mit weniger als 50 Kolonien und 16,99 % bei Platten mit mehr als 150 Kolonien. In einem weiteren Schritt wurde, durch den Vergleich der Positionsinformationen aus der manuellen Zählung und der Algorithmenzählung, überprüft, ob es sich bei den vom CCA gezählten Kolonien wirklich um Kolonien handelt. Die mittlere Übereinstimmungsrate betrug 99,46 %. Dies zeigt, dass der CCA sehr selektiv ist und es quasi keine Fehlerkennungen gibt. Für eine Auswertung eines Bildes mit dem CCA wurden im Mittel 2 s benötigt, wohingegen die manuelle Zählung im Mittel ca. 2 min dauerte.

Als Hauptgrund für die Abweichung zwischen den Ergebnissen des CCA und der manuellen Zählung sind Koloniecluster im Randbereich der Platte, welche vom Algorithmus nicht erkannt werden. Im Gegensatz zu Einzelkolonien können die Koloniecluster weder

anhand ihrer Größe noch anhand ihrer geometrischen Form von Binarisierungsartefakten, welche aufgrund von Reflexionen vermehrt im Randbereich auftreten, unterschieden werden und werden deshalb vom CCA verworfen. Dieser Effekt kommt besonders bei Agarplatten mit hoher Koloniedichte zum Tragen, da hier die Wahrscheinlichkeit höher ist, dass Koloniecluster im Randbereich auftreten. Um diesen Fehler auszugleichen wurde ein Korrekturfaktor eingeführt, welcher auf einer linearen Regression beruht. Durch diesen Korrekturfaktor konnte die mittlere Abweichung bei hohen Koloniedichten von 16,99 % auf 7,16 % verbessert werden. Allerdings wurde bei niedrigen Koloniedichten eine Überkorrektur festgestellt. Daher sollte der Korrekturfaktor nur bei Platten mit mehr als 50 Kolonien angewandt werden.

Als weitere potentielle Anwendung des CCA wurde das Inokulieren von Flüssigkulturen mit einer definierten OD, durch Kolonien die direkt von einer Agarplatte entnommen wurden, identifiziert. Dafür wurde mittels CCA die Größe der Kolonie auf der Agarplatte und die daraus resultierende OD nach dem resuspendieren dieser Kolonie bestimmt. Da der Schwerpunkt des CCA auf dem Zählen von Kolonien liegt, zeigte sich, dass die Koloniegröße von diesem nicht genau abgebildet wird. Dies hat zur Folge, dass eine exakte Vorhersage der OD anhand der Algorithmenenergebnisse mit der aktuellen Form des CCA nicht möglich ist.

Um den Algorithmus weiter zu verbessern sollte die Erkennung der Koloniecluster im Randbereich verbessert werden. Eine Möglichkeit wäre hierbei den Randbereich gesondert zu betrachten, wie es bei Chiang *et al.* (2015) vorgestellt wird. Zusätzlich sollte noch ein zweiter Modus in den CCA implementiert werden, welcher den Fokus auf die exakte Bestimmung der Koloniegröße legt und so das definierte Inokulieren von Flüssigkulturen direkt von Agarplatten ermöglicht. Damit der CCA sinnvoll im Labor eingesetzt werden kann, ist eine Integration in ein App notwendig. Eine mögliche Implementierung des CCA ist bei Austerjost *et al.* (2017) beschrieben.

Durch die entwickelten Bildverarbeitungsalgorithmen konnten neue Messverfahren für biotechnologische Prozesse etabliert und bestehende Anwendungen optimiert werden. Das ISM kann nun für Hochzelldichtemessungen von *P.-pastoris*- und *E.-coli*-Kultivierungen eingesetzt werden. Zusätzlich kann die Messzonenhöhe des ISM automatisiert bestimmt werden, was den Einsatz für den Anwender erleichtert und die Reproduzierbarkeit erhöht. Die Auswertung von Mischzeitexperimenten anhand von Aufnahmen einer Hochgeschwindigkeitskamera wurde ermöglicht und das Zählen von Kolonien auf Agarplatten anhand von Bildern, welche mit Handheld Devices aufgenommen wurden.

Wie man an den Bildverarbeitungsalgorithmen aus dieser Arbeit erkennen kann variiert die Komplexität stark mit der Anwendung und mit der Bildqualität. Der CCA ist sehr komplex und besteht aus mehr als 30 Schritten von denen sich viele gegenseitig beeinflussen. Dennoch

ist dieser Ansatz vermutlich nur eine von vielen möglichen Lösungen um Kolonien auf Smartphonebildern zu zählen. Aufgrund der hohen Komplexität der benötigten Algorithmen ist es sehr schwer und zeitaufwendig für Menschen die optimale oder auch nur eine gute Lösung für solche anspruchsvollen Aufgaben in der Bildverarbeitung zu finden.

Daher gibt es in der Bildverarbeitung einen Trend hin zum Einsatz von künstlicher Intelligenz in Form von Deep Learning Algorithmen, um komplexe Problemstellungen besser lösen zu können. Schon heute können diese Algorithmen viele verschiedene Bestandteile auf Bildern erkennen und auf komplexe Zusammenhänge schließen (LeCun *et al.* 2015), wobei sie in einigen Bereichen bereits vergleichbare oder sogar bessere Leistungen erzielen als der Mensch (Ciresan *et al.* 2012). In der Zukunft wird diese Art von Algorithmen auch Einsatz in der Biotechnologie finden und so den Anwendungsbereich von Bildverarbeitungsalgorithmen noch deutlich erweitern.

# A Anhang: Material und Methoden

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien stammen, sofern nichts anderes angegeben ist, von den folgenden vier Herstellern: Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) und Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

Alle Algorithmen in dieser Arbeit wurden in C# als Teil der hauseigenen Bildverarbeitungssoftware „Graphic Analyzer“ programmiert. Dieser kann Dr. Patrick Lindner vom Institut für Technische Chemie erhalten werden.

## A.1 In-situ-Mikroskopie zur Zelldichtebestimmung in *P.-pastoris*-Kultivierungen

### Kultivierung

Für alle Kultivierungen wurde der *P. pastoris* -Stamm AX33 , welcher chromosomal integriertes methanol induzierbares Insulinvorstufengen trägt, verwendet. Der Stamm wurde von Gurrnkonda *et al.* (2010) hergestellt. In der Batchphase wurde das von Gurrnkonda *et al.* 2010 entwickelte definierte Medium eingesetzt (Tabelle A.1). Das verwendete Feed-Medium ist in Tabelle A.4 beschrieben und basiert auf der Arbeit von Goodrick *et al.* 2001.

Die Kultivierungen wurden in einem 2 L Edelstahlreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 1,6 L durchgeführt. Zum Start eines Kultivierungsdruchgangs wurde eine einzelne *P. pastoris* Kolonie von einer YPD-Agarplatte (10 g/L Hefeextrakt, 10 g/L Pepton, 20 g/L Glukose und 20 g/L Agar) und in einem 100 mL Schüttelkolben mit Schikanen mit 10 mL YPD resuspendiert. Diese Kolben wurden über Nacht bei 30 °C und 200 rpm kultiviert. Diese Kultur wurde verwendet um die Vorkultur zu starten. Dafür wurde ein Teil der Kultur in einen 1 L Schüttelkolben mit Schikanen in dem sich 100 mL des definierten Mediums befanden gegeben, sodass eine die Vorkultur eine OD von 0,5 hatte. Die Vorkultur wurde dann für 24 h bei 30 °C kultiviert und im Anschluss zum Inokulieren des Reaktors verwendet, sodass eine Start-OD von 0,5 erreicht wurde. Die Kultivierungen K4 und K5 wurden als Fedbatch-Kultivierung

durchgeführt. In K4 Kultivierung wurde die Zufütterung nach 28 h mit einer Pumprate von 0,2 mL/min gestartet und nach 50 h Kultivierungsdauer auf 0,4 mL/min erhöht. In K5 Kultivierung wurde die Zufütterung nach 34 h mit einer Pumprate von 0,2 mL/min gestartet und nach 44 h Kultivierungsdauer auf 0,6 mL/min erhöht.

Alle Reaktorkultivierungen wurden unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt. Die Temperatur wurde auf 30 °C gehalten. Der pH-Wert wurde mittels elektrochemischer Elektrode (Easferm Plus 120, Hamilton, USA) überwacht und durch Zupumpen von 3 M NaOH und 1 M HCl auf 5,5 gehalten. Der gelöste Sauerstoff wurde mittels amperometrischer Sauerstoffelektrode (InPro6820 O2-Sensor, Mettler Toledo, Schweiz) überwacht und durch kaskadierendes Rühren auf 20 % gehalten. Zur Begasung wurden 3 L/min Luft zugeführt bis die Rührerdrehzahl das Maximum von 1200 rpm erreicht hatte. Dann wurde noch zusätzlich 0,5 L/min reiner Sauerstoff zugeführt.

Als Referenzmessungen wurden OD und BTM anhand von Offline-Proben bestimmt. Dabei wurden alle Messungen als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die OD wurde bei 600 nm gemessen (Multiskan GO UV-Vis spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Deutschland). Für die BTM Messungen wurden 2 mL Zellsuspension in ein vorgewogenes Gefäß überführt und zentrifugiert (14 800 rpm für 5 min bei 8 °C mit einer Fresco 21 Zentrifuge, Thermo Fisher Scientific, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen und die Gefäße wurden bei 80 °C bis zur Massenkonstanz getrocknet. BTM Proben wurden erst ab einer OD von 10 genommen.

**Tabelle A.1** Zusammensetzung des Kultivierungsmediums für die Batchphase der *P. pastoris*-Kultivierungen

Chemikalie	Konzentration [g/L]
Glycerin	Variabel (Tabelle A.3)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9,4
Yeast Trace Metal Solution (YMTS) (Tabelle A.2)	4,56
CaCl <sub>2</sub>	0,28
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15,7
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	4,6
Biotin	0,0004

## ISM Einstellungen

Zur Beobachtung aller *P. pastoris* Kultivierungen wurden das ISM-TT mit einem 10x Objektiv verwendet. Für die Bildaufnahme wurde das Objektiv so verfahren, dass die Fokusebene auf der Innentubusscheibe lag. Dies hat zur Folge, dass die Zellen auf dem Bild defokussiert aufgenommen werden. Dadurch erscheint die Mitte der Zellen auf den Bildern hell und die

**Tabelle A.2** Zusammensetzung der Yeast Trace Metal Solution (YMTS) für die *P.-pastoris*-Kultivierungen

Chemikalie	Konzentration
KI	207,5 mg/L
MnSO <sub>4</sub>	760,6 mg/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	484 mg/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	43,3 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	5,032 g/L
FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	12 g/L
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	9,2 g/L

**Tabelle A.3** Glycerol Konzentrationen, ISM-Messzonenhöhen und Typen der *P.-pastoris*-Kultivierungen

Kultivierung	Typ	Start Glycerol Konz. [g/L]	Fed Glycerol Konz. [g/L]	Messzonenhöhe [um]
K1	Batch	95	-	40
K2	Batch	130	-	40
K3	Batch	130	-	40
K4	Fed-Batch	95	500	20, 40, 60
K5	Fed-Batch	100	500	20
K6	Batch	100	-	20
K7	Batch	105	-	20
K8	Batch	100	-	20

**Tabelle A.4** Zusammensetzung des Feed-Medium der *P.-pastoris*-Kultivierungen

Chemikalie	Konzentration
Glycerol	500 g/L
YTMS	12 mL/L
Biotin	2,4 mg/L

Ränder dunkel. Dies erleichtert das Zählen der Zellen und wurde auch schon auf andere Zelltypen angewandt (Lüder *et al.* 2014). Bei allen Kultivierungen wurde die Messzone des ISM zwischen zwei Messzyklen immer auf ca. 6 mm aufgefahren, um ein mögliches Zusetzen der Messzone zu verhindern. Alle weiteren Parameter sind in Tabelle A.5 dargestellt. Die Parameter der Algorithmen sind in den Tabellen A.6, A.7 und A.8 dargestellt.

**Tabelle A.5** ISM-Einstellungen für die *P. pastoris* Kultivierungen

ISM-Einstellungen	K1-K3	K4	K5-7	K8
Messzonenhöhe [ $\mu\text{m}$ ]	40	20, 40, 60	20	20
Abstand zwischen Messzyklen [min]	30	30	30	30
Abstand zwischen Bildern [s]	2	1,5	2	2
Bilder pro Messzyklus	300	200 *3	300	300
LED-Helligkeit [%]	100	100	100	100
Belichtungszeit [ $\mu\text{s}$ ]	300	300	300	300
Videomodus [Pixel]	1392 x 1040	1392 x 1040	1392 x 1040	1392 x 1040

**Tabelle A.6** Verwendete Parameter für die Berechnungen des Cluster Recognition Algorithm (CRA). Für die Kultivierung K5 musste ein anderer Bildausschnitt gewählt werden, da bei den ISM Aufnahmen die dunklen Randbereiche leicht verschoben sind.

Parameter	K1-K4 & K6-K8	K5
Binärisierungsschwellenwert	85	85
Minimale Objektgröße	200	200
Bildausschnitt X-Position	250	300
Bildausschnitt Y-Position	70	100
Bildausschnitt Breite	1000	1000
Bildausschnitt Höhe	800	800

**Tabelle A.7** Verwendete Parameter für die Berechnungen des Pichia Counter Algorithm (PCA)

Parameter	Wert
Top Hat Filter Größe	7
Levels Linear	10
Levels Linear Maximum	40
Binärisierungsschwellenwert	140
Minimale Objektgröße	12
Maximale Objektgröße	512

**Tabelle A.8** Verwendete Algorithmen Einstellungen des Turbidity Algorithm (TA)

Parameter	K4	K5	K6	K7	K8
X-Position	250	275	210	170	200
Y-Position	100	25	80	100	100
Breite	1000	1000	1000	1000	1000
Höhe	800	800	800	800	800

## A.2 Hochzellichtmessungen in *E.-coli*-Kultivierungen mittels In-situ-Mikroskopie

### Kultivierung

Für alle Experimente in diesem Abschnitt wurde der *Escherichia coli*-Stamm BL21 (DE3) verwendet. Alle Kultivierungen wurden als Fed-Batch Kultivierungen durchgeführt. Sowohl in der Batchphase als auch während der Zufütterung wurden die von Seeger *et al.* (1995) entwickelten Medien mit kleinen Änderungen verwendet (Tabelle A.9 & A.10).

Die Kultivierungen wurden in einem 2 L Edelstahlreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 1,6 L durchgeführt. Für die Vorkultur wurden 100 ml des Batchmediums in einen 500 ml Schüttelkolben gegeben und dann mit 1 ml Gefrierkultur inokuliert. Im Anschluss wurde die Kultur für 24 h bei 180 rpm und 37 °C inkubiert. Die Vorkultur wurde dann verwendet um den Reaktor mit einer OD von 0,5 zu inokulieren. Die *E. coli* Zellen wurden dann für 14 h über Nacht kultiviert. Im Anschluss wurde die Zugabe des Feed-Mediums mit einer Pumprate von 0,3 ml/min gestartet. Jede Stunde wurde die Glucosekonzentration im Medium gemessen (YSI 2950D Biochemistry Analyser, Xylem Analytics Germany, Deutschland). Wenn die Konzentration unterhalb 0,5 g/L lag wurde die Pumprate um 0,3 ml/min erhöht bis zu einer maximalen Pumprate von 2,4 ml/min.

Alle Reaktorkultivierungen wurden unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt. Die Temperatur wurde auf 37 °C gehalten. Der pH-Wert wurde mittels elektrochemischer Elektrode (Easferm Plus 120, Hamilton, USA) überwacht und durch Zupumpen von 3 M NaOH und 1 M HCl auf 7 gehalten. Der gelöste Sauerstoff wurde mittels amperometrischer Sauerstoffelektrode (InPro6820 O<sub>2</sub>-Sensor, Mettler Toledo, Schweiz) überwacht und durch kaskadierendes Rühren auf 20 % gehalten. Zur Begasung wurden 3 L/min Luft zugeführt bis die Rührerdrehzahl das Maximum von 1200 rpm erreicht hatte. Dann wurde noch zusätzlich 0,5 L/min reiner Sauerstoff zugeführt.

Als Referenzmessungen wurden OD und BTM anhand von offline Proben bestimmt. Hierbei wurden alle Messungen als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die OD wurde bei 600 nm

gemessen (Multiskan GO UV-Vis spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Deutschland). Für die BTM Messungen wurden 2 mL Zellsuspension in ein vorgewogenes Gefäß überführt und zentrifugiert (14 800 rpm für 5 min bei 8 °C mit einer Fresco 21 Zentrifuge, Thermo Fisher Scientific, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen und die Gefäße wurden bei 80 °C bis zur Massenkonstanz getrocknet.

**Tabelle A.9** Zusammensetzung des Mediums für die Batchphase der *E.-coli*-Kultivierungen.

Chemikalie	Konzentration g/L
Glucose	20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13,3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4
Zitronensäure	1,7
Na <sub>2</sub> EDTA · 2 H <sub>2</sub> O	0,014
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,003
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,013
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,002
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,003
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,002
Zn(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,034
Fe(III) citrat	0,101
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1,2
Thiamin · HCl	0,005
Kanamycin	0,02
Desmophen Antischaummittel	1 mL/L

### ISM Einstellungen

Für die Beobachtung aller *E. coli* Kultivierungen wurde das ISM-TT mit einem 10x Objektiv verwendet. Für die Bildaufnahme wurde das Objektiv so verfahren, dass die Fokusebene auf der Innentubusscheibe lag. Dies hat zur Folge, dass die Zellen auf dem Bild defokussiert aufgenommen wurden, allerdings können die *E. coli* Zellen aufgrund ihrer Größe nicht einzeln aufgelöst werden. In E2 wurden Messungen mit verschiedenen Messzonenhöhen durchgeführt. Dafür wurden in jedem Messzyklus drei mal 200 Bilder aufgenommen. Für das Verstellen der Messzonenhöhe wurde die Messzone immer einmal weit aufgefahren und im Anschluss automatisch auf die korrekte Höhe eingestellt. Bei allen Kultivierungen wurde die Messzone des ISM zwischen zwei Messzyklen auf ca. 6 mm aufgefahren, um ein mögliches Zusetzen der Messzone zu verhindern. Alle weiteren Parameter sind in Tabelle A.11 dargestellt.

**Tabelle A.10** Zusammensetzung des Feed-Mediums der *E.-coli*-Kultivierungen. Für E1 wurden 500 g/L Glucose verwendet bei E2 und E3 875 g/L

Chemikalie	Konzentration g/L
Glucose	500 / 875
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	20
Na <sub>2</sub> EDTA · 2 H <sub>2</sub> O	0,013
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,004
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	0,0235
CuCl <sub>2</sub>	0,0544
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,0047
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,004
Zn(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,016
Fe(III) citrat	0,040
Thiamin · HCl	0,0045
Kanamycin	0,020

**Tabelle A.11** ISM-Einstellungen für die *E.-coli*-Kultivierungen

ISM-Einstellungen	E1	E2	E3
Messzonenhöhe [µm]	20	20, 40, 60	20
Abstand zwischen Messzyklen [min]	30	30	30
Abstand zwischen Bildern [s]	1,5	1,5	1,5
Bilder pro Messzyklus	200	200 *3	200
LED-Helligkeit [%]	100	100	100
Belichtungszeit [µs]	300	300	300
Videomodus [Pixel]	1392 x 1040	1392 x 1040	1392 x 1040

Die verwendeten Parameter des Turbidity Algorithm (TA) sind in Tabelle A.12 dargestellt. Die leicht verschiedenen Positionen kommen dadurch zustande, dass die dunklen Bereiche sich zwischen den einzelnen Messungen leicht verschieben. Grund dafür können mechanische Spannungen oder eine leicht andere Anordnung der ISM Tubi zu einander sein.

**Tabelle A.12** Verwendete Algorithmen Einstellungen des Turbidity Algorithm (TA)

Parameter	E1	E2	E2	E2	E3
Messzonenhöhe [ $\mu\text{m}$ ]	20	20	40	60	20
X-Position	340	380	380	370	340
Y-Position	220	225	225	220	220
Breite	800	800	800	800	800
Höhe	600	600	600	600	600

### **A.3 Automatisierte Bestimmung der Messzonenhöhe beim In-situ-Mikroskop-TT**

Für die diesen Teil der Arbeit wurden Saphirglasscheiben (SITUS Technicals GmbH, Deutschland) verwendet. Die Scheibe hat einen Durchmesser von 10 mm und eine Stärke von 1 mm für den Innentubus und für den Außentubus einen Durchmesser von 14 mm und eine Stärke von 1,6 mm. Die Markierungen wurde von Dr. Jürgen Koch vom Laser Zentrum Hannover e.V. mittels Lasergravur-Verfahren auf die Saphirglasscheiben aufgebracht.

Die Saphirglasscheiben wurden so eingesetzt, dass die Markierung der Saphirglasscheibe des Innentubus auf der der Messzone abgewandten Seite war. Beim Außentubus wurde die Saphirglasscheibe so eingesetzt, dass die Markierung zur Messzonenseite hin zeigte. Für die spätere Anwendung sollten die Scheibenmarkierungen auf beiden Saphirglasscheiben auf der der Messzone abgewandten Seite sein, da sich sonst Objekte an den Markierungen anlagern könnten. In diesem Fall musste diese Anordnung gewählt werden, da der Arbeitsabstand des 10x Objektivs nur 9 mm beträgt. Aufgrund des aktuellen Aufbaus des ISM kann der Objektiv Tubus nicht ganz an die Saphirglasscheibe heran gefahren werden. Daher reichen diese 9 mm Arbeitsabstand nicht aus um die Markierung des Außentubus zu fokussieren, wenn diese auf der der Messzonen abgewandten Seite liegt. Durch Veränderungen der Objektivtubuslänge und eine leicht andere Gewindeführung im Innentubus könnte dieses Problem behoben werden und dafür sorgen, dass das Objektiv direkt an die Saphirglasscheibe des Innentubus herangeführt werden kann. Für die Validierungsmessungen ist die Anordnung der Markierungen aber nicht relevant und kann somit auch in diesem Aufbau durchgeführt werden.

Für die Validierung des entwickelten Verfahrens wurden durch Abstandshalter definierte Abstände eingestellt. Als Abstandshalter für die Messungen wurden Fühlerlehren verwendet deren Stärke mittels Mikrometerschraube (Mitutoyo Produkt-Nr. 102-301) bestimmt wurde. Dann wurde für jeden Abstand eine Bildserie aufgenommen bei der das Objektiv schrittweise verschoben wurde. Bei jedem Schritt wurde ein Bild aufgenommen und die dazu gehörige Position gespeichert. Im Anschluss wurden die Bilder mit dem WMA ausgewertet. Die zwei Objektivpositionen mit den stärksten Ergebnissen vom WMA repräsentieren die Positionen der Markierungen. Nach dem alle Abstände gemessen wurden, wurde das ISM vollständig auseinander und wieder zusammen gebaut. Dann wurde erneut alle Abstände gemessen. Dies wurde insgesamt dreimal für jedes Objektiv durchgeführt, so dass es für jeden Abstand und jedes Objektiv drei Messungen gibt. Die Parameter des WMA und die Einstellungen des ISM sind in Tabelle A.13 & A.14 dargestellt.

**Tabelle A.13** Algorithmen Einstellungen für die Auswertung der aufgenommenen Bilder zur Bestimmung der Messzonenhöhe

Parameter	Werte
Binarisierungsschwellenwert	130
Anzahl der verwendeten größten Objekte	1
Minimale Objektgröße [Pixel]	10
Minimale Objekt Kompaktheit	6
Maximale Objekt Kompaktheit	512

**Tabelle A.14** Verwendete ISM-Einstellungen

ISM-Einstellungen	10x Objektiv	4x Objektiv
Belichtungszeit [ $\mu$ s]	300	60
LED-Helligkeit [%]	100	100

## A.4 Entwicklung eines Algorithmus zur Mischzeitbestimmung

Die getesteten Mischkammern wurden mittels Schmelzschichtungsdruck aus Polymilchsäuren bei 215 °C gedruckt. Alle Experimente wurden bei 200 rpm durchgeführt. In die Mischkammer wurden 4 mL Leitungswasser gegeben und als Farbstoff wurde 4  $\mu$ L blaue Tinte verwendet. Die Zugabe der Tinte erfolgte manuell mittels einer Kolbenhubpipette.

Zur Bildaufnahme wurde die Kamera Casio EX-FH20 verwendet. Die Aufnahmen der Mischexperimente erfolgte mit 420 Bildern pro Sekunde. Die Kamera wurde auf einem Stativ auf dem Schüttler installiert, so dass sie den Schüttelbewegungen folgte und eine

feste Position zur untersuchten Mischkammer hatte. Die Beleuchtung erfolgte über einen LED-Ring, der um die Kameralinse installiert wurde.

Die Bilder wurden von dem entwickelten Bildverarbeitungsalgorithmus analysiert. Die Anpassung der RVI erfolgte für jede Messung individuell. Dabei wurde versucht einen möglichst großen Bereich abzudecken ohne, dass die Teile der Seitenwand in der RVI lagen. Die Algorithmen Parameter sind in Tabelle A.15 dargestellt.

**Tabelle A.15** Algorithmen Einstellungen des Varianzalgorithmus (VA) der einzelnen Mischzeitexperimente (Viereckig (E4), Sechseckig (E6), Zehneckig (E10) Rund (R), 2 Schikanen (S2), 4 Schikanen (S4), 6 Schikanen (S6), Deltaform mit 4 Schikanen (D4)). Wird beim VA ein Eckenwert von 17 oder größer eingestellt, so wird vom Algorithmus die Kreisform verwendet.

Experiment	X Position	Y Postion	Radius	Anzahl Ecken	Startwinkel
E4_1	116	87	17	4	45
E4_2	101	82	16	4	59
E4_3	107	79	16	4	22
E6_1	107	94	17	6	49
E6_2	109	80	16	6	69
E6_3	95	87	16	6	69
E8_1	109	85	17	8	50
E8_2	117	87	17	8	36
E8_3	100	81	17	8	10
E10_1	115	83	17	10	0
E10_2	105	83	17	10	0
E10_3	101	80	17	10	0
R_1	113	75	16	17	0
R_2	109	82	16	17	0
R_3	119	84	16	17	0
S2_1	103	79	17	17	0
S2_2	107	92	17	17	0
S2_3	102	93	17	17	0
S4_1	108	77	17	17	0
S4_2	98	92	17	17	0
S4_3	102	74	17	17	0
S6_1	115	84	17	17	0
S6_2	103	86	17	17	0
S6_3	101	84	17	17	0
D4_1	101	84	17	17	0
D4_2	94	87	17	17	0
D4_3	97	88	17	17	0

## A.5 Automatisiertes Zählen von Bakterienkolonien auf Agarplatten mit Handheld Devices

Für alle Experimente in diesem Abschnitt wurde der *Escherichia coli* Stamm BL21 (DE3) verwendet. Als Medium für alle Kultivierungen wurde LB-Medium verwendet (Tabelle A.16). Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt. Für die Herstellung von Agarplatten wurde dem LB-Medium 15 g/L Agar hinzugesetzt. Beim Gießen der Agarplatten wurden jeweils 20 mL Medium mittels einer Pipette in die Petrischalen gegeben.

**Tabelle A.16** Zusammensetzung des LB-Mediums

Komponente	Einwaage [g/L]
Trypton	10
Hefeextrakt	5
Natriumchlorid	10
Kanamycin	0,025
(Agar)	15

Für die Vorkulturen wurden 10 mL LB-Medium in einen 100 mL Schüttelkolben gegeben und mit 1 mL *E. coli* Gefrierkultur inokuliert. Die Vorkultur wurde bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD von 0,04 kultiviert. Im Anschluss wurden verschiedene Verdünnungen der Vorkultur hergestellt (1:100 bis 1:16000). Von jeder Verdünnung wurden mehrere Platten hergestellt. Dafür wurden jeweils 50 mL der Verdünnung in die Mitte der Agarplatte gegeben und mithilfe eines Drigalskispatels homogen auf der Platte verteilt. Im Anschluss wurden die Platten für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach diesen 24 h wurden die Platten bei 8 °C gelagert. Die Bildaufnahmen der Platten wurden im Abstand von 24 h durchgeführt. Dabei wurden nur Platten verwendet, die auch für manuelle Zählungen verwertbar gewesen wären. Platten die vollständig von einem Bakterienteppich bedeckt waren wurden nicht verwendet.

### Bildaufnahme und Algorithmusvalidierung

Alle verwendeten Bilder wurden mit der Kamera des Samsung Galaxy S4 Mini aufgenommen. Die Kameraauflösung wurden dafür auf 2,4 Megapixel gesetzt. Die Platten wurden auf einem homogenen schwarzen Untergrund platziert. Bei einigen Platten wurde der Deckel für die Aufnahme entfernt, da dieser zu viele Kondenswassertropfen enthielt. Die Aufnahmen wurden freihändig mittels Smartphone gemacht, ohne die Verwendung von zusätzlichen Beleuchtungssystemen. Die Beleuchtung erfolgte über die Neonröhren der Deckenbeleuchtung im Labor. Bei der Bildaufnahme wurde versucht die Reflexionen auf der Platte so gering wie möglich zu halten.

Der Algorithmus wurde in der Programmiersprache C# als Teil der hauseigenen Bilderverarbeitungssoftware „Graphic Analyzer“ entwickelt. Zur Validierung des Algorithmus wurden 100 Bilder sowohl händisch als auch mit dem Algorithmus ausgewertet. Um die manuelle Auswertung zu vereinfachen wurden alle Kolonien auf den Bildern händisch markiert und im Anschluss dann mit Hilfe des „Graphic Analyzer“ ausgezählt. Während des Auszählens der händischen Markierungen wurde gleichzeitig die Übereinstimmung der Position von den händisch markierten Kolonien und den vom Algorithmus gefunden Kolonien verglichen. Dies ist ein zusätzliches Qualitätskriterium für die Fehleranfälligkeit des Algorithmus. Für alle Auswertungen wurde ein normaler Desktop Computer verwendet (CPU: Intel(R) Core(TM)2 Duo CPU T8100 2.10 GHz; Ram: 4 GB; HDD; Windows 7, 32 bit)

Die für die Berechnungen verwendeten Algorithmen Parameter sind in Tabelle A.17 dargestellt.

**Tabelle A.17** Verwendete Algorithmen Einstellungen des Colony Counter Algorithm (CCA)

Parameter	Wert
Mindestgröße [Pixel]	10
Maximale Exzentrizität	5
Epsilon	0,1
Hough	0

### **Photometrische Vermessung von Kolonien**

Zur Bestimmung der fotometrischen Dichte von Kolonien wurde jeweils eine Kolonie mittels Impföse von der Platte aufgenommen und in 1 mL Saline (0,9% NaCl) resuspendiert. Im Anschluss wurde die OD bei 600 nm mittels Photometer (Multiskan GO UV-vis Spektrophotometer, ThermoFisher Scientific, Deutschland) bestimmt. Für die Auswertung der Messung wurde die ermittelte OD dann mit dem vom Algorithmus ermittelten Koloniedurchmesser korreliert.

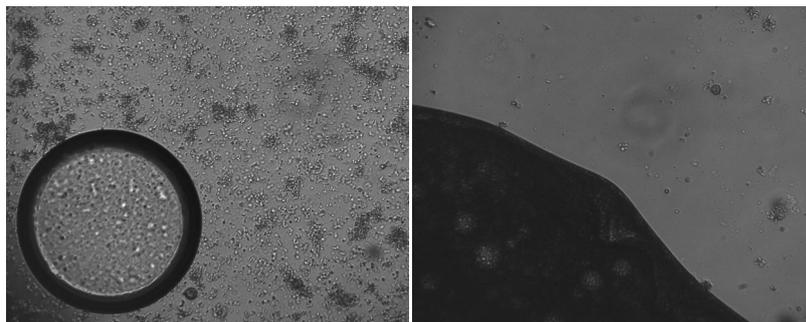
## B Anhang: Zusätzliche Informationen

### B.1 In-situ-Mikroskopie zur Zelldichtebestimmung in *P.-pastoris*-Kultivierungen

#### B.1.1 Bubble Analyzer

Luftblasen auf ISM Bildern können einen großen Einfluss auf die Ergebnisse der ISM Messungen haben. Deshalb wird hier der BA Algorithmus vorgestellt, welcher Luftblasen auf ISM Bildern erkennt und es somit erlaubt diese aus den Ergebnissen der Messungen zu entfernen. Die Anwendbarkeit des Algorithmus wird anhand von Ausreißern aus den *P.-pastoris*-Kultivierung K1 und K3 aus Kapitel 4 gezeigt.

Luftblasen können bei Messungen mit dem ISM in verschiedenen Formen auftreten. Die beiden wichtigsten Formen, da sie die Messungen am meisten beeinflussen, werden im Folgenden besprochen. Die erste Variante ist, dass sich die Blase vollständig in der Messzone befindet. Bei der zweiten Variante liegt die Luftblase nur zum Teil im sichtbaren Bereich der Messzone und ragt so vom Rand in das Bild hinein (Abbildung B.1). Auch wenn sich die Blasentypen in ihrer Form deutlich unterscheiden, haben sie doch eine wichtige Gemeinsamkeit; sie sind zumindest in Teilbereichen sehr dunkel. Sogar bei sehr dichter Clusterbildung am Ende der Kultivierungen erreichen die *P.-pastoris*-Cluster nicht so niedrige



**Abbildung B.1** Beispiele für zwei Arten von Luftblasen: (Links) Luftblase vollständig im Bild (K3, 17 h). (Rechts) Luftblase reicht vom Rand in das Bild hinein (K1, 5,5 h).

Grauwerte. Daher können diese Eigenschaft der Blasen ausgenutzt werden um sie auf Bildern zu erkennen.

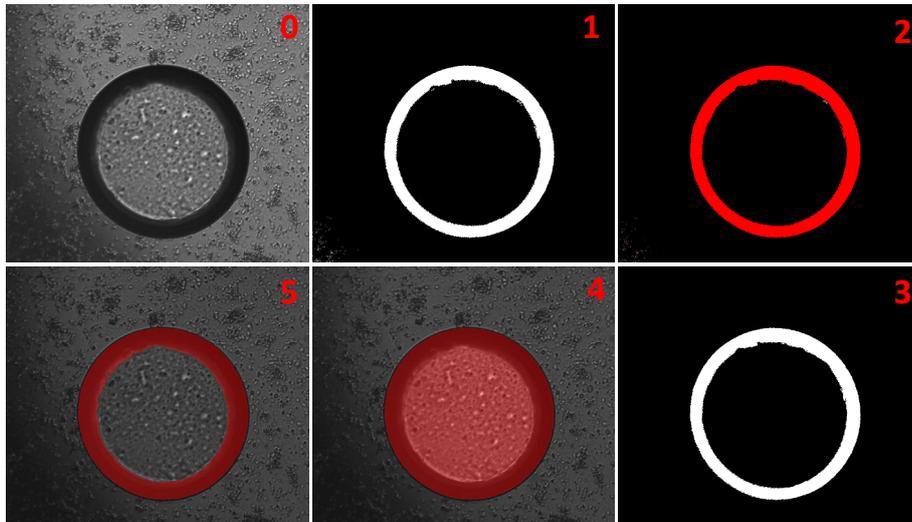
### **Algorithmus**

Zur Erkennung von Luftblasen in Bildern wurde auf Grundlage der zuvor beschriebenen Eigenschaften der Luftblasen der Bubble Analyzer (BA) entwickelt. Dieser Algorithmus wurde in seiner Ausführung so angepasst, dass er möglichst gut die Einflüsse von Luftblasen auf den Cluster Recognition Algorithm (CRA) für *P.-pastoris*-Kultivierungen korrigiert. Für andere Anwendungen muss der Algorithmus vermutlich modifiziert werden. Der Ablauf des BA ist in Abbildung B.2 dargestellt. Im ersten Schritt wird das Originalbild binarisiert, wobei alle Pixel unterhalb eines bestimmten Grauwerts weiß werden und die anderen Pixel schwarz. Der Schwellenwert ist dabei mit einem Wert von 35 sehr niedrig, so dass nur die Pixel der Luftblasen unterhalb des Schwellenwertes liegen. Im nächsten Schritt wird eine Objekterkennung unter Verwendung einer Moore-Nachbarschaft durchgeführt. Dabei werden benachbarte Pixel zu Objekten zusammen gefasst und im gleichen Zug wird auch die Größe der Objekte bestimmt. Im dritten Schritt werden alle Objekte die kleiner als 500 Pixel sind verworfen, da diese zu klein sind um Luftblasen zu sein. In Schritt vier werden Löcher innerhalb der Objekte entfernt und die Lochpixel den Objekten hinzugefügt. Auch wenn das Innere der Blase deutlich heller ist und dort Bildobjekte vom CRA erkannt werden könnten, sind diese nicht zur Auswertung geeignet und werden daher entfernt. Im letzten Schritt wird der CRA auf das Bild angewandt und alle vom CRA erkannten Pixel gespeichert. Diese Pixel werden dann mit den vom BA erkannten Pixeln verglichen und übereinstimmende Pixel gelöscht. Dadurch werden alle vom CRA gefunden Pixel, welche innerhalb der Luftblase liegen entfernt. Dies hat zur Folge, dass die Luftblase keinen Einfluss mehr auf das Ergebnis des CRA hat. Die für die Auswertung verwendeten Algorithmenparameter des BA sind in Tabelle B.1 (S. 114) gezeigt.

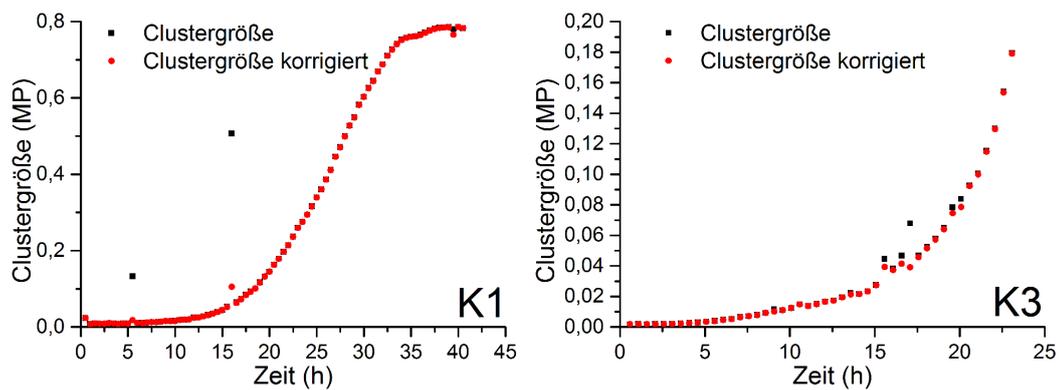
### **Ergebnisse und Diskussion**

In der Abbildung B.3 ist der Verlauf der CRA Werte der gesamten Kultivierung K1 und die ersten 25 h der Kultivierung K3 mit und ohne Verwendung des BA dargestellt. Bei K3 werden nur die ersten 25 h dargestellt, da sonst die Abweichungen durch die Achsenskalierung verloren gehen würden.

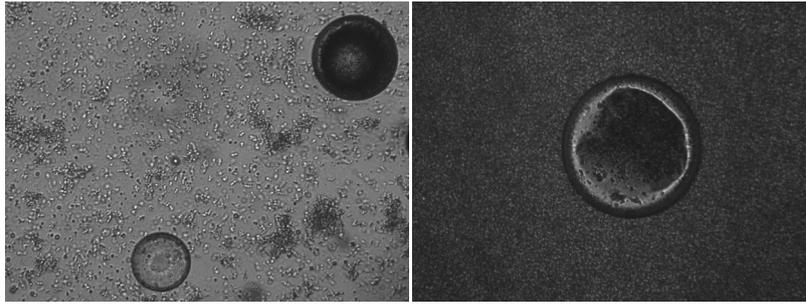
In der *P.-pastoris*-Kultivierung K3 gibt es zwischen 15 h und 17 h einige vom Verlauf abweichende Werte und einen deutlichen Ausreißer (Abbildung B.3). Diese kommen durch kleine Luftblasen auf den Bildern zustande. Durch die Anwendung des BA kann der Ausreißer



**Abbildung B.2** Ablauf des Bubble Analyzer (BA): 0. Originalbild; 1. Binarisierung mittels Schwellenwertverfahren und Grenzwert 35; 2. Objekterkennung; 3. Größenausschluss; 4. Lochentfernung in den Objekten Überlagerungsbild aus Originalbild und Objektbild; 5. Pixel die sowohl vom CRA als auch vom BA erkannt wurden. Diese Pixel werden aus dem CRA Ergebnis entfernt.



**Abbildung B.3** Plot der CRA Werte mit und ohne Korrektur durch den BA für die *P.-pastoris*-Kultivierungen K1 und K3.



**Abbildung B.4** Links: Bild mit zwei Luftblasen aus Kultivierung K3. Eine wird durch den BA erkannt (rechts oben) und die andere nicht, weil zu hell (mitte unten). Rechts: Bild mit Luftblase bei hoher Zelldichte der Kultivierung (K1, 39,5h). Das gesamte Bild wird von *P.-pastoris*-Clustern eingenommen außer dem Bereich mit der Luftblase.

vollständig entfernt werden, da es sich um eine stabile Luftblase handelt (Abbildung B.1, links). Diese wird vom BA erkannt und die Werte korrigiert. Bei den anderen Werten wird zwar eine Verbesserung erreicht, aber die Werte sind immer noch zu hoch für den erwarteten Verlauf. Der Grund dafür sind kleinere hellere Luftblasen, welche während diesen Messungen auftreten. Sie sind dunkel genug um vom CRA als Cluster eingestuft zu werden, aber nicht ausreichend dunkel um vom BA erkannt zu werden (Abbildung B.4, links).

In der Kultivierung K1 sind bei 5,5 h und 16 h zwei deutliche Ausreißer zu sehen (Abbildung B.3). Diese kommen durch sehr große Luftblasen zustande die seitlich in das Bild herein reichen, so wie in Abbildung B.1 (rechts) gezeigt. Durch Verwendung des BA kann der Ausreißer bei 5,5 h quasi vollständig entfernt und der bei 16 h deutlich abgeschwächt werden. Bei 16 h hat die Luftblase einen leicht helleren Randbereich, der nicht vom BA erkannt wird. Dies führt dazu, dass der Einfluss der Luftblase nicht vollständig entfernt werden kann. Zusätzlich zeigt die korrigierte Clustergröße bei 39,5 h eine kleine Abweichung nach unten, diese kommt durch eine Luftblase zustande die im Bild auftaucht und durch den BA entfernt wird (Abbildung B.4, rechts). Da zu diesem Zeitpunkt eigentlich das gesamte Bild von *P. pastoris* bedeckt ist führt das Entfernen der Luftblasenpixel zu dieser Abweichung. Um ein solches Problem zu umgehen, könnte man anstatt die Ergebnisse des CRA absolut in Megapixeln anzugeben den Bedeckungsgrad des Bildes verwenden. Also wie viel Prozent aller Bildpixel durch Cluster belegt sind. In diesem Fall könnte man einfach die Luftblasenpixel von den Clusterpixeln und den Gesamtpixeln abziehen und würde solche Abweichungen am Ende der Kultivierung vermeiden.

Zusätzlich wäre es sinnvoll einen BA Algorithmus in die ISM Steuersoftware zu implementieren. Anhand dieser könnten die Bilder bereits während der Messung auf Luftblasen untersucht werden. Sollte in mehreren Bildern hintereinander eine Luftblase detektiert werden, am besten noch in ähnlicher Position im Bild, dann ist dies ein sicheres Zeichen, dass sich eine Luftblase in der Messzone festgesetzt hat. Die Steuersoftware des ISM könnte drauf

hin die Messung kurz unterbrechen und die Messzone auffahren, sodass die Luftblase aus dem Bildbereich entweichen kann. Damit könnte der Einfluss von Luftblasen auf die ISM Messungen nochmals deutlich verringert werden.

**Tabelle B.1** Zur Auswertung verwendete Parameter des Bubble Analyzer (BA)

Parameter	Werte
Luftblasen: Binärisierungsschwellenwert	35
Luftblasen: Minimale Objektgröße	500
Binärisierungsschwellenwert	85
Minimale Objektgröße	200
Bildausschnitt X-Position	250
Bildausschnitt Y-Position	70
Bildausschnitt Breite	1000
Bildausschnitt Höhe	800

### B.1.2 Daten des Turbidity Algorithm (TA) für *P. pastoris* -Kultivierungen

**Tabelle B.2** Werte der linearen Regressionen des invertierten Grauwertes des Turbidity Algorithm (TA) mit der OD und BTM für die *P. pastoris*-Kultivierungen K4-K8. Der Parameter  $m$  ist die Steigung,  $b$  der Y-Achsenabschnitt und  $R^2$  das Bestimmtheitsmaß der Regression. Der OD-Bereich und der BTM-Bereich geben den niedrigsten und höchsten Wert an, welcher für die Regression noch verwendet wurde.

Parameter	K4	K5	K6	K7	K8
OD					
$m_{OD}$	3,48	2,58	3,11	3,29	5,11
$b_{OD}$	-485,4	-285,96	428,84	-442,82	-664,9
$R^2$	0,964	0,984	0,906	0,973	0,955
OD-Bereich []	0,54-209	0,9-241,8	0,5-57,6	0,5-66,5	1,52-59
BTM					
$m_{DCM}$ [g/L]	1,361	0,91	1,67	1,03	2,19
$b_{DCM}$ [g/L]	-168,84	95,3	231,29	129,46	281,18
$R^2$	0,93	0,988	0,934	0,895	0,968
BTM-Bereich [g/L]	11,4-73,8	2,1-83,5	6,9-35,1	16,2-29,7	6,3-29,6

## B.2 Hochzelldichtemessungen in *E.-coli*-Kultivierungen mittels In-situ-Mikroskopie

**Tabelle B.3** Werte der linearen Regressionen des invertierten Grauwertes des Turbidity Algorithm (TA) mit der OD und BTM für die Kultivierungen E1-E3. Der Parameter  $m$  ist die Steigung,  $b$  der Y-Achsenabschnitt und  $R^2$  das Bestimmtheitsmaß der Regression. Der OD-Bereich und der BTM-Bereich geben den niedrigsten und höchsten Wert an, welcher für die Regression noch verwendet wurde.

Plot	Regression	a	b	c	$R^2$	Gültigkeitsbereich
BTM 20 $\mu\text{m}$	$y = a \cdot x + b$	0.7665	-36.822	-	0.994	11,67-70,1 g/L
BTM 40 $\mu\text{m}$	$y = a * e^{b \cdot x}$	2.9984	0.02	-	0.994	11,67-83 g/L
BTM 60 $\mu\text{m}$	$y = a * e^{b \cdot x}$	2.7	0.018	-	0.994	11,67-83 g/L
OD 20 $\mu\text{m}$	$y = a \cdot x + b$	2.099	90.223	-	0.986	0,17-196,7
OD 40 $\mu\text{m}$	$y = a \cdot x^2 + b \cdot x + c$	0.007	0.2588	-22.043	0.999	0,17-196,7
OD 60 $\mu\text{m}$	$y = a \cdot x^2 + b \cdot x + c$	0.0082	-0.3703	3.0716	0.997	0,17-226,7

## B.3 Automatisierte Bestimmung der Messzonenhöhe beim In-situ-Mikroskop-TT

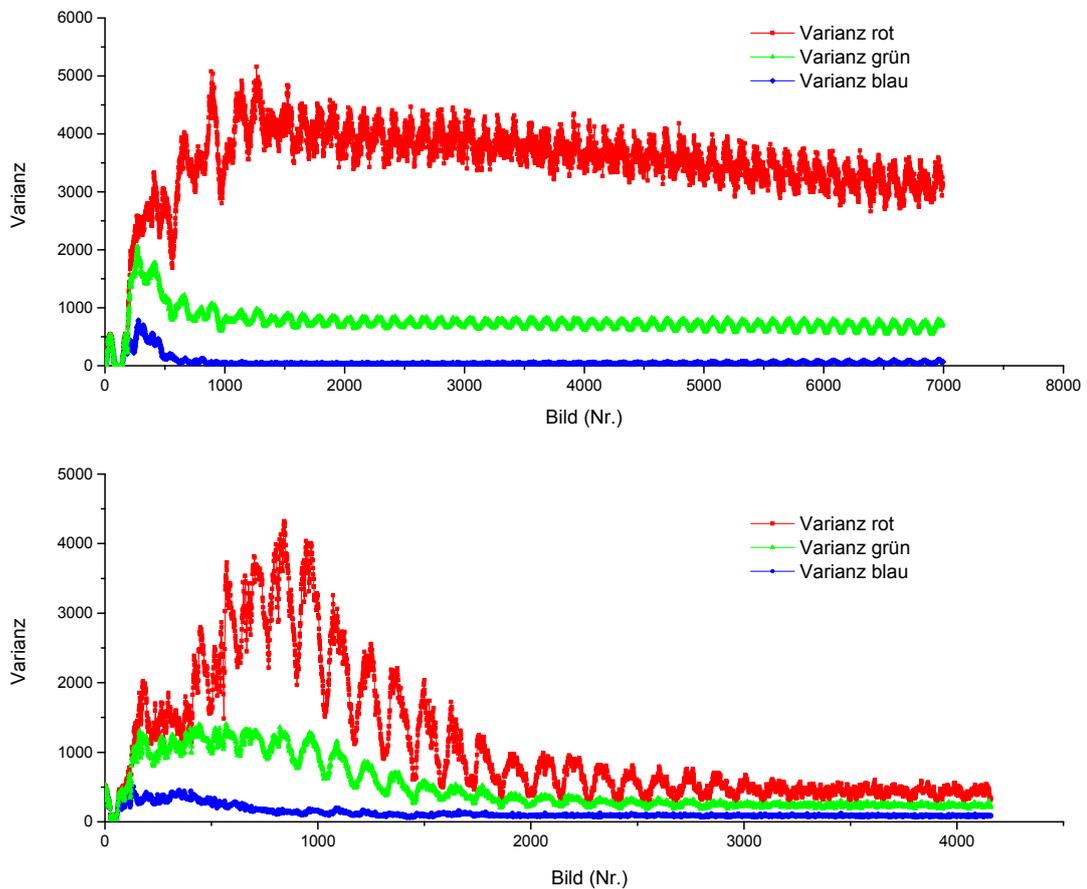
**Tabelle B.4** Gemessene Stärke der Fühlerlehren, welche für die Messungen mit definierten Abständen verwendet wurden. Für die Kalibration wurde bei unterschiedlichen Stärken immer die größere Stärke verwendet.

Soll [ $\mu\text{m}$ ]	Gemessen A [ $\mu\text{m}$ ]	Gemessen B [ $\mu\text{m}$ ]	Verwendet [ $\mu\text{m}$ ]
50	50	50	50
100	100	100	100
150	140	140	140
200	190	195	195
350	355	350	355
500	495	495	495
700	690	695	695

## B.4 Entwicklung eines Algorithmus zur Mischzeitbestimmung

**Tabelle B.5** Bestimmte Mischzeiten für verschiedene Mischkammergeometrien (Viereckig (E4), Sechseckig (E6), Zehneckig (E10) Rund (R), 2 Schikanen (S2), 4 Schikanen (S4), 6 Schikanen (S6), Deltaform mit 4 Schikanen (D4)). Die Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt und unabhängig von einander mit dem VA und dem entwickelten Homogenitätskriterium ausgewertet.

Name	Messung 1 [s]	Messung 2 [s]	Messung 3 [s]	Mittelwert [s]	Standard- abweichung [s]	Standard- abweichung [%]
E4	2,91	6,53	4,02	4,49	1,85	41,26
E6	2,87	4,06	2,96	3,30	0,67	20,18
E10	3,09	1,67	2,90	2,55	0,77	30,08
R	2,75	2,58	4,55	3,29	1,09	33,13
S2	0,64	0,71	0,68	0,67	0,04	5,32
S4	0,35	0,88	0,91	0,71	0,31	43,96
S6	0,26	0,55	0,84	0,55	0,29	52,52
D4	0,96	1,00	1,22	1,06	0,14	13,18



**Abbildung B.5** Varianz der drei Farbk채nale f체r Bilder einer runden Mischkammer (Oben) und einer Mischkammer mit 4 Ecken (Unten). In der runden Mischkammer wurde der Farbstoff in Bild 190 dazu gegeben. Bei der viereckigen Mischkammer erfolgte die Farbstoffzugabe in Bild 60. In beiden Graphen zeigten die rote Varianz ein ungew枚hnliches Verhalten, sie steigt iber l채ngere Zeit an. Dieses Verhalten macht eine Auswertung mit dem entwickelten Verfahren unm枚glich.

## B.5 Automatisiertes Zählen von Bakterienkolonien auf Agarplatten mit Handheld Devices

**Tabelle B.6** Regressionsparameter für alle OD gegen Koloniegröße Korrelationen für alle Messreihen. Für die Regression wurde folgende Formel verwendet  $y = a \cdot e^{b \cdot x}$  wobei  $x$  der Koloniedurchmesser in Millimetern (mm) ist.

Alter [Tage]	a	b [mm <sup>-1</sup> ]	Bestimmtheitsmaß
1	0,0392	0,5434	0,7567
1	0,048	0,4611	0,8407
2	0,0181	0,8066	0,805
2	0,0531	0,5083	0,7746
3	0,0266	0,7836	0,9029
4	0,0253	0,7316	0,817
4	0,0463	0,575	0,7981
4	0,0833	0,4601	0,5429

# Verzeichnisse

## Abkürzungsverzeichnis

<b>BA</b>	Bubble Analyzer
<b>BTM</b>	Biotrockenmasse
<b>CCA</b>	Colony Counter Algorithm
<b>CRA</b>	Cluster Recognition Algorithm
<b>ISM</b>	In-situ-Mikroskop
<b>ISM-TT</b>	In-situ-Mikroskop-TT
<b>KBE</b>	koloniebildende Einheit
<b>MOG</b>	mittlere Objektgröße
<b>MOE</b>	mittlere Objektexzentrizität
<b>MP</b>	Megapixel
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>PCA</b>	Pichia Counter Algorithm
<b>SA</b>	Segregationsalgorithmus
<b>SIS</b>	simple image statistics
<b>RVI</b>	Region von Interesse
<b>TA</b>	Turbidity Algorithm
<b>VA</b>	Varianzalgorithmus
<b>YMTS</b>	Yeast Trace Metal Solution
<b>WMA</b>	Window Marker Analyzer

## Abbildungsverzeichnis

3.1	ISM-Bilder von Lewatit-Partikeln (links) und Ergebnisbild nach der Auswertung mit dem Bildverarbeitungsalgorithmus <i>ParticleAnalyzer</i> . Aus dem Bild wurden zwei intakte Partikel und drei Partikelbruchstücke erkannt (Prediger, 2013). . . . .	13
3.2	ISM-Bilder von Lactose-Kristallen und Auswertung der Bilder mit einem Bildverarbeitungsalgorithmus. Die erkannten Kristalle sind farbig dargestellt. Kristalle die den Rand berühren werden ignoriert (Bluma, 2009). . . . .	14
3.3	Wundheilungssassay mit DA3-Zellen. (0) Mikroskopaufnahme der verletzten Zellen. (1) Durchführung der Klassifizierung der $20 \times 20$ Pixel großen Abschnitte. Je heller die Bildbereiche, desto wahrscheinlicher handelt es sich um zellfreie Bereiche. (2) Binärbild des klassifizierten Bildes. (3) Ergebnisbild: Der weiß umrandete Bereich in der Mitte des Bildes wurde als verletzter Bereich erkannt. Modifiziert nach Zaritsky <i>et al.</i> (2011). . . . .	15
3.4	Aufbau einer Smartphone basierten Biomarkerdetektionsplattform (Coskun <i>et al.</i> 2013). . . . .	16
3.5	Bild in drei verschiedenen Bildformaten und schematischer Darstellung der zugehörigen Pixeldatenmatrix: Farbbild (links), Graustufenbild (Mitte), Binärbild (rechts). Quelle des Farbbildes (bilder.n3po.com). . . . .	17
3.6	Ergebnisbilder Kantendetektionsalgorithmen; (0) Originalbild (wikimedia.org); (1) Sobel-Operator; (2) Canny-Algorithmus; (3) SUSAN-Algorithmus. . . . .	18
3.7	Anwendung von Filteroperation auf digitale Bilder (Lindner, 2017). . . . .	19
3.8	Binärbilder generiert unter Verwendung verschiedener Schwellenwerte. (0) Originalbild (wikimedia.org2); (1) Schwellenwert: 40; (2) Schwellenwert: 70, (3) Schwellenwert: 110, (4) Schwellenwert: 160; (5) Automatischer Schwellenwert nach Otsu-Verfahren. . . . .	21
3.9	Anwendung des Bradley-local-Thresholding: Originalbild (links) und erzeugtes Binärbild (rechts). Modifiziert nach Bradley und Roth (2007). . . . .	22
3.10	Links: Von-Neumann-Nachbarschaft. Rechts: Moore-Nachbarschaft. Die blauen Pixel werden jeweils als benachbart zum roten Pixel gezählt. . . . .	23
3.11	Schematischer Ablauf des Border-Tracing-Algorithmus (von links nach rechts). Die weißen Pixel stellen Objektpixel dar und die grauen Pixel nicht Objektpixel. Bei grünen Pfeilen wurde zuvor links herum und bei roten Pfeilen rechts herum gedreht. Modifiziert nach Krabichler (2005). . . . .	23

3.12	Messprinzip des verwendeten ISM. Das ISM ist ein Durchlicht-Hellfeld-Mikroskop mit einer Unendlich Optik. Die Hintergrundbeleuchtung ist über eine LED realisiert. Die Messzone zwischen Innen- und Außentubus wird von von zwei Saphirscheiben begrenzt. Der Innentubus und das Objektiv werden über Schrittmotoren bewegt. Durch das Verfahren des Innentubus kann die Höhe der Messzone variiert werden. Modifiziert nach Marquard <i>et al.</i> 2016. . . . .	25
3.13	Abb. 18: Schematische Seitenansicht des ISM-TT (links) mit Explosionszeichnungen vom Innentubus (Mitte, unten) und Objektivtubus (Mitte, oben) und vom Außentubus (rechts) (Prediger, 2013). . . . .	26
4.1	Fließschema des Cluster Recognition Algorithm (CRA) . . . . .	28
4.2	Ergebnisbilder der Einzelschritte des Cluster Recognition Algorithm (CRA): (0) Originalbild; (1) Binärisierung; (2) Größenausschluss; (3) Finale Objekte. Die Summe aller Objektpixel bildet den Ausgabewert des CRA. . . . .	29
4.3	Fließschema des Pichia Counter Algorithm (PCA) . . . . .	29
4.4	Ergebnisbilder der Einzelschritte des Pichia Counter Algorithm (PCA): (0) Originalbild; (1) Top-Hat Filter; (2) Binärisierung; (3) Bild nach Größenausschluss; (4) Originalbild überlagert mit detektierten Objekten; (5) Gefunden lokale Maxima des Originalbildes innerhalb der Objektgrenzen. Das Ergebnis des PCA ist die Summe der gefundenen lokalen Maxima. . . . .	30
4.5	Offline-Daten und Algorithmenenergebnisse der Kultivierungen K1-K3. Als Offline-Daten wurden die BTM in g/L und die OD bei 600 nm bestimmt. Alle Offline-Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung dieser Messungen. Die Ergebnisse des CRA in MP und des PCA in gezählten Zellen wurden anhand der ISM-Bilder bestimmt. Die Messzonenhöhe des ISM für diese Kultivierungen wurde auf 40 µm eingestellt. . . . .	32
4.6	Korrelation der Ergebnisse des CRA mit der offline bestimmten OD und der BTM für die Kultivierung K1. Alle Offline-Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt und Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung dieser Messungen. Das Bestimmtheitsmaß $R^2$ der linearen Regression beträgt für die BTM 0,987 und für die OD 0,993. . . . .	33
4.7	ISM-Bilder der Kultivierung K2 nach 5 h, 16 h, 25 h, 32,5 h (von links nach rechts) Kultivierungszeit. . . . .	34

4.8	Korrelation der Ergebnisse des PCA mit der offline bestimmten OD und der BTM für die Kultivierung K1. Alle Offline-Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt und die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung dieser Messungen. Die lineare Regression wurde nur über den nicht gesättigten Teil der PCA Ergebnisse durchgeführt. Das Bestimmtheitsmaß $R^2$ der linearen Regression beträgt für die BTM 0,87 und für die OD 0,968. . . . .	35
4.9	Offline-Daten und Algorithmenenergebnisse der Kultivierungen K4 und K5. Als Offline-Daten wurden die BTM in g/L und die OD bei 600 nm bestimmt. Alle Offline-Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung dieser Messungen. Die Ergebnisse des CRA in MP und des PCA in gezählten Zellen wurde anhand der ISM-Bilder bestimmt. Die Messzonenhöhe des ISM für diese Kultivierungen wurde auf 20 $\mu$ m eingestellt. . . . .	37
4.10	Korrelation der Ergebnisse des CRA mit der offline bestimmten OD und der BTM für die Kultivierung K4 und K5. Alle Offline-Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt und Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung dieser Messungen. Das Bestimmtheitsmaß $R^2$ der linearen Regression beträgt bei K4 für die BTM 0,991 und für die OD 0,988. Bei K5 liegt dieser Wert für die BTM bei 0,968 und für die OD bei 0,987. . . . .	38
4.11	Offline-Daten und Algorithmenenergebnisse der Kultivierung K6-K8. Als Offline-Daten wurden die BTM in g/L und die OD bei 600 nm bestimmt. Alle Offline-Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung dieser Messungen. Die Ergebnisse des CRA in MP und des PCA in gezählten Zellen wurde anhand der ISM-Bilder bestimmt. Die Messzonenhöhe des ISM für diese Kultivierungen wurde auf 20 $\mu$ m eingestellt. . . . .	40
4.12	Korrelation der Ergebnisse des PCA mit der offline bestimmten OD und der BTM für die Kultivierung K7. Alle Offline-Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung dieser Messungen. Die lineare Regression wurde nur über den nicht gesättigten Teil der PCA Ergebnisse durch geführt. Das Bestimmtheitsmaß $R^2$ der linearen Regression beträgt für die BTM 0,933 und für die OD 0,961. . . . .	41
4.13	Konzept des kombinierten Algorithmus aus CRA und PCA unter Verwendung eines erweiterten Entscheidungskriteriums. . . . .	43
4.14	Korrelation zwischen den Ergebnissen des Turbidity Algorithm (TA) und den Offline-Zelldichtemessungen OD (links) und BTM (rechts) für die Kultivierungen K4-K8. Die Parameter der linearen Regressionen sind in Tabelle B.2 (S. 114). . . . .	44

5.1	Fließschema des Turbidity Algorithm (TA). . . . .	47
5.2	ISM-Bild aus Kultivierung E1. Das rote Viereck markiert den Bereich der für die weiteren Berechnungen des TA verwendet wird. . . . .	48
5.3	Offline-Daten und Algorithmenenergebnisse der <i>E.-coli</i> -Kultivierungen E1-E3. Als Offline-Daten wurden die BTM in g/L und die OD bei 600 nm bestimmt. Alle Offline-Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung dieser Messungen. Die Ergebnisse des TA wurden anhand der ISM-Bilder der Kultivierungen berechnet. . . . .	49
5.4	Beispielbilder aus der Kultivierung E2. Links: ISM-Bild nach 19,5 h mit einer BTM von 70,1 g/L und einem invertierten Grauwert von 126. Rechts: ISM-Bild nach 23,5 h mit einer BTM von 100,2 g/L und einem invertierten Grauwert von 116. Die hellen Bereiche sind Luftblasenblasen und führen trotz höherer Zelldichte zu einem niedrigeren invertierten Grauwert. Die Blasen entstehen vermutlich durch die hohe Viskosität des Mediums zu diesem Zeitpunkt. . . . .	50
5.5	Korrelation der Ergebnisse des TA mit der offline gemessenen BTM (links) und OD (rechts) für die Kultivierungen E1-E3. Alle Offline-Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt und die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung dieser Messungen. Die lineare Regression wurde nur über den nicht gesättigten Teil der TA Ergebnisse durchgeführt (Tabelle 5.1). . . . .	50
5.6	Korrelation der Ergebnisse des TA mit der offline gemessenen BTM (links) und OD (rechts) für die Kultivierungen E2 bei drei verschiedenen Messzonenhöhen. Alle Offline-Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt und die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung dieser Messungen. Es wurden verschieden Regressionen für die einzelnen Datenreihen durchgeführt (Tabelle B.3 S. 115). . . . .	53
6.1	Messprinzip zur Ermittlung des Abstandes zwischen den beiden Saphirglasscheiben. Das Objektiv des ISM wird schrittweise auf die Saphirglasscheiben zubewegt. Sobald die Markierungen auf den Scheiben in der Fokusebene liegen, werden sie vom Algorithmus erkannt und dieser liefert ein Signal. Anhand der Signalstärke und Objektivpostion kann nun der Abstand zwischen beiden Saphirglasscheiben berechnet werden. . . . .	56
6.2	Fließdiagramm des entwickelten Algorithmus zur Verarbeitung von Scheibenmarkierungen. . . . .	57

6.3	In der oberen Reihe sind Bilder der Scheibenmarkierung mit verschiedenen Fokusebenen dargestellt. Zwischen den Bildern wurde die Fokusebene jeweils um 20 $\mu\text{m}$ in Richtung Außentubus verschoben. Die Reihe darunter zeigt die dazugehörigen Sobelbilder. Die Zahlen unterhalb der Bilder sind die vom Algorithmus berechneten mittleren Grauwerte. Das schärfste Bild (Nr. 4) hat den höchsten mittleren Grauwert. . . . .	58
6.4	Fühlerlehren in der Messzone des ISM zur Bestimmung von definierten Abständen. . . . .	59
6.5	Markierung der Innentubussaphirglasscheiben für das 10x Objektiv (Bild 1–2) und für das 4x Objektiv (Bild 3–4). Für die jeweiligen Objektive wurden verschiedene Scheibenmarkierungen verwendet. Die Bilder 1 und 3 zeigen jeweils die Fokussierung auf die markierte Seite der Saphirglasscheiben die Bilder 2 und 4 die Fokussierung auf die nicht markierte Seite der Scheibe. . .	60
6.6	Ergebnisse des entwickelten Messverfahrens bei definierten Messzonenhöhen von 500 $\mu\text{m}$ und 700 $\mu\text{m}$ unter Verwendung eines 10x Objektivs. Die jeweiligen Maxima des mittleren Grauwertes geben die Position der Saphirglasscheiben an. . . . .	61
6.7	Korrelation der definierten Abstände zu den berechneten Abständen aus dem entwickelten Verfahren für ein 10x Objektiv (links) und ein 4x Objektiv (Rechts). Die Daten der beiden linearen Regressionen sind in Tabelle 6.1 dargestellt. Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Fehlerbalken geben das 95 % Konfidenzintervall der Messung an. . . . .	62
7.1	Schüttelplatte mit verschiedenen Mischkammergeometrien (Raddatz <i>et al.</i> 2017).	65
7.2	Fließschema des entwickelten Varianzalgorithmus (VA) . . . . .	66
7.3	Auswahl der Region von Interesse (RVI) durch den Benutzer für eine runde (links) und eine viereckige Mischkammer (rechts). Der Rote Punkt in der Mitte der Mischkammern ist der Mittelpunkt der Auswahl und soll das Zielen für den Nutzer erleichtern. Die rote Umrandung begrenzt die RVI. . . . .	66
7.4	Mischprozess in einer zehneckigen Mischkammer. In Bild Nr. 1 wird die Tinte hinzugefügt. Alle weiteren Bilder sind im Abstand von 0,3 s aufgenommen, was einer Rotation des Kreisschüttlers entspricht. Nach dem entwickelten Kriterium ist in Bild Nr. 19 die Homogenität erreicht. . . . .	68
7.5	Varianz der drei Farbkänale für Bilder einer Mischkammer mit 10 Ecken. Die Mittelwertfilter haben alle eine Fensterbreite von 126 Bilder, diese entspricht der Anzahl an Bildern die während einer Rotation des Kreisschüttlers aufgenommen werden. Der Farbstoff wurde in Bild 215 dazu geben. . . . .	69

7.6	Varianz des grünen Farbkanals für Bilder einer Mischkammer mit 10 Ecken. Der Mittelwertfilter hat eine Fensterbreite von 126 Bilder, diese entspricht der Anzahl an Bildern die während einer Rotation des Kreisschüttlers aufgenommen werden. Der Farbstoff wurde in Bild 215 dazu geben. . . . .	70
7.7	Bestimmte mittlere Mischzeiten für verschiedene Mischkammergeometrien (Viereckig (E4), Sechseckig (E6), Zehneckig (E10) Rund (R), 2 Schikanen (S2), 4 Schikanen (S4), 6 Schikanen (S6), Deltaform mit 4 Schikanen (D4)). Die Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt und unabhängig von einander mit dem VA und dem entwickelten Homogenitätskriterium ausgewertet. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Dreifachbestimmung dar. . . .	71
8.1	Beispielbilder der wichtigen Algorithmenschritte des Colony Counter Algorithm (CCA): (0) Ausgangsbild; (1) Bild umgewandelt in Graustufenbild und in der Plattenerkennung ermittelter Ausschnitt; (2) Überlagerung aller im iterativen Thresholding gefunden runden Objekten; (3) Gruppierung mittels DBSCAN Algorithmus. Die blauen Einzelkolonien werden für die weitere Prozessierung verwendet; (4) Teilung der Koloniecluster mittels Circular Hough-Transformation; (5) Ergebnisbild: rot: Einzelkolonien, blau: Einzelkolonien gefunden im Randbereich, grün: Kolonien in Clustern. . . . .	75
8.2	Fließschema des Colony Counter Algorithm (CCA): (1) Vorbereitung des Bildes, Plattendetektion, Zuschneiden des Bildes, Hintergrundeliminierung; (2) Ermitteln des optimalen Binärisierungsschwellenwertes; (3) Erkennung von Einzelkolonien und Kolonieclustern; (4) Aufteilen der Koloniecluster in Einzelkolonien; (5) Finden fehlender Einzelkolonien. . . . .	76
8.3	Beispiel für das verwendete iterative Thresholding. Obere Reihe: Binärbilder bei den Binärisierungsschwellenwerten 39, 48 und 60 von links nach rechts. Untere Reihe: Runde Objekte aus dem darüberliegenden Bild. Alle Objekte mit einer Exzentrizität größer als 2 wurden entfernt. Pixelsumme der runden Objekte 4500, 10 800 und 5100 von links nach rechts . . . . .	77
8.4	Schritte der Circular Hough-Transformation: (0) Randpixel des Koloniecluster Objektes; (1) Alle gefunden Kreise in Abhängigkeit ihrer prozentualen Stärke (je grüner desto Stärker, je röter desto schwächer); (2) Verbleibende beste Kreise nach Entfernung von überlappenden Kreisen; (3) Finale Kreise, nach Entfernung von Kreisen außerhalb des Objektes. . . . .	79
8.5	Links: Mit dem Smartphone aufgenommenes Bild, welches so in den CCA eingespeist wird; Rechts: Validierungsbild in dem Einzelkolonien rot und Kolonien in Koloniecluster blau markiert wurden. . . . .	80

8.6	Vergleich zwischen CCA und manueller Zählung von 100 Agarplatten. Die blau gestrichelte Linie stellt die optimalen Ergebnisse dar, d. d. die Algorithmenzählung und die manuelle Zählung stimmen über ein. Die rot gepunktete Linie ist die lineare Regression zwischen den beiden Werten. Die Regression hat eine Steigung von 1,17 und ein $R^2$ von 0,98. . . . .	82
8.7	Defizite in der Erkennung von Kolonieclustern im Randbereich. (1) Bild der manuellen Zählung mit 171 gezählten Kolonien. Einzelkolonien sind rot und Kolonien innerhalb von Kolonieclustern sind blau markiert. (2) Ergebnisbild der Gruppierung. Das grüne Objekt am Rand der Platte ist Teil des Randbereiches und wird verworfen. Dies bedeutet, dass auch alle Koloniecluster innerhalb des Objektes verworfen werden, auch wenn sie selbst nicht teil des Randbereichs sind. (3) Ergebnisbild CCA mit 110 gezählten Kolonien. Die farblosen Kolonien auf dem Bild wurden nicht vom Algorithmus gezählt. . .	82
8.8	Vergleich von Randobjektlöschung und Randpixellöschung. (0) Ausgangsbild mit allen als Clustern definierten Objekten. Alles außerhalb des grünen unterlegten Bereiches in der Mitte wird als Randbereich betrachtet. (1) Objekte nach Randobjektlöschung. Objekte mit mehr als ein drittel Pixel im Randbereich werden als Randobjekte betrachtet und gelöscht. (2) Objekte nach Randpixellöschung. Die Definition von Randobjekten ist identisch, allerdings wird nicht das Ganz Objekt gelöscht, sondern nur die Pixel, welche im Randbereich liegen	84
8.9	Alternativer Ansatz bei dem nur Pixel im Randbereich gelöscht werden und nicht das ganze Objekt.(1a) Manuell gezählte Kolonie mit 171 gezählten Kolonien. Einzelkolonien sind rot und Kolonien innerhalb von Kolonieclustern sind blau markiert. (2a) Koloniecluster nach der Eliminierung von Pixeln im Randbereich. (3a) Ergebnisbild CCA mit 140 gezählten Kolonien. Die farblosen Kolonien auf dem Bild wurden nicht vom CCA gezählt. (1b) Manuell gezählte Kolonie mit 39 gezählten Kolonien. (2b) Koloniecluster nach der Eliminierung von Pixeln im Randbereich. (3b) Ergebnisbild CCA mit 78 gezählten Kolonien. Alle Kolonien die im Randbereich der Platte gefunden wurden sind Fehlerkennungen, die auf die nicht ausreichende Entfernung von Binarisierungsartefakten im Randbereich zurückzuführen ist. . . . .	85
8.10	Korrelation zwischen Koloniedurchmesser und OD für Kolonien von einer drei Tage alten Platte. Die Regression erfolgte mit der Formel $y = a \cdot e^{b \cdot x}$ mit $a = 0,027$ , $b = 0,784$ und einem $R^2$ von 0,9. . . . .	87
8.11	Links: Kolonien zeigen deutliche Auswüchse am Rand. Diese entstehen durch Binarisierungsartefakte. Rechts: Helle Umrandungen der markierten Kolonien zeigen, dass die erkannte Koloniegröße deutlich kleiner ist als die tatsächliche Kolonie . . . . .	88

B.1	Beispiele für zwei Arten von Luftblasen: (Links) Luftblase vollständig im Bild (K3, 17 h). (Rechts) Luftblase reicht vom Rand in das Bild hinein (K1, 5,5 h).	110
B.2	Ablauf des Bubble Analyzer (BA): 0. Originalbild; 1. Binarisierung mittels Schwellenwertverfahren und Grenzwert 35; 2. Objekterkennung; 3. Größenausschluss; 4. Lochentfernung in den Objekten Überlagerungsbild aus Originalbild und Objektbild; 5. Pixel die sowohl vom CRA als auch vom BA erkannt wurden. Diese Pixel werden aus dem CRA Ergebnis entfernt.	112
B.3	Plot der CRA Werte mit und ohne Korrektur durch den BA für die <i>P.-pastoris</i> -Kultivierungen K1 und K3.	112
B.4	Links: Bild mit zwei Luftblasen aus Kultivierung K3. Eine wird durch den BA erkannt (rechts oben) und die andere nicht, weil zu hell (mitte unten). Rechts: Bild mit Luftblase bei hoher Zelldichte der Kultivierung (K1, 39,5 h). Das gesamte Bild wird von <i>P.-pastoris</i> -Clustern eingenommen außer dem Bereich mit der Luftblase.	113
B.5	Varianz der drei Farbk채n채le f체r Bilder einer runden Mischkammer (Oben) und einer Mischkammer mit 4 Ecken (Unten). In der runden Mischkammer wurde der Farbstoff in Bild 190 dazu geben. Bei der viereckigen Mischkammer erfolgte die Farbstoffzugabe in Bild 60. In beiden Graphen zeigten die rote Varianz ein ungewöhnliches Verhalten, sie steigt über längere Zeit an. Dieses Verhalten macht eine Auswertung mit dem entwickelten Verfahren unmöglich.	117

## Tabellenverzeichnis

4.1	Werte der linearen Regressionen der Clustergröße des CRA mit der OD und BTM für die Kultivierungen K1-K3. Der Parameter $m$ ist die Steigung, $b$ der Y-Achsenabschnitt und $R^2$ das Bestimmtheitsmaß der Regression. Das $\sigma$ bezeichnet die Standardabweichung der Regressionsparameter. Der OD-Bereich und der BTM-Bereich geben den niedrigsten und höchsten Wert an, welcher für die Regression noch verwendet wurde.	33
4.2	Werte der linearen Regressionen der gezählten Zellen des PCA mit der OD und BTM für die Kultivierungen K1-K3. Der Parameter $m$ ist die Steigung, $b$ der Y-Achsenabschnitt und $R^2$ das Bestimmtheitsmaß der Regression. Das $\sigma$ bezeichnet die Standardabweichung der Regressionsparameter. Der OD-Bereich und der BTM-Bereich geben den niedrigsten und höchsten Wert an, welcher für die Regression noch verwendet wurde.	36

4.3	Werte der linearen Regressionen der Clustergröße des CRA mit der OD und BTM für die Kultivierungen K4 und K5. Der Parameter $m$ ist die Steigung, $b$ der Y-Achsenabschnitt und $R^2$ das Bestimmtheitsmaß der Regression. Das $\sigma$ bezeichnet die Standardabweichung der Regressionsparameter. Der OD-Bereich und der BTM-Bereich geben den niedrigsten und höchsten Wert an, welcher für die Regression noch verwendet wurde. . . . .	38
4.4	Werte der linearen Regressionen der gezählten Zellen des PCA mit der OD und BTM für die Kultivierungen K6-K8. Der Parameter $m$ ist die Steigung, $b$ der Y-Achsenabschnitt und $R^2$ das Bestimmtheitsmaß der Regression. Das $\sigma$ bezeichnet die Standardabweichung der Regressionsparameter. Der OD-Bereich und der BTM-Bereich geben den niedrigsten und höchsten Wert an, welcher für die Regression noch verwendet wurde. . . . .	42
5.1	Werte der linearen Regressionen des invertieren Grauwertes des TA mit der OD und BTM für die Kultivierungen E1-E3. Der Parameter $m$ ist die Steigung, $b$ der Y-Achsenabschnitt und $R^2$ das Bestimmtheitsmaß der Regression. Das $\sigma$ bezeichnet die Standardabweichung der Regressionsparameter. Der OD-Bereich und der BTM-Bereich geben den niedrigsten und höchsten Wert an, welcher für die Regression noch verwendet wurde. . . . .	51
6.1	Ermittelte Parameter der linearen Regression aus den Messungen mit definierten Abständen. Der Parameter $m$ ist die Steigung der linearen Regression, $b$ der Y-Achsenabschnitt und $R^2$ das Bestimmtheitsmaß der Regression. . . . .	62
8.1	Mittlere Abweichung zwischen manueller Zählung und Ergebnissen des Algorithmus. Die Normierung des prozentualen Anteils erfolgt auf Basis der manuellen Zählung. . . . .	83
A.1	Zusammensetzung des Kultiverungsmediums für die Batchphase der <i>P.-pastoris</i> -Kultivierungen . . . . .	98
A.2	Zusammensetzung der Yeast Trace Metal Solution (YMTS) für die <i>P.-pastoris</i> -Kultivierungen . . . . .	99
A.3	Glycerol Konzentrationen, ISM-Messzonenhöhen und Typen der <i>P.-pastoris</i> -Kultivierungen . . . . .	99
A.4	Zusammensetzung des Feed-Medium der <i>P.-pastoris</i> -Kultivierungen . . . . .	99
A.5	ISM-Einstellungen für die <i>P. pastoris</i> Kultivierungen . . . . .	100
A.6	Verwendete Parameter für die Berechnungen des Cluster Recognition Algorithm (CRA). Für die Kultivierung K5 musste ein anderer Bildausschnitt gewählt werden, da bei den ISM Aufnahmen die dunklen Randbereiche leicht verschoben sind. . . . .	100

A.7	Verwendete Parameter für die Berechnungen des Pichia Counter Algorithm (PCA)	100
A.8	Verwendete Algorithmen Einstellungen des Turbidity Algorithm (TA)	101
A.9	Zusammensetzung des Mediums für die Batchphase der <i>E.-coli</i> -Kultivierungen.	102
A.10	Zusammensetzung des Feed-Mediums der <i>E.-coli</i> -Kultivierungen. Für E1 wurden 500 g/L Glucose verwendet bei E2 und E3 875 g/L	103
A.11	ISM-Einstellungen für die <i>E.-coli</i> -Kultivierungen	103
A.12	Verwendete Algorithmen Einstellungen des Turbidity Algorithm (TA)	104
A.13	Algorithmen Einstellungen für die Auswertung der aufgenommenen Bilder zur Bestimmung der Messzonenhöhe	105
A.14	Verwendete ISM-Einstellungen	105
A.15	Algorithmen Einstellungen des Varianzalgorithmus (VA) der einzelnen Misch- zeitexperimente (Viereckig (E4), Sechseckig (E6), Zehneckig (E10) Rund (R), 2 Schikanen (S2), 4 Schikanen (S4), 6 Schikanen (S6), Deltaform mit 4 Schikanen (D4)). Wird beim VA ein Eckenwert von 17 oder größer eingestellt, so wird vom Algorithmus die Kreisform verwendet.	107
A.16	Zusammensetzung des LB-Mediums	108
A.17	Verwendete Algorithmen Einstellungen des Colony Counter Algorithm (CCA)	109
B.1	Zur Auswertung verwendete Parameter des Bubble Analyzer (BA)	114
B.2	Werte der linearen Regressionen des invertieren Grauwertes des Turbidity Algo- rithm (TA) mit der OD und BTM für die <i>P.-pastoris</i> -Kultivierungen K4-K8. Der Parameter $m$ ist die Steigung, $b$ der Y-Achsenabschnitt und $R^2$ das Bestimm- theitsmaß der Regression. Der OD-Bereich und der BTM-Bereich geben den niedrigsten und höchsten Wert an, welcher für die Regression noch verwendet wurde.	114
B.3	Werte der linearen Regressionen des invertieren Grauwertes des Turbidity Algo- rithm (TA) mit der OD und BTM für die Kultivierungen E1-E3. Der Parameter $m$ ist die Steigung, $b$ der Y-Achsenabschnitt und $R^2$ das Bestimmtheitsmaß der Regression. Der OD-Bereich und der BTM-Bereich geben den niedrigsten und höchsten Wert an, welcher für die Regression noch verwendet wurde.	115
B.4	Gemessene Stärke der Fühlerlehren, welche für die Messungen mit definierten Abständen verwendet wurden. Für die Kalibration wurde bei unterschiedli- chen Stärken immer die größere Stärke verwendet.	115
B.5	Bestimmte Mischzeiten für verschiedene Mischkammergeometrien (Viereckig (E4), Sechseckig (E6), Zehneckig (E10) Rund (R), 2 Schikanen (S2), 4 Schikanen (S4), 6 Schikanen (S6), Deltaform mit 4 Schikanen (D4)). Die Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt und unabhängig von einander mit dem VA und dem entwickelten Homogenitätskriterium ausgewertet.	116

B.6 Regressionsparamter für alle OD gegen Koloniegröße Korrelationen für alle Messreihen. Für die Regression wurde folgende Formel verwendet  $y = a \cdot e^{b \cdot x}$  wobei  $x$  der Koloniedurchmesser in Millimetern (mm) ist. . . . . 118

## Literaturverzeichnis

- Alves, Gabriel M. und Paulo E. Cruvinel (2016). „Customized Computer Vision and Sensor System for Colony Recognition and Live Bacteria Counting in Agriculture“. In: *Sensors & Transducers* 201.6, S. 65–77.
- Arnold, S. Alison *et al.* (2002). „Use of at-line and in-situ near-infrared spectroscopy to monitor biomass in an industrial fed-batch Escherichia coli process“. In: *Biotechnology and Bioengineering* 80.4, S. 405–413.
- Austerjost, Jonas *et al.* (2017). „A smart device application for the automated determination of E. coli colonies on agar plates“. In: *Engineering in Life Sciences*, S. 1–23.
- Baeshen, Mohammed N. *et al.* (2015). „Production of biopharmaceuticals in E. Coli: Current scenario and future perspectives“. In: *Journal of Microbiology and Biotechnology* 25.7, S. 953–962.
- Barber, PR *et al.* (2000). „An automated colony counter utilising a compact Hough transform“. In: *Proceedings of Medical Image Understanding and Analysis*, S. 41–44.
- Bluma, Arne (2009). „Adaption inline mikroskopischer Verfahren an die Überwachung und Charakterisierung biotechnologischer Kristallisationsprozesse“. Diss.
- Bluma, Arne *et al.* (2009). „Adaptation of in-situ microscopy for crystallization processes“. In: *Journal of Crystal Growth* 311.17, S. 4193–4198.
- Bradley, Derek und Gerhard Roth (2007). „Adaptive Thresholding using the Integral Image“. In: *Journal of Graphics Tools* 12.2, S. 13–21.
- Breen, Edmond J. und Ronald Jones (1996). „Attribute openings, thinnings, and granulometries“. In: *Computer Vision and Image Understanding* 64.3, S. 377–389.
- Brugger, Silvio D. *et al.* (2012). „Automated Counting of Bacterial Colony Forming Units on Agar Plates“. In: *PLoS ONE* 7.3, e33695.
- Canny, J (1986). „A computational approach to edge detection.“ In: *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence* 8.6, S. 679–698.
- Cereghino, G P L *et al.* (2002). „Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*“. In: *Curr Opin Biotech* 13.4, S. 329–332.

- Cereghino, J L und J M Cregg (2000). „Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.“ In: *FEMS microbiology reviews* 24.1, S. 45–66.
- Chiang, Pei Ju *et al.* (2015). „Automated counting of bacterial colonies by image analysis“. In: *Journal of Microbiological Methods* 108, S. 74–82.
- Ciresan, D. *et al.* (2012). „Multi-column Deep Neural Networks for Image Classification“. In: *CVPR*, S. 3642–3649.
- Cortazar, Bingen *et al.* (2015). „Quantification of plant chlorophyll content using Google Glass“. In: *Lab on a Chip* 15.7, S. 1708–1716.
- Coskun, Ahmet F. *et al.* (2013). „Albumin testing in urine using a smart-phone“. In: *Lab on a Chip* 13.21, S. 4231.
- Crowley, John *et al.* (2005). „Monitoring a high cell density recombinant *Pichia pastoris* fed-batch bioprocess using transmission and reflectance near infrared spectroscopy“. In: *Enzyme and Microbial Technology* 36.5-6, S. 621–628.
- Doorn, L J van *et al.* (2000). „Importance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA status for the efficacy of antibiotic treatment.“ In: *Gut* 46.3, S. 321–6.
- Eliceiri, Kevin W *et al.* (2012). „Biological imaging software tools“. In: *Nature Methods* 9.7, S. 697–710.
- Ester, Martin *et al.* (1996). „A Density-Based Algorithm for Discovering Clusters in Large Spatial Databases with Noise“. In: *Proceedings of the 2nd International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining*, S. 226–231.
- Fehrenbach, R *et al.* (1992). „On-line biomass monitoring by capacitance measurement.“ In: *Journal of biotechnology* 23.3, S. 303–314.
- Funke, Matthias *et al.* (2009). „The baffled microtiter plate: Increased oxygen transfer and improved online monitoring in small scale fermentations“. In: *Biotechnology and Bioengineering* 103.6, S. 1118–1128.
- Gan, Samuel Ken-En und Jun-Kai Poon (2016). „The world of biomedical apps: their uses, limitations, and potential“. In: *Scientific Phone Apps and Mobile Devices* 2.1, S. 6.
- Garcia-Ortega, Xavier *et al.* (Okt. 2013). „Fed-batch operational strategies for recombinant Fab production with *Pichia pastoris* using the constitutive GAP promoter“. In: *Biochemical Engineering Journal* 79, S. 172–181.
- Geissmann, Quentin (2013). „OpenCFU, a New Free and Open-Source Software to Count Cell Colonies and Other Circular Objects“. In: *PLoS ONE* 8.2, S. 1–10.

- Goodrick, J. C. *et al.* (2001). „High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system“. In: *Biotechnology and Bioengineering* 74, S. 492–497.
- Gurramkonda, Chandrasekhar *et al.* (2010). „Application of simple fed-batch technique to high-level secretory production of insulin precursor using *Pichia pastoris* with subsequent purification and conversion to human insulin.“ In: *Microbial cell factories* 9, S. 31.
- Hallas, Gary und Paul Monis (2015). „Evaluation of heterotrophic plate and chromogenic agar colony counting in water quality laboratories“. In: *MethodsX* 2, S. 415–422.
- Illingworth, J. und J. Kittler (1987). „The Adaptive Hough Transform“. In: *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* PAMI-9.5, S. 690–698.
- Invitrogen (2013). „One ShotTOP10 Competent Cells“. In: *Invitrogen User Guide* 280126, S. 1–16.
- Jenzsch, Marco *et al.* (2006). „Estimation of biomass concentrations in fermentation processes for recombinant protein production“. In: *Bioprocess and Biosystems Engineering* 29.1, S. 19–27.
- Krabichler, Charlotte (2005). „Erkennen von Hefezellen in der mit Methoden der Bildverarbeitung“. Diss. Fachhochschule Weihenstephan.
- LeCun, Yann *et al.* (2015). „Deep learning“. In: *Nature* 521.7553, S. 436–444.
- Li, Pingzuo *et al.* (2007). „Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*.“ In: *Applied biochemistry and biotechnology* 142.2, S. 105–124.
- Lindner, Patrick (2017). „Vorlesung Digitale Bildverarbeitung“. In: *Leibniz Universität Hannover*.
- Lücking, Tim H., Franziska Sambale, Sascha Beutel *et al.* (2015). „3D-printed individual labware in biosciences by rapid prototyping: A proof of principle“. In: *Engineering in Life Sciences* 15.1, S. 51–56.
- Lücking, Tim H., Franziska Sambale, Birte Schnaars *et al.* (Jan. 2015). „3D-printed individual labware in biosciences by rapid prototyping: In vitro biocompatibility and applications for eukaryotic cell cultures“. In: *Engineering in Life Sciences* 15.1, S. 57–64.
- Lüder, C *et al.* (2014). „In situ microscopy and MIR-spectroscopy as non-invasive optical sensors for cell cultivation process monitoring“. In: *Pharmaceutical Bioprocessing* 2, S. 157–166.
- Luttmann, Reiner *et al.* (2015). „Sequential/parallel production of potential Malaria vaccines – A direct way from single batch to quasi-continuous integrated production“. In: *Journal of Biotechnology* 213, S. 83–96.

- Macauley-Patrick, Sue *et al.* (2005). „Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system“. In: *Yeast* 22.4, S. 249–270.
- Marose, Stefan *et al.* (1998). „Two-dimensional fluorescence spectroscopy: A new tool for on-line bioprocess monitoring“. In: *Biotechnology Progress* 14.1, S. 63–74.
- Marquard, D. *et al.* (2016). „In situ microscopy for online monitoring of cell concentration in *Pichia pastoris* cultivations“. In: *Journal of Biotechnology* 234, S. 90–98.
- Matsubayashi, Y *et al.* (Apr. 2011). „‘White wave’ analysis of epithelial scratch wound healing reveals how cells mobilise back from the leading edge in a myosin-II-dependent fashion“. In: *Journal of Cell Science* 124.7, S. 1017–1021.
- Mayr, B *et al.* (1992). „Engineering approach to mixing quatification in bioreactors“. In: *Bioprocess Engineering* 8.3, S. 137–143.
- Nischwitz, Alfred *et al.* (2011). *Computergrafik und Bildverarbeitung - Band II: Bildverarbeitung*, S. 608.
- O’Clair, Lindy *et al.* (2017). „Ein neuartiger Assay zur Messung chemotaktischer Migration in Echtzeit“. In: *BIOspektrum* 23.2, S. 171–173.
- Opitz, Britta *et al.* (2013). „In situ microscopy for in-line monitoring of the enzymatic hydrolysis of cellulose“. In: *Analytical Chemistry* 85.17, S. 8121–8126.
- Otsu, Nobuyuki (1979). „A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms“. In: *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics* 9.1, S. 62–66.
- Physik Instrumente GmbH & Co. KG, PI (2015). *Datenblatt: Präzisions- Mikro- Linearstellisch M-122*.
- Prediger, Andreas (2013). „Entwicklung von In-situ- und Durchfluss-Mikroskopen für die Bioprozesstechnik“. Diss.
- Prediger, Andreas *et al.* (2011). „In Situ Microscopy for Online Monitoring of Enzymatic Processes“. In: *Chemical Engineering and Technology* 34.5, S. 837–840.
- Pridmore, Andrew (2012). *Evaluation of the ProtoCOL 3 instrument for enumeration of bacterial and fungal colonies on agar plates*. Techn. Ber. November 2012, S. 1–9.
- Raddatz, L. *et al.* (2017). „3D-Druck - Chancen, Möglichkeiten, Risiken“. In: *Chemie in unserer Zeit*.
- Reshes, Galina *et al.* (2008). „Cell Shape Dynamics in *Escherichia coli*“. In: *Biophysical Journal* 94.1, S. 251–264.
- Roche Diagnostics, GmbH (2012). *Cedex HiRes Analyzer Information regarding the Cedex HiRes Analyzer*. August.

- Rodríguez, Vida *et al.* (2014). „Design and implementation of a high yield production system for recombinant expression of peptides“. In: *Microbial Cell Factories* 13.1, S. 65.
- Rudolph, Guido *et al.* (2007). „Online Monitoring of Microcarrier Based Fibroblast Cultivations With In Situ Microscopy“. In: 99.1, S. 136–145.
- Seeger, Anke *et al.* (1995). „Comparison of temperature- and isopropyl-beta-d-thiogalactopyranoside-induced synthesis of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*“. In: *Enzyme and Microbial Technology* 17.10, S. 947–953.
- Shariff, Aabid *et al.* (2010). „Automated Image Analysis for High-Content Screening and Analysis“. In: *Journal of Biomolecular Screening* 15.7, S. 726–734.
- Shiloach, Joseph und Rephael Fass (2005). „Growing *E. coli* to high cell density - A historical perspective on method development“. In: *Biotechnology Advances* 23.5, S. 345–357.
- Siano, Steven A. (1997). „Biomass measurement by inductive permittivity“. In: *Biotechnology and Bioengineering* 55.2, S. 289–304.
- Sim, Jia-Zhi *et al.* (2015). „GelApp: Mobile gel electrophoresis analyser“. In: *Nature Methods Application Notes*, S. 1–2.
- Smith, Sm und Jm Brady (1995). „SUSAN—a new approach to low level image processing“. In: *International journal of computer vision* 23.1, S. 45–78.
- Stamm, Anne *et al.* (2016). „In vitro wound healing assays - State of the art“. In: *BioNanoMaterials* 17.1-2, S. 79–87.
- Steinbrecher, R (2005). *Bildverarbeitung in der Praxis*, S. 321.
- Surribas, Anna *et al.* (2006). „State variables monitoring by in situ multi-wavelength fluorescence spectroscopy in heterologous protein production by *Pichia pastoris*“. In: *Journal of Biotechnology* 124.2, S. 412–419.
- Süße, Herbert und Erik Rodner (2014). *Bildverarbeitung und Objekterkennung*, S. 666.
- Valderrama-Rincon, Juan D *et al.* (2012). „An engineered eukaryotic protein glycosylation pathway in *Escherichia coli*“. In: *Nature Chemical Biology* 8.5, S. 434–436.
- Vogel, M. *et al.* (2015). „PetriJet Platform Technology: An Automated Platform for Culture Dish Handling and Monitoring of the Contents“. In: *Journal of Laboratory Automation* 20.4, S. 447–456.
- Wacker, M. (2002). „N-Linked Glycosylation in *Campylobacter jejuni* and Its Functional Transfer into *E. coli*“. In: *Science* 298.5599, S. 1790–1793.
- Wriessnegger, Tamara *et al.* (2009). „Identification of phosphatidylserine decarboxylases 1 and 2 from *Pichia pastoris*“. In: *FEMS Yeast Research* 9.6, S. 911–922.

- Xue, Tianfan *et al.* (2015). „A computational approach for obstruction-free photography“. In: *ACM Transactions on Graphics* 34.4, 79:1–79:11.
- Yamane, Tsueno *et al.* (1992). „Fed-Batch Culture Automated“. In: *Biotechnology* 39.4, S. 550–555.
- Zaritsky, Assaf *et al.* (Nov. 2011). „Cell Motility Dynamics: A Novel Segmentation Algorithm to Quantify Multi-Cellular Bright Field Microscopy Images“. In: *PLoS ONE* 6.11. Hrsg. von Giuseppe Chirico, e27593.
- Zordan, Michael D. *et al.* (2011). „A high throughput, interactive imaging, bright-field wound healing assay“. In: *Cytometry Part A* 79 A.3, S. 227–232.

## Online Quellen

- sueddeutsche.de <http://www.sueddeutsche.de/muenchen/gesichtserkennung-bei-der-polizei-selfies-koennten-inzukunft-verbrechen-aufklaeren-1.2820125>, Abruf am 24.07.2017.
- acatech.de [http://www.acatech.de/fileadmin/user\\_upload/Baumstruktur\\_nach\\_Website/Acatech/root/de/Publikationen/Stellungnahmen/acatech\\_IMPULS\\_Biotechnologie\\_WEB.pdf](http://www.acatech.de/fileadmin/user_upload/Baumstruktur_nach_Website/Acatech/root/de/Publikationen/Stellungnahmen/acatech_IMPULS_Biotechnologie_WEB.pdf), Abruf am 24.07.2017
- bilder.n3po.com <http://bilder.n3po.com/Kunstdrucke/Riesenrad.jpg.html>, Abruf am 27.07.2017
- wikimedia.org [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9f/Camera\\_obscura.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9f/Camera_obscura.jpg), Abruf am 18.07.2017
- wikimedia.org2 [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4b/Image\\_processing\\_pre\\_otsus\\_algorithm.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4b/Image_processing_pre_otsus_algorithm.jpg), Abruf am 18.07.2017

## Liste der an dieser Arbeit beteiligten Personen und Institutionen

An einigen der beschriebenen Experimente und Entwicklungen in dieser Arbeit waren neben dem Autor noch weitere Personen beteiligt, diese werden hier aufgeführt.

Dr. Patrick Lindner	Konzeptionierung des Bildverarbeitungsalgorithmus Window Marker Analyzer (Kapitel 6)
Dr. Jürgen Koch (Laser Zentrum Hannover e.V.)	Einfügen der Markierungen auf den Saphirglasscheiben mittels Lasergravur (Kapitel 6)
Lukas Raddatz	Entwicklung und Druck der verschiedenen Mischkammern. Konzeptionierung und Durchführen der Mischzeitexperimente (Kapitel 7)
Jonas Austerjost	Durchführung von Experimenten zur Testung des Colony Counter Algorithm (Kapitel 8)

### **Im Rahmen der Promotion betreute Abschlussarbeiten aus denen Ergebnisse in die vorliegende Dissertation eingeflossen sind, sind im Folgenden aufgeführt:**

Anton Enders, Bachelorarbeit: Online-Zelldichtebestimmung von *Pichia pastoris* Kultivierungen mittels In-situ Mikroskopie, im Fach Life Science an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 03/2015 - 04/2015. Dieser Bachelorarbeit sind experimentelle Daten für das Kapitel 4 entnommen.

Soraya Düsterloh, Bachelorarbeit: Evaluierung von Bildverarbeitungsalgorithmen für *E. coli*-Kultivierungen, im Fach Life Science an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 02/2016 - 04/2016. Dieser Bachelorarbeit sind experimentelle Daten für die Kapitel 5 und 8 entnommen.

# Curriculum Vitae

## Persönliche Angaben

Name	Daniel Marquard
Geburtsdatum	12.12.1988
Geburtsort	Hannover
Nationalität	Deutsch

## Ausbildung

2014 - 2017	<b>Promotionsstudium</b> Chemie, Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
2011 - 2013	<b>Masterstudium</b> Life Science, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
2008 - 2011	<b>Bachelorstudium</b> Life Science, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
2001 - 2008	<b>Allgemeine Hochschulreife</b> , Leibniz Schule Hannover

## Publikationsliste

### Fachartikel

**D. Marquard** (75 %) ,A. Enders, G. Roth, U. Rinas, T. Scheper, P. Lindner, In situ microscopy for online monitoring of cell concentration in *Pichia pastoris* cultivations, *Journal of Biotechnology*, **2016**

**D. Marquard** (70 %), C. Schneider-Barthold, S. Duesterloh, T. Scheper, P. Lindner, Online monitoring of cell concentration in high cell density *Escherichia coli* cultivations using In situ Microscopy, *Journal of Biotechnology*, **2017**

J. Austerjost, **D. Marquard** (35 %), L. Raddatz, T. Scheper, P. Lindner, S. Beutel, Smart devices for the automated counting of colony forming units, *Engineering in Life Science*, **2017**

### Vorträge

**D. Marquard**, A. Enders, G. Roth, U. Rinas, T. Scheper, P. Lindner, In-situ-Mikroskopie: Ein neues Werkzeug für die Online-Überwachung von hochzellichten Kultivierungen von *Pichia pastoris*, *ProcessNet-Jahrestagung und 32. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen*, Aachen, Deutschland, **2016**

**D. Marquard**, J. Austerjost, C. Schneider-Barthold, S. Duesterloh, S. Beutel, T. Scheper, P. Lindner, Development of a novel image analyzing algorithm for images of plated bacterial colonies acquired by handheld devices, *Interdisziplinäres Doktorandenseminar des Arbeitskreis Prozessanalytik*, Berlin, Deutschland, **2017** (Vortragspreis)

## Posterbeiträge

**D. Marquard**, T. Lücking, D. Solle, T. Scheper, Softsensoren für die Regelung von CHO-Zellkultivierungen, *Interdisziplinäres Doktorandenseminar des Arbeitskreis Prozessanalytik*, Berlin, Deutschland, **2015**

**D. Marquard**, A. Enders, G. Roth, P. Lindner, T. Scheper, Image processing algorithms for online monitoring of cell density in *Pichia pastoris* cultivations by In situ Microscopy, *German Conference on Bioinformatics*, Dortmund, Deutschland, **2015**

**D. Marquard**, A. Enders, G. Roth, P. Lindner, T. Scheper, In situ Microscopy for online monitoring of cell density in *Pichia pastoris* cultivations, *Interdisziplinäres Doktorandenseminar des Arbeitskreis Prozessanalytik*, Berlin, Deutschland, **2016** (Posterpreis)

### Weitere Projekte die während dieser Dissertation bearbeitet wurden:

Als ein weiteres Projekt während dieser Dissertation wurde die Software „Biomodeller“ weiterentwickelt und optimiert. Hierbei handelt es sich um eine Software mit der Differentialgleichungssysteme von Bioprozessmodellen gelöst werden können und die Parameter dieser Modelle mit Hilfe von Optimierungsalgorithmen an Datensätze angepasst werden können. Die Software und entwickelten Bioprozessmodelle können bei Dr. Dörte Solle aus dem Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover erfragt werden.