

**Entwicklung eines In-situ Mikroskops  
zur bildgestützten Online-Überwachung von Bioprocessen**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von

Jan-Gerd Frerichs

Geboren am 14. März 1969 in Hannover

Hannover, im Januar 2000

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. Gerlinde Kretzmer

Tag der Promotion: 5. Mai 2000

# Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Thomas Scheper. Ich bedanke mich bei ihm herzlichst für die gebotenen Arbeitsmöglichkeiten, sowohl im Rahmen dieser Arbeit als auch für einer Vielzahl anderer, von ihm mit ganzem Herzen unterstützter Projekte, an denen er mich teilhaben ließ.

Frau Priv.-Doz. Dr. Gerlinde Kretzmer danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Bei der Europäischen Union bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen der Förderung des „Efficient Cell“ Projekts.

Den Mitarbeitern des Instituts für Technische Chemie in Hannover danke ich für die gute Aufnahme, angenehme Atmosphäre, die angeregten Diskussionen und die stets gute Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt

- Jörg Schaper für sein erstklassiges Engagement im Rahmen seiner Diplomarbeit.
- Wilhelm Behnsen und der feinmechanischen Werkstatt des Instituts für Technische Chemie, ohne die diese Arbeit niemals möglich gewesen wäre.
- Der Elektronikwerkstatt für ihre Hilfe bei der Entwicklung der manuellen Steuerung.
- André Kethler und Dirk Ide für die Mitarbeit an Hard- und Software der automatischen Steuerung.
- Dr. Klaus Joeris für die anregenden Diskussionen und die vielen Tipps und Ideen.
- Alexander Loa und Georg Renemann für ihre Kultivierungsarbeiten.
- Matthias Arndt und Daniela Boehl für das Bereitstellen ihrer Fermenter für diverse Experimente.
- Dr. Stefan Hellwig für die Unterstützung bei den Dichtigkeitstests an der RWTH Aachen.
- Konstantin Konstantinov und Andreas Flagmeyer für ihre Unterstützung während meines Aufenthaltes bei der Bayer Corporation in Berkeley.
- Georg Renemann und ganz besonders Simona Becker für das Korrekturlesen dieser Arbeit.
- Silke Schneider für ihre langjährige Unterstützung. Ohne sie wäre diese Arbeit nie zustande gekommen.

Bei meinen Eltern möchte ich mich an dieser Stelle für die stete Unterstützung ganz besonders bedanken.

# Zusammenfassung

Diese Arbeit beschreibt die Entwicklung eines online-fähigen Bildanalyse-Systems für die Überwachung biotechnologischer Kultivierungsprozesse. Zur Bildaufnahme innerhalb des Bioreaktors wird die Entwicklung eines speziellen, sogenannten In-situ Mikroskops beschrieben, das in Verbindung mit einer angeschlossenen CCD-Kamera und einem Framegrabber in einem Rechnersystem die Aufnahmeeinheit darstellt. Anforderungen an das In-situ Mikroskop sind unter anderem Miniaturisierbarkeit, Sterilisierbarkeit und leichte Handhabbarkeit. Nach der Aufnahme wird das Bild unter Verwendung von Bildverarbeitungs-routinen automatisch ausgewertet. Das Bild wird auf Zellzahl, Zellgrößenverteilung und Zellmorphologie (Einzelzellen, Doppelzellen, Zellcluster) untersucht. Als Messobjekte werden Tier- bzw. Hefezellen verwendet, deren Zustand während des Kultivierungsverlaufs am Ort ihres Entstehens innerhalb des Bioreaktors beobachtet wird. Dem Einsatz eines automatischen Bildanalyse-Systems kommt dabei große Bedeutung zu, weil dadurch Kontamination des Reaktors bei der Probenahme, Messfehler durch Überlastung des auswertenden Personals oder Subjektivität beim Auszählen von Zellproben vermieden werden. Eine kontinuierliche Beobachtung des Kultivierungsprozesses bei geringem Personalaufwand wird möglich. Untersuchungen mit der In-situ Mikroskopie ergeben, dass die erhaltenen Daten gut mit denen klassischer Analysemethoden, wie Zellzählung mit der Thomakammer oder Messung der optischen Dichte, korrelieren.

Schlagworte: Mikroskopie, Bildverarbeitung, Zellkultivierung

## Abstract

The objective of this work was the development of an online image analysis system for monitoring biotechnological cultivation processes. For image acquisition directly inside a fermentor the development of an in-situ microscope, a special light microscope, is described. In combination with a frame grabber and a CCD camera the in-situ microscope represents the image acquisition unit. The acquired cell image is stored and further processed on a personal computer in respect of cell number, cell size distribution and cell morphology (i.e. single cells, double cells and cell clusters). The main requirements for the microscope's design were miniaturization, sterilizeability and easy manageability. For cultivation and observation mammalian cells are used as well as yeast cells. Their conditions during cultivation can be analyzed continuously directly inside the fermentor without risking any contamination of the cultivation broth. The results obtained with in-situ microscopy correlate well with comparable classical analytical methods like cell counting with the hemocytometer chamber or measurement of the optical density.

Keywords: microscopy, image analysis, cell cultivation

# Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG .....	1
2	THEORETISCHER TEIL .....	5
2.1	MIKROORGANISMEN UND IHRE KULTIVIERUNG .....	5
2.1.1	DER KULTIVIERUNGSVERLAUF .....	5
2.1.2	HEFEZELLEN (SACCHAROMYCES CEREVISIAE).....	7
2.1.3	TIERZELLEN.....	9
2.1.4	ZELLTOD BEI TIERZELLEN.....	11
2.2	MIKROSKOPISCHE BETRACHTUNG VON MIKROORGANISMEN .....	13
2.2.1	BELEUCHTUNGSVARIANTEN .....	14
2.2.2	NUMERISCHE APERTUR.....	16
2.2.3	KONSTRUKTIVE AUSFÜHRUNG VON LICHTMIKROSKOPEN .....	16
2.3	BILDVERARBEITUNG IN DER BIOTECHNOLOGIE .....	18
2.3.1	BILDVERARBEITUNGSSYSTEM.....	18
2.3.2	BILDVORVERARBEITUNG .....	18
2.3.3	SEGMENTIERUNG UND MERKMALSEXTRAKTION .....	19
2.3.3.1	Allgemeines.....	19
2.3.3.2	Automatische Schwellwertverfahren.....	19
2.3.3.2.1	Die verwendeten Likelihoodfunktionen .....	21
2.3.3.2.2	Maximierung einer Likelihoodfunktion unter Verwendung von Mischverteilungsmodellen .....	23
2.3.3.2.2.1	Das Verfahren von Kittler und Illingworth.....	23
2.3.3.2.2.2	Das Verfahren von Kurita et al. ....	25
2.3.3.2.2.3	Das Verfahren von Otsu.....	25
2.3.3.3	Morphologische Operatoren .....	26
2.3.3.4	Textur .....	27
2.3.3.4.1	Minimaler und Maximaler Grauwert .....	27
2.3.3.4.2	Mittlerer Grauwert.....	27
2.3.3.4.3	Varianz der Grauwerte.....	28
2.3.4	KLASSIFIKATION .....	28
3	MATERIAL UND METHODEN.....	29
3.1	HEFEZELLEN.....	29
3.2	CHINESE HAMSTER OVARY ZELLEN .....	30
3.3	BABY HAMSTER KIDNEY ZELLEN.....	30
3.4	AUFBAU DES MESS-SYSTEMS .....	31
3.4.1	OFFLINE-MIKROSKOPIE ALS REFERENZ.....	31
3.4.2	IN-SITU MIKROSKOPIE .....	31
3.4.2.1	Allgemeines.....	31
3.4.2.2	Manuelle Ansteuerung des In-situ Mikroskops .....	33
3.4.2.3	Automatische Ansteuerung des In-situ Mikroskops.....	33
3.4.2.3.1	Hardware.....	33
3.4.2.3.2	Software.....	34
3.4.3	BILDAUFNAHME.....	36

3.4.3.1	Hardwareausstattung .....	36
3.4.3.2	Softwareausstattung .....	36
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL .....</b>	<b>37</b>
4.1	IN-SITU MIKROSKOP HARDWARE .....	37
4.1.1	MACHBARKEITSSTUDIE .....	39
4.1.2	ERSTER PROTOTYP .....	41
4.1.3	ZWEITER PROTOTYP .....	42
4.2	OFFLINE EXPERIMENTE .....	43
4.2.1	BILDANALYSE FÜR HEFEZELLEN .....	43
4.2.1.1	Bildverarbeitungssoftware .....	48
4.2.1.2	Evaluierung des Bildverarbeitungsverfahrens für Hefezellen .....	49
4.2.1.3	Arbeitsbereich des In-situ Mikroskops .....	51
4.2.1.4	Synchrone Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	54
4.2.2	BILDANALYSE FÜR TIERZELLEN .....	60
4.2.2.1	Bildverarbeitungssoftware .....	62
4.2.2.2	Kultivierung von Chinese Hamster Ovary Zellen .....	63
4.2.2.3	Kultivierung von Baby Hamster Kidney Zellen .....	65
4.2.2.4	Lebend-tot-Unterscheidung bei ungefärbten Tierzellen .....	65
4.2.2.5	Gruppenzählversuch zur Lebend-tot-Unterscheidung .....	68
4.3	ONLINE VERSUCHE MIT DEM IN-SITU MIKROSKOP .....	74
4.3.1	DICHTIGKEITSTESTS .....	74
4.3.2	AUFNAHMEN VON HEFEZELLEN .....	74
4.3.3	AUFNAHMEN VON CHO-ZELLEN .....	77
4.3.4	AUFNAHMEN VON BHK-ZELLEN .....	77
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>81</b>
5.1	ZUSAMMENFASSUNG .....	81
5.2	AUSBLICK .....	83
5.2.1	AUTOFOKUSSIERUNG .....	83
5.2.2	SCHLIEßMECHANISMUS DER PROBEHAHMEZONE .....	83
5.2.3	INTERNETANBINDUNG .....	83
5.2.4	VERBESSERTE TEXTURANALYSE .....	83
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>88</b>
7.1	VERWENDETE FORMELZEICHEN .....	88
7.2	VERWENDETE ABKÜRZUNGEN .....	89
7.3	SCHATZMANN-MEDIUM .....	90
7.4	BAUFORMEN VON FERMENTERPORTS .....	92
7.4.1	APPLIKON .....	92
7.4.2	BRAUN BIOTECH INTERNATIONAL .....	93
7.5	SCHALTPLAN DER AUTOMATISCHEN STEUERUNG .....	94

# 1 Einleitung und Zielsetzung

Die Anwendung biotechnologischer Prozesse hat sich im Laufe der letzten Jahre in der chemischen und pharmazeutischen Industrie einen festen Platz erobert. Ein Beispiel hierfür ist die Synthese von humanen Proteinen, wie z.B. Interleukin 2 (IL-2), tissue Plasminogen Activator (t-PA) oder Antithrombin III (AT-III), deren Herstellung mit Hilfe der organischen Synthese wegen der hochkomplexen Strukturen nur schwer realisierbar ist. Aufgrund dieser Tatsache werden diese Proteine mit Hilfe der Fermentation von Säugetierzellen gewonnen. Diese stellt eine konkurrenzfähige Alternative zu dem technisch und finanziell aufwendigen Verfahren der Protein-Extraktion aus Blut und Gewebe dar, bei dem möglicherweise Infektionen mit Krankheiten wie Aids oder Hepatitis auftreten können. Auch bei der Herstellung von Produkten in der Lebensmittelindustrie, z.B. Bier, Wein, Käse oder Brot, werden Mikroorganismen, hier speziell Hefen, eingesetzt.

Ein anderer Bereich hat sich innerhalb des letzten Jahrzehnts ebenso vielversprechend entwickelt wie die Biotechnologie, hauptsächlich durch die rasante Entwicklung leistungsfähiger Rechnersysteme. Gemeint ist die digitale Bildverarbeitung, die in zunehmendem Maße in den unterschiedlichsten Aufgabengebieten Einsatz findet. In der Telematik beispielsweise werden Bildverarbeitungssysteme zur Steuerung des Verkehrsflusses verwendet. Die Automobilindustrie erforscht Möglichkeiten zur Fahrbahnerkennung und automatischen Steuerung von Kraftfahrzeugen mittels Bildverarbeitungsverfahren. Im industriellen Bereich entstehen in der Fertigung immer mehr Einsatzmöglichkeiten bei der Prozessüberwachung und -steuerung sowie in der Qualitätskontrolle. Im Rahmen der Biotechnologie und dabei insbesondere bei der mikroskopischen Zellbeobachtung nimmt die Bildverarbeitung einen immer größer werdenden Stellenwert ein [Vecht-Lifshitz et al., 1992].

Die vorliegende Dissertation beschreibt Entwicklung und Einsatz eines online-fähigen Bildanalyse-Systems für die Überwachung biotechnologischer Kultivierungsprozesse von Mikroorganismen. Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Modellorganismen handelt es sich um Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) und Tierzellen, hier speziell Chinese Hamster Ovary (CHO) und Baby Hamster Kidney (BHK) Zellen. Die beschriebenen Verfahren lassen sich jedoch auf nahezu beliebige Mikroorganismen übertragen, beispielsweise filamentöse Organismen oder Bakterien. Dabei ist lediglich eine Adaption der Bildanalyse an den entsprechenden Mikroorganismus notwendig. Häufig liegen bereits entsprechende, bisher nur für die Offline-Analyse verwendete Algorithmen vor.

Um das Wachstum und die Produktivität von Mikroorganismen zu kontrollieren und zu optimieren, ist eine Überwachung der Fermentation durch geeignete Analytik notwendig. Wachstum und Produktivität hängen

von verschiedenen Parametern ab, wie z.B. Mediumzusammensetzung, Temperatur, Rührerdrehzahl oder pH-Wert. Diese Parameter werden mit unterschiedlichen Analytikverfahren erfasst. Oftmals ist jedoch ein hoher apparativer Aufwand notwendig, speziell zur Detektion bestimmter Substrate und Produkte in einem komplexen Gemisch. Eine ausreichend schnelle Erkennung mit leicht zu bedienenden Sensoren ist häufig nicht möglich. Außerdem wird der Zustand der Kulturorganismen über die meisten dieser Parameter nur indirekt erfasst. Optisch-mikroskopische Methoden werden seit jeher zur Beobachtung von Kultivierungsprozessen verwendet und eignen sich gut für die Überwachung des Zellwachstums und zur direkten Bestimmung beispielsweise der Zellkonzentration [Konstantinov et al., 1994].

Damit in das Prozessgeschehen regelnd eingegriffen werden und eine Optimierung der laufenden Kultivierung erfolgen kann, sollte die Analytik möglichst online durchführbar sein. Unter Online-Fähigkeit ist dabei die automatische Auswertung der anfallenden Messdaten in Echtzeit zu verstehen, also in einem zeitlichen Rahmen, der eine Interpretation des aktuellen Zustands des Kultivierungsprozesses erlaubt und einen regelnden Eingriff einer an die Analytik angekoppelten Prozesssteuerung ermöglicht. Weiterhin erstrebenswert ist der Ausschluss aller Risiken einer Kontamination der Kultivierung, die insbesondere bei einer Probenahme eintreten kann. Bei einer Erfassung der Prozessparameter direkt im Fermenterinnenraum, wie sie bei der In-situ Mikroskopie erfolgt, vermindert sich das Kontaminationsrisiko damit beträchtlich.

Bei der In-situ Mikroskopie handelt es sich um ein Verfahren, bei dem eine heißdampfsterilisierbare bzw. autoklavierbare Mikroskopsonde in einen Standardport eines Fermenters eingesetzt wird. Diese Mikroskopsonde ermöglicht eine Bildaufnahme direkt in der Kulturbrühe. Das Mikroskopbild wird mit einer an das In-situ Mikroskop angeschlossenen CCD-Kamera aufgenommen und mit einem sogenannten Framegrabber digitalisiert. Die Auswertung der digitalisierten mikroskopischen Bilder wird mit Hilfe von Bildverarbeitungs-routinen auf einem Personal Computer durchgeführt. Anhand des mit der In-situ Mikroskopie gewonnenen Datenmaterials können Aussagen über Zellgröße und Biomasse, Zellgrößenverteilung bzw. Zellkonzentration, Zellmorphologie und Zellvitalität getroffen werden. Eine Steuerung des Prozesses anhand des gewonnenen Datenmaterials ist möglich. Der dieser Arbeit zugrundeliegende Stand der Technik soll im folgenden kurz beschrieben werden.

Erste Versuche zur In-situ Mikroskopie wurden 1989 von der japanischen Kirin-Brauerei durchgeführt. Das dort eingesetzte System, Fermentoskop genannt, wurde jedoch nur zur Beobachtung der Fermentationen, nicht aber zur Steuerung des Brauprozesses verwendet. Arbeiten zur Bildverarbeitung mit Hefezellen wurden u.a. von [Zalewski, 1995 und 1996] und [Pons, 1993 und 1997] durchgeführt. Die Untersuchungen liefen jedoch unter Verwendung von Bypass-Systemen in Verbindung mit konventionellen Mikroskopen ab. Eine In-situ Mikroskopsonde mit angekoppelter Bildverarbeitung wird erstmals 1991 in der Offenlegungsschrift von Prof. H. Suhr erwähnt. Das entsprechende Patent wurde 1997 erteilt [Suhr, 1997]. [Bittner, 1998] be-



schreibt die Realisierung eines entsprechenden Mikroskops für die Beobachtung von Kultivierungsprozessen an Hefen mit einer Durchlicht-Hellfeld-Anordnung und einer Zone zur Ruhigstellung eines mechanisch definierten Probenahmevolumens. Eine weitere Arbeit von [Schneider, 1995] beschreibt ein entsprechendes System mit Auflicht-Fluoreszenzoptik, wobei kein mechanisch definiertes Probenahmevolumen verwendet wird. Die Zellparameter werden statt dessen in einem optisch definierten Probenahmevolumen mit Hilfe eines „Depth from Focus“-Verfahren bestimmt [Scholz, 1995].

Eine weitere Realisierung einer In-situ Mikroskopsonde zur Partikelmesstechnik nach dem Durchlicht-Verfahren wird in der Offenlegungsschrift von [Suhr, 1999] beschrieben. Hierbei wird ebenfalls ein optisch definiertes Probevolumen zugrundegelegt. Dabei besteht das Problem in der aufgrund der Strömung im Fermenter relativ schnellen, ungebremsten Bewegung (ca. 1 m/s) der zu beobachtenden Teilchen durch das Gesichtsfeld der Kamera, wodurch es zu einer beträchtlichen Bewegungsunschärfe kommt. Um diese Unschärfe zu kompensieren, ist eine impulsartige Beleuchtung von max. 1  $\mu$ s notwendig. Die Besonderheit dieses Systems liegt in der Art der Beleuchtung, die hier durch eine gepulste Elektroluminiszenzdiode (LED) statt der bisher üblicherweise verwendeten Laserlichtquelle realisiert wird. Eine im Rahmen der Herstellerspezifikationen betriebene LED verfügt aber nicht über eine ausreichende Helligkeit. Bei dem dort angewandten gepulsten Betrieb kann eine höhere Lichtintensität der Diode dadurch erreicht werden, dass während des Pulsbetriebes der Diodenstrom stark erhöht wird, die Diode also mit starker Überlast betrieben wird. Durch die Kürze der Ströme wird ihre Zerstörung jedoch verhindert.

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Mikroskop basiert auf dem System von Bittner und verfügt ebenfalls über ein mechanisch definiertes Probenahmevolumen. Allgemein kann das Gesamtsystem für die In-situ Mikroskopie unterteilt werden in die Bildaufnahme mit dem In-situ Mikroskop selbst und die danach folgende automatische Auswertung des Bilddatenmaterials durch eine geeignete Bildverarbeitung. Diese Bildverarbeitungsalgorithmen müssen auf jeden auszuwertenden Mikroorganismus angepasst werden. Bisherige Forschungsarbeiten zur In-situ Mikroskopie befassten sich fast ausschließlich mit Hefen [Bittner, 1994] [Schneider, 1995]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben Hefekultivierungen auch Tierzellkultivierungen mit der In-situ Mikroskopie untersucht und Algorithmen zur Auswertung des Bildmaterials entwickelt.

Im folgenden Kapitel wird die für das weitere Verständnis dieser Arbeit notwendige Theorie vorgestellt. Dabei wird insbesondere auf die Grundlagen der Optik und der Bildverarbeitung sowie auf die verwendeten Modellorganismen eingegangen.

Kapitel 3 stellt die Hard- und Software vor, die für die Entwicklung und den Betrieb des In-situ Mikroskops zur Verfügung stand. Die einzelnen Meilensteine während der Hardware-Entwicklung sowie die während der Experimente mit der In-situ Mikroskopie gewonnenen Ergebnisse werden in Kapitel 4 aufgezeigt. Kapitel 5 gibt

eine Zusammenfassung und zeigt Perspektiven dieses optischen Verfahrens auf. In Kapitel 6 ist die zugrundeliegende Literatur angegeben, und Abschnitt 7 dient als Referenz für die verwendeten Formelzeichen und Abkürzungen, die Zusammensetzung des Schatzmann-Mediums und Technische Zeichnungen.

## 1.1 Theoretischer Teil

In diesem Abschnitt werden zunächst die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Mikroorganismen und ihre Eigenschaften vorgestellt. Dann werden die Grundlagen der Bildverarbeitung beschrieben, soweit sie für das weitere Verständnis dieser Arbeit notwendig sind. Schließlich wird näher auf die Anforderungen eingegangen, die bei der Entwicklung der Mikroskop-Hardware berücksichtigt werden mussten.

## 1.2 Mikroorganismen und ihre Kultivierung

Zellkultivierungen können auf verschiedene Arten durchgeführt werden, wobei zwischen *in vivo*- und *in vitro*-Kultivierungen unterschieden wird. Bei der *in vivo*-Kultivierung werden ganze Organismen genutzt, deren Gewebe sich aus verschiedenen Zelltypen zusammensetzt. Im Gegensatz dazu wird bei der *in vitro*-Kultivierung nur ein ganz spezieller Zelltypus kultiviert, so daß man eine große Zahl von Zellen heranzüchten kann, die homogene Eigenschaften besitzen [Lodish et al., 1996]. *In vitro*-Kultivierungen können sowohl auf Agar, einem halbfesten Nährboden aus Polysacchariden, als auch in flüssigem Nährmedium in Suspension durchgeführt werden. Der Kultivierungsverlauf von in dieser Arbeit durchgeführten Suspensionskultivierungen wird im folgenden näher vorgestellt.

### 1.2.1 Der Kultivierungsverlauf

Eine Kultivierung wird in einem Bioreaktor in einem speziellen Nährmedium durchgeführt. Zu Beginn der Kultivierung wird das sterile Nährmedium in der Regel mit Zellen aus einer Vorkultur angeimpft. Die Zellen treten unter Verbrauch der Nährstoffe in die Wachstumsphase ein, bis in Folge von Nährstoffmangel oder durch sonstige Verschlechterungen der Umgebungsparameter die Vermehrung aufhört. Dieser spezielle Fall einer Kultivierung wird als Batch-Kultur bezeichnet. Während dieser werden weder Nährstoffe von außen hinzugefügt noch Zellen entnommen, es handelt sich daher um ein diskontinuierliches Verfahren.

Eine Probenahme erfolgt nur zur Prozessüberwachung. Diese hat im idealen Fall aber keinen Einfluss auf die Kultivierung, da das Volumen der entnommenen Probe im Bezug auf das Gesamtvolumen der Batch-Kultur gering ist. Bei der Probenahme besteht jedoch ein nicht zu vernachlässigendes Kontaminationsrisiko, das den Erfolg der Kultivierung gefährdet.

Der Wachstumsverlauf kann in mehrere Phasen unterteilt werden, siehe Abbildung 2.1) [Diekmann et al., 1991]:

In der sogenannten lag-Phase ① passen sich die Zellen an die neue Umgebung an; es ist keine oder nur eine geringe Zunahme der Zelldichte zu erkennen.

- In der exponentiellen oder log-Phase ② wachsen die Zellen nach einem exponentiellen Wachstumsgesetz (Gleichung (2.1)).
- In der stationären Phase ③ entspricht die Wachstumsrate der Absterberate, da ein oder mehrere Substrate (z.B. Glucose, Sauerstoff) limitiert sind. Es ist weder eine Zunahme noch eine Abnahme der Zelldichte zu erkennen.
- Die letzte Phase, die sogenannte Absterbephase ④, ist durch eine deutliche Abnahme der Zellkonzentration charakterisiert.

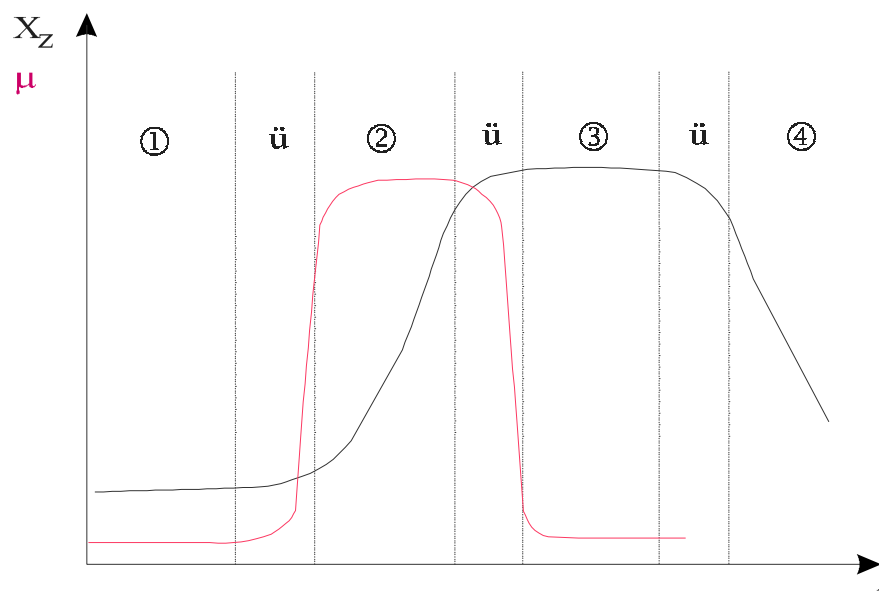


Abbildung 2.1: Wachstumsverlauf während einer Batch-Kultivierung. Dargestellt sind die spezifische Wachstumsrate  $\mu$  und die Zelldichte  $X_z$  während der einzelnen Phasen der Kultivierung. Mit  $\ddot{u}$  sind die Übergangsphasen gekennzeichnet.

Während der exponentiellen Phase lässt sich das Wachstum über folgenden mathematischen Ansatz beschreiben [Scholz, 1995].  $N_t$  ist die Zahl der Zellen zum Zeitpunkt  $t$  nach  $n$  Teilungen und  $N_0$  die ursprüngliche Zellzahl:

$$N_t = N_0 \cdot 2^n \quad (2.1)$$

Diese exponentielle Gleichung kommt dadurch zustande, dass sich eine Zelle nach einer gewissen Zeit in eine Mutter- und eine Tochterzelle teilt. Diese beiden Zellen teilen sich nach dem gleichen Schema, so dass nach jeder Teilung eine Verdopplung der Zellzahl eintritt.

Enthält das Nährmedium mehrere Substrate, so kann es in einer Batch-Kultur während der exponentiellen Phase zu Diauxie kommen [Scholz, 1995]. Die Zellen verstoffwechseln zunächst ein Substrat bevorzugt und stellen dann ihren Stoffwechsel durch Bildung von Enzymen in einer zweiten lag-Phase um. Diese Enzyme ermöglichen es den Zellen, ein weiteres Substrat aus dem Medium als Nährstoff zu verwerten, so dass es zu einem zweiten exponentiellen Wachstum kommt.

Nach Abschluss der exponentiellen Phase in einer Batch-Kultivierung kann damit begonnen werden, zu der Kultivierung nährstoffreiches Medium hinzuzufüttern. Diese sogenannte Fedbatch-Kultivierung stellt ein Beispiel für ein halbkontinuierliches Verfahren dar. Durch die Nährstoffzugabe ist es möglich, die Kultur möglichst lange in der stationären Phase zu halten oder sogar ein erneutes Wachstum zu bewirken.

Neben den erwähnten diskontinuierlichen und halbkontinuierlichen Verfahren gibt es auch kontinuierliche Kultivierungsverfahren. Dabei wird ständig eine bestimmte Menge der kompletten Nährlösung zugeführt. Um im Reaktor ein konstantes Volumen zu haben, wird die gleiche Menge der Kulturbrühe einschließlich der Zellen über einen Auslauf aus dem Reaktor entfernt. Nach einer bestimmten Zeit stellt sich ein Gleichgewicht zwischen abfließenden und durch Zellteilung neu entstehenden Zellen ein, so dass die Zelldichte konstant bleibt. Diese Prozessführung wird chemostat genannt.

Insbesondere bei Hefezellen lässt sich durch Eingriffe in die kontinuierliche Kultivierung, z.B. durch eine kurze Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr, ein synchroner Kultivierungsverlauf erzeugen [Wheals, 1987]. Mit einer solchen synchronen Kultur, die auch als oszillierend bezeichnet wird [Scheper, 1985], lassen sich leicht Aussagen über den Zellzyklus treffen.

In den folgenden Abschnitten werden Mikroorganismen beschrieben, die sich mit den vorgestellten Techniken kultivieren lassen.

### 1.2.2 Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*)

*Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) gehören zur Klasse der Ascomyceten oder Schlauchpilze. Es sind verschiedene Stämme bekannt, wie z.B. die Bäcker-, Bier- und Weinhefe. Die Einzelzellen, die eine runde bis ovale Morphologie aufweisen, liegen meist getrennt voneinander vor, können sich aber auch zu Zellverbänden zusammenlagern [Schlegel, 1992]. Eine Mycelbildung erfolgt jedoch nicht.

Die Vermehrung geschieht durch ungeschlechtliche Sprossung, wobei die Mutterzelle eine kleinere Tochterzelle bildet, die als Knospe oder Sprosse bezeichnet wird, siehe Abbildung 2.2. Unter bestimmten Bedingungen kann es jedoch auch zu einer geschlechtlichen Vermehrung kommen. Dabei wird aus einer diploiden Zelle ein Sporenbehälter (Ascus), der vier haploide Sporen enthält. Jede dieser Sporen kann sich durch Sprossung vermehren und dann mit einer anderen Spore verschmelzen [Phaff, 1981].

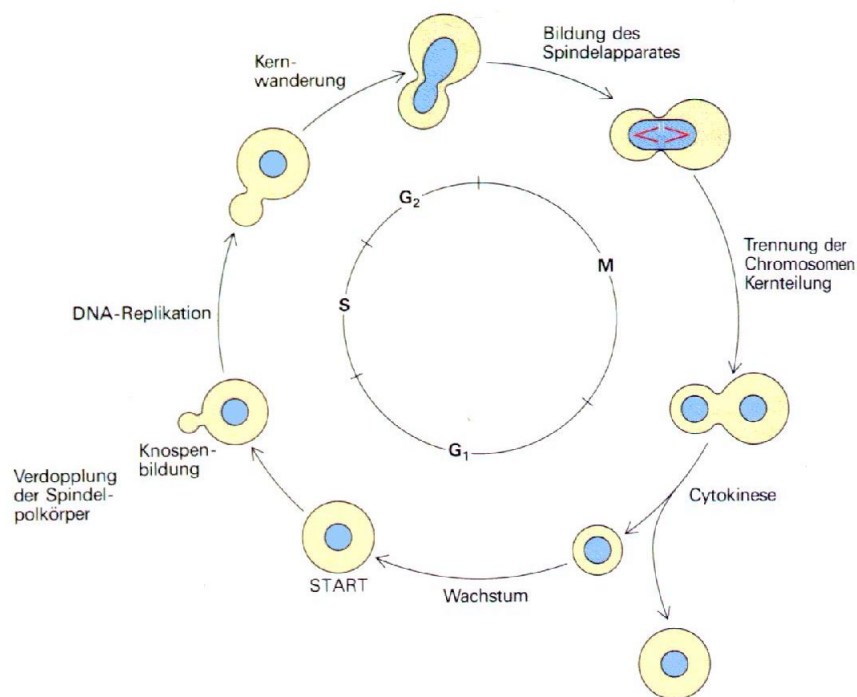


Abbildung 2.2: Morphologische Veränderung während des Zellzyklus von *S. cerevisiae* [Lodish et al., 1996].

Der Vorteil des Einsatzes von *S. cerevisiae* in der Biotechnologie liegt in der kurzen Generationszeit von 90 - 120 Minuten, der Robustheit der Hefezellen und den geringen Kosten für die Kultivierung, da nur Minimalmedien benötigt werden. Diese Minimalmedien enthalten Glucose als Kohlenstoff- und Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle sowie einige Salze. Wegen der Größe von 3-8  $\mu\text{m}$  und der geringen Neigung zur Bildung von Agglomeraten sind Hefezellen für lichtmikroskopische Untersuchungen besonders geeignet [Bittner, 1994].

### 1.2.3 Tierzellen

Tierzellen sind im Gegensatz zu Bakterien und Hefezellen in der Lage, humanphysiologisch aktive Proteine, wie z.B. Antithrombin III (AT-III) oder tissue Plasminogen Activator (t-PA), zu synthetisieren. Sie verfügen als Vertreter der Eukaryonten im Gegensatz zu den Prokaryonten über ein endoplasmatisches Reticulum und einen Golgi-Apparat und können somit posttranslatorische Modifikationen, wie z.B. Glykolisierungen, an Proteinen ausführen [Hüners, 1996].

Der Zellzyklus der Tierzellen gliedert sich wie auch die Zellzyklen anderer Eukaryonten in vier Phasen:

**S-Phase:** S-Phase wie Synthese-Phase; hier erfolgt die Replikation der DNA.

**G<sub>2</sub>-Phase:** Das G steht für gap (englisch: Lücke). In diesem Abschnitt des Zellzyklus überprüft die Zelle, ob die DNA-Replikation vollständig abgeschlossen ist.

**M-Phase:** M steht für Mitose. Dies ist die Phase des eigentlichen Zellteilungsschrittes, der wiederum in mehrere Phasen eingeteilt werden kann: Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase (s. Abbildung 2.3).

**G<sub>1</sub>-Phase:** Es handelt sich um die letzte Phase des Zellzyklus, in der die Zelle überprüft, ob sie in einen erneuten Zellteilungszyklus eintritt, oder ob sie in die G<sub>0</sub>-Phase geht, wenn die Umgebungsparameter für eine Teilung ungünstig sind. Aus der G<sub>0</sub>-Phase kann die Zelle dann bei günstigeren Bedingungen wieder in den Zellzyklus gelangen.

Die G<sub>1</sub>-Phase, S-Phase und G<sub>2</sub>-Phase werden zusammen auch als Interphase bezeichnet.

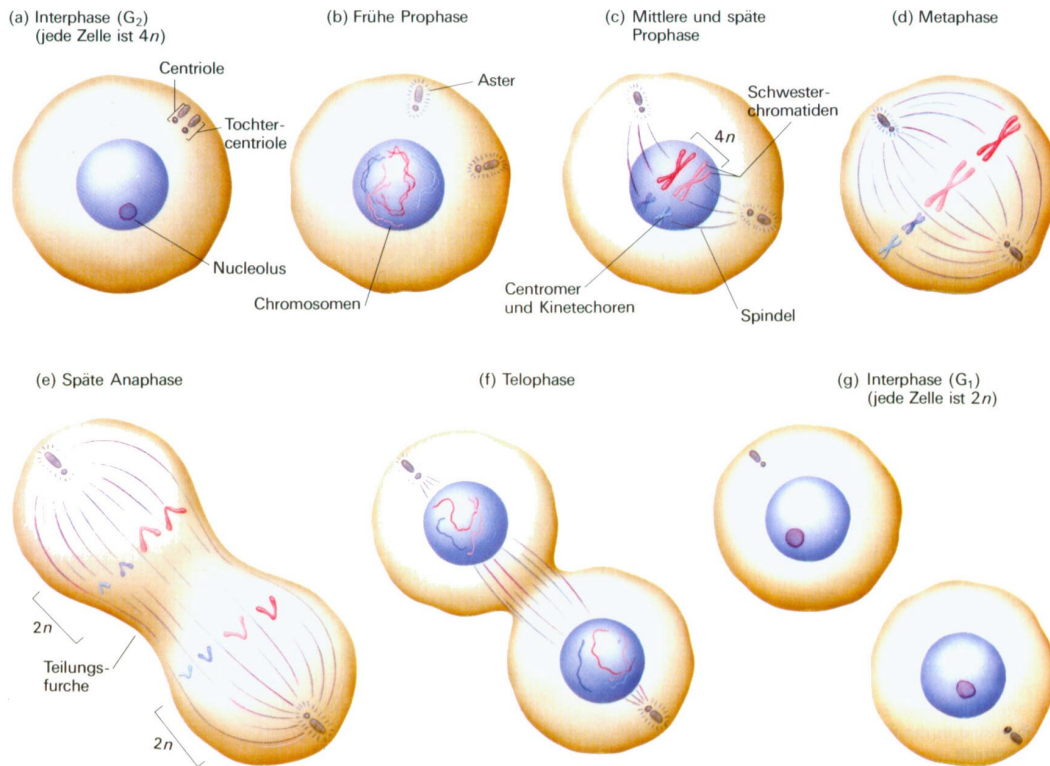


Abbildung 2.3: Morphologische Veränderung einer Tierzelle während des Zellzyklus. Die S-Phase ist nicht dargestellt [Lodish et al., 1996].

Tierzellen haben eine Generationszeit von mehreren Stunden, z.B. CHO-Zellen ca. 22 Stunden, BHK-Zellen ca. 24 Stunden. Für die Kultivierung von Tierzellen werden spezielle nährstoffreiche Nährmedien benötigt, die neben den zehn essentiellen Aminosäuren (siehe Tabelle 2.1) auch Cystein, Glutamin und Tyrosin enthalten, da die Zellen diese nicht selbstständig synthetisieren können. Außerdem sind in den Nährmedien noch Vitamine, Salze, Glucose und Serum, das für die Teilung der kultivierten Zellen benötigt wird, enthalten. Einige Säugetierzellen können auch in serumfreien Medien kultiviert werden.

Tabelle 2.1: Die zehn essentiellen Aminosäuren.

Arginin	Methionin
Histidin	Phenylalanin
Isoleucin	Threonin
Leucin	Tryptophan
Lysin	Valin



#### 1.2.4 Zelltod bei Tierzellen

Bei Tierzellen wird zwischen zwei verschiedenen Arten von Zelltod unterschieden, der Nekrose (necros = griechisch: tot) und der Apoptose (altgriechisch: Fallen der Blätter im Herbst). Die Charakterisierung dieser beiden Arten von Zelltod kann anhand von unterschiedlichen morphologischen und biochemischen Merkmalen geschehen [Wyllie et al., 1980]. Die dabei am häufigsten verwendeten morphologischen Merkmale sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.2: Morphologische Kriterien zur Identifikation von Nekrose und Apoptose [Darzynkiewicz et al., 1998].

##### **Nekrose**

- Anschwellen der Zelle und des Zellkerns
- Ungleichmäßige Kondensation des Chromatins
- Anschwellen der Mitochondrien
- Vakuolenbildung im Cytoplasma
- Zerbrechen der Plasmamembran („geisterähnliche“ Zellen)
- Auflösung der DNA (Karyolyse)
- Ansteckung der Zellen in der Umgebung der nekrotischen Zelle durch den in den extrazellulären Raum freigesetzten Zellinhalt

**Apoptose**

- Verringerte Zellgröße, zusammengerollte Zellgestalt
- Wellungen der Plasmamembran („blebbing/budding“)
- Kondensation des Chromatins (DNA-Hyperchromizität)
- Verlust der strukturellen Kennzeichen des Zellkerns (glattes Erscheinungsbild)
- Fragmentierung des Kerns (Karyorrhexis)
- Auftreten von „apoptotic bodies“
- Ausdehnung des endoplasmatischen Reticulums
- Relativ unveränderte Zellorganellen
- Phagozytose des Zellrestes *in vivo*/ „Sekundärnekrose“ *in vitro*
- Ablösung der Zelle aus der Gewebekultur

Biochemisch lassen sich Nekrose und Apoptose anhand der entstandenen DNA-Bruchstücke identifizieren. Bei der Nekrose liegt ein Gemisch aus unterschiedlich langen DNA-Fragmenten vor, bei der Apoptose bilden sich charakteristische Bruchstücke mit 180-200 Basenpaaren. Die Apoptose lässt sich auch daran erkennen, dass das Phosphatidylserin von der cytoplasmatischen Membranseite auf die extrazelluläre Seite verlagert wird.

Nekrose wird durch starke Veränderungen der physiologischen Konditionen hervorgerufen. Als solche wären z.B. starke Änderungen der Umgebungstemperatur oder die Einwirkung von Giften zu nennen. Im Gegensatz zur Apoptose wird das Auftreten von Nekrose also nicht von inneren Faktoren der Zelle, sondern durch eine heftige Störung in der Umgebung ausgelöst.

Apoptose wird auch als programmierter Zelltod (PCD = programmed cell death) bezeichnet. Dabei entscheidet die Zelle selbst zu sterben. Die Apoptose spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Tieren, wobei meist unerwünschte Zellen eliminiert werden [Jacobson, 1997]. Von außen kann Apoptose z.B. durch in therapeutischen Dosen verabreichte cytotoxische Krebsmittel (Chemotherapeutika), UV-Strahlen, freie Radikale oder Wasserstoffperoxid ausgelöst werden.

Apoptotische Zellen zeigen im Gegensatz zu nekrotischen keine erhöhte Membranpermeabilität, zumindest nicht bevor die charakteristischen morphologischen Veränderungen aufgetreten sind.

### 1.3 Mikroskopische Betrachtung von Mikroorganismen

Im folgenden werden die Grundlagen der Lichtmikroskopie kurz erläutert, soweit sie für die Entwicklung des In-situ Mikroskops notwendig waren. Weiterführende Erklärungen sind in zahlreichen Fachbüchern zur Mikroskopie und Optik, z.B. [Beyer et al., 1988], [Gerlach, 1985], [Göke, 1988], [Hänzel, 1993], [Michel, 1981], [Pluta, 1988], zu finden.

Lichtmikroskopie wird dazu verwendet, um kleine, im Nahbereich liegende Objekte für den Betrachter zu vergrößern. Im zusammengesetzten Mikroskop kommt die Vergrößerung in zwei Schritten zustande. Durch das Objektiv wird das Bild zu einem reellen, seitenverkehrten Zwischenbild vergrößert. Die zweite Vergrößerung wird durch das Okular erreicht, wodurch ein virtuelles Endbild entsteht. Die Gesamtvergrößerung des Mikroskops  $V_M$  errechnet sich also aus der Maßstabszahl des Objektivs  $M_{Ob}$  und der Eigenvergrößerung des Okulars  $V_{Ok}$ .

$$V_M = M_{Ob} \cdot V_{Ok} \quad (2.2)$$

Der Strahlengang des Mikroskops ist in Abbildung 2.4 dargestellt.

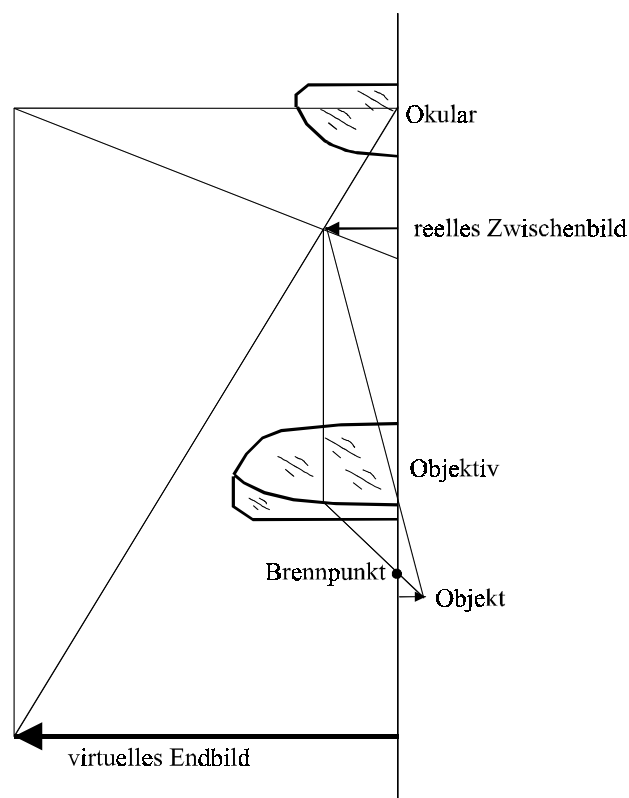


Abbildung 2.4: Schematischer Strahlengang eines Mikroskops [Gerlach, 1985].

### 1.3.1 Beleuchtungsvarianten

Für die Lichtmikroskopie gibt es verschiedene Beleuchtungsarten (siehe Abbildung 2.5), die je nach Beschaffenheit des zu betrachtenden Objekts Vor- und Nachteile besitzen. Es wird zwischen Auflicht- und Durchlicht-Anordnungen und Hell- bzw. Dunkelfeld-Beleuchtung unterschieden:

**Durchlicht-Hellfeld:** Das Präparat wird von unten durch den Kondensor beleuchtet. Dabei fällt das Mikroskopierlicht direkt in das Objektiv. Unterschiedliche Präparatstrukturen schwächen das Licht unterschiedlich stark, so dass Helligkeits- und Farbunterschiede zu erkennen sind.

**Durchlicht-Dunkelfeld:** Die Beleuchtung ist so eingestellt, dass das Mikroskopierlicht nicht direkt in das Objektiv eindringt. Erst durch Einbringen des Präparats gelangt von diesem Streulicht in das Mikroskopobjektiv. Die leuchtenden Präparatstrukturen sind auf dunklem Hintergrund zu erkennen.

**Auflicht-Hellfeld:** Die Beleuchtung des Präparats erfolgt durch das Mikroskopobjektiv, das bei dieser Beleuchtungsanordnung gleichzeitig die Aufgabe des Kondensors übernimmt. An der Oberfläche des Präparats wird das Licht unterschiedlich stark in das Objektiv reflektiert. Mit dieser Anordnung ist es möglich, die Präparatoberfläche zu betrachten.

**Auflicht-Dunkelfeld:** Das Licht fällt durch einen ringförmig um das Objektiv angeordneten Kondensor auf die Präparatoberfläche. Das Reflexionslicht geht am Objektiv vorbei, nur das am Objekt gestreute Licht tritt in das Objektiv ein. Diese Anordnung ist besonders gut für plastische Darstellungen des Präparats geeignet, wenn die Dunkelfeldbeleuchtung nur einseitig erfolgt.

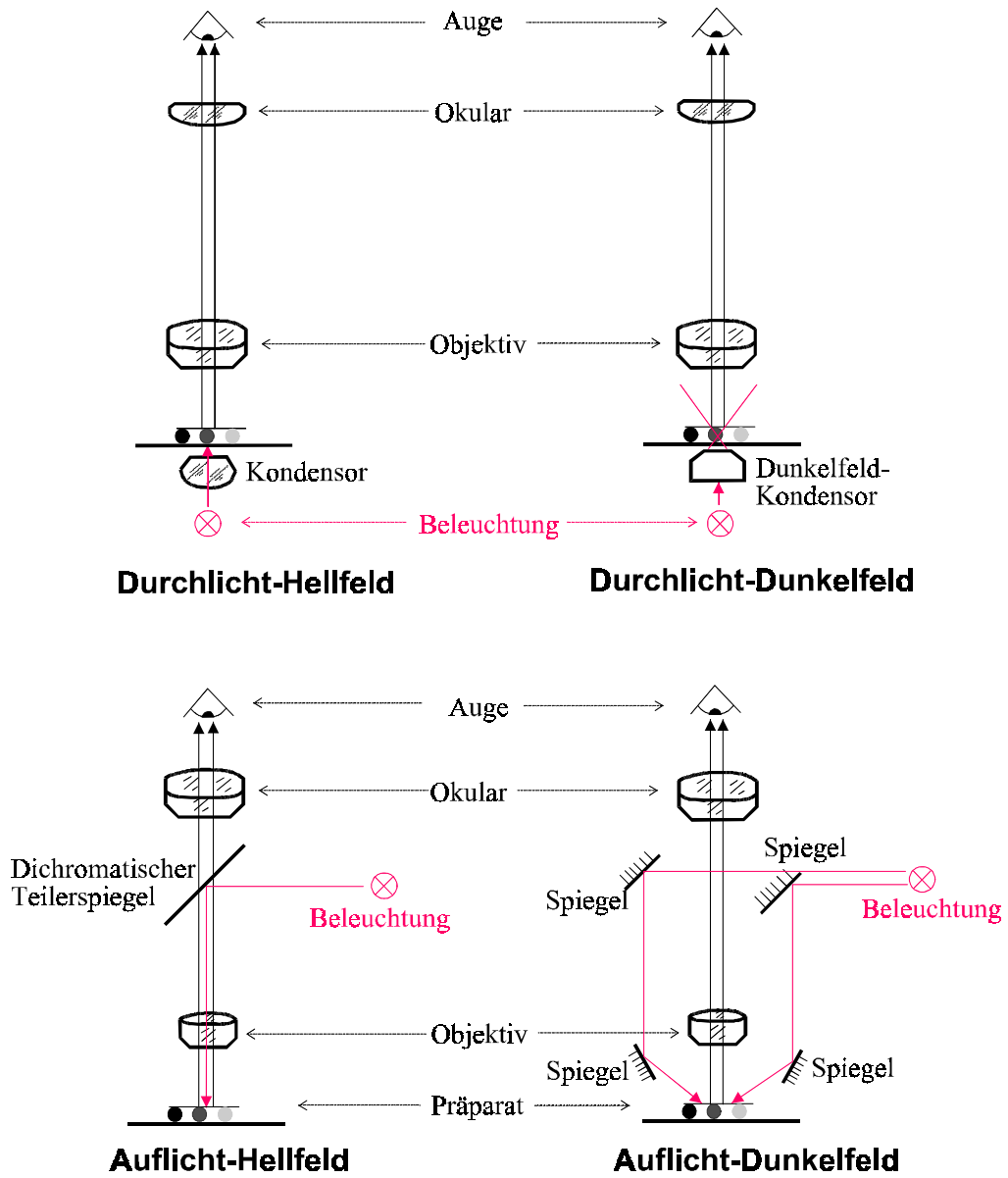


Abbildung 2.5: Beleuchtungsarten in der Lichtmikroskopie [Gerlach, 1985].

### 1.3.2 Numerische Apertur

Das Auflösungsvermögen eines Objektivs wird durch seine numerische Apertur ( $NA$ ) bestimmt.  $NA$  ist dabei das Produkt aus dem Brechungsindex  $n_D$  und dem Sinus des halben Öffnungswinkels  $\alpha$ .

$$NA = n_D \cdot \sin \alpha \quad (2.3)$$

Je größer die numerische Apertur ist, desto besser wird ein Objekt aufgelöst. Allerdings nehmen die Schärfentiefe und der Bildkontrast mit steigender Apertur ab, siehe Abbildung 2.6. Gebräuchliche Objektive verfügen über eine numerische Apertur von 0,3-0,4. Das entspricht einem Auflösungsvermögen von ca.  $1 \mu\text{m}$ , das für die im Rahmen dieser Arbeit betrachteten Größenordnungen ausreicht.

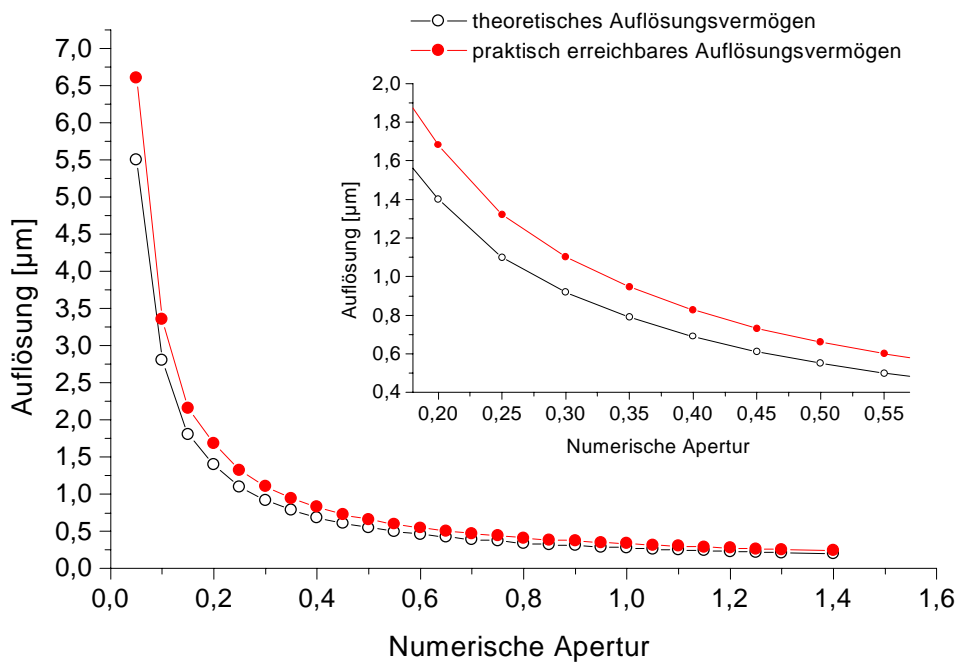


Abbildung 2.6: Abhängigkeit der Auflösung von der numerischen Apertur ( $NA$ ) [Joeris, 1999].

### 1.3.3 Konstruktive Ausführung von Lichtmikroskopen

Bei näherer Betrachtung des allgemeinen Aufbaus von kommerziellen Lichtmikroskopen finden sich zwei konstruktive Varianten: zum einen Systeme mit endlich korrigierter Optik und zum anderen die moderneren Geräte mit einer unendlich korrigierten Optik. Der Hauptunterschied zwischen beiden Ausführungsformen liegt im Aufbau der Objektive. Während die endlich korrigierten Objektive ein reelles Bild erzeugen, das dann in Kombination mit dem Okular zu einem virtuellen Bild vergrößert wird, erzeugen unendlich korrigierte Objektive ein Abbild des Objektes im Unendlichen. Dieses Bild muss zunächst mit einer sogenannten Tubuslin-

se in ein reelles Bild abgebildet werden, bevor es mit einem Okular weiter vergrößert werden kann. Das unendlich korrigierte Objektiv und die Tubuslinse müssen immer als zusammengehörige Einheit betrachtet werden. Dieser konstruktive Aufwand wird mit einem höheren Preis für das System erkaufte. Dadurch ergibt sich jedoch die Möglichkeit, beispielsweise zusätzliche Filter in den Strahlengang einzusetzen, was bei Lichtmikroskopen mit endlich korrigierter Optik nicht oder nur schwer möglich ist, da sich durch Einfügen optischer Filter die Länge des Strahlenganges ändert. Dieses steht aber im Widerspruch zur benötigten Gesamtlänge des Strahlenganges. Ein wichtiger Parameter ist hier die mechanische Tubuslänge des Mikroskops, die abhängig vom Hersteller des Objektivs üblicherweise 160 mm bzw. 170 mm betragen muss, um ein scharfes Bild darzustellen.

## 1.4 Bildverarbeitung in der Biotechnologie

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Bildverarbeitungsverfahren kann in vier Stufen unterteilt werden, die in diesem Abschnitt erläutert werden sollen.

### 1.4.1 Bildverarbeitungssystem

Die Bildaufnahme erfolgt üblicherweise mit einer CCD-Kamera, die mit einem Framegrabber gekoppelt ist. Das von der CCD-Kamera gelieferte analoge Bildsignal wird vom Framegrabber digitalisiert und in einem Rechnersystem zur weiteren Verarbeitung abgelegt. Ein typisches Bildverarbeitungssystem ist in Abbildung 2.7 abgebildet.

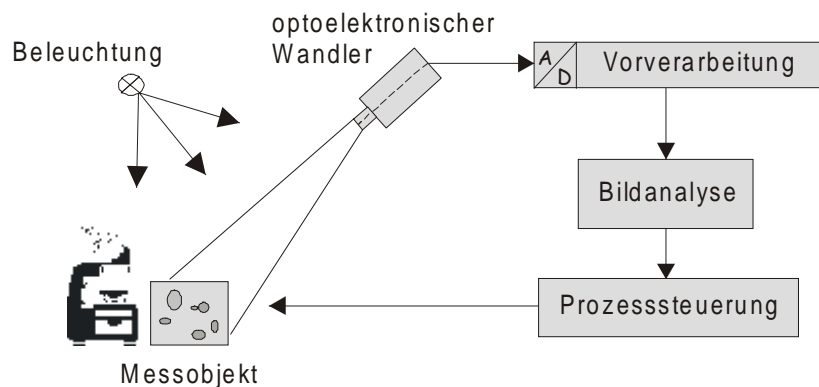


Abbildung 2.7: Allgemeiner Aufbau eines Bildverarbeitungssystems.

### 1.4.2 Bildvorverarbeitung

Die Bildvorverarbeitung dient dazu, Störungen, z.B. Rauschen, aus Bildern zu entfernen, Bilder für die Bildanalyse durch den Menschen zu vereinfachen oder einfach nur um sie ästhetischer zu gestalten. Die Operationen der Bildvorverarbeitung lassen sich grob in drei Klassen einteilen [Bässmann et al., 1998].

**Punktoperationen**, z.B. Histogramm-Modifikation oder Schwellwertoperation: Der neue Grauwert eines Bildelementes (englisch: picture element, Pixel) hängt nur vom alten Grauwert ab.

**Lokale Operationen**, z.B. morphologische Operatoren: Die Bildelemente in einer definierten Umgebung („Maske“) um das zu betrachtende Bildelement tragen zum neuen Grauwert bei.

**Globale Operationen**, z.B. Fourier-Transformation: Alle Bildelemente tragen zum neuen Grauwert eines Bildelementes bei.



### 1.4.3 Segmentierung und Merkmalsextraktion

#### 1.4.3.1 Allgemeines

Die Segmentierung des Bildes dient der Herausarbeitung von Regionen im Bild, die für die nachfolgende Bildanalyse relevant sind. Hierbei wird die irrelevante Bildinformation, z.B. der Hintergrund, von der relevanten, z.B. den Zellregionen, getrennt und damit eine Irrelevanzreduktion durchgeführt. Die sich innerhalb der Bildanalyse an die Segmentierung anschließende Merkmalsextraktion führt zu einer ersten symbolischen Beschreibung des Bildes. Bezogen auf Zellbilder sind Merkmale wie beispielsweise „Größe“, „Rundlichkeit“, „Länglichkeit“ oder allgemein „Form“ der Zelle denkbar [Liedtke, 1987].

#### 1.4.3.2 Automatische Schwellwertverfahren

Nach der Bildvorverarbeitung folgt im Rahmen der Bildanalyse die Segmentierung und Merkmalsextraktion. Da die gesamte Bildverarbeitung ohne Benutzereingriff ablaufen soll, muss der für die Abtrennung der Zellen vom irrelevanten Hintergrund notwendige Schwellwert automatisch festgelegt werden. Hierfür existieren unterschiedliche Verfahren, die im folgenden kurz beschrieben werden sollen.

Zur automatischen Segmentierung des Grauwertbildes wird ein Maximum Likelihood Verfahren, basierend auf Mischverteilungsmodellen, verwendet. Dieses Verfahren ist aus der Literatur als ein gutes Segmentierungsverfahren bekannt [Liedtke, 1987]. Bei der Bildaufnahme wird das Bild durch den Framegrabber zunächst mit  $L=256$  Stufen (8-bit) linear quantisiert. Damit ergibt sich das Histogramm  $h$ , das die Auftretenshäufigkeit des quantisierten Bildsignals wiedergibt. Jeder Wert  $g$  des Histogramms  $h$  liegt im Intervall  $[0...L-1]$ . In dem Histogramm werden geeignete Schwellwerte zur Segmentierung ermittelt (englisch: thresholding). In diesem Fall ist das Histogramm bimodal. Es besteht aus zwei Peaks  $a$  und  $b$ , die den Hintergrund und die zukünftigen Zellregionen repräsentieren. Wird ein beliebiger Schwellwert  $th$  zwischen den Peaks gewählt, werden die Bereiche durch diesen getrennt, siehe Abbildung 2.8.

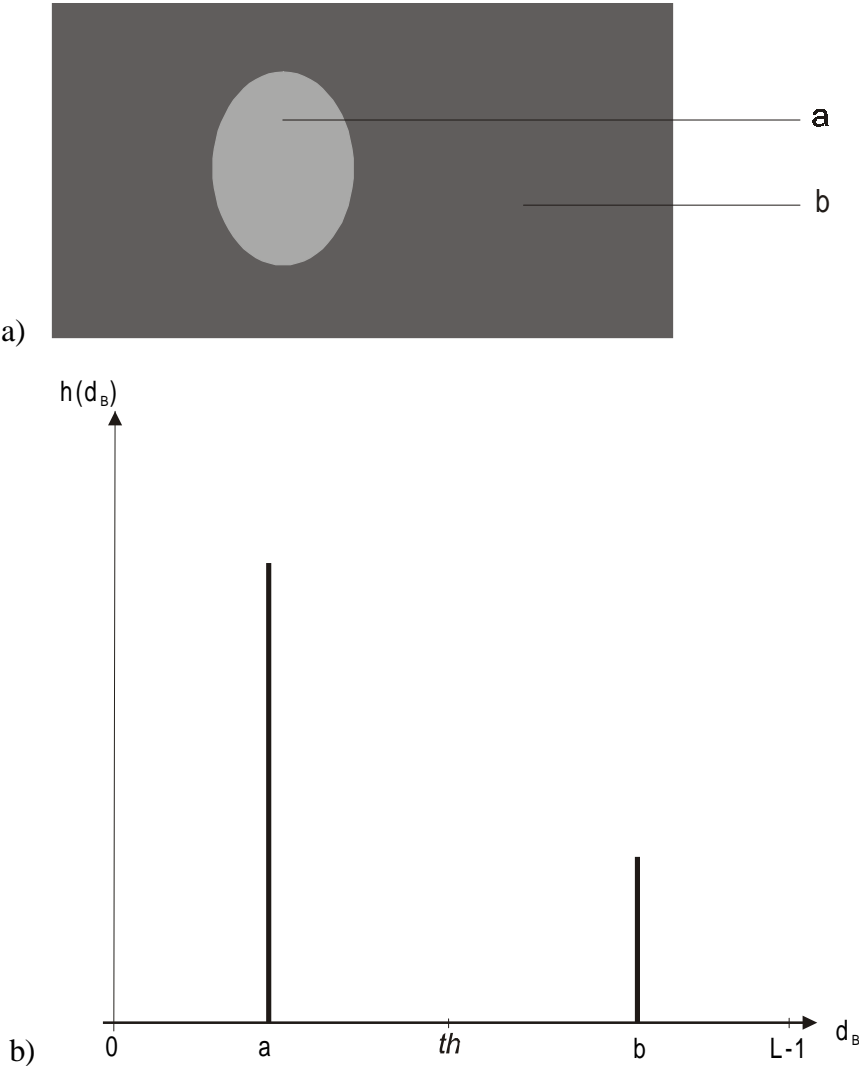


Abbildung 2.8: a) Idealisiertes Bild mit einer Zellregion. b) Bimodales Histogramm des Zellbildes aus a). Der Schwellwert  $th$  trennt Hintergrund und Zellregion. Das Zellbild ist nicht verrauscht.

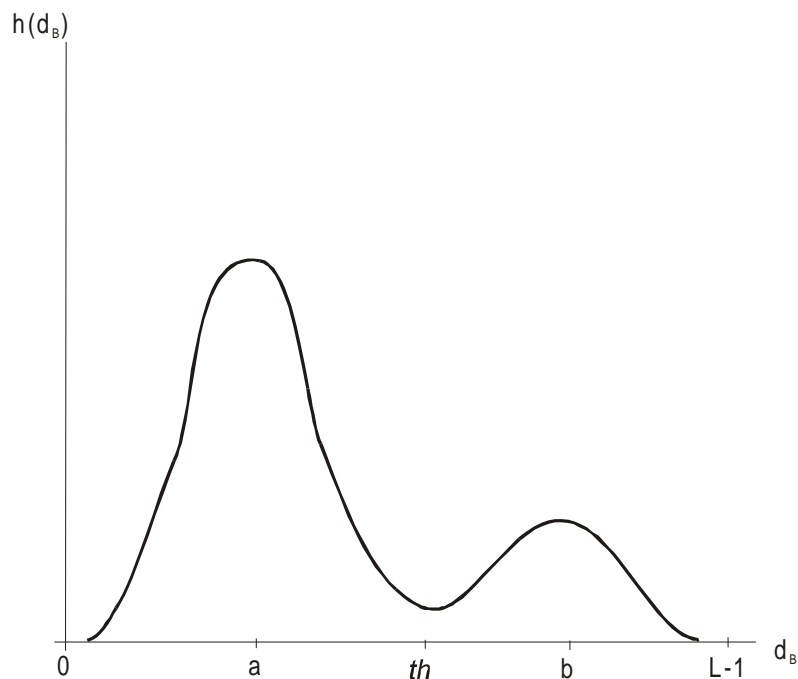


Abbildung 2.9: Bimodales Histogramm des Zellbildes analog zu Bild 2.8. Das Bild ist allerdings mit Rauschen versehen. Der Wert  $th$  ist der ideale Schwellwert für die Segmentierung.

Das aufgenommene Zellbild ist im allgemeinen jedoch fehlerbehaftet, beispielsweise verrauscht. Ein die Realität besser beschreibendes Histogramm zeigt Bild 2.9. Das lokale Minimum zwischen den beiden Peaks ist der ideale Schwellwert zur Segmentierung.

Es wird daher angenommen, dass sich das Histogramm  $h$  als Summe von zwei Gaußverteilungen darstellen lässt. Dies wird als ein Mischverteilungsmodell bezeichnet [Bock, 1974]. Mit einem Maximum Likelihood Multithresholding Verfahren werden, basierend auf Mischverteilungsmodellen, die Parameter beider Gaußverteilungen geschätzt und der optimale Schwellwert im Histogramm bestimmt.

#### 1.4.3.2.1 Die verwendeten Likelihoodfunktionen

Gegeben sei das reale Zellbild  $\mathbf{B}$ , dessen diskrete Werte  $d_B$  im Intervall  $[0 \dots L-1]$  liegen. In diesem Fall sei  $L=256$ . Die Verteilung von  $d_B$  über den Wertebereich  $[0 \dots L-1]$  kann in einem Histogramm  $h(d_B)$  dargestellt werden, das die Auftretenshäufigkeit jedes Wertes  $d_B$  des realen Zellbildes wiedergibt. Die Wahrscheinlichkeitsverteilung  $p(d_B)$  des realen Zellbildes  $\mathbf{B}$  ergibt sich durch Normierung von  $h(d_B)$ :

$$p(d_B) = \frac{h(d_B)}{N} \quad (2.4)$$

$$N = \sum_{d_B=0}^{L-1} h(d_B) \quad (2.5)$$

Die Werte  $d_B$  des realen Zellbildes sollen in zwei Klassen  $C_1$  (Hintergrund) und  $C_2$  (Zellen) klassifiziert werden. Dazu wird ein Schwellwert an der Stelle  $th$  im Histogramm  $h(d_B)$  benötigt. Klasse  $C_1$  enthält die Punkte des realen Zellbildes, für die  $d_B$  im Intervall  $[0 \dots th]$  liegt und  $C_2$  enthält Punkte mit den Werten im Intervall  $[th+1 \dots L-1]$ . Jede Klasse  $C_i$  sei ein realer, statistisch unabhängiger, gleichverteilter Gaußscher oder nicht Gaußscher Prozess. In dieser Arbeit wird angenommen, dass sich die Wahrscheinlichkeitsverteilung  $p(d_B)$  des realen Zellbildes als Summe von zwei Gaußverteilungen mit den Parametervektoren  $\Theta_\varphi = (P_\varphi, \mu_\varphi, \sigma_\varphi)$ ,  $\varphi = 1, 2$  darstellen lässt.  $P_\varphi$  ist die Auftretenswahrscheinlichkeit,  $\mu_\varphi$  der Mittelwert und  $\sigma_\varphi$  die Standardabweichung einer Klasse  $C_\varphi$ , wobei die Parametervektoren der beiden Gaußverteilungen geschätzt werden müssen:

$$p(d_B) = \sum_{\varphi=1}^2 \frac{P_\varphi}{\sqrt{2\pi}\sigma_\varphi} \exp\left[-\frac{(d_B - \mu_\varphi)^2}{2\sigma_\varphi^2}\right] \quad (2.6)$$

Ein solches Modell wird Mischverteilungsmodell (englisch: *Population Mixture Model*) genannt [Kurita et al., 1992]. Für die bedingte Auftretenswahrscheinlichkeit  $p(d_\eta / Z_\eta)$  des Wertes  $d_\eta = (d_B)_\eta$  eines Punktes  $\eta = 1 \dots N$  des realen Zellbildes mit dem gegebenen, zu  $d_\eta$  gehörenden Klassifizierungsvektor  $Z_\eta = (z_{1\eta}, z_{2\eta})$ , gilt:

$$p(d_\eta / Z_\eta) = \sum_{\varphi=1}^2 z_{\varphi\eta} \cdot p_\varphi(d_\eta / C_\varphi) = \prod_{\varphi=1}^2 p_\varphi(d_\eta / C_\varphi)^{z_{\varphi\eta}} \quad (2.7)$$

Dabei gilt für den Klassifizierungsvektor :

$$z_{\varphi\eta} = \begin{cases} 1 & d_\eta \in C_\varphi \\ 0 & d_\eta \notin C_\varphi \end{cases} \quad (2.8)$$

Mit der Randwahrscheinlichkeit

$$p(Z_\eta) = \prod_{\varphi=1}^2 P_\varphi^{z_{\varphi\eta}} \quad (2.9)$$

ergibt sich die Verbundwahrscheinlichkeit

$$p(d_\eta, Z_\eta) = p(Z_\eta) \cdot p(d_\eta / Z_\eta) = \prod_{\varphi=1}^2 \{P_\varphi \cdot p_\varphi(d_\eta / C_\varphi)^{z_{\varphi\eta}}\} \quad (2.10)$$

$P_\varphi$  ist die a-priori Wahrscheinlichkeit des Auftretens des Bereichs  $C_\varphi$ . Es sei vorausgesetzt, dass alle Paare  $(d_\eta, Z_\eta)$  statistisch unabhängig sind.

Daraus ergeben sich zwei Likelihoodfunktionen [Kurita et al., 1992]. Die Likelihoodfunktion aufgrund der bedingten Wahrscheinlichkeitsverteilung nach Gl. (2.6) lautet mit der Abkürzung für  $\mathbf{D}=\{D_1,\dots,D_N\}$ ,  $\mathbf{Z}=\{Z_1,\dots,Z_N\}$  [Kurita et al., 1992]:

$$L(\mathbf{D}/\mathbf{Z};\Theta^\varphi)=\prod_{\eta=1}^N f(d_\eta/Z_\eta;\Theta^\varphi)=\prod_{\eta=1}^N \prod_{\varphi=1}^2 [f_\varphi(d_\eta;\Theta_\varphi)]^{z_{\varphi\eta}} \quad (2.11)$$

Die Likelihoodfunktion aufgrund der Verbundwahrscheinlichkeitsverteilung nach Gl. (2.9) lautet:

$$L(\mathbf{D},\mathbf{Z};\Theta^\varphi)=\prod_{\eta=1}^N f(d_\eta,Z_\eta;\Theta^\varphi)=\prod_{\eta=1}^N \prod_{\varphi=1}^2 [P_\varphi \cdot f_\varphi(d_\eta;\Theta_\varphi)]^{z_{\varphi\eta}} \quad (2.12)$$

Durch Maximierung der jeweiligen Likelihoodfunktion ergibt sich der optimale Schwellwert  $th$ .

#### 1.4.3.2.2 Maximierung einer Likelihoodfunktion unter Verwendung von Mischverteilungsmodellen

In dem folgenden Abschnitt wird die Maximierung einer Likelihoodfunktion unter Verwendung von Mischverteilungsmodellen vorgestellt. Die Mischverteilungsmodelle unterscheiden sich in den zu schätzenden Parametern und der sich daraus ergebenden Likelihoodfunktion.

##### 1.4.3.2.2.1 Das Verfahren von Kittler und Illingworth

Das Mischverteilungsmodell von [Kittler et al., 1986] geht von folgender Wahrscheinlichkeitsverteilung für jede Klasse  $C_\varphi$  aus:

$$p_\varphi(d_B/C_\varphi)=\frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_\varphi}\exp\left(-\frac{(d_B-\mu_\varphi)^2}{2\sigma_\varphi^2}\right), \varphi=1,2 \quad (2.13)$$

Jede Klasse  $C_\varphi$  sei also gaußverteilt mit unterschiedlichen Varianzen  $\sigma_\varphi^2$  und Mittelwerten  $\mu_\varphi$ . Dann lautet die Likelihoodfunktion der Verbundwahrscheinlichkeitsverteilung nach Gl. (2.9) und Gl. (2.11) mit der Abkürzung  $d_\eta=(d_B)_\eta$ :

$$L(\mathbf{D},\mathbf{Z};\Theta^2)=\prod_{\eta=1}^N \prod_{\varphi=1}^2 \left[ \frac{P_\varphi}{\sqrt{2\pi}\sigma_\varphi} \exp\left(-\frac{d_\eta-\mu_\varphi^2}{2\sigma_\varphi^2}\right) \right]^{z_{\varphi\eta}} \quad (2.14)$$

Zur Vereinfachung wird üblicherweise mit dem natürlichen Logarithmus der Likelihoodfunktion (*log-Likelihoodfunktion*) gerechnet. Dieses ist zulässig, da die Likelihoodfunktion stets positiv und der Logarith-

mus eine monoton steigende Funktion ist. Die Maxima der log-Likelihoodfunktion befinden sich daher an derselben Stelle wie bei der eigentlichen Funktion:

$$l(D, Z; \Theta^2) := \ln[L(D, Z; \Theta^2)] \quad (2.15)$$

Dann ergibt sich die zu maximierende Likelihoodfunktion zu:

$$l(D, Z; \Theta^2) = \sum_{\eta=1}^N \sum_{\varphi=1}^2 z_{\varphi\eta} \cdot \ln(P_{\varphi}) - \frac{N}{2} \ln(2\pi) - \frac{1}{2} \sum_{\eta=1}^N \sum_{\varphi=1}^2 z_{\varphi\eta} \cdot \ln(\sigma_{\varphi}^2) - \sum_{\eta=1}^N \sum_{\varphi=1}^2 \frac{1}{2\sigma_{\varphi}^2} z_{\varphi\eta} (d_{\eta} - \mu_{\varphi})^2 \quad (2.16)$$

Die a-priori Wahrscheinlichkeit  $P_{\varphi}$  des Auftretens einer Klasse  $C_{\varphi}$  ergibt sich aus den Komponenten  $z_{\varphi\eta}$  der Klassifizierungsvektoren zu:

$$P_{\varphi} = \frac{1}{N} \sum_{\eta=1}^N z_{\varphi\eta} \quad (2.17)$$

Damit vereinfacht sich die log-Likelihoodfunktion der Verbundwahrscheinlichkeitsverteilung zu:

$$l(D, Z; \Theta^2) = N \sum_{\varphi=1}^2 P_{\varphi} \ln(P_{\varphi}) - \frac{N}{2} \ln(2\pi) - \frac{N}{2} \sum_{\varphi=1}^2 P_{\varphi} \ln(\sigma_{\varphi}^2) - \frac{N}{2} \quad (2.18)$$

Die optimalen Parameter sind dann [Kurita et al., 1992]:

$$\hat{P}_{\varphi} = \sum_{d_B=th_{\varphi-1}+1}^{th_{\varphi}} p(d_B) \quad (2.19)$$

$$\hat{\mu}_{\varphi} = \frac{1}{\hat{P}_{\varphi}} \sum_{d_B=th_{\varphi-1}+1}^{th_{\varphi}} d_B \cdot p(d_B) \quad (2.20)$$

$$\hat{\sigma}_{\varphi}^2 = \frac{1}{\hat{P}_{\varphi}} \sum_{d_B=th_{\varphi-1}+1}^{th_{\varphi}} (d_B - \hat{\mu}_{\varphi})^2 \cdot p(d_B) \quad (2.21)$$

Die geschätzten Parameter sind jetzt nur noch von den Schwellwerten abhängig. Die in Abhängigkeit der Schwellwerte zu maximierende log-Likelihoodfunktion ist:

$$\hat{l}(D, Z; \hat{\Theta}^2) = N \sum_{\varphi=1}^2 \hat{P}_{\varphi} \ln(\hat{P}_{\varphi}) - \frac{N}{2} \ln(2\pi) - \frac{N}{2} \sum_{\varphi=1}^2 \hat{P}_{\varphi} \ln(\hat{\sigma}_{\varphi}^2) - \frac{N}{2} \Rightarrow \max \quad (2.22)$$

#### 1.4.3.2.2.2 Das Verfahren von Kurita et al.

Dieser Abschnitt beschreibt die Maximierung der log-Likelihoodfunktion aufgrund der Verbundwahrscheinlichkeitsverteilung nach Gl. (2.11) unter der Annahme unterschiedlicher Mittelwerte und gleicher Varianzen nach [Kurita et al., 1992].

Dann ergibt sich aus Gl. (2.11) mit Gl. (2.12) und Gl. (2.9) folgende log-Likelihoodfunktion der Verbundwahrscheinlichkeitsverteilung:

$$l(D, Z; \Theta^2) = \sum_{\eta=1}^N \sum_{\varphi=1}^2 z_{\varphi\eta} \cdot \ln(P_\gamma) - \frac{N}{2} \ln(2\pi) - \frac{N}{2} \ln(\sigma^2) - \frac{1}{2\sigma^2} \left[ \sum_{\eta=1}^N \sum_{\varphi=1}^2 z_{\varphi\eta} (d_\eta - \mu_\varphi)^2 \right] \quad (2.23)$$

Die optimalen Parameter ergeben sich analog Abschnitt 2.3.3.2.2.1 zu:

$$\hat{P}_\varphi = \sum_{d_B=th_{\varphi-1}+1}^{th_\varphi} p(d_B) \quad (2.24)$$

$$\hat{\mu}_\varphi = \frac{1}{\hat{P}_\varphi} \sum_{d_B=th_{\varphi-1}+1}^{th_\varphi} d_B \cdot p(d_B) \quad (2.25)$$

$$\hat{\sigma}^2 = \sum_{\varphi=1}^2 \sum_{d_B=th_{\varphi-1}+1}^{th_\varphi} (d_B - \hat{\mu}_\varphi)^2 \cdot p(d_B) \quad (2.26)$$

Die bezüglich der Schwellwerte zu maximierende log-Likelihoodfunktion ist dann:

$$\hat{l}(D, Z; \hat{\Theta}^2) = N \sum_{\varphi=1}^2 \hat{P}_\varphi \ln(\hat{P}_\varphi) - \frac{N}{2} \ln(2\pi) - \frac{N}{2} \ln(\hat{\sigma}^2) - \frac{N}{2} \Rightarrow \max \quad (2.27)$$

#### 1.4.3.2.2.3 Das Verfahren von Otsu

Die Wahrscheinlichkeitsverteilungen für die einzelnen Klassen  $C_\varphi$  seien für das Mischverteilungsmodell nach [Otsu, 1979] folgendermaßen gegeben:

$$p_\varphi(d_B / C_\varphi) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left(-\frac{(d_B - \mu_\varphi)^2}{2\sigma^2}\right) \quad (2.28)$$

Die Mittelwerte  $\mu_\varphi$  der Klassen seien also verschieden, die Varianzen alle gleich ( $\sigma_\varphi^2 = \sigma^2 = const$ ).

Daraus ergibt sich folgende log-Likelihoodfunktion der bedingten Wahrscheinlichkeitsverteilung nach Gl. (2.10) mit Gl. (2.6) mit der bereits bekannten Abkürzung  $d_\eta = (d_B)_\eta$ :

$$l(D/Z; \Theta^2) = -\frac{N}{2} \ln(2\pi) - \frac{N}{2} \ln(\sigma^2) - \frac{1}{2\sigma^2} \left[ \sum_{\eta=1}^N \sum_{\varphi=1}^2 z_{\varphi\eta} (d_\eta - \mu_\varphi)^2 \right] \quad (2.29)$$

Die optimalen Parameter für die log-Likelihoodfunktion lauten:

$$\hat{P}_\varphi = \sum_{d_B=th_{\varphi-1}+1}^{th_\varphi} p(d_B) \quad (2.30)$$

$$\hat{\mu}_\varphi = \frac{1}{\hat{P}_\varphi} \sum_{d_B=th_{\varphi-1}+1}^{th_\varphi} d_B \cdot p(d_B) \quad (2.31)$$

$$\hat{\sigma}^2 = \sum_{\varphi=1}^2 \sum_{d_B=th_{\varphi-1}+1}^{th_\varphi} (d_B - \hat{\mu}_\varphi)^2 \cdot p(d_B) \quad (2.32)$$

Die in Abhängigkeit des Schwellwertes  $th$  zu maximierende log-Likelihoodfunktion ergibt sich dann zu:

$$\hat{l}(D/Z; \hat{\Theta}^2) = -\frac{N}{2} \ln(2\pi) - \frac{N}{2} \ln(\hat{\sigma}^2) - \frac{N}{2} \Rightarrow \max \quad (2.33)$$

#### 1.4.3.3 Morphologische Operatoren

Morphologische Operatoren sind lokale Operatoren, d.h., sie wirken sich lokal auf jeden Pixel des Bildes aus. Sie zeichnen sich durch eine große Bandbreite von Anwendungsmöglichkeiten aus. So werden sie z.B. zur Säuberung „ausgefranster“ Ränder von Bildbereichen, zur Kontursegmentierung aber auch zur Texturanalyse verwendet.

Im Mittelpunkt der morphologischen Bildverarbeitung steht das sogenannte Strukturelement sowie die beiden grundlegenden Operationen „Erosion“ und „Dilation“. Die „Erosion“ trägt Pixel von Bereichsrändern ab. Umgekehrt fügt die „Dilation“ Pixel hinzu. Die Art des Abtragens ist mit dem Strukturelement kontrollierbar. Das Strukturelement ist eine beliebig geformte Operatormaske.

Aufbauend auf „Erosions“- und „Dilations“-Operationen ergeben sich durch abwechselndes Anwenden die sogenannten „Opening“- und „Closing“-Operationen. Eine „Opening“-Operation ist eine „Erosion“ gefolgt von einer „Dilation“. Das „Opening“ dient im Wesentlichen dem Abtragen „ausgefranster“ Bildränder und dem Eliminieren kleiner Bereiche. Das „Closing“ ist eine „Dilation“ gefolgt von einer „Erosion“. Das „Closing“ schließt z.B. die Lücken zwischen den „Fransen“. Für weitergehende Erläuterungen sei auf die Fachliteratur verwiesen, z.B. [Bässmann et al., 1998], [Haberäcker, 1995].



#### 1.4.3.4 Textur

Es ist schwierig, eine eindeutige Definition von Textur anzugeben. Textur beschreibt die lokalen Abhängigkeiten und den Aufbau von hellen und dunklen Teilbereichen in zusammenhängenden Gebieten. Diese Teilbereiche werden Primitive genannt und besitzen Bildpunkte mit sehr ähnlichen Grauwerten, die sie gegenüber anderen Bereichen unterscheiden. Die Größe der Primitive ist beliebig. Daraus ergeben sich die beiden unterschiedlichen Methoden, Textur zu beschreiben. Beide lassen sich unterscheiden in ein strukturelles und ein statistisches Verfahren. Zum einen wird versucht, die Primitive, aus denen die Textur aufgebaut ist, zu erfassen. Zum anderen werden die Abhängigkeiten und Relationen zwischen den Primitiven für die Texturbeschreibung ausgewertet. Bei den hier vorliegenden Zellbildern werden natürliche Texturen untersucht, die sehr unregelmäßig sind und sich nicht aus einfach segmentierbaren Primitiven zusammensetzen. Deshalb wird die Grauwertstruktur im folgenden immer statistisch betrachtet; dies gilt für die gesamte Zellfläche.

Im folgenden werden einige Beispiele statistischer Texturmerkmale kurz erläutert [Westerkamp, 1992]. Sämtliche Merkmale sind aus dem Grauwert histogramm  $h(g)$ ,  $g=d_B$  abgeleitet, das die Auftretenswahrscheinlichkeit eines jeden möglichen Bildpunktes im gesamten Bild beschreibt. Für weiterführende Informationen zu dem großen Gebiet der Texturanalyse sei auf die einschlägige Fachliteratur verwiesen [Russ, 1992], [Liedtke et al., 1987], [Niemann, 1989].

##### 1.4.3.4.1 Minimaler und Maximaler Grauwert

Der minimale Grauwert  $g_{min}$  ist der dunkelste im Bild vorkommende Grauwert. Analog dazu ist der maximale Grauwert  $g_{max}$  der hellste auftretende Grauwert.

##### 1.4.3.4.2 Mittlerer Grauwert

Der mittlere Grauwert berechnet sich als arithmetisches Mittel aller im Bild vorkommenden Grauwerte. Ein Bild mit einem niedrigen mittleren Grauwert erscheint sehr dunkel, während ein helles Bild einen großen mittleren Grauwert besitzt.

$$\bar{g} = \frac{\sum_{g=g_{min}}^{g_{max}} g \cdot h(g)}{\sum_{g=g_{min}}^{g_{max}} h(g)} \quad (2.34)$$

#### 1.4.3.4.3 Varianz der Grauwerte

Die Varianz der Grauwerte beschreibt die Homogenität des Bildes. Ein homogenes Bild besitzt nur sehr ähnliche Grauwerte. Die Varianz ist dementsprechend klein. Besitzt ein Bild aber helle und dunkle Bereiche, dann ist mit einem großen Wert der Varianz zu rechnen.

$$\sigma_g^2 = \frac{\sum_{g=g_{\min}}^{g_{\max}} h(g)(g - \bar{g})^2}{g_{\max} - g_{\min}} \quad (2.35)$$

Sind Informationen über die Homogenität lokaler Bereiche im Bild von Interesse, so lässt sich auch eine lokale Varianz berechnen:

$$\sigma_{g_{lok}}^2(i, j) = \frac{1}{W^2} \sum_{k=i-M}^{i+M} \sum_{l=j-M}^{j+M} [g(k, l) - \bar{g}(i, j)]^2 \quad (2.36)$$

$g(i, j)$  ist der Grauwert im Punkt  $(i, j)$  und  $\bar{g}(i, j)$  die mittlere Grauwert innerhalb der Maske um diesen Mittelpunkt:

$$\bar{g}(i, j) = \frac{1}{W^2} \cdot \sum_{k=i-M}^{i+M} \sum_{l=j-M}^{j+M} g(k, l) \quad (2.37)$$

Die lokale Varianz ist ein Maß für die Homogenität in einem wählbaren Fenster („Maske“) des Bildes.  $W$  ist eine ungerade Zahl und beschreibt die Größe der Maske  $M=(W-1)/2$ . Bei Verwendung der lokalen Varianz ergibt sich speziell bei Zellbildern mit stark texturierten Zellen vor einem homogenen Hintergrund ein einfacher Segmentierungsansatz.

#### 1.4.4 Klassifikation

Die Klassifikation liefert die Zuweisung jeder während Segmentierung und Merkmalsextraktion erkannten Region zu einem Zelltyp mit den zuvor ermittelten Merkmalen. Existieren beispielsweise tote und lebende Zellen in einem Bild, so wird anhand der im vorherigen Schritt ermittelten Merkmale eine Klassifikation in die Klassen „tot“ und „lebend“ durchgeführt. Diese Stufe repräsentiert die höchste Abstraktionsebene der Bildverarbeitung.

## 2 Material und Methoden

In diesem Kapitel wird zunächst auf die verwendeten Zelltypen und deren allgemeine Kultivierungsparameter eingegangen. Für nähere Details zu den einzelnen Versuchen sei auf den Experimentellen Teil in Kapitel 4 verwiesen. Im Anschluss wird die Zusatzhard- und -software beschrieben, die für den Betrieb des In-situ Mikroskops notwendig ist und zum Teil in Eigenarbeit entwickelt wurde.

### 2.1 Hefezellen

Für Hefe-Fermentationen wurden Zellen des Stamms *S. cerevisiae* H620 verwendet. Die anfänglichen Kultivierungsbedingungen sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1: Kultivierungsbedingungen einer Batch-Kultivierung von *S. cerevisiae* H620.

Kultivierungsanlage	2 L Reaktor Biostat M (Offline-Messungen) bzw. 15 L Reaktor Biostat C mit Dampfheizung (Online-Experimente), beide B. Braun Biotech International, Melsungen
Messdatenerfassung	RISP (TCI)
Medium	Schatzmann-Medium mit 30 g/L Glucose (s. Anhang)
Temperatur	30°C
pH	4.85
Begasungsrate	1 vvm (1,0 L/min)
Rührerdrehzahl	700 UpM

Die kontinuierliche Kultivierung erfolgte in dem 2 L Reaktor. Da dessen Abmessungen für den Betrieb des In-situ Mikroskops zu klein waren, konnten die Proben nur offline verarbeitet werden. Nach einer anfänglichen Batch-Kultivierung wurde auf kontinuierlichen Betrieb mit einer Verdünnungsrate von  $D=0,05 \text{ h}^{-1}$  umgestellt. Nach Durchlaufen eines Zellzyklus wurde die Verdünnungsrate auf  $D=0,13 \text{ h}^{-1}$ , die Begasungsrate von 1 L/min auf 1,5 L/min und die Rührerdrehzahl von 700 UpM auf 800 UpM erhöht. Die betrachteten Oszillationen wurden durch eine vorangehende zweiminütige Stickstoffbegasung induziert.

Der 15 L Biostat C Reaktor wurde für eine Batch-Kultivierung mit eingesetztem In-situ Mikroskop verwendet, wodurch eine Bildaufnahme online möglich war. Es galten im übrigen die gleichen Bedingungen wie bei der oben beschriebenen Batch-Kultivierung, die vor der kontinuierlichen Kultivierung durchgeführt wurde.

## 2.2 Chinese Hamster Ovary Zellen

Für alle Kultivierungen wurden Zellen der rekombinanten Suspensionszell-Linie CHO-Tf70R verwendet, die im Rahmen des EU-Projektes von der Firma Pharmacia, Schweden, zur Verfügung gestellt wurden. Diese Zell-Linie ist durch Transduktion von zellfremden Genen in der Lage, tissue-Plasminogen Activator (t-PA) zu produzieren. Dieses Glykoprotein bewirkt die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin, welches dann im Folgeschritt in der Lage ist, Blutgerinnsel aufzulösen. Als Kulturmedium wurde das serumfreie BIOPRO I (Biowhittaker Europe, Verviers, Belgien) verwendet, das mit Nährstoffen (3 g/L Glucose und 0,3 g/L Glutamin) angereichert wurde.

Die Kultivierungen wurden in 250 mL Spinner-Flaschen (Techne Corporation, Cambridge, England) durchgeführt, wobei die Rührerdrehzahl 25 UpM betrug.

Die im Brutschrank B5060 EK (Heraeus, Hanau) eingestellten Kultivierungsbedingungen waren eine Temperatur von 37°C, eine 5%-ige Kohlendioxid-Atmosphäre und hohe Luftfeuchtigkeit (ca. 96%).

## 2.3 Baby Hamster Kidney Zellen

Es wurden zwei verschiedene BHK Zell-Linien verwendet. Vorversuche wurden mit Zellen der rekombinanten BHK Zell-Linie BHK21pSVIL2 durchgeführt, die von der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig zur Verfügung gestellt wurde. Diese Zell-Linie produziert Interleukin 2 (IL-2), welches das Wachstum von T-Lymphocyten und die Antikörpersekretion durch Plasmazellen stimuliert. Als Kulturmedium wurde das serumfreie SMIF 7 (Life Technologies Inc., Rockville, USA) verwendet. Die Kultivierungen wurden in 250 mL bzw. 500 mL Spinner-Flaschen (Techne Corporation, Cambridge, England) durchgeführt, wobei eine Rührerdrehzahl von 25 UpM eingestellt wurde. Weitere Kultivierungsbedingungen waren eine Temperatur von 37°C, eine 5%-ige Kohlendioxid-Atmosphäre und hohe Luftfeuchtigkeit, welche im Brutschrank B 5060 EK (Heraeus, Hanau) eingestellt wurden.

Die Online-Experimente fanden bei der Bayer Corporation in Berkeley, USA, statt. Sie wurden mit einer rekombinanten BHK21 Zell-Linie und proteinfreiem Medium basierend auf DMEM: Ham's F12 durchgeführt. Als Fermenter diente ein 15 L Reaktor von Applikon (Schiedam, Niederlande). Die Prozessparameter wurden über ein Labview-Modul (National Instruments, USA) unter Microsoft Windows NT 4.0 gesteuert. Da wegen des zu großen Aufwandes ein direkter Betrieb im Fermenter nicht möglich war, wurde das Mikroskop in einem Bypass installiert.

## 2.4 Aufbau des Mess-Systems

### 2.4.1 Offline-Mikroskopie als Referenz

Um erstes Datenmaterial für die Entwicklung der Bildverarbeitungsroutinen zu erhalten, wurden, da sich das In-situ Mikroskop noch in der Entwicklung befand, Bilder zunächst offline akquiriert. Dazu wurde ein Inverses Forschungsmikroskop (Olympus IX-50, Japan) mit einem Objektiv mit 20-facher Vergrößerung (Planachromat, NA=0,4, Olympus, Japan) verwendet. An das Mikroskop angekoppelt war eine CCD-Kamera (Jai CV-M50, Jai, Japan). Bei dieser Kamera handelte es sich um ein preisgünstiges Monochrom-Modell mit 1/3" CCD-Element, das auch später für die Bildakquisition mit dem In-situ Mikroskop verwendet wurde.

### 2.4.2 In-situ Mikroskopie

Dieser Abschnitt beschreibt die einzelnen Komponenten des In-situ Mikroskop Systems. Zunächst wird auf den allgemeinen Aufbau des Systems eingegangen. Darauf folgend werden die Geräte vorgestellt, die zum Betrieb des Mikroskops ergänzend benötigt wurden bzw. dafür entwickelt werden mussten, wie z.B. die Steuerboxen. Auf die Entwicklung und Realisierung der eigentlichen Mikroskop-Hardware und der Bildverarbeitungssoftware wird im Experimentellen Teil eingegangen.

#### 2.4.2.1 Allgemeines

Das in dieser Arbeit beschriebene System zur In-situ Mikroskopie ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Analog zum Aufbau eines Standard-Bildverarbeitungssystems besteht es aus einer Aufnahmeeinheit, die sich in das Mikroskop mit CCD-Kamera und Bildaufnahmegerät aufteilt. Die Auswertung des Datenmaterials erfolgt getrennt vom Aufnahmesystem auf einem zweiten Rechner, der in einem anderen Raum aufgestellt werden kann. Dadurch ergibt sich die vorteilhafte Trennung von Labor- und Bürobereich. Im Idealfall könnte das System komplett vom Büroarbeitsplatz überwacht und gesteuert werden, wodurch die Gefahr einer Kontamination des Laborbereiches noch weiter vermindert würde. Auf den konstruktiven Aufbau des In-situ Mikroskops wird in Kapitel 4.1 eingegangen. Um das Mikroskop anzusteuern, ist in den Bildaufnahmegerät eine ISA-Erweiterungskarte eingebaut, die entweder über diesen oder über den Auswerterechner angesprochen werden kann. Damit die Bildaufnahme mit dem Mikroskop zu Test- und Initialisierungszwecken auch manuell gesteuert werden kann, wurde außerdem eine manuelle Steuereinheit entwickelt. Diese ermöglicht bei zusätzlicher Verwendung eines Laptop-Rechners zur Bildaufnahme den mobilen Einsatz des In-situ Mikroskops.

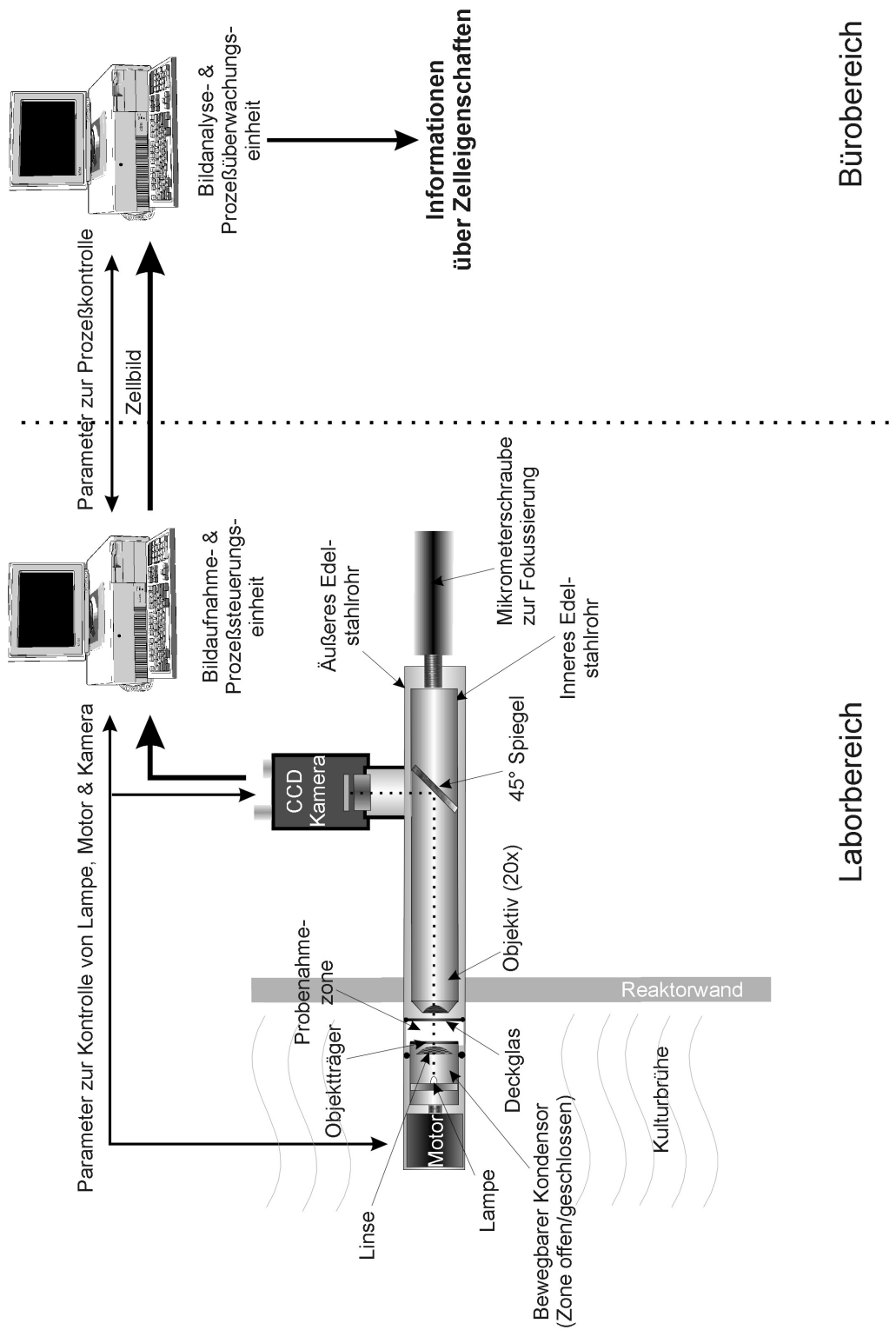


Abbildung 3.1: Aufbau des In-situ Mikroskop Systems.

### 2.4.2.2 Manuelle Ansteuerung des In-situ Mikroskops

Die manuelle Steuereinheit ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Damit ist es möglich, die Probenahmezone des Mikroskops zu öffnen und zu schließen, die Lampenhelligkeit zu regulieren, die Betriebsspannung des Motors zu regeln und kurzzeitig den Strom am Motor zu erhöhen, um dadurch die Leistung heraufzusetzen.



Abbildung 3.2: Manuelle Steuereinheit für das In-situ Mikroskop.

### 2.4.2.3 Automatische Ansteuerung des In-situ Mikroskops

#### 2.4.2.3.1 Hardware

Die automatische Steuerung erlaubt ein automatisiertes Messen mit dem In-situ Mikroskop. Abbildung 3.3 zeigt ein Bild der dazu in Eigenarbeit entwickelten ISA-Karte für IBM-kompatible PC. Der Schaltplan dazu ist im Anhang, Kapitel 7.5, abgebildet. Für weiterführende Literatur sei auf [Bitterle et al., 1993], [Thieser, 1993] und [Kainka, 1997] verwiesen.

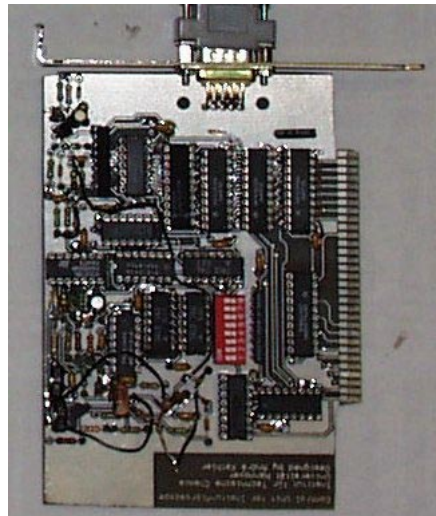


Abbildung 3.3: Automatische Steuerung für das In-situ Mikroskop auf einer ISA-Einsteckkarte für PC.

#### 2.4.2.3.2 Software

Zum Betrieb der Steuerkarte unter Microsoft Windows 95 wurde eine entsprechende Software in Borland Delphi 3.0 entwickelt. Das Vorhandensein des Treiber-Quellcodes für den verwendeten Framegrabber (Eltec PC-Eye 1, Eltec elektronik, Mainz) erleichterte das Einbinden der Bildakquisition in die Software, so dass ein integriertes Softwarepaket für die Bildaufnahme mit dem In-situ Mikroskop entstand.

Die Benutzeroberfläche der Steuersoftware zeigt Abbildung 3.4. Alle relevanten Parameter, wie Lampenhelligkeit, Dauer des Probenahmezyklus und Anzahl der Bildaufnahmezyklen je Probe können eingestellt werden. Der Bildaufnahmezyklus wird dazu folgendermaßen definiert.

Die Verschlussdauer der Probenahmezone sowie die Verweildauer bei offener Probenahmezone werden angegeben. Die beiden Zustände „Probenahmezone geschlossen“ und „Probenahmezone geöffnet“ sind durch einen Anstieg des Stromes zu dem Zeitpunkt definiert, wenn der Motor gegen den Widerstand des Deckglases bzw. des Getriebes fährt. Dies wird der Software von der Steuerkarte gemeldet. Dann erfolgt eine sofortige Abschaltung des Motors. Ein Bildaufnahmezyklus besteht damit aus „Zufahren der Probenahmezone“, „Verweilen in geschlossenem Zustand“, „Öffnen der Probenahmezone“ und „Verweilen in geöffnetem Zustand“. Für den Zustand „Verweilen in geschlossenem Zustand“ kann weiterhin ein Zeitraum angegeben werden, der verstreichen muss, bevor ein Bild aufgenommen wird. Dieses dient zum „Ruhigstellen“ der Probe.



Eine Probenahme wiederum besteht aus mehreren, üblicherweise zehn, Bildaufnahmezyklen, um eine ausreichend genaue Statistik zu erhalten.

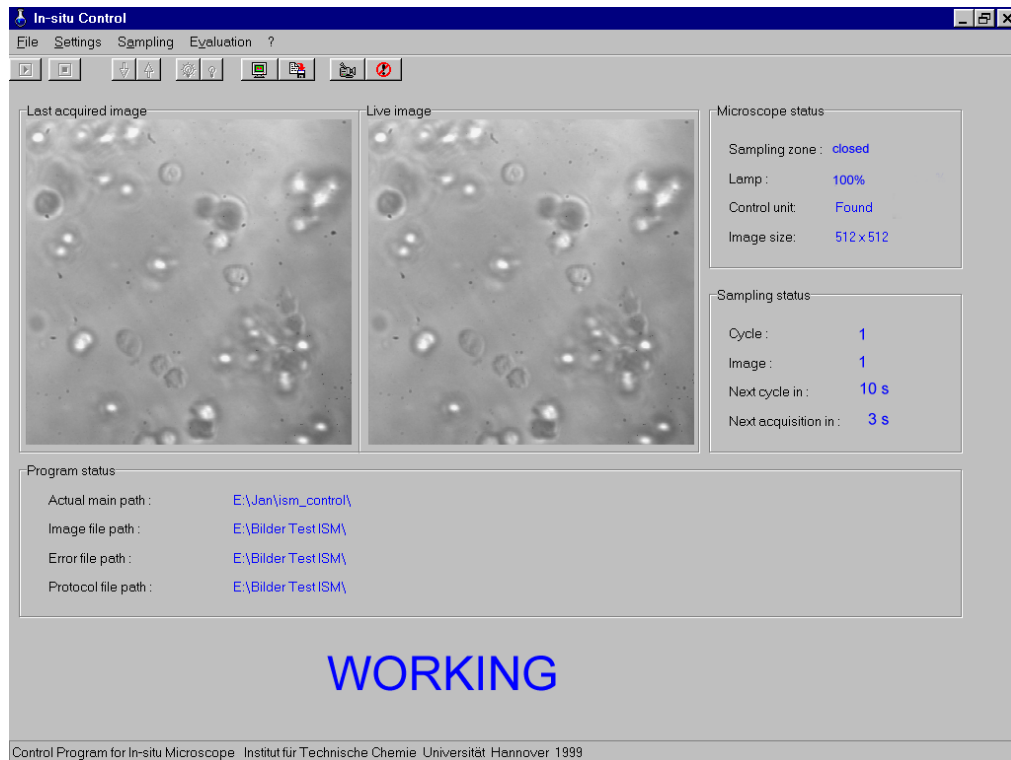


Abbildung 3.4: Graphische Benutzeroberfläche der integrierten Steuersoftware für das In-situ Mikroskop.

Der Bildschirm der integrierten Steuersoftware ist in mehrere Bereiche unterteilt. Zwei Fenster dienen zur Darstellung des aktuellen und des zuletzt akquirierten Mikroskopbildes. Rechts daneben existieren zwei übereinander angeordnete Bereiche. Im oberen finden sich Angaben zum Status der Probenahmezone („geschlossen“, „offen“, „schließt“, „öffnet“), zur Lampenhelligkeit, zum Status der Steuerkarte und zur eingestellten Bildgröße. Das darunter angeordnete Feld enthält Angaben zur aktuell laufenden Probenahme, wie Anzahl der abgearbeiteten Probenahmezyklen, verbleibende Zeit bis zur nächsten Bildaufnahme, Anzahl aufgenommener Bilder je Probenahme und verbleibende Zeit bis zur nächsten Probenahme. Das darunter quer angeordnete Feld enthält Angaben zu den Datenpfaden, in denen die Bilder bzw. Protokoll-Dateien abgespeichert werden. Unter diesem Feld ist ein Warnhinweis zu sehen, der signalisiert, dass gerade eine Messung läuft. Andere Meldungen kennzeichnen mögliche Fehlfunktionen des Mikroskops.

### 2.4.3 Bildaufnahme

#### 2.4.3.1 Hardwareausstattung

Das von der CCD-Kamera akquirierte analoge Bildsignal wird mit einer in der Bildaufnahme- & Prozesssteuerungseinheit befindlichen Framegrabber-Karte digitalisiert. Zur Bildaufnahme wird ein PC mit Intel Pentium Prozessor (133 MHz, 64 MB RAM) unter Microsoft Windows 95 verwendet. In den Rechner eingebaut ist ein PCI-Framegrabber (ELTEC PC-Eye 1, 8 bit, 256 Graustufen, 20 MSamples/s). Die auch als C-Library mitgelieferte Treibersoftware erlaubt ein einfaches Einbinden des Framegrabbers in eigene Anwendungen. Der Framegrabber ist mit einer 1/3" CCD-Kamera (JAI CV-M 50) verbunden. Die Bilddatenauswertung erfolgte mit einem PC mit Intel Pentium Pro Prozessor (200 MHz, 128 MB RAM) unter Microsoft Windows NT 4.0.

Die digitalen Bilddaten werden in der Bildanalyse- und Prozessüberwachungseinheit mit Hilfe von Bildverarbeitungsroutinen ausgewertet.

#### 2.4.3.2 Softwareausstattung

Bei den eingesetzten Bildverarbeitungsroutinen handelt es sich um Eigenentwicklungen. Es wird dabei auf die Entwicklungsumgebung Ad Oculos 3.1 (dbs, Bremen) zurückgegriffen. Diese Umgebung stellt die gebräuchlichsten Bildverarbeitungsalgorithmen auch als Quellcode zur Verfügung und ermöglicht mittels einer graphischen Benutzeroberfläche das visuelle Zusammenstellen des Bildverarbeitungsablaufes anhand eines Flussdiagramms. Eigene Erweiterungen können leicht mit der Programmiersprache C integriert werden. Die Notwendigkeit, eigenentwickelte Software einzusetzen, ergab sich aus der Tatsache, dass zur Bildanalyse von Zellbildern lokale Bereiche im Bild betrachtet werden müssen. Dieses ist aber mit konventioneller Bildverarbeitungssoftware, wie beispielsweise Khoros (Khoral Research, USA) oder Optimas (Media Cybernetics, USA), in der Regel nur interaktiv möglich. Oft lassen sich zwar unter Verwendung von Makros zusammengefasste Befehlssequenzen definieren, die einen gewissen Automatisierungsgrad erlauben. Diese Makros sind jedoch in der Regel für eine vollständige Automatisierung nicht mächtig genug. Da dieses aber gefordert war, mussten die entsprechenden Bildverarbeitungsroutinen in Ad Oculos integriert werden. Die Flussdiagramme für die verwendeten Zelltypen sind in den entsprechenden Abschnitten des Experimentellen Teiles in Kapitel 4 beschrieben.

Anhand der während der Bilddatenauswertung gewonnenen Daten und weiterer, im Verlauf der Kultivierung ermittelter Parameter kann dann in den Kultivierungsprozess eingegriffen und dieser gesteuert werden.

## 3 Experimenteller Teil

Der Experimentelle Teil gliedert sich in drei Abschnitte. Zunächst werden einzelne Meilensteine während der Entwicklung der In-situ Mikroskop Hardware beschrieben. Dann wird im Softwareteil die Realisierung der Bildverarbeitungssoftware dargestellt, und zwar getrennt für Hefe- bzw. Tierzellen. Innerhalb des Softwareteils werden außerdem Ergebnisse der Experimente vorgestellt, die unter Anwendung der Bildverarbeitungsverfahren für den jeweiligen Zelltyp durchgeführt wurden. In einem letzten großen Abschnitt werden Installation und Betrieb des In-situ Mikroskops in Fermentern zu Online-Experimenten erläutert und die Ergebnisse diskutiert.

### 3.1 In-situ Mikroskop Hardware

Vorgaben für die Konstruktion des In-situ Mikroskops waren

**Online-Fähigkeit:** Das In-situ Mikroskop soll zur Analyse des Zellzustandes während des Kultivierungsprozesses verwendet werden können. Eine Steuerung der Kultivierung unter Verwendung des gewonnenen Datenmaterials soll möglich sein.

**Sterilisierbarkeit:** Da das In-situ Mikroskop mit der Kultivierungsbrühe in direkten Kontakt kommt, muss eine Sterilisation bzw. Autoklavierung vor Beginn des Kultivierungsprozesses möglich sein. Es dürfen daher nur entsprechend geeignete Materialien für das In-situ Mikroskop verwendet werden.

**Leichte Handhabbarkeit:** Da das In-situ Mikroskop industriell einsetzbar sein soll, muss die Handhabung des Mikroskops ohne aufwendige und damit preisintensive Schulungen möglich sein. Dieses bedeutet u.a. die Realisierung einer möglichst intuitiven Bedienung der Bildverarbeitungs- und Steuersoftware. Auch sollte das Mikroskop modular aufgebaut sein, so dass ein Austausch einzelner Komponenten erleichtert wird.

**Robustheit:** Ein industrieller Einsatz setzt voraus, dass das In-situ Mikroskop entsprechend rauen Bedingungen und Laufzeiten von mehreren Monaten gewachsen sein muss.

**Verwendung** in Ingold-Normstutzen mit 25 mm Innendurchmesser: Um ein möglichst universelles, in unterschiedlichen industriellen Umgebungen einsetzbares Produkt zu entwickeln, ist die Berücksichtigung von de-facto Standards unerlässlich. Daher wurde das Mikroskop für die sehr oft anzutreffenden Fermenterports mit einem Innendurchmesser von 25 mm konstruiert.

**Günstiger Preis** im Vergleich zu anderen Analysemethoden: Diese Vorgabe schließt eine Verwendung von Sonderanfertigungen aus.

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte In-situ Mikroskop ist in ein Edelstahlrohr mit einem Außendurchmesser von 24,8 mm integriert. Durch einen 25 mm Ingold-Normstutzen an der Seite des Reaktors wird es direkt in die Kulturbrühe eingetaucht. In dem Edelstahlrohr sind die endlich korrigierte Mikroskop-Optik mit 20-facher Vergrößerung, die motorisch zu verschließende und zu öffnende Probenahmezone sowie die Beleuchtungseinheit untergebracht. Bei dem für die Optik verwendeten Objektiv handelt es sich um einen Achromaten mit numerischer Apertur  $NA=0,4$  (Nikon GmbH, Düsseldorf).

Als größte Herausforderung während der Entwicklung stellte sich die vorgesehene Verwendung in einem 25 mm Ingold-Normstutzen heraus. Dadurch wurde eine starke Miniaturisierung des Mikroskop-„Innenlebens“ erforderlich. 25 mm Ports existieren je nach Fermenter-Hersteller in unterschiedlichen Längen. Das Mikroskop ist, bedingt durch die endlich korrigierte Optik, für einen 25 mm Port mit einer Stutzenlänge von max. 40 mm entwickelt worden und orientiert sich an der Bauform von Fermenterports der Firmen Applikon und B. Braun Biotech International. Skizzen dieser Ports sind im Anhang. Kapitel 7.4, zu finden.

Die Länge des in den Fermenter hineinragenden unteren Abschnitts des In-situ Mikroskops unterliegt engen Grenzen. Der Außentubus des In-situ Mikroskops darf nicht zu weit in den Fermenter hineinragen, da er sonst, speziell bei kleineren Fermentern mit Volumina unter 15 L, mit den Rührern bzw. dem Begasungskäfig in Berührung kommt. Eine Länge bis maximal 30 mm ab Innenkante der Fermenterwand ist sinnvoll. Da in diesem Abschnitt des Mikroskops jedoch mit der Beleuchtung und dem Schließmechanismus für die Probenahmezone eine optisch und mechanisch aufwendige Apparatur installiert werden muss, ist eine entsprechend kurze Realisierung nicht möglich. Untersuchungen an Fermentern unterschiedlicher Hersteller ergaben, dass das Mikroskop maximal 50 mm in den Fermenter hineinragen darf, um den Anforderungen zu genügen.

Aufwendig war im Vorfeld der Entwicklung des weiteren die Suche nach einem geeigneten Motor zum Öffnen und Schließen der Probenahmezone, da Motor-Getriebekombinationen mit den erforderlichen Parametern von maximal 20 mm Durchmesser, 20 mm Höhe und einer aufzubringenden Kraft von ca. 10 N kaum zu bekommen sind. Aufgrund des angestrebten Preises kam eine Speziallösung für den Motor aber nicht in Frage.

Bei dem verwendeten Motor handelt es sich um einen 6 V Getriebemotor mit Untersetzung 1:487 und einem Getriebe aus Stahl und Messing (Feintechnik Bertsch, Villingen-Schwenningen). Mit dem Motor kann die Probenahmezone auf- bzw. zugefahren werden. Die Probe wird also nicht aus dem Fermenter entnommen, sondern lediglich zur Bildaufnahme ruhiggestellt. Im Anschluss an die Bildaufnahme wird die Probe nach

dem Öffnen der Probenahmezone durch die Strömung im Fermenter wieder aus der Probenahmezone herausgespült.

Vorgabe war, nur Materialien zu verwenden, die für eine Sterilisation bei 121°C geeignet sind. Aus diesem Grund wurde darauf geachtet, möglichst keine Klebeverbindungen in Bereichen zu verwenden, die von der Sterilisation direkt betroffen sind, insbesondere nicht im unteren Abschnitt des In-situ Mikroskops im Bereich der Probenahmezone

Diese Probenahmezone wird durch den Objektträger auf dem beweglichen Kondensor und das Deckglas begrenzt. Der Objektträger hat eine Dicke von 20 mm. Das Deckglas ist 0,3 mm stark. Bei dem verwendeten Objektiv kommt es wegen der numerischen Apertur von  $NA=0,4$  noch nicht zu Abbildungsfehlern, obwohl Deckgläser üblicherweise nur eine Dicke von 0,14 mm haben. Gleichzeitig wird durch die größere Dicke gewährleistet, dass das Deckglas dem Fermenterinnendruck standhält. Beide Glasflächen bestehen aus Saphir, da Zellen an diesem Werkstoff sehr schlecht haften können und somit ein schnelles Zuwachsen des Gesichtsfeldes verhindert wird. Der Kondensor besteht aus einer integrierten Ultra-Mikroglühlampe (Conrad Elektronik, Hirschau) und einer Plankonvexlinse aus BK7-Glas mit einer Brennweite von 3 mm (Linos GmbH, Göttingen).

In geschlossenem Zustand hat die Probenahmezone eine Höhe von ca. 50-100  $\mu\text{m}$ . Die eingeschlossene Probe wird mit dem Kondensorsystem durchleuchtet. Die Helligkeit der Lampe ist in 256 Stufen regelbar. Durch Drehen einer Mikrometerschraube am außen liegende Ende des Mikroskops können die Zellen in der Probe fokussiert werden. Mit der CCD-Kamera, die bei der Machbarkeitsstudie und dem ersten Prototyp des In-situ Mikroskops seitlich am Mikroskop angebracht und beim zweiten Prototyp direkt auf dem Außentubus aufgesetzt ist, können Bilder aufgenommen werden. Durch den seitlichen Anbau der Kamera an das In-situ Mikroskop ist bei den beiden ersten Versionen die Installation eines 45°-Spiegels im Strahlengang des Mikroskops erforderlich.

Innerhalb des Entwicklungszeitraums durchlief die Mikroskop-Hardware, wie schon angesprochen, drei Phasen, die im Folgenden skizziert werden sollen.

### 3.1.1 Machbarkeitsstudie

Die Entwicklung begann mit einer Machbarkeitsstudie, die auf der Arbeit von [Bittner, 1994] basiert. Abbildung 4.1 zeigt ein Foto des im Rahmen dieser Machbarkeitsstudie entstandenen In-situ Mikroskops. Der Kondensor mit dem Motor ist ausgebaut und liegt rechts neben dem Gerät. Bei dem Motor handelt es sich noch nicht um den endgültig verwendeten, sondern um ein Exemplar mit längerer Bauform. Daher ist bei

dieser Version der in den Fermenter hineinragende Teil des In-situ Mikroskops auch deutlich länger als bei den beiden späteren Versionen, die den kürzeren Motor verwenden.



Abbildung 4.1: Machbarkeitsstudie eines In-situ Mikroskops. Rechts der ausgebaute Motor mit der Beleuchtungseinheit.

Bei dieser Machbarkeitsstudie war noch, wie auch bei Bittner, der Betrieb des Mikroskops in einem Deckelport des Fermenters vorgesehen. Dieses stellte sich jedoch als nicht praktikabel heraus, da dann der Füllungsgrad des Fermenters sehr hoch sein muss. Befindet sich zu wenig Kulturbrühe im Fermenter, kann es vorkommen, dass die Probenahmezone des In-situ Mikroskops nicht in die Kulturbrühe hineinragt. Außerdem kann es zu Problemen mit der möglichen Schaumbildung im oberen Bereich des Fermenters kommen. In der Regel sind bei Fermentationen auch bereits alle Deckelports von anderen Mess-Sonden belegt. Im Gegensatz zu dem Gerät von Bittner wurde für die Machbarkeitsstudie auch kein „Scheibenwischer“ für die Reinigung der Probenahmezone verwendet, da die Konstruktion einer solchen Apparatur aufgrund ihrer Mechanik als für den industriellen Einsatz zu aufwendig und aufgrund der zu verwendenden Materialien als nicht sterilisierbar erachtet wurde. Für die zuweilen notwendige Reinigung der mit der Kulturbrühe in Kontakt kommenden Glasflächen musste also eine andere Lösung gefunden werden, die bei dem folgenden, ersten Prototyp beschrieben wird.

### 3.1.2 Erster Prototyp

Basierend auf den Erkenntnissen der Machbarkeitsstudie wurde ein neuartiges In-situ Mikroskop konzipiert, das für den Einsatz in einem seitlichen Fermenterport geeignet ist. Dadurch kommt das In-situ Mikroskop stets mit der Kulturbrühe in Kontakt. Hier steht in der Regel auch mehr Platz für die Installation zur Verfügung als im Deckelbereich. Durch eine ausgeklügelte Anordnung von O-Ring Dichtungen ist die Möglichkeit gegeben, das Mikroskop zum Reinigen der Probenahmezone mit einem stabilen Handgriff entsprechend weit aus dem Fermenter herauszuziehen, ohne dass dabei die Gefahr einer Kontamination des Fermenterinnenraums besteht. Zwei Rasten verhindern, dass das Mikroskop versehentlich zu weit aus dem Fermenter herausgezogen bzw. in diesen hineingeschoben wird. Nach dem Herausziehen ist die Probenahmezone von außen zugänglich und kann auf einfache Weise ausgespült werden. Der Mechanismus basiert auf dem Intrac-System der Firma Mettler-Toledo (Gießen). Bei der Konstruktion des Prototyps wurden ausschließlich sterilisationsfeste Steck- und Drehverbindungen verwendet und keine Klebeverbindungen. Alle Teile des In-situ Mikroskops bestehen aus sterilisier- bzw. autoklavierbaren Materialien. Außen- und Innentubus sind aus Edelstahl V2A 4301, die O-Ringe aus Ethylen-Propylen-Dien-Kautschuk (EPDM), und die Kunststoffummantelung besteht aus Polyethylen. Die Kamera ist auch hier seitlich am Mikroskop angebracht und kann vor der Sterilisation zusammen mit dem Objektiv vom Mikroskopkörper abgezogen werden.

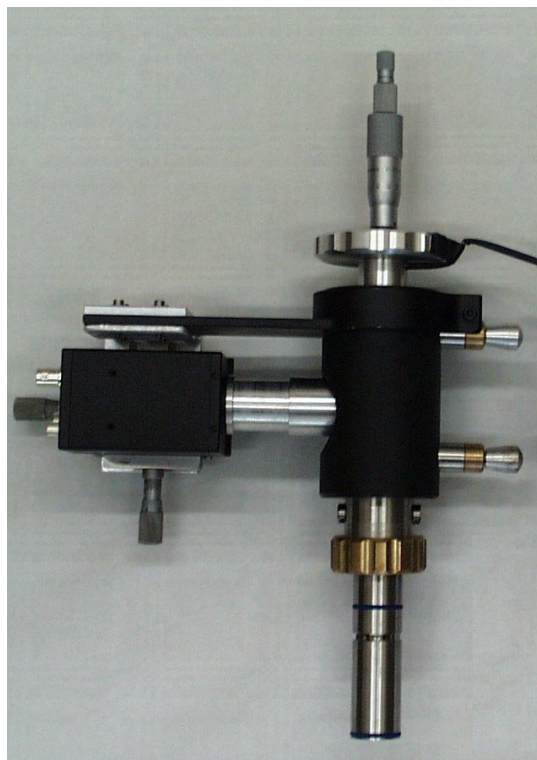


Abbildung 4.2: Erster Prototyp des In-situ Mikroskops.

### 3.1.3 Zweiter Prototyp

Bei dem zweiten Prototyp des In-situ Mikroskops, dargestellt in Abbildung 4.3, ist die Kamera direkt auf dem Mikroskoptubus verschraubt. Das Mikroskop verfügt über einen geraden Strahlengang. Dadurch vereinfacht sich dessen Konstruktion sowie die Handhabbarkeit beträchtlich, beispielsweise bei der Fokussierung des Zellbildes. Abbildung 4.4 zeigt das In-situ Mikroskop eingesetzt in den 25 mm Port eines 30 L Fermenters in herausgezogenem Zustand. Die Probenahmezone ist dadurch von außen zu Reinigungszwecken zugänglich. Um die Temperaturbeständigkeit des In-situ Mikroskops noch weiter zu verbessern, wurde der Mantelzylinder des Mikroskops aus glasfaserverstärktem Teflon hergestellt.



Abbildung 4.3: Zweiter Prototyp des In-situ Mikroskops.



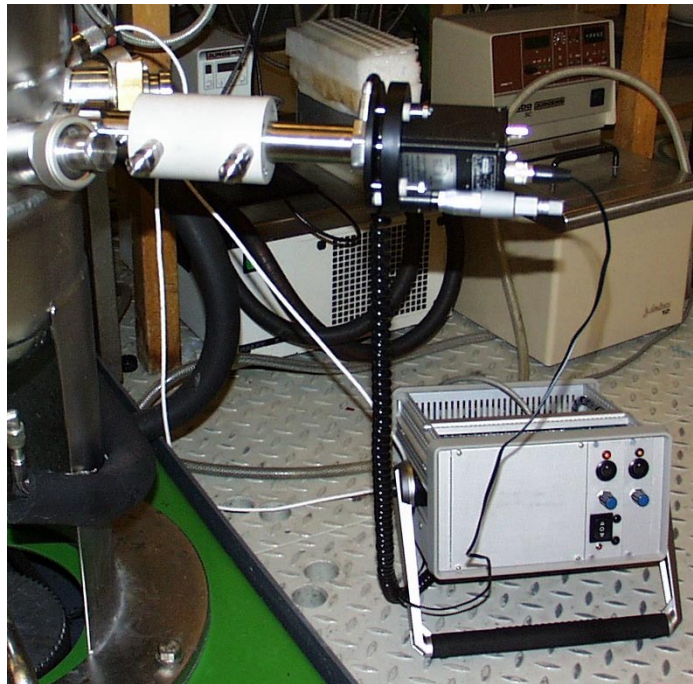


Abbildung 4.4: Zweiter Prototyp des In-situ Mikroskops mit manueller Steuereinheit (unten rechts). Das Mikroskop ist in einen 30 L Biostat UD Reaktor (B. Braun Biotech International, Melsungen) eingesetzt.

## 3.2 Offline Experimente

### 3.2.1 Bildanalyse für Hefezellen

Zur Auswertung der mit dem In-situ Mikroskop aufgenommenen Bilder wird das leicht modifizierte Verfahren von [Frerichs, 1997] verwendet, das sich bereits im Rahmen dieser Diplomarbeit bewährt hat. Es beruht darauf, dass bei leichter Defokussierung des Mikroskopbildes innerhalb der Hefezellen ein heller Brennfleck entsteht, wodurch der Kontrast des Zellbildes verstärkt, die Zellkontur aber nur unwesentlich verändert wird. Das Bildverarbeitungsverfahren soll im folgenden kurz vorgestellt werden. Dabei wird insbesondere auf die vorgenommene Änderung eingegangen.

Zunächst wird das digitalisierte Zellbild (Abbildung 4.5 a) in einem Vorverarbeitungsschritt mit einem Maximum-Operator gefiltert, um die hellen Bereiche im Bild zu verstärken, die Zellregionen repräsentieren, siehe Abbildung 4.5 b.

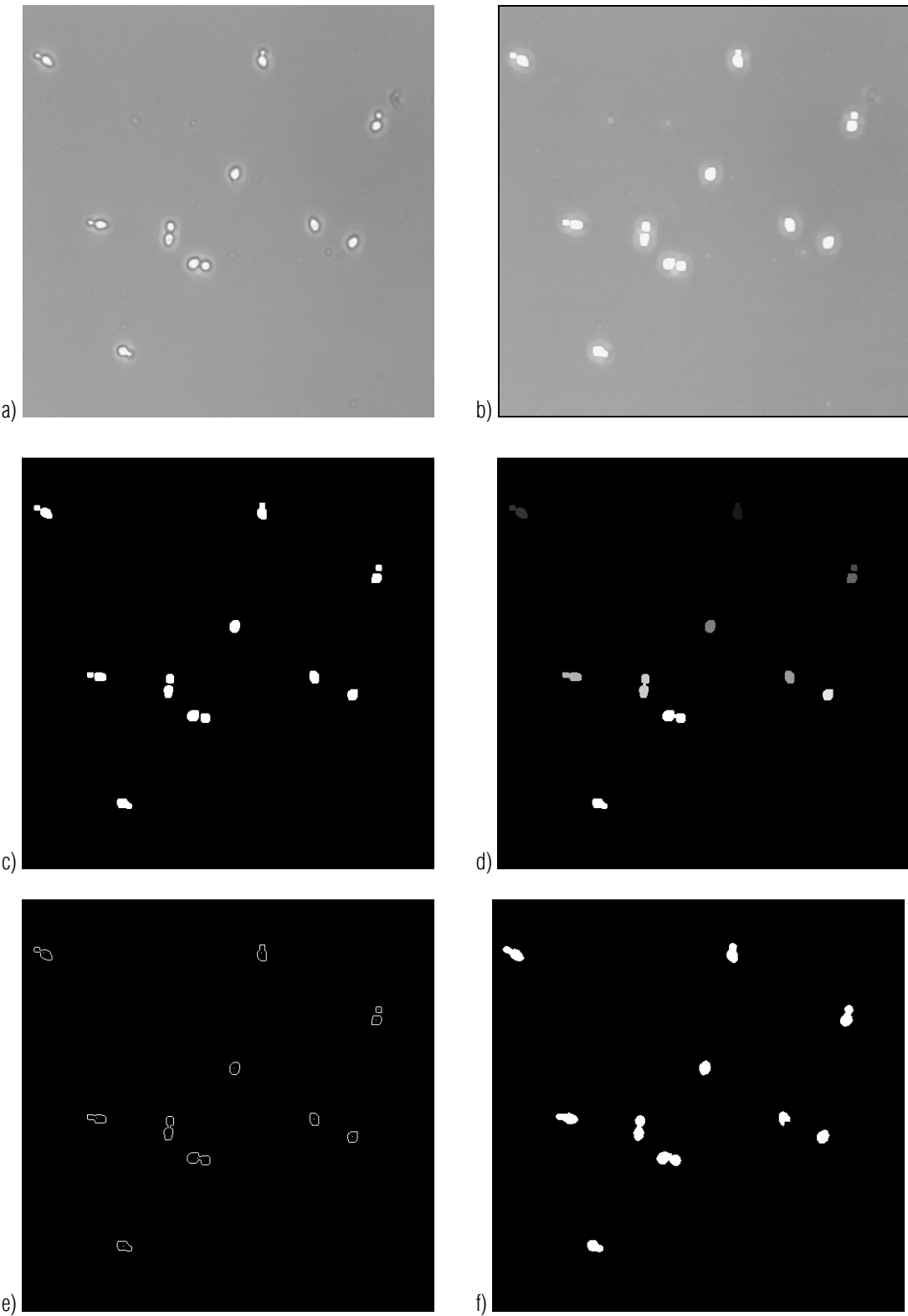


Abbildung 4.5: Verlauf der Bildanalyse am Beispiel eines Bildes mit Hefezellen, 400-fache Vergrößerung.

Danach wird ein globaler Schwellwert in dem Zellbild gesetzt, der den dunklen Bildhintergrund von den hellen Bereichen mit Zellen abtrennt (Abbildung 4.5 c). Zur Schwellwertbildung werden als Erweiterung des Verfahrens von [Frerichs, 1997] hinsichtlich einer Automatisierung die in Kapitel 3 beschriebenen Verfahren zur Automatischen Schwellwertberechnung nach dem Maximum Likelihood Verfahren eingesetzt. Als das am besten geeignete Verfahren stellt sich dabei das Verfahren von [Kurita et al., 1992] heraus (Kapitel 2.3.3.2.2.2), wobei die beiden anderen Verfahren nur wenig schlechter abschneiden, siehe Abbildung 4.5. Somit scheinen reale Zellbilder am besten mit dem Verfahren von [Kurita et al., 1992] modelliert werden zu können. Ergebnisse der Anwendung der Verfahren zur automatischen Schwellwertbildung an einem realen Zellbild zeigt Abbildung 4.6 a-c. In Klammern sind die automatisch ermittelten Schwellwerte angegeben.

Durch eine anschließende „Closing“-Operation werden benachbarte, durch die automatische Schwellwertbildung aber getrennte Zellbereiche wieder zusammengefasst (Abbildung 4.5 d). Das ist notwendig, um später innerhalb dieser größeren, zusammengefassten Regionen zu untersuchen, ob dort entweder zwei lediglich benachbarte Einzelzellen, eine Doppelzelle oder ein Zellcluster vorliegen.

Im nächsten Schritt werden die so erhaltenen Regionen gelabelt, um sie voneinander unterscheiden zu können (ebenfalls Abbildung 4.5 d). Jetzt kann jede Region einzeln untersucht werden. Da analog zur Zählkammer auch bei der Bildverarbeitung nur die Zellen gezählt werden sollen, die vollständig im Beobachtungsbereich liegen, werden zunächst noch eventuell vorhandene Randregionen im Bild eliminiert.

Alle folgenden Operationen werden auf jeder einzelnen Zellregion ausgeführt. Zunächst wird innerhalb der Region erneut ein Intensitäts-Schwellwert gebildet, wodurch die Helligkeitsmaxima vom Hintergrund getrennt werden. Nach dieser Segmentierung repräsentiert jedes Helligkeitsmaximum eine Zelle in dieser Region. Ausgehend von den Mittelpunkten dieser lokalen Zellregionen werden die exakten Zellkonturen gesucht (Abbildung 4.5 e). Dann wird verglichen, ob sich die Konturen zweier Zellbereiche berühren oder überschneiden. Ist das der Fall, so könnte es sich bei diesem Zellpaar um eine Doppelzelle handeln. Dieses wird aufgrund der Größen beider Zellregionen sowie des Überlappungsgrades überprüft. Für genauere Details zu dem Bildverarbeitungsalgorithmus für Hefen sei auf [Frerichs, 1997] verwiesen. Den Algorithmus im Flussdiagramm zeigt Abbildung 4.7. Das erhaltene Bild nach Beendigung des Bildverfahrens ist in Abbildung 4.5 f dargestellt.

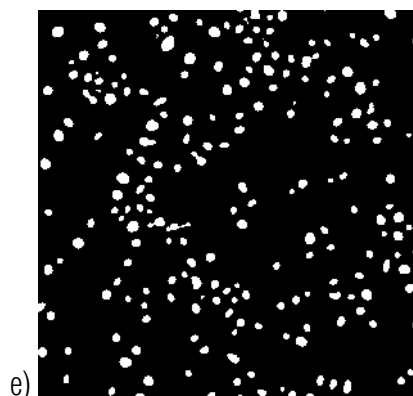
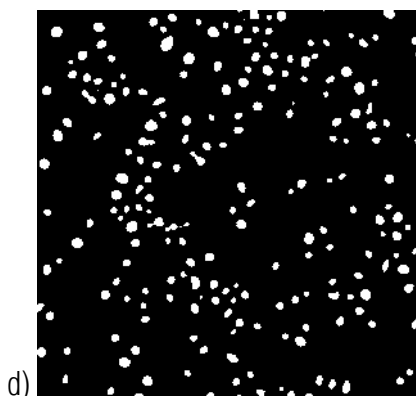
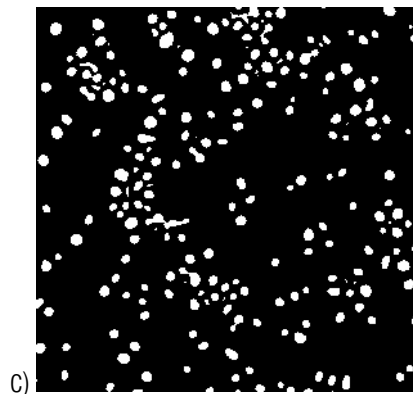
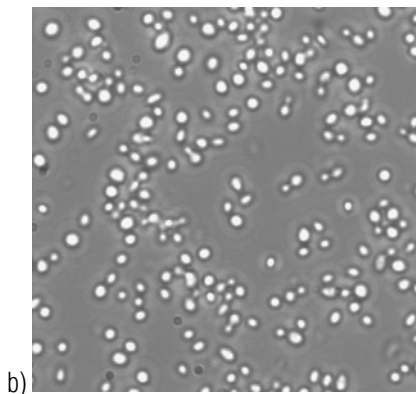
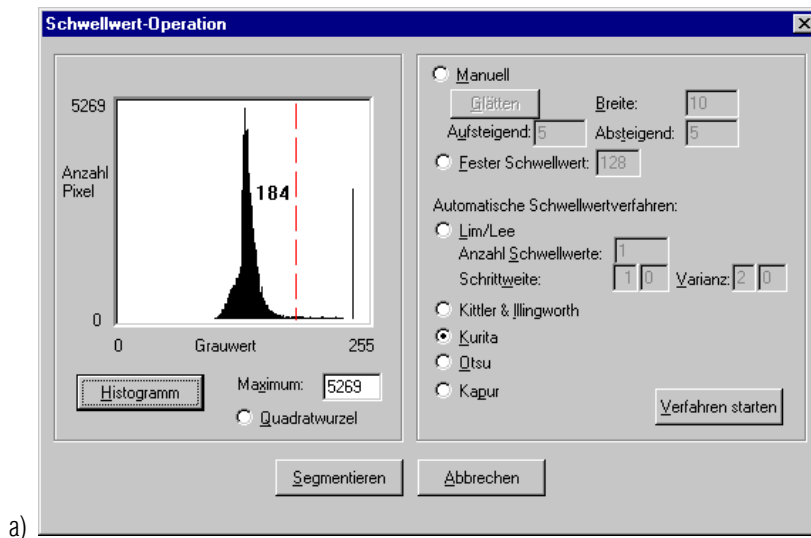


Abbildung 4.6: Ergebnisse der Segmentierung unter Verwendung der Maximum Likelihood Verfahren. a) Histogramm b) Originalbild, c) Segmentierung nach [Kittler et al., 1986] (Schwellwert 163), d) Segmentierung nach [Kurita et al., 1992] (Schwellwert 184), e) Segmentierung nach [Otsu, 1979] (Schwellwert 178).

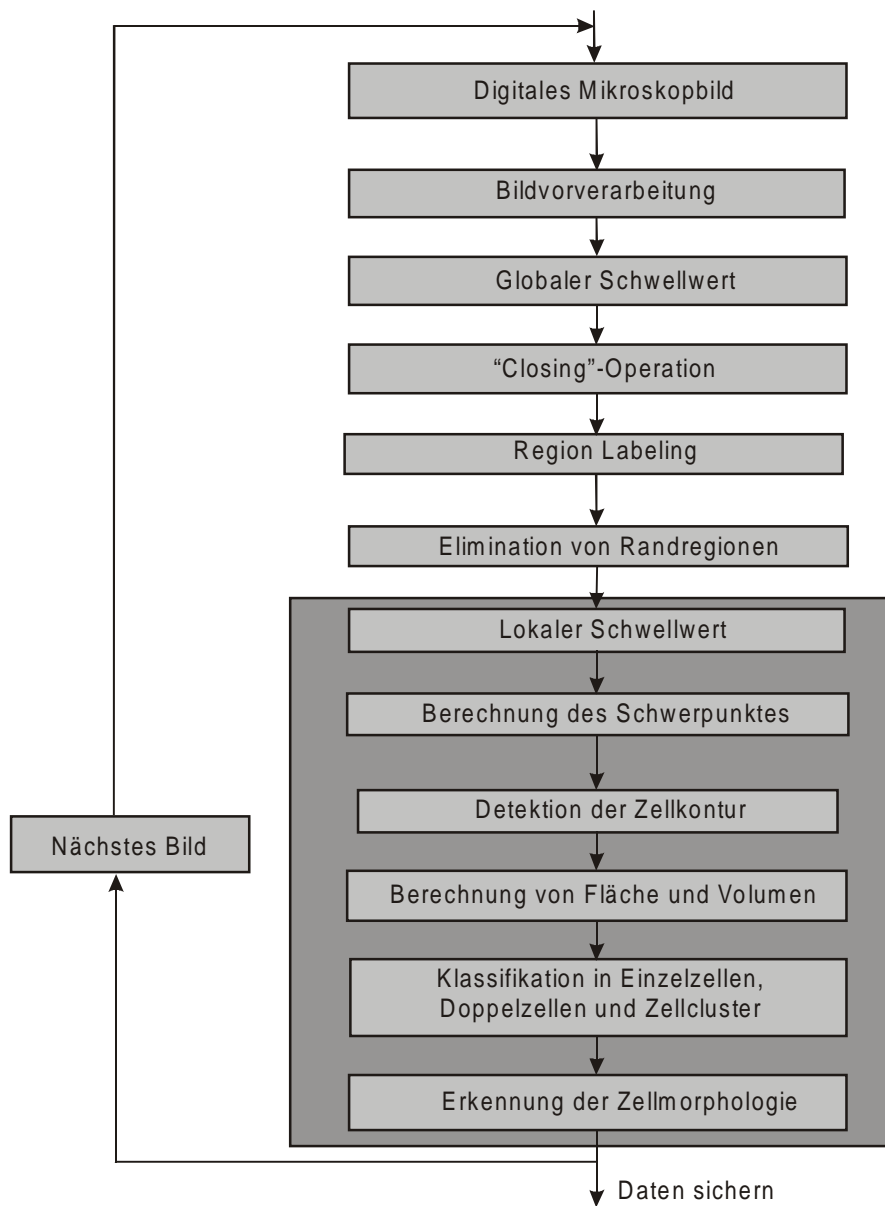


Abbildung 4.7: Flussdiagramm des Bildverarbeitungsverfahrens zur Analyse von Hefezellen [Frerichs, 1997].

### 3.2.1.1 Bildverarbeitungssoftware

Die Umsetzung des Flussdiagramms in Ad Oculos ist in Abbildung 4.8 dargestellt.

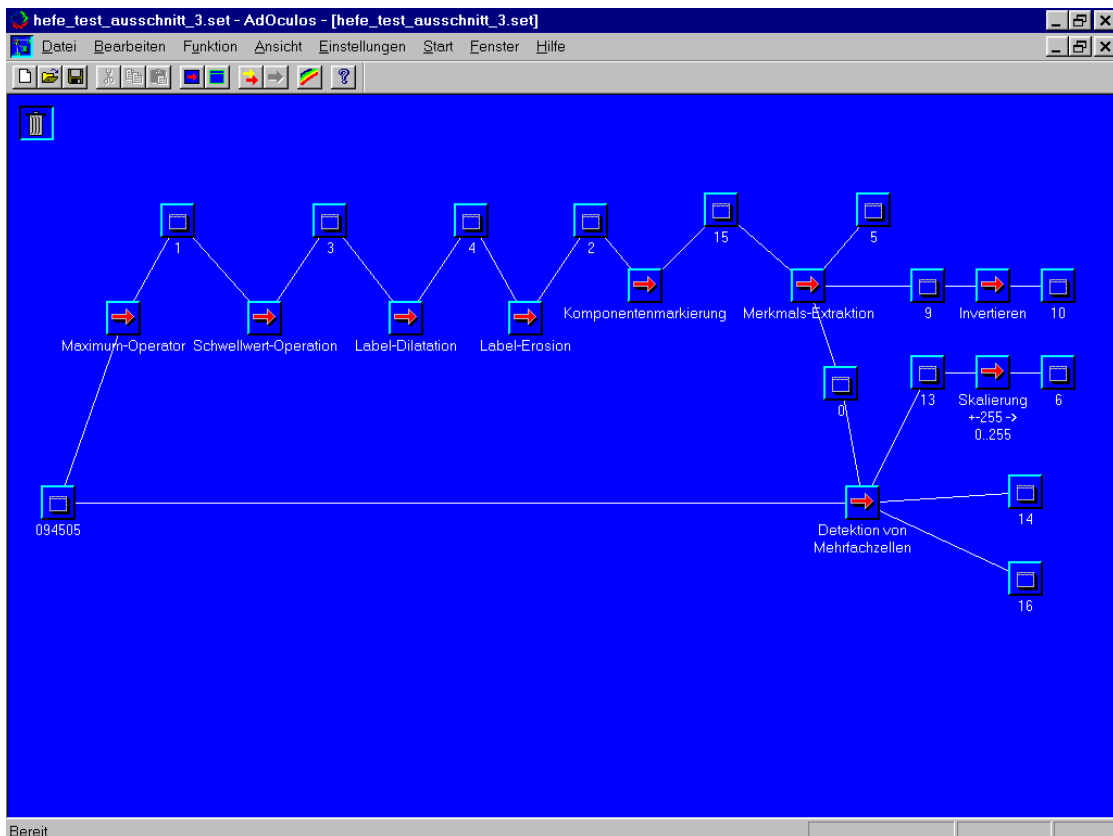


Abbildung 4.8: Implementierung des Bildverarbeitungsverfahrens für Hefezellen in Ad Oculos 3.1.

Der Einsatz einer visuellen Umgebung wie Ad Oculos erlaubt eine nahezu direkte Umsetzung des Flussdiagramms. Der Programmablauf erfolgt im Bild von links nach rechts. Es wechseln sich Funktionsblöcke (Pfeile) und Ausgabeblocke zur Betrachtung von Zwischenergebnissen (Ordner) ab. Die Untersuchung der einzelnen lokalen Zellregionen ist vollständig in dem Funktionsblock „Detektion von Mehrfachzellen“ implementiert, da eine andere Realisierung des Schleifendurchlaufs für jede im Bild vorhandene Zellregion technisch nicht umsetzbar war.

In den folgenden Abschnitten werden Ergebnisse der Anwendung des Bildverarbeitungsverfahrens für Hefezellen auf Bilder realer Kultivierungen vorgestellt. Die Untersuchungen erfolgten in der Regel an offline genommenen Proben, da die Entwicklung des In-situ Mikroskops parallel zu diesen Untersuchungen verlief und zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen war.

### 3.2.1.2 Evaluierung des Bildverarbeitungsverfahrens für Hefezellen

*S. cerevisiae* H620 wurden in einem 2 L Schüttelkolben kultiviert. Als Kulturmedium wurde das Schatzmann-Medium verwendet. Die Kultivierung wurde mit 440 mL Medium durchgeführt, das unter der Sterilbank mit Hefezellen angeimpft wurde. Die Animpfzelldichte betrug  $1,55 \cdot 10^5$  Zellen/mL. Die Kultivierungstemperatur betrug 30°C. Die Probenahme während der Kultivierung erfolgte offline über einen Auslauf am Schüttelkolben.

Von jeder Probe wurden die folgenden Parameter bestimmt:

- Optische Dichte bei 590 nm ( $OD_{590}$ )
- Zellzahl [Zellen/mL] durch Auszählen in einer Neubauer Improved Zählkammer unter dem Mikroskop BH-2 mit Phasenkontrasteinrichtung (Firma Olympus, Japan) bei 200-facher Vergrößerung
- Zellzahl [Zellen/Bild] mit der Bildverarbeitungssoftware für Hefezellen, zuvor waren jeweils 10 Bilder je Probe offline akquiriert worden.

In Abbildung 4.9 sind die mit dem Bildverarbeitungsverfahren ermittelten Zellzahlen (Einzel-, Doppelzellen und Zellcluster) dargestellt, die sich durchschnittlich in einem Bild befanden, wenn die zehn aufgenommenen Bilder ausgewertet wurden.

In Abbildung 4.10 sind die optische Dichte bei 590 nm ( $OD_{590}$ ), die Zellzahl [Zellen/mL], die durch manuelles Auszählen erhalten wurde, und die durchschnittliche Zellzahl [Zellen/Bild], die sich durch Auswerten der zehn aufgenommenen Bilder mit dem Bildverarbeitungsverfahren ergab, dargestellt. Hierbei sind die Einzel- und Doppelzellen zur Gesamtzellzahl zusammengefasst.

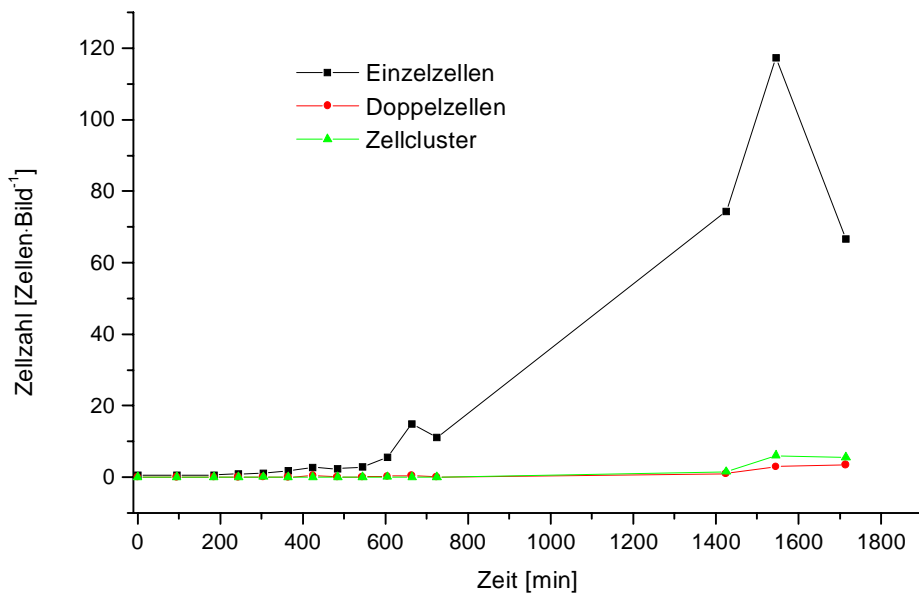


Abbildung 4.9: Ergebnisse der Bildverarbeitung [Schaper, 1999].

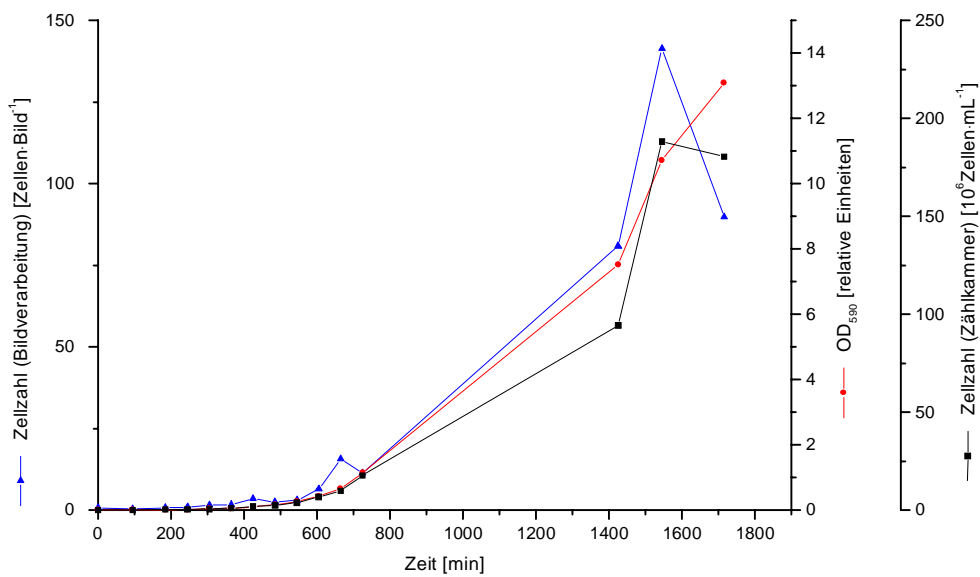


Abbildung 4.10: Vergleich der optischen Dichte OD<sub>590</sub>, der Zellzahl [Zellen/mL], die mit Hilfe der Zählkammer bestimmt wurde, und der Zellzahl [Zellen/Bild] (Einzelzellen plus Doppelzellen), die mit der Bildverarbeitung während einer Schüttelkultivierung von *S. cerevisiae* erhalten wurde [Schaper, 1999].



Durch Auftragen der Ergebnisse der Bildverarbeitung gegen die durch manuelles Auszählen in der Zählkammer erhaltenen Resultate ergibt sich der in Abbildung 4.11 dargestellte Verlauf.

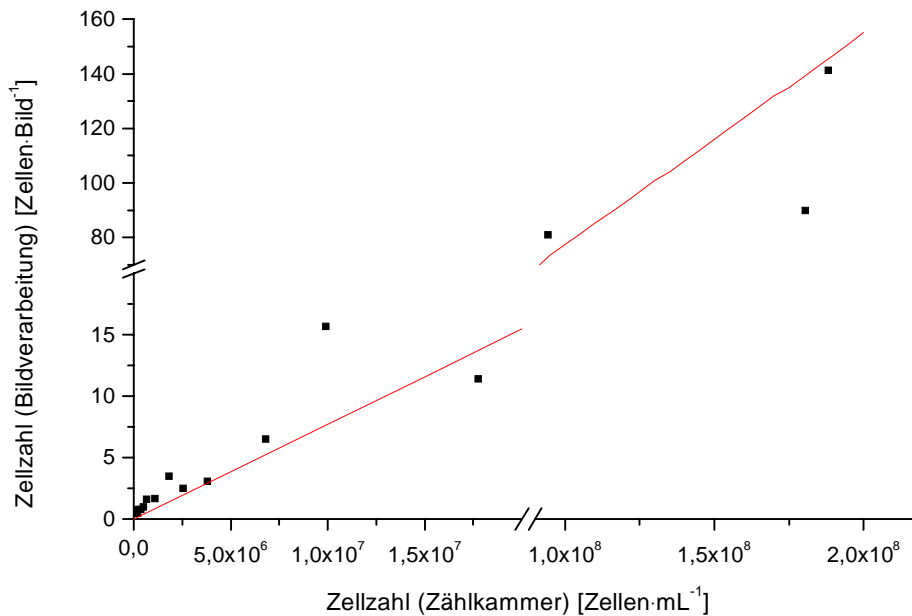


Abbildung 4.11: Zellzahl [Zellen/Bild] (Bildverarbeitung) vs. Zellzahl [Zellen/mL] (Zählkammer) [Schaper, 1999].

Die Ergebnisse der Bildverarbeitung schwanken stark um den idealen Verlauf (rote Gerade), der durch lineare Regression ermittelt wurde. Dieses kommt dadurch, dass die zur Bildaufnahme aufgetragenen Proben kein einheitliches Volumen besitzen, so dass die Zellzahl [Zellen/Bild] nicht mit der Zellzahl [Zellen/mL] korreliert.

### 3.2.1.3 Arbeitsbereich des In-situ Mikroskops

Um den Arbeitsbereich des Bildverarbeitungsverfahrens zu ermitteln, wurde eine Verdünnungsreihe einer Suspension von 1 g Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) in 100 mL 0,9%-iger Kochsalzlösung angesetzt.

Dadurch wurden Proben mit unterschiedlichen Zellkonzentrationen hergestellt. Mit Hilfe der Bildaufnahmeeinheit wurden von diesen jeweils zehn Bilder in einer Thoma-Kammer aufgenommen, um ein definiertes Probenvolumen zu haben. Die Bilder wurden mit Hilfe des Bildverarbeitungsverfahrens für Hefezellen ausgewertet.

Parallel dazu wurden die jeweiligen Proben unter dem Mikroskop BH-2 (Olympus, Japan) manuell in der Neubauer Improved Zählkammer bei 200-facher Vergrößerung ausgezählt.

In Abbildung 4.12 sind die Ergebnisse der Auswertung mit dem Bildverarbeitungsverfahren dargestellt. Es ist jeweils der Durchschnittswert aus den zehn Bildern angegeben. In Abbildung 4.13 sind sowohl die Zellzahlen [Zellen/mL] aufgetragen, die durch manuelles Auszählen in der Zählkammer ermittelt wurden, als auch die mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware durch Addieren von Einzel- und Doppelzellen und anschließendem Multiplizieren mit dem Volumenfaktor des Bildausschnittes erhaltenen. Außerdem ist die Abweichung angegeben, die mit folgender Formel berechnet wurde:

$$\text{Abweichung}[\%] = \left| \frac{\text{Zellzahl}(\text{manuell}) - \text{Zellzahl}(\text{Bildverarbeitung})}{\text{Zellzahl}(\text{manuell})} \right| \cdot 100 \quad (4.1)$$

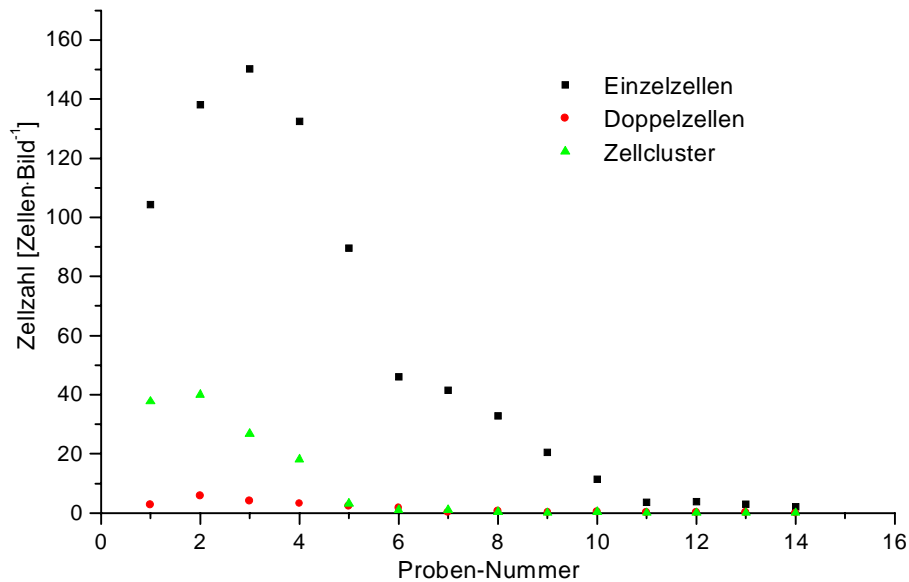


Abbildung 4.12: Ergebnisse des Bildverarbeitungsverfahrens für Hefezellen für eine Verdünnungsreihe.

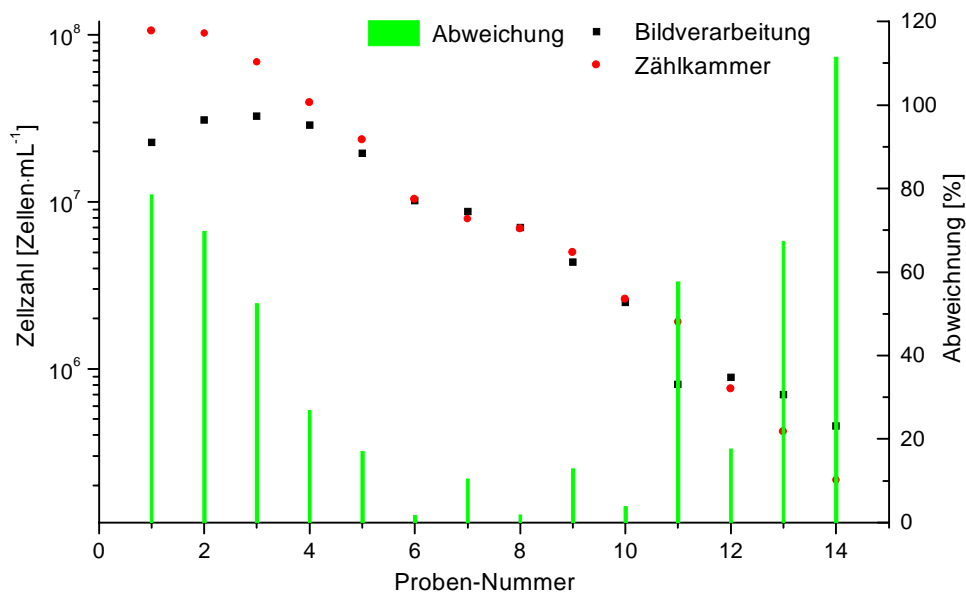


Abbildung 4.13: Vergleich der Ergebnisse von Zählkammer (manuell) und Bildverarbeitungsverfahren zur Ermittlung des Arbeitsbereiches des In-situ Mikroskops (logarithmische Darstellung).

Die erhaltenen Werte stimmen im Bereich zwischen  $7,5 \cdot 10^5$  und  $3 \cdot 10^7$  Zellen/mL gut überein. Bei höheren Zellkonzentrationen als  $3 \cdot 10^7$  Zellen/mL nimmt die Zahl der Zellcluster stark zu, da die Zellen zu dicht zusammenliegen und von der Bildverarbeitung nicht mehr in Einzel- und Doppelzellen unterschieden werden können. Daher liegen die mit der Bildverarbeitung ermittelten Zellzahlen unter den durch manuelles Auszählen erhaltenen Werten.

Ist die Zellkonzentration geringer als  $7,5 \cdot 10^5$  Zellen/mL, weichen die Ergebnisse voneinander ab, da nur noch sehr wenige Zellen im Bild sichtbar sind und mehr als zehn Bilder notwendig sind, um eine verwertbare Zellzahl zu erhalten.

Beim Einsatz des In-situ Mikroskops während einer Kultivierung können permanent Bilder aufgenommen werden. Dabei erreicht das In-situ Mikroskop eine Bildaufnahmefrequenz von ca. zwei Bildern pro Minute. Dieser Wert ergibt sich aus der maximalen Schließ- bzw. Öffnungsgeschwindigkeit der Probenahmezone. Wird aus den zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmten Zellzahlen ein über die Zeit gleitender Mittelwert gebildet, dann können auch geringere Zellzahlen als  $7,5 \cdot 10^5$  Zellen/mL erfasst werden.

Durch Veränderung des Probenahmenvolumens ist es möglich, den Messbereich zu verschieben. Bei Verwendung eines größeren Probenahmenvolumens können auch Zellkonzentrationen, die kleiner als

$7,5 \cdot 10^5$  Zellen/mL sind, noch hinreichend genau bestimmt werden, da dann wieder mehr Zellen im Bild vorhanden sind. Vermindert man hingegen das Probenahmenvolumen, dann können auch Zellzahlen oberhalb von  $3 \cdot 10^7$  Zellen/mL bestimmt werden. In einem kleineren Probenahmenvolumen sind weniger Zellen enthalten, so dass sich diese in der Probenahmezone besser verteilen können und nicht so viele Zellcluster gezählt werden.

#### 3.2.1.4 Synchrone Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Kultivierung wurde wie in Kapitel 3.1 beschrieben durchgeführt. Als Zufütterungslösung wurde das Schatzmannmedium verwendet, dem 0,005% Antischaummittel Wacker Silikon (Wacker Chemie GmbH, München) zugesetzt wurden. Durch Online-Analytik wurden der Kohlendioxid- und der Sauerstoffgehalt im Abgas sowie die NAD(P)H-Fluoreszenz und der Gelöstsauerstoffgehalt ( $pO_2$ ) bestimmt.

Durch zweiminütige Begasung mit Stickstoff wurden die Zellen zur Oszillation gebracht [Marose, 1999]. Sobald sich die Oszillation stabilisiert hatte, wurden während eines Zyklus am Reaktorauslauf offline Proben genommen. Anhand dieser Proben wurden die Biotrockenmasse (BTM), die optische Dichte ( $OD_{590}$ ) und die Zahl der Einzel-, Doppelzellen und Zellcluster mit Hilfe des Bildverarbeitungsverfahrens bestimmt. Außerdem wurden die Durchmesser  $D$  der Einzelzellen in den aufgenommenen Bildern aus der jeweiligen Zellfläche  $A$  errechnet, siehe Gleichung 4.2.

$$D = \sqrt{\frac{4A}{\pi}} \quad (4.2)$$

In Abbildung 4.14 sind die optische Dichte und die Biotrockenmasse und in Abbildung 4.15 die mit Hilfe des Bildverarbeitungsverfahrens bestimmten Zellzahlen dargestellt. Die während eines Oszillations-Zyklus online protokollierten Daten sind in Abbildung 4.16 und Abbildung 4.17 zu sehen.

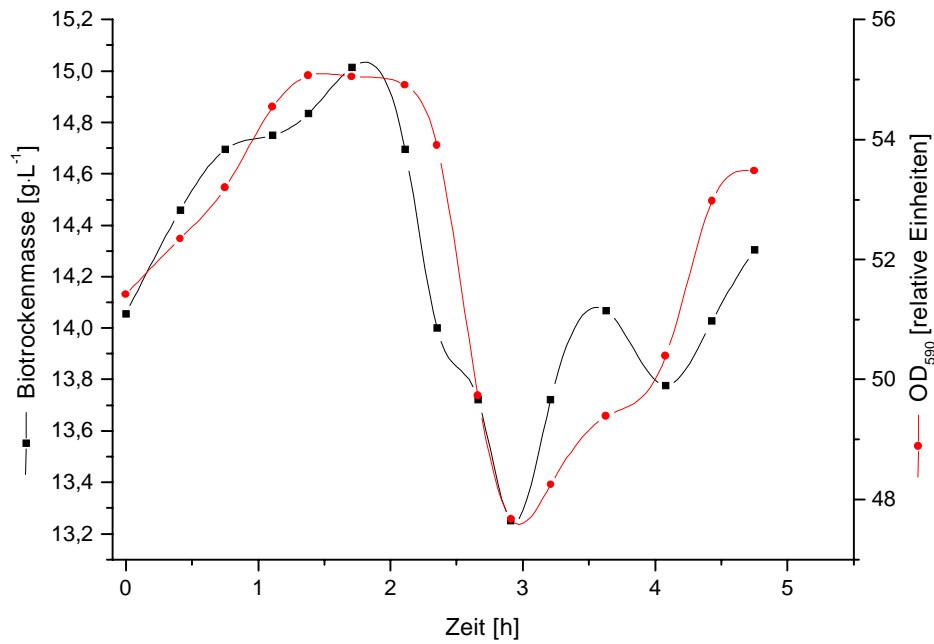


Abbildung 4.14: Optische Dichte und Biotrockenmasse während eines Oszillations-Zyklus von *S. cerevisiae* [Schaper, 1999].

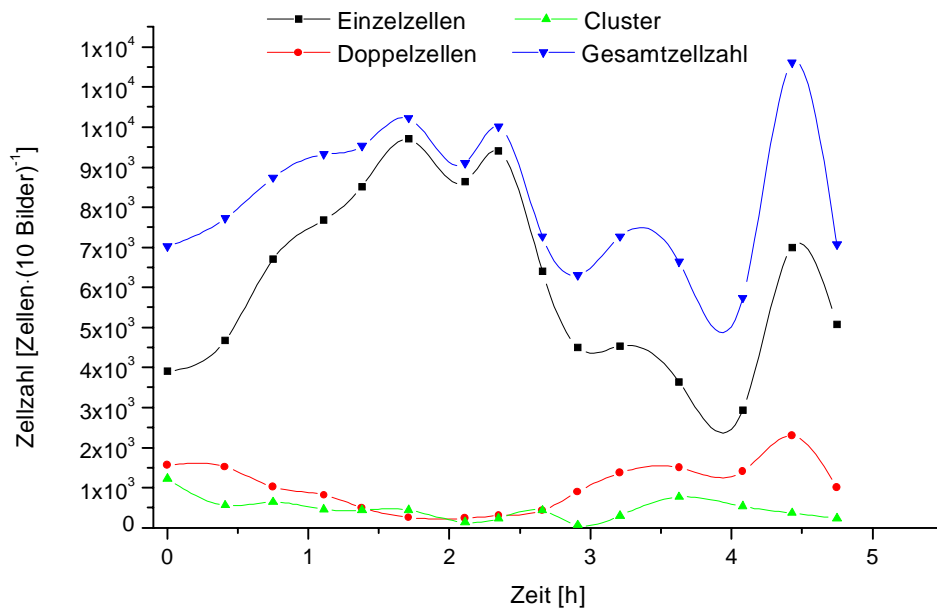


Abbildung 4.15: Änderung der Zellzahlen während eines Oszillations-Zyklus von *S. cerevisiae*. Die Gesamtzellzahl ergibt sich aus der Zahl der Einzel- plus Doppelzellen [Schaper, 1999].

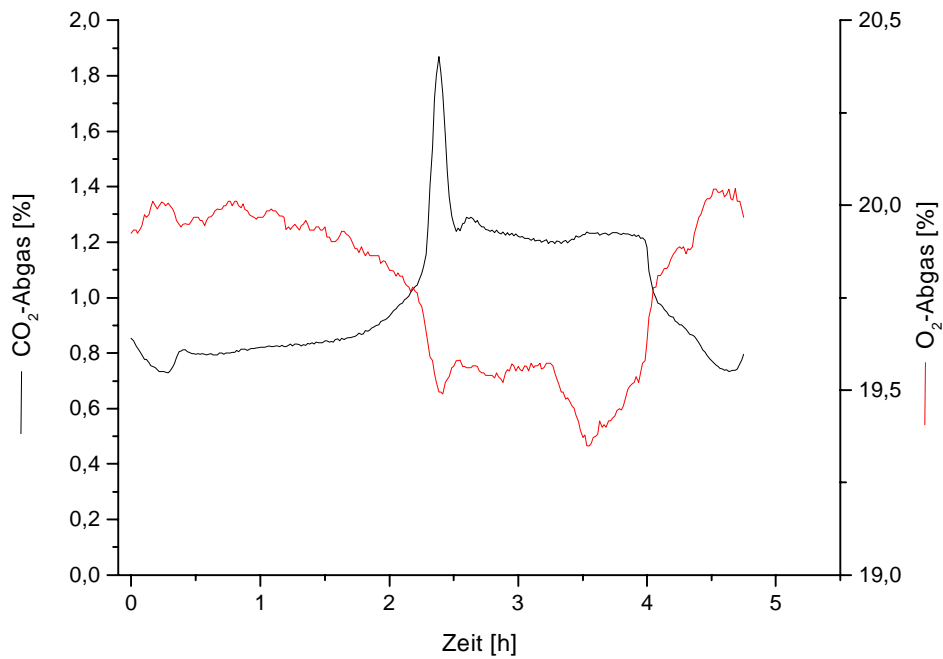


Abbildung 4.16: Kohlendioxid- und Sauerstoffgehalt im Abgas während eines Oszillations-Zyklus [Schaper, 1999].

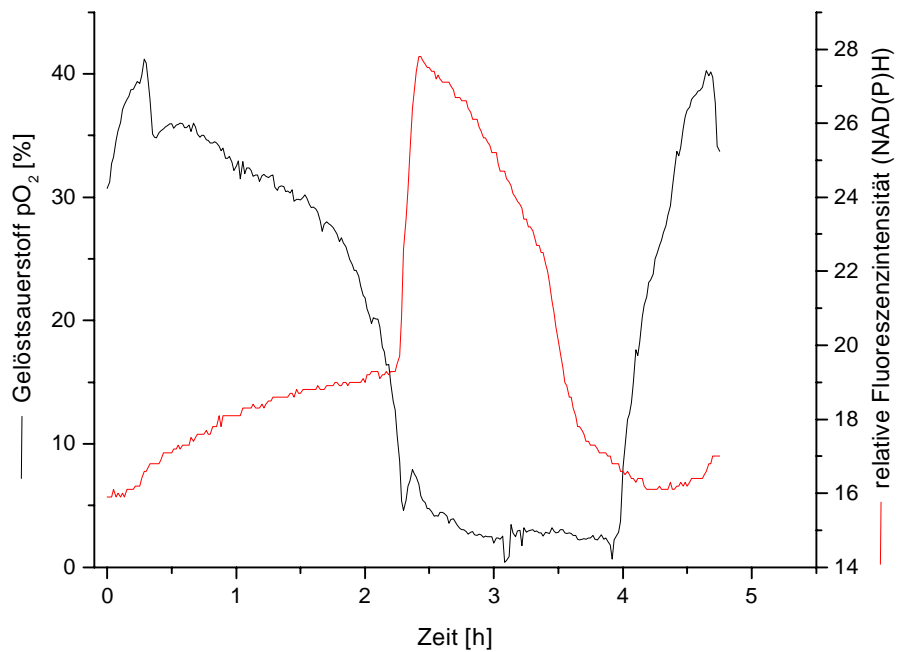
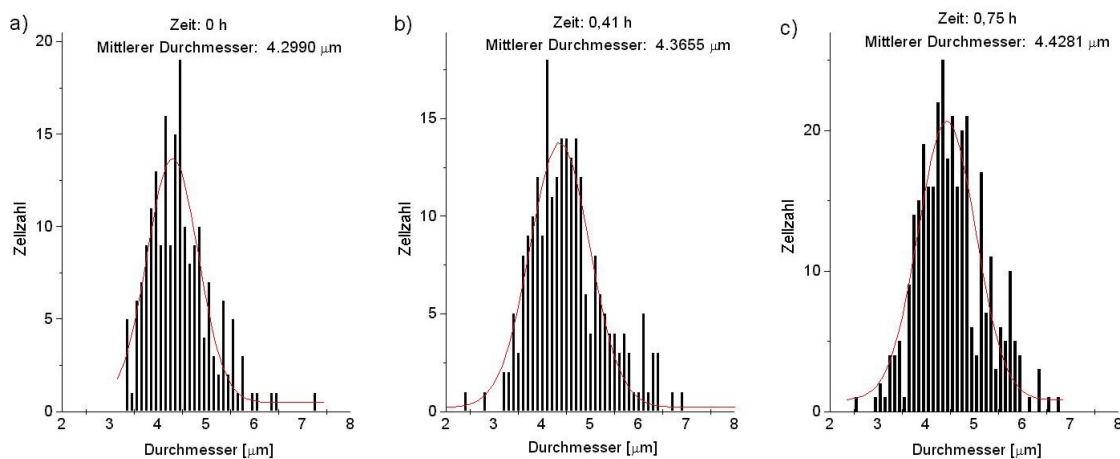


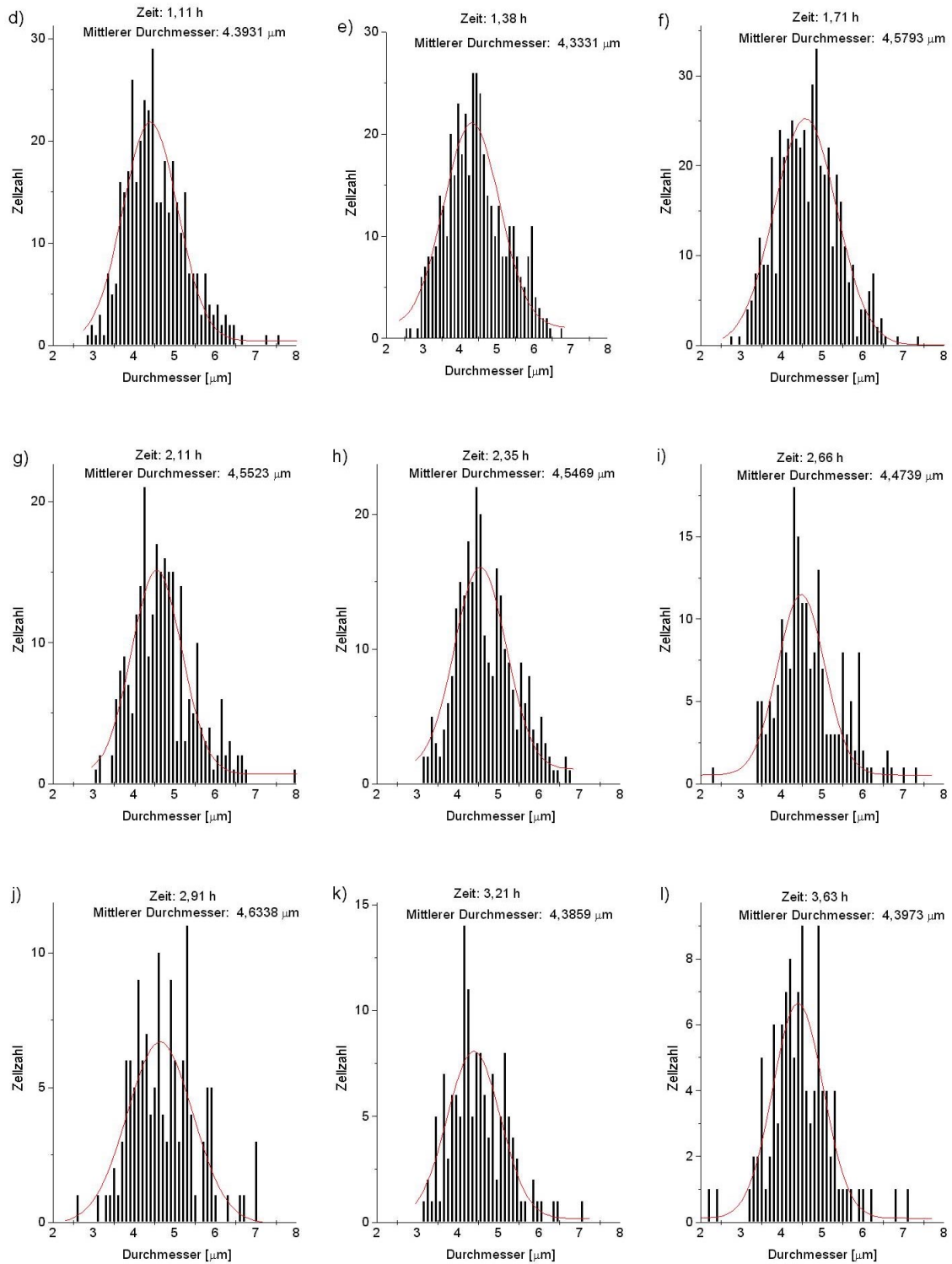
Abbildung 4.17: Gelöstsauerstoffgehalt und NAD(P)H-Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{Ex.}} = 360 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em.}} = 440\text{-}460 \text{ nm}$ ) während eines Oszillations-Zyklus [Schaper, 1999].

Die optische Dichte, die Biotrockenmasse und die Gesamtzellzahl steigen bis zu einem Maximum nach ca. 1,7 Stunden an. Die Zahl der Doppelzellen durchläuft zu dieser Zeit gerade ein Minimum. Viele Zellen befinden sich am Maximum in der  $G_1$ -Phase, in der die Sprossung abgeschlossen ist und die Tochterzellen in der Größe wachsen. Dieses stimmt mit Ergebnissen von [Beuse et al., 1998] überein. Diese beschreiben den Zellzyklus unter anderem anhand des Kohlendioxidgehaltes im Abgas und anhand des Gelöstsauerstoffgehaltes. Demnach befinden sich die Zellen von Anfang an bis nach etwa zwei Stunden in der  $G_1$ -Phase.

Nach ca. vier Stunden durchläuft die Gesamtzellzahl ein Minimum, das mit einem Maximum der Zahl der Doppelzellen zusammenfällt. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich viele Zellen in der  $G_2$ -Phase, in der die Knospen gut erkennbar sind. Auch diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von Beuse et al. überein, die beobachtet haben, dass beim Übergang der Zellen von der S- in die  $G_2$ -Phase ein Absinken des Kohlendioxidgehaltes im Abgas und ein Anstieg des Gelöstsauerstoffgehaltes zu erkennen sind. Der gesamte Zyklus dauert etwa 4,25 Stunden.

Um festzustellen, ob anhand der Zellgrößenverteilung zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung Aussagen über den Zellzyklus getroffen werden können, wurden die Durchmesser der Einzelzellen aus den zehn aufgenommenen Bildern der jeweiligen Probe in einzelnen Histogrammen dargestellt (siehe Abbildung 4.18 a-0).







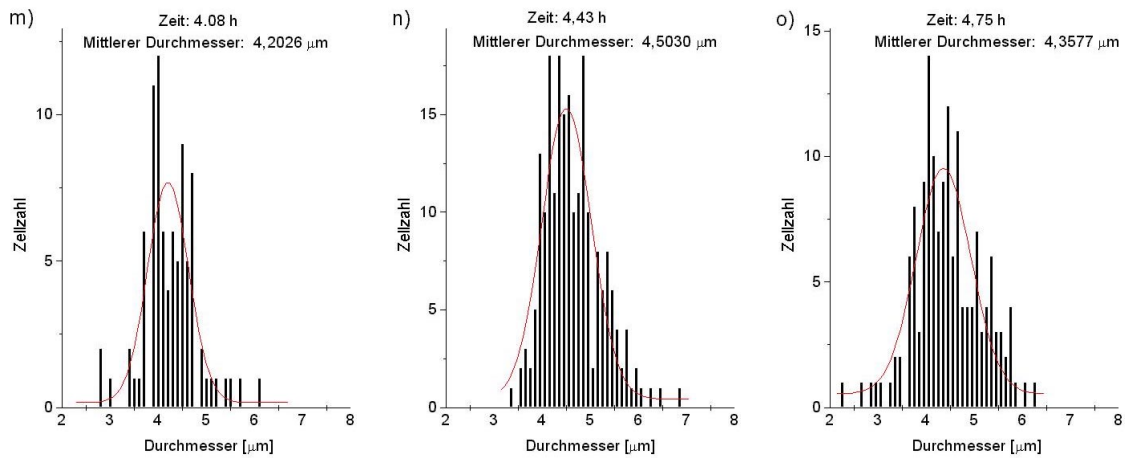


Abbildung 4.18 a-o: Größenverteilungen der Zellen anhand der Durchmesser zu verschiedenen Zeiten des Oszillations-Zyklus. Der angegebene mittlere Durchmesser ergibt sich aus dem Maximum der Gauß-Kurve [Schaper, 1999].

Durch Auftragen der mittleren Durchmesser gegen die Kultivierungszeit ergibt sich der in Abbildung 4.19 dargestellte Verlauf.

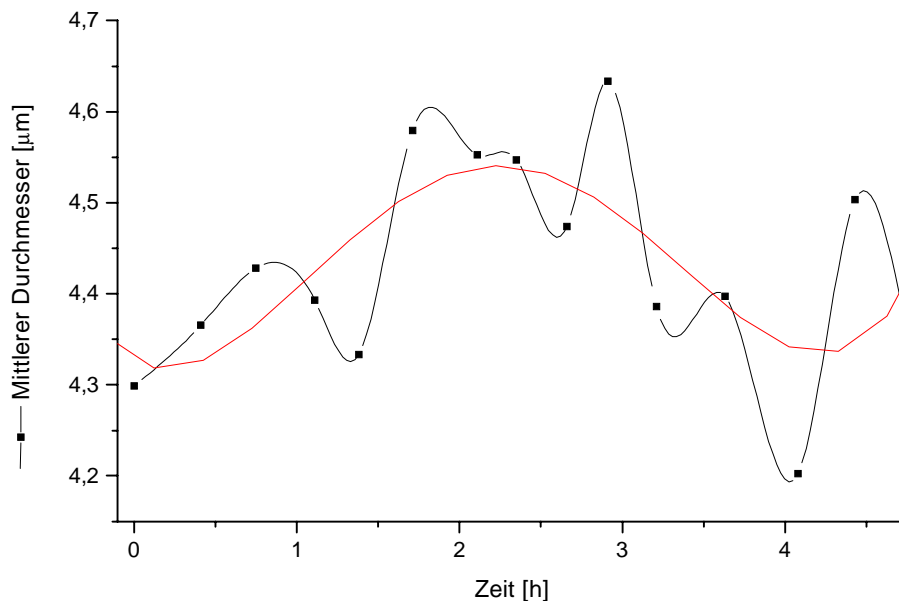


Abbildung 4.19: Verlauf der mittleren Durchmesser während des Oszillations-Zyklus [Schaper, 1999].

Die Zellen besitzen nach ca. zwei Stunden den größten mittleren Durchmesser. Nach den zuvor angestellten Überlegungen sind zu diesem Zeitpunkt die meisten Zellen am Ende der  $G_1$ -Phase und die Tochterzellen

haben ihr Wachstum beendet. Den kleinsten mittleren Durchmesser besitzen die Zellen nach etwa einer Viertelstunde und nach ca. 4,25 Stunden. Diese beiden Minima entsprechen sich, da der Zyklus etwa 4,25 Stunden dauert. Der Verlauf der mittleren Durchmesser stimmt mit dem überein, was bereits unter Einsatz von Durchflusszytometrie ermittelt wurde [Marose, 1999], allerdings sind die Absolutwerte bei der Bildverarbeitung kleiner als die durchflusszytometrisch bestimmten. Aussagen über den Zellzyklus sollten aber wegen der starken Schwankungen besser anhand anderer Parameter, wie optischer Dichte, Biotrockenmasse oder Kohlendioxidgehalt im Abgas, getroffen werden.

### 3.2.2 Bildanalyse für Tierzellen

Für die in dieser Arbeit untersuchten CHO- bzw. BHK-Zellen muss eine vollständig andere Bildanalyse verwendet werden als für Hefezellen. Der Grund dafür ist die fehlende Möglichkeit, durch Defokussierung des Zellbildes einen Brennfleck innerhalb der Tierzelle zu erzeugen, wie es bei den Hefezellen möglich ist. Daher müssen andere charakteristische Merkmale gefunden werden, um Zellregionen von Bildhintergrund und Artefakten, wie z.B. Dreckpartikeln, zu trennen.

Diese Unterscheidung wird aufgrund von zwei Merkmalen unternommen. Zum einen haben Tierzellen üblicherweise einen Durchmesser zwischen 10 und 20  $\mu\text{m}$  und eine rundliche Form. Dadurch ist eine Unterscheidung von Dreckpartikeln möglich, die üblicherweise größer und nicht rund sind. Das gleiche gilt für Artefakte, die kleiner als 10  $\mu\text{m}$  sind. Zum anderen ist das Hauptcharakteristikum die im Vergleich zum Hintergrund relativ große „Unruhe“ in der Grauwertstruktur der Zelle. Dieses aus der Texturanalyse bekannte Merkmal wird durch die lokale Varianz gemessen (siehe Kapitel 2.3.3.4.3). Je „unruhiger“ oder inhomogener ein Bildbereich ist, desto höher ist seine lokale Varianz.

Da sich Bilder von CHO- und BHK-Zellen bezüglich der zur Bildanalyse verwendeten Merkmale nicht signifikant unterscheiden, kann für beide Zelltypen ein gemeinsamer Bildverarbeitungsalgorithmus entwickelt werden. Dieser Algorithmus basiert auf einer Veröffentlichung von [Wu et al., 1995] und soll im folgenden beschrieben werden. Das Bildverarbeitungsverfahren für Tierzellen ist als Flussdiagramm in Abbildung 4.20 dargestellt.

Nach Digitalisierung des Mikroskopbildes erfolgt zunächst eine Hintergrundsubtraktion, um eventuelle Beleuchtungsunregelmäßigkeiten über den Bildbereich zu kompensieren. Dann wird über das gesamte Bild die lokale Varianz für jeden Pixel (englisch: picture element, Bildpunkt) unter Berücksichtigung eines Fensters mit einer Größe von 5x5 Pixeln berechnet. Über die lokale Varianz aller Bildpunkte wird ein Histogramm berechnet und dann mit dem bereits aus der Bildverarbeitung für Hefezellen bekannten Maximum Likelihood

Verfahren zur automatischen Schwellwertbildung in einem Segmentierungsschritt der Bildhintergrund von den relevanten Bereichen mit Zellen getrennt.

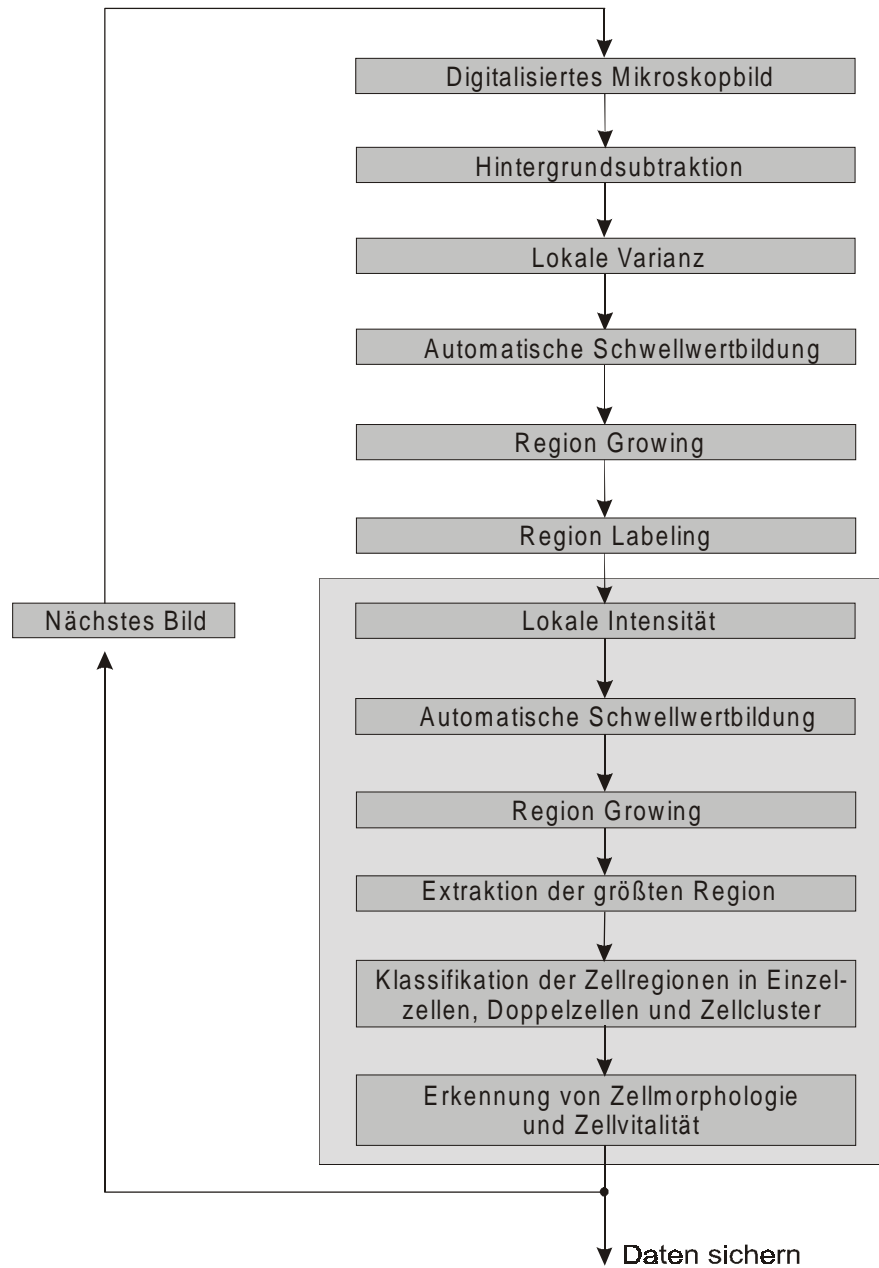


Abbildung 4.20: Flussdiagramm des Bildverarbeitungsverfahrens für Tierzellen.

Nach der Segmentierung wird das gewonnene Binärbild innerhalb des Region Growing Schrittes zu größeren Regionen zusammengefasst und von Randregionen, die nicht mitgezählt werden, sowie Gebieten, die zu klein

sind, um Tierzellen darzustellen, gereinigt. Dadurch werden Bildbereiche herausgearbeitet, die Tierzellen repräsentieren. Im Anschluss werden diese Regionen gelabelt, um sie im folgenden Schritt dann einzeln behandeln zu können.

Wie auch bei der Bildverarbeitung für Hefezellen wird jetzt jede gefundene Zellregion auf Einzel- bzw. Doppelzellen oder Zellcluster untersucht. Bei Tierzellen sind Zellcluster allerdings recht unwahrscheinlich, weil die Zellkonzentration wesentlich niedriger als bei Hefezellen ist. Cluster treten in der Regel nur dann auf, wenn die Zellen klumpen oder, beispielsweise bei Perfusionsreaktoren sehr hohe Zellkonzentrationen erreicht werden.

### 3.2.2.1 Bildverarbeitungssoftware

Die Realisierung des Bildverarbeitungsverfahrens für Tierzellen in Ad Oculos 3.1 ist in Abbildung 4.21 dargestellt. Wie auch bei der Umsetzung des Bildverarbeitungsverfahrens für Hefezellen, ist die lokale Behandlung der Zellregionen in einem einzigen Icon, hier „CellCountCHO“, implementiert.

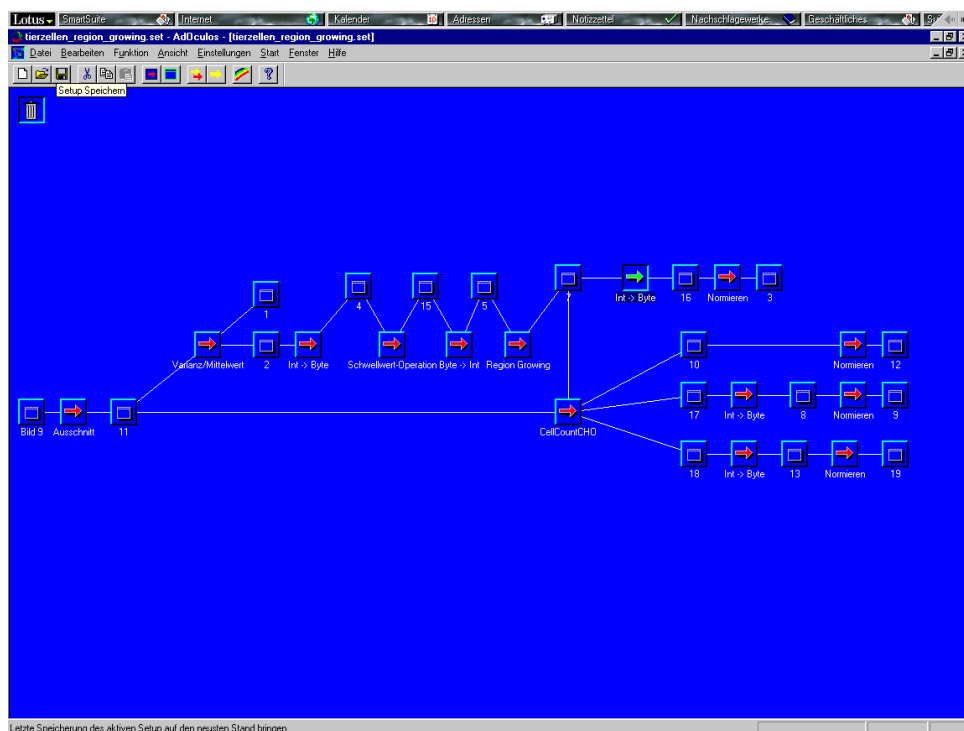


Abbildung 4.21: Implementierung des Bildverarbeitungsverfahrens für Tierzellen in Ad Oculos 3.1.

### 3.2.2.2 Kultivierung von Chinese Hamster Ovary Zellen

Für die Überwachung der Kultivierungen wurden aus den Spinner-Flaschen Proben unter einer Sterilbank Technoflow 2F150-II GS (Integra Biosciences) entnommen. Der Glucose- und Lactatgehalt sowie die Lebend- und Totzellzahl und die Vitalität der Offline-Proben wurden bestimmt. Außerdem wurden von jeder Probe zehn Bilder zur Auswertung mit der Bildverarbeitungssoftware aufgenommen.

Da Lactatgehalte oberhalb von 3 g/L auf Zellen toxisch wirken [Schlaeger et al., 1989] und ein Gehalt von 2 g/L bereits einen wachstumshemmenden Effekt hat [Loa, 1997], wurde bei Lactatgehalten von ca. 1,5 g/L das Kulturmedium gewechselt.

Die Bildanalyse für CHO-Zellen ist an einem Beispiel in Abbildung 4.22 dargestellt. Das Originalbild zeigt Abbildung 4.22 a. Nach Berechnung der lokalen Varianz in jedem Punkt des Originalbildes ergibt sich das Varianzbild gemäß Abbildung 4.22 b. Durch einen globalen Schwellwert wird dieses in mögliche Zellregionen und Hintergrund segmentiert (Abbildung 4.22 c), von kleinen Gebieten befreit und gelabelt (Abbildung 4.22 d). Durch einen zweiten, nun aufgrund der Intensitätsinformation innerhalb der Zellregion gesetzten Schwellwert wird die Zellkontur optimiert (Abbildung 4.22 e).

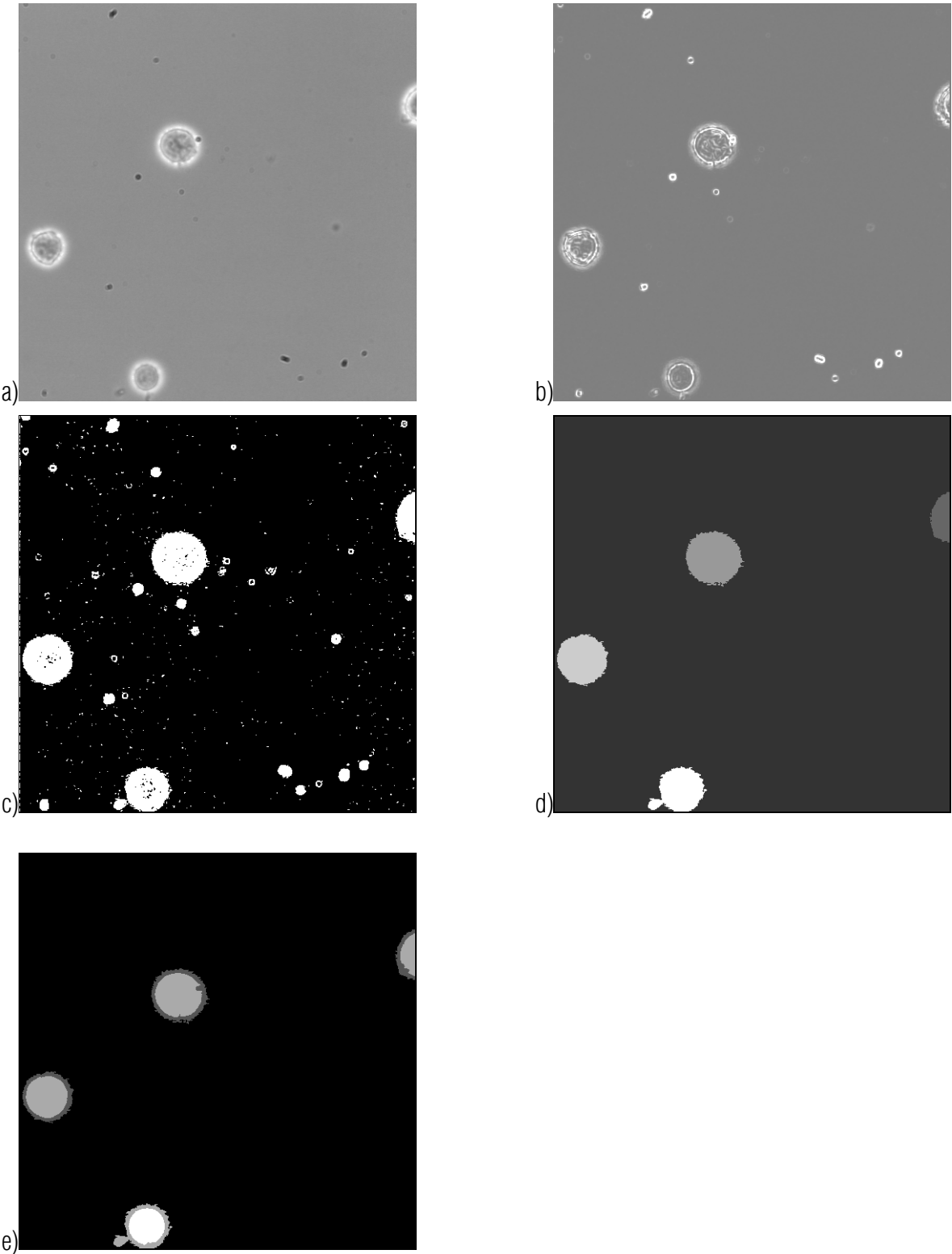


Abbildung 4.22: Verlauf der Bildanalyse am Beispiel einer Bildsequenz von CHO-Zellen in 400-facher Vergrößerung.

### 3.2.2.3 Kultivierung von Baby Hamster Kidney Zellen

Die Bedingungen für die Kultivierungen wurden bereits in Kapitel 3.3 beschrieben. Die Kultivierungen wurden durch Offline-Analytik überwacht. Die Probenahme erfolgte durch Entnahme von einigen Millilitern Kulturmedium unter der Sterilbank Technoflow 2F150-II GS (Integra Biosciences). Es wurden der Glucose- und Lactatgehalt ermittelt sowie die Lebendzellzahl, die Totzellzahl und die Vitalität durch Auszählen der Probe bestimmt. Außerdem wurden mit Hilfe der Bildaufnahmeeinheit jeweils zehn Bilder pro Probe aufgenommen.

Aus dem schon bei den CHO-Zellen erwähnten Grund wurde bei Lactatgehalten über 2 g/L das Kulturmedium gewechselt.

Da die Bildverarbeitungsverfahren für CHO- und BHK-Zellen identisch sind, sei hier auf eine Darstellung des Ablaufs der Bildverarbeitung für BHK-Zellen verzichtet. Bilder von BHK-Zellen, die während dieser Kultivierungen aufgenommen wurden, sind in Kapitel 4.3.4 dargestellt.

### 3.2.2.4 Lebend-tot-Unterscheidung bei ungefärbten Tierzellen

Um bei Tierzellkultivierungen die Vitalität zu bestimmen, werden die Proben mit speziellen Vitalitätsfarbstoffen angefärbt. Der Farbstoff dringt nur in Zellen ein, die eine defekte Zellmembran besitzen, so dass nur nekrotische Zellen angefärbt werden. Apoptotische Zellen, deren Zellmembran nicht defekt ist und die folglich von Vitalitätsfarbstoffen nicht angefärbt werden, müssen anders markiert werden.

Bei der In-situ Mikroskopie ist ein Anfärben der Probe nicht möglich, da die Probe nicht aus dem Reaktor entnommen wird, und die meisten Farbstoffe nicht in den erforderlichen Mengen in einen Online-Prozess eingebracht werden können, da sie auf die Zellen eine toxische Wirkung haben. Ein Ansatz ist, unterschiedliche Merkmale in der Morphologie und der Textur von lebenden und toten Zellen herauszuarbeiten, die es ermöglichen, lebende und tote Zellen ohne Anfärben mit Hilfe von Bildverarbeitungsroutinen voneinander zu unterscheiden.

Als lebend werden im folgenden alle Zellen bezeichnet, die nicht nekrotisch sind, also auch apoptotische Zellen. Diese weisen, obwohl zu den toten Zellen zählend, eine ähnliche Textur auf wie lebende Zellen. Da die untersuchten Kultivierungen einen Vitalitätsgrad von über 97% besitzen, wird der sehr geringe Teil apoptotischer Zellen hier vernachlässigt. Unter toten Zellen sind im folgenden also ausschließlich nekrotische Zellen zu verstehen.

Lebende Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie bei fokussierter Aufnahme von einem hellen Ring umgeben sind, der durch das an der Zellmembran gestreute Mikroskopierlicht entsteht (siehe Abbildungen 4.23 a und 4.24 a). Die Zellmembran ist als glatter dunkler Ring zu erkennen. Im durch die Zellmembran einge-

schlossenen Bereich des Bildes, im folgenden als Zellmitte bezeichnet, gibt es nur geringe Grauwertschwankungen, da die Zelloberfläche glatt ist.

Tote Zellen haben keine glatte Oberfläche, was daran zu erkennen ist, dass die Zellmitte eine geriffelte, unebene Textur aufweist (siehe Abbildungen 4.23 b und 4.24 b). Die Zellmembran ist nicht so glatt wie bei lebenden Zellen. Außerdem ist um die Zellen kein heller Ring zu erkennen. Tote Zellen weisen bei gleicher Beleuchtung eine geringere Helligkeit auf als lebende Zellen. Die entsprechenden Grauwertprofile sind in Abbildung 4.23 c) und 4.23 d) abgebildet. Der mittlere Grauwert des Zellprofils bei der lebenden Zelle ist 213, bei der toten Zelle beträgt er 200.

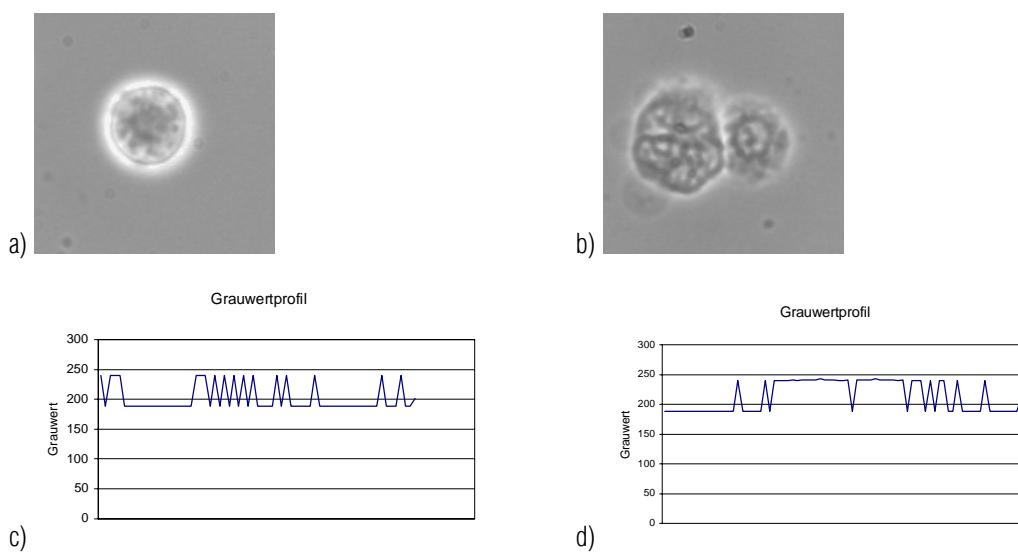


Abbildung 4.23: Bildausschnitte aus Kultivierungsbildern, a) lebende CHO-Zelle, b) zwei tote CHO-Zellen, c) Grauwertprofil zu a), d) Grauwertprofil zu b).



Abbildung 4.24: Bildausschnitte aus Kultivierungsbildern, a) lebende BHK-Zelle, b) tote BHK-Zelle.

Auch der Verlauf der Zellteilung ist anhand morphologischer Zellmerkmale erkennbar (siehe Abbildung 4.25 und Abbildung 4.26). Die sich teilende Zelle besitzt eine erdnusschalenförmige Struktur. Die Form der bei-



den entstehenden Zellen ist während der Teilung zu sehen. Auf der Verbindungsachse ist jedoch noch keine Zellmembran zu erkennen.

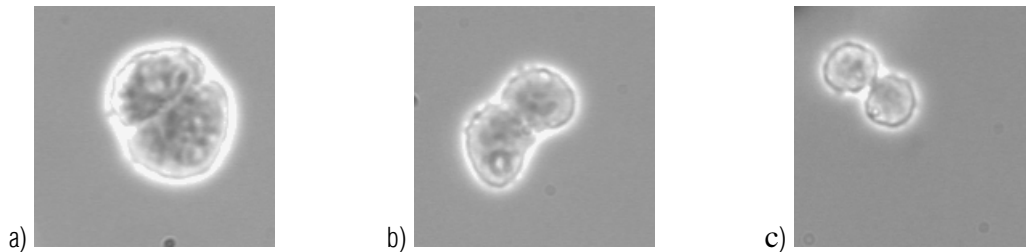


Abbildung 4.25: Bildausschnitte aus Kultivierungsbildern. a) BHK-Zelle zu Beginn der Teilung. Die Zelle beginnt sich an der Teilungsstelle einzuschnüren. b) BHK-Zelle während der Teilung: stärkere Einschnürung, zwei Zellen sind zu erkennen. c) BHK-Zellen am Ende der Teilung: nur noch geringer Kontakt der Einzelzellen.

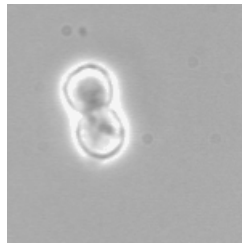


Abbildung 4.26: CHO-Zelle während der Teilung.

Im Gegensatz zu sich teilenden Zellen sind bei zwei Zellen, die sich nur zusammengelagert haben, zwischen den Zellen der helle Ring und die Zellmembranen der einzelnen Zellen erkennbar (siehe Abbildung 4.27).

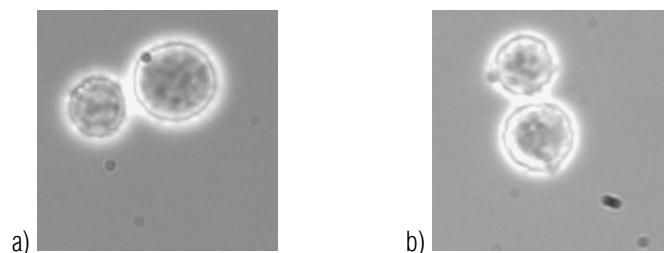


Abbildung 4.27: Bildausschnitte aus Kultivierungsbildern von zusammengelagerten Zellen. a) CHO-Zellen. b) BHK-Zellen.

Morphologische Merkmale der Apoptose können bei den BHK-Zellen beobachtet werden (siehe Abbildung 4.28). Die Zellen zeigen zwar den hellen Ring, den auch lebende Zellen aufweisen, müssen jedoch zu den toten Zellen gezählt werden, da auf der Zellmembran Auswüchse („blebbing“) zu erkennen sind.

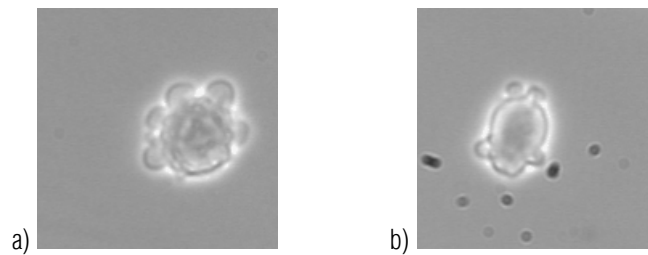


Abbildung 4.28: Apoptotische Morphologie bei BHK-Zellen.

Um die Apoptose anhand solcher morphologischer Merkmale zu identifizieren, müssen noch weitergehende Forschungen betrieben werden. Dazu müsste beispielsweise gezielt Apoptose induziert werden, und die apoptotischen Zellen müssten z.B. durch Anfärben mit Annexin V flow-cytometrisch gezählt werden [Darynkiewicz et al., 1998].

Bei der verwendeten CHO-Zell-Linie sind keine typischen morphologischen Merkmale der Apoptose zu erkennen. Dieses wird bereits in der Arbeit von [Loa, 1997] festgestellt, in der eine Unterscheidung von apoptotischen, nekrotischen und lebenden CHO-Zellen durch Anfärben mit Propidiumiodid und Annexin V im Durchflusszytometer erfolgt [Loa, 1997]. Auch andere Autoren berichten, dass bei CHO-Zellen der nekrotische Zelltod der entscheidende ist [Singh et al., 1994]. In einem weiteren Artikel [Singh et al., 1997] wird festgestellt, dass CHO-Zellen zwar Apoptose eingehen, dass dabei jedoch kein „blebbing“ und kein Auflösen der Zellen in „apoptotic bodies“ zu erkennen ist. Dadurch ist Apoptose bei diesen Zellen nur schwer identifizierbar.

### 3.2.2.5 Gruppenzählversuch zur Lebend-tot-Unterscheidung

Um herauszufinden, ob eine Lebend-tot-Unterscheidung bei CHO-Zellen anhand der beschriebenen Merkmale möglich ist, wurde ein Gruppenzählversuch durchgeführt.

100  $\mu$ L von einer Probe der Spinner-Flaschen-Kultivierung CHO IV wurden mit dem gleichen Volumen von 0,4%-iger Trypan-Blau-Lösung (Sigma Chemical Co., St. Louis) versetzt und in einer Thoma-Kammer aufgetragen. Dann wurden 32 Bilder, ein Bild pro Großquadrat der Zählkammer, offline aufgenommen.

Ein Beispielbild ist in Abbildung 4.29 dargestellt.

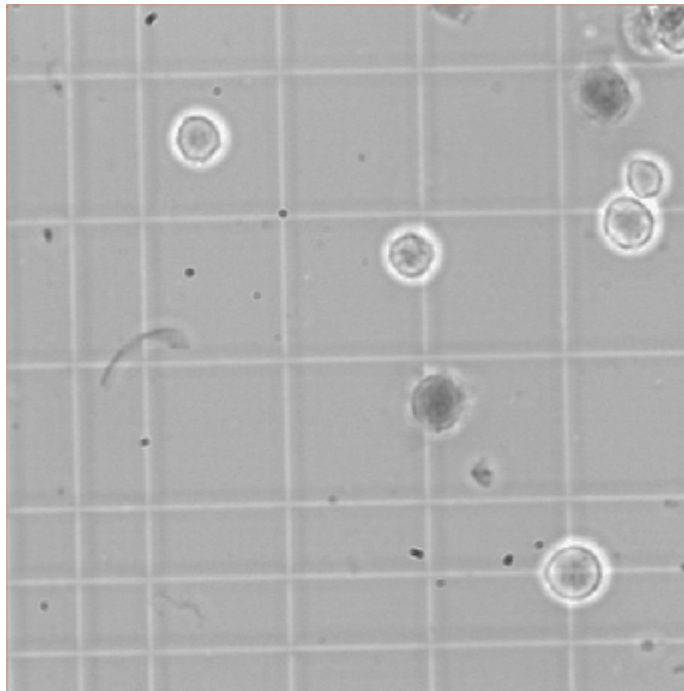


Abbildung 4.29: Ausschnitt aus einem Großquadrat der Thoma-Kammer (Größe:  $24,6 \mu\text{m} \cdot 24,6 \mu\text{m}$ ). Aufgetragen sind mit Trypan-Blau gefärbte CHO-Zellen.

Weitere  $100 \mu\text{L}$  der Probe wurden mit  $100 \mu\text{L}$  0,9%-iger Kochsalzlösung versetzt, um die gleiche Verdünnung zu erreichen, und ebenfalls in einer Thoma-Kammer aufgetragen. Es wurden wiederum 32 Bilder aufgenommen. In Abbildung 4.30 ist ein Beispielbild dargestellt.

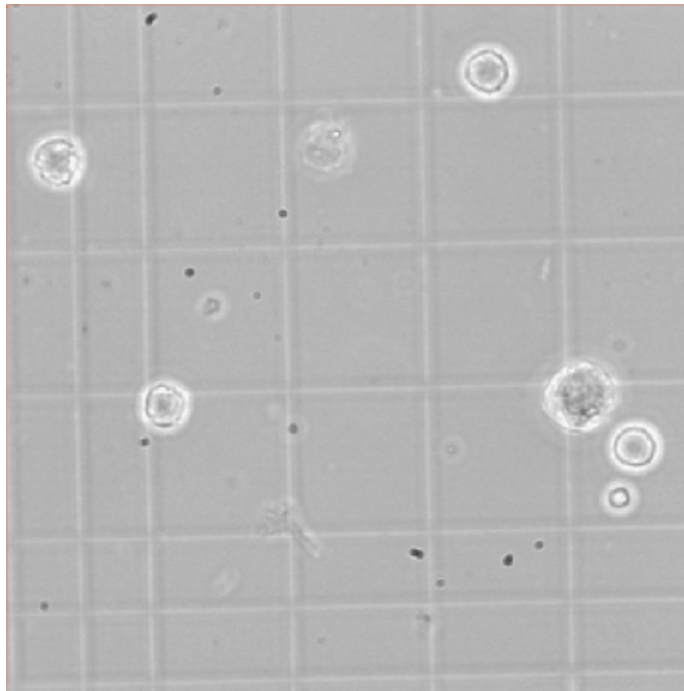


Abbildung 4.30: Ausschnitt aus einem Großquadrat der Thoma-Kammer (Größe:  $24,6 \mu\text{m} \cdot 24,6 \mu\text{m}$ ). Aufgetragen sind CHO-Zellen.

Von 25 Probanden wurden jeweils die lebenden und toten Zellen in den 32 Bildern ausgezählt. Dabei wurden bei der mit Trypan-Blau gefärbten Probe dunkle Zellen als tot und helle Zellen als lebend gezählt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.31 zu sehen. Bei der mit Kochsalzlösung verdünnten Probe wurden die helleren Zellen mit glattem Rand und hellem Ring als lebend, die dunkleren Zellen mit rauer Oberfläche und geriffelter, ungleichmäßiger Textur als tot deklariert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.32 dargestellt.

Eine Unterscheidung zwischen Einzel- und Doppelzellen wurde nicht getroffen. Bei auftretenden Zellclustern wurden die einzelnen erkennbaren Zellen bestmöglich gezählt.

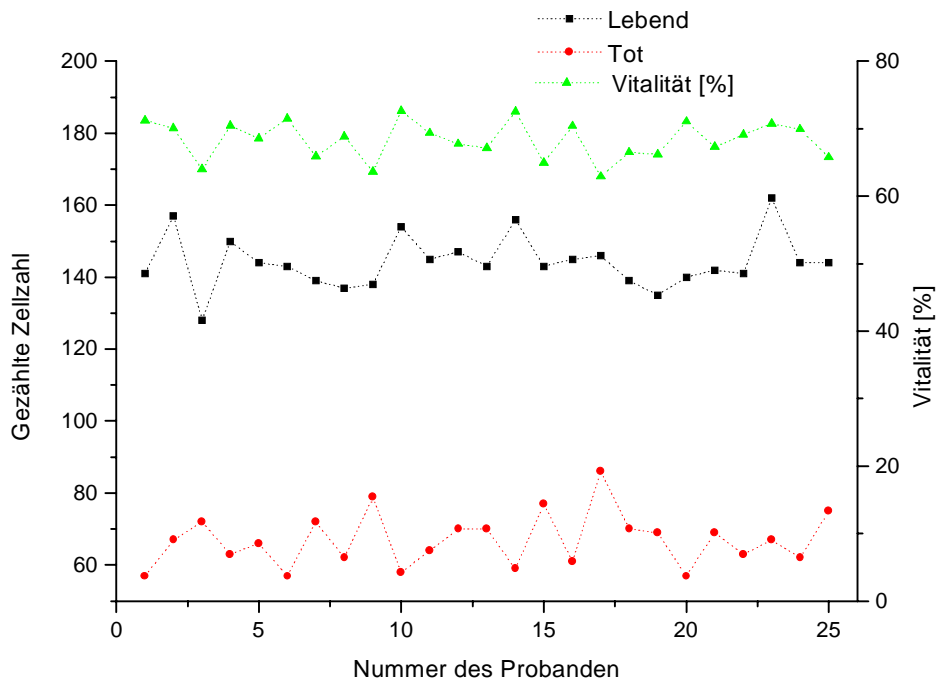


Abbildung 4.31: Auszählresultate der mit Trypan-Blau gefärbten Probe [Schaper, 1999].

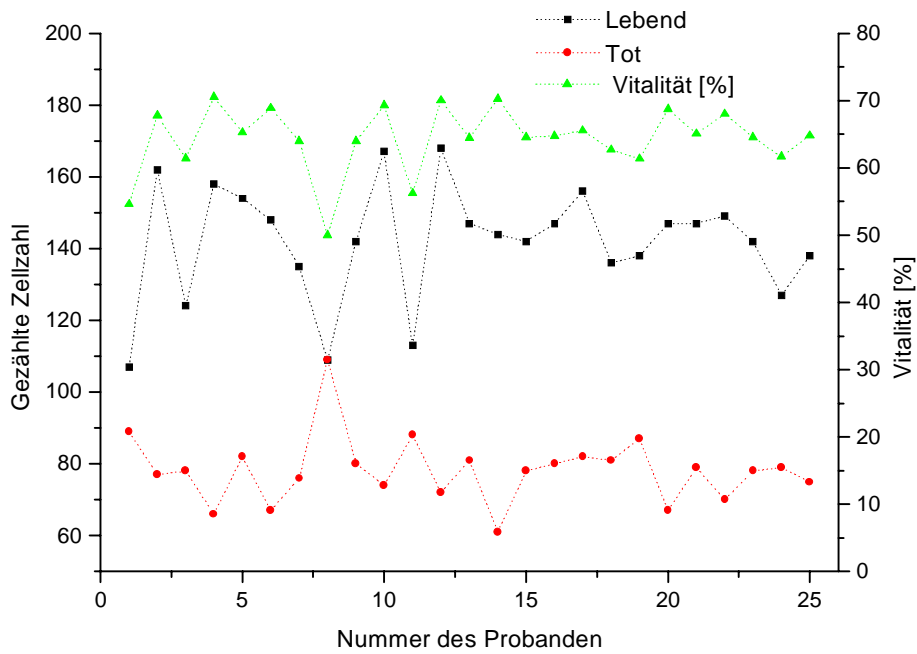


Abbildung 4.32: Auszählresultate der ungefärbten Probe [Schaper, 1999].

Unter Verwendung von Gleichung (4.3) wurde die absolute Abweichung der Vitalitäten voneinander bestimmt.

$$Abweichung[\%] = \left| \frac{Vitalität(gefärbt) - Vitalität(ungefärbt)}{Vitalität(gefärbt)} \right| \cdot 100 \quad (4.3)$$

Die so berechneten Abweichungen sind in Abbildung 4.33 dargestellt.

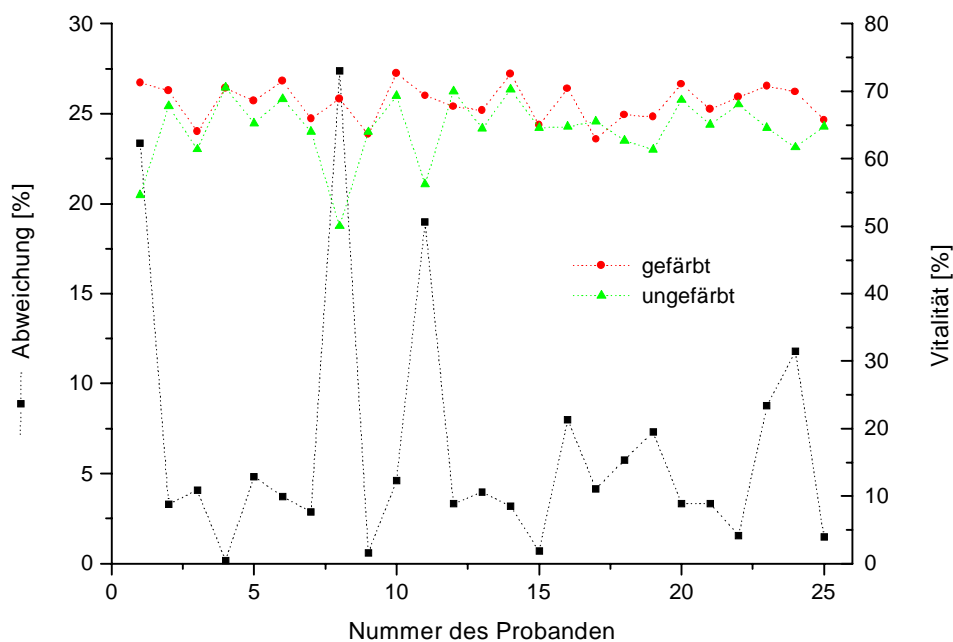


Abbildung 4.33: Absolute Abweichung der Vitalitäten der gefärbten und ungefärbten Proben [Schaper, 1999].

Die durch Auszählen der Bilder mit gefärbten und ungefärbten Zellen bestimmten Vitalitäten stimmen bei 84% der Probanden gut überein. Die Abweichungen betragen dabei bis zu 10%. Lediglich bei den Probanden 1, 8, 11 und 24 kam es zu größeren Abweichungen.

Die beschriebenen Zelltexturmerkmale können also offensichtlich für eine Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen verwendet werden. Allerdings muss noch geprüft werden, ob die Anwendung der charakteristischen Merkmale auch für Proben mit geringerer Vitalität verwendbare Ergebnisse liefert.

Da sowohl bei den Vitalitätsfärbungen als auch bei der Identifizierung anhand der Zelltexturmerkmale apoptotische Zellen als lebend gezählt werden, obwohl sie den toten zuzurechnen sind, ist der entstandene Fehler in der Vitalität der Proben bei beiden Verfahren gleich groß.

### 3.3 Online Versuche mit dem In-situ Mikroskop

#### 3.3.1 Dichtigkeitstests

Um die Dichtigkeit und Passgenauigkeit des In-situ Mikroskops zu überprüfen, wurden Tests mit unterschiedlichen Fermentern durchgeführt. Verwendet wurden dabei 7 L, 15 L und 30 L Fermenter von Applikon (Schiedam, Niederlande), ein 30 L Fermenter der Firma Bioengineering (Basel, Schweiz), sowie ein Biostat C mit 15 L und ein Biostat UD Reaktor mit 30 L Volumen (Braun Biotech International, Melsungen).

Die Biostat C und UD Reaktoren waren mit einer digitalen Mess- und Regeleinheit (DCU, 16-bit Mikrorechner auf VME-Bus Basis) versehen, welche wiederum mit dem auf einem separaten Rechner installierten Prozessleitsystem Ubicon (esd, Hannover) kommunizierte. Die Messdatenerfassung und die Prozesssteuerung erfolgten von diesem externen Rechnersystem aus. Die 7 L und 30 L Applikon Fermenter wurden mit einer proprietären Lösung von Applikon unter Microsoft Windows NT 4.0 betrieben, der 15 L Fermenter ebenfalls unter Microsoft Windows NT 4.0 mit LabView (National Instruments, USA).

Die Untersuchungen an den 7 L und 30 L Applikon Fermentern und an dem 30 L Fermenter von Bioengineering wurden an der RWTH Aachen durchgeführt. Tests mit dem 15 L Applikon Fermenter fanden bei Bayer Corporation, Berkeley, USA, statt. Alle Biostat Fermenter standen am Institut für Technische Chemie zur Verfügung.

Zum Test wurde das In-situ Mikroskop in einen seitlichen Port des jeweiligen Fermenters eingesetzt. Der Fermenter wurde mit destilliertem Wasser gefüllt, bis das Mikroskop mit Flüssigkeit bedeckt war. Der Fermenter wurde verschlossen. Die Temperatur wurde auf 121°C bei einem Druck von maximal 3 bar eingestellt. Diese Parameter wurden für 20 Minuten gehalten. Während dieses Zeitraumes wurde überprüft, ob Flüssigkeit aus dem Mikroskop austrat.

#### 3.3.2 Aufnahmen von Hefezellen

Um den ersten Prototyp des In-situ Mikroskops online zu testen, wurden in einem 15 L Biostat C Fermenter unter Verwendung einer Hefevorkultur vom Stamm *S. cerevisiae* H620 in Schatzmann-Medium (siehe Kapitel 7.3) Zellwachstumsversuche durchgeführt. Die eingestellten Parameter sind in Kapitel 3.1 beschrieben. Dabei wurde hauptsächlich Wert auf das Langzeitverhalten des In-situ Mikroskops sowie die Bildqualität gelegt, weniger auf die quantitativen Ergebnisse des Kultivierungsprozesses. Eine Bildsequenz mit Aufnahmen des In-situ Mikroskops zeigt Abbildung 4.34.



Das erhaltene Bildmaterial ist in der Regel aufgrund des einfachen Aufbaus des In-situ Mikroskops unschärfer als das von einem konventionellen Forschungsmikroskop erhaltenen. Auch ist eine manuelle Nachfokussierung bei einer automatischen Bildaufnahme nicht möglich. Eine Autofokussierung ist bisher nicht implementiert. Trotz des unscharfen Bildmaterials ist aber in der Bildsequenz deutlich das Zellwachstum über den Kultivierungsprozess erkennbar. Eine automatische Auswertung der Kultivierung ist jedoch mit den vorhandenen Bildverarbeitungsverfahren nicht möglich, da das Bild insgesamt zu inhomogen ist. Dieses liegt auch daran, dass die Probenahmezone zu tief ist und die Zellen dadurch in mehreren Ebenen liegen. Dadurch liegen Zellen sowohl innerhalb als auch außerhalb der Fokusebene. An einer Verbesserung der Bildqualität muss noch gearbeitet werden. Dennoch wäre eine Bildanalyse unter Verwendung des vorhandenen Bildmaterials bei einem anderen Ansatz für die Bildauswertung durchaus möglich. Es ist beispielsweise denkbar, nicht jede einzelne Zelle im Bild für sich allein zu betrachten, sondern die Gesamterscheinung eines Zellbildes als Maß für z.B. die Zellkonzentration anzunehmen. So ließe sich zwar keine exakte Zellgrößenverteilung ermitteln, aber zumindest die Zellkonzentration einer Probe.

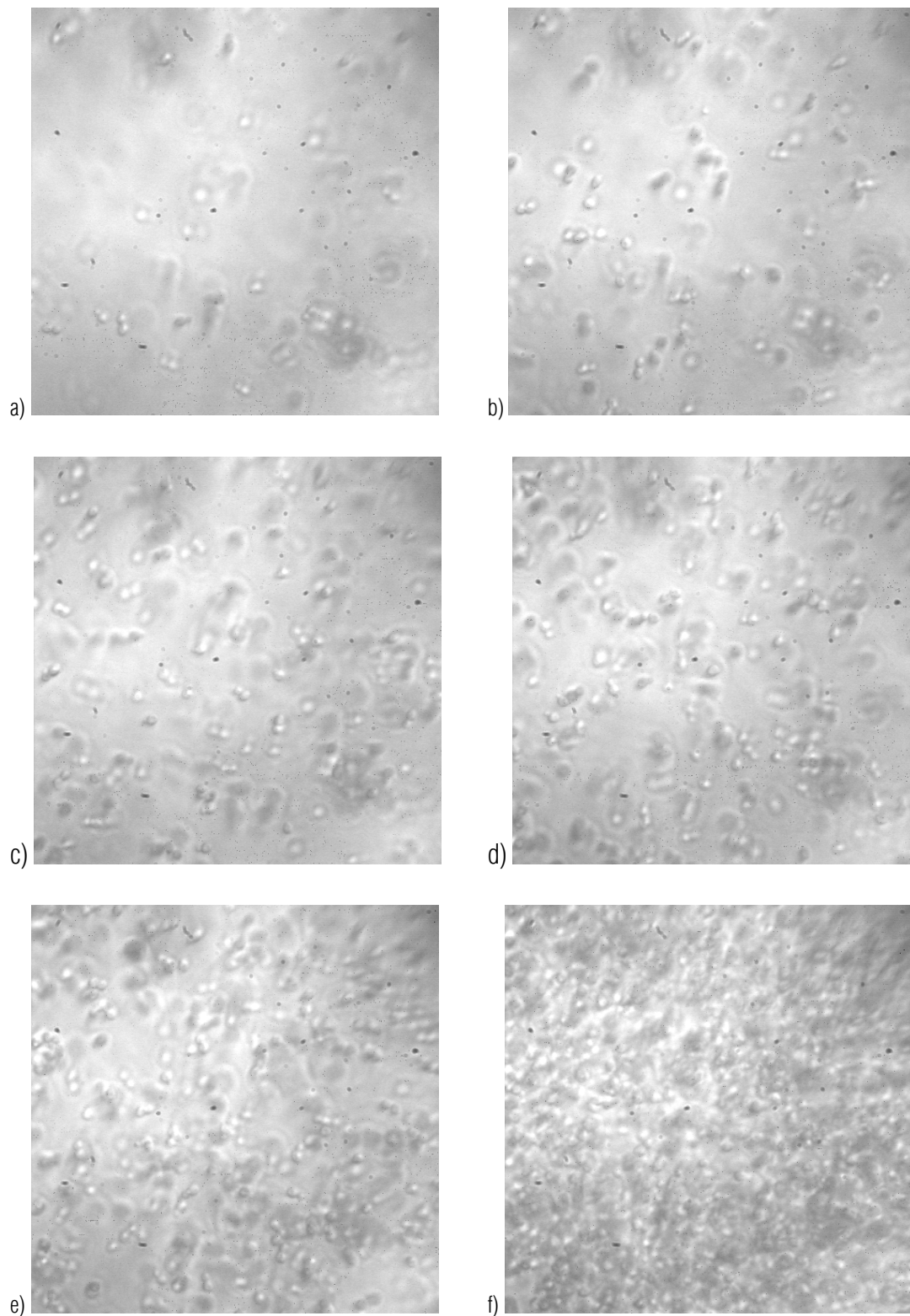


Abbildung 4.34: Bildsequenz einer Hefekultivierung, aufgenommen online mit dem In-situ Mikroskop nach a) 10 Stunden, b) 12 Stunden, c) 13 Stunden, d) 14 Stunden, e) 15 Stunden und f) 19 Stunden Kultivierungsdauer.

### 3.3.3 Aufnahmen von CHO-Zellen

Eine Aufnahme von CHO-Zellen mit dem ersten Prototyp des In-situ Mikroskops zeigt Abbildung 4.35. Sie stammt von einer offline genommenen Probe, da aus technischen Gründen eine Tierzellkultivierung in einem Fermenter der notwendigen Größe nicht möglich war. Für eine entsprechende Kultivierung war die Verwendung eines Fermenters mit mindestens 10 L Arbeitsvolumen erforderlich, der zu diesem Zeitpunkt nicht zur Verfügung stand. Zum Vergleich der Bildqualität ist rechts die Aufnahme mit einem konventionellen Forschungsmikroskop Olympus IX-50 (Olympus, Japan) dargestellt.

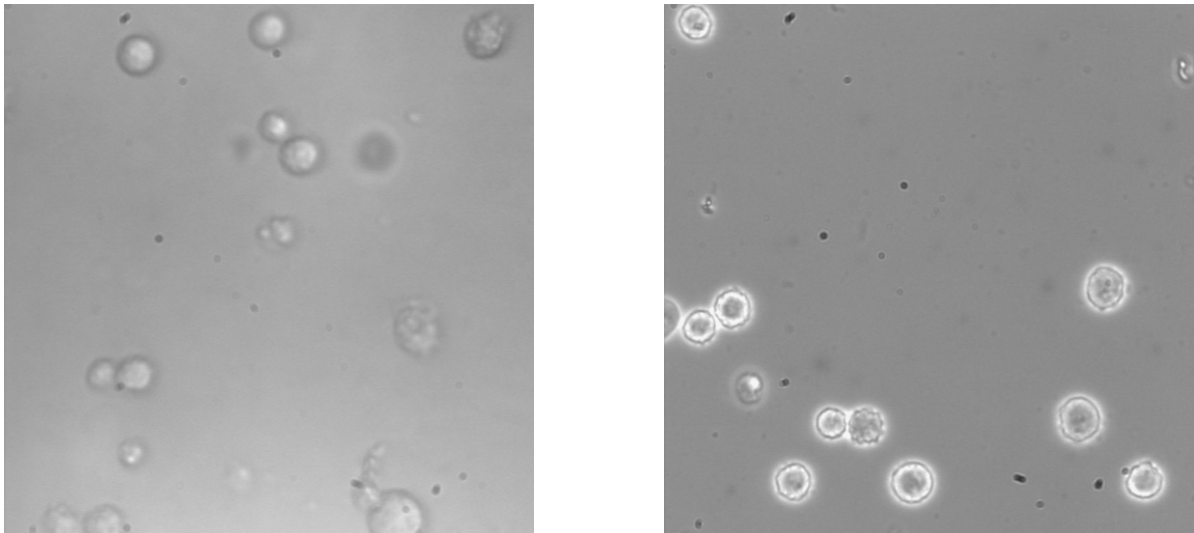


Abbildung 4.35: Aufnahmen von CHO-Zellen: links mit dem In-situ Mikroskop, rechts zum Vergleich mit einem konventionellen Forschungsmikroskop. Die Zellkonzentration beträgt  $5 \cdot 10^5$  Zellen/mL.

Die Ausleuchtung des Bildbereiches ist bei dem In-situ Mikroskop insgesamt sehr gut. Lediglich die Bildschärfe ist noch nicht optimal. Dieses ist auf einen zu langen Strahlengang des In-situ Mikroskops zurückzuführen. Auch ist der Kontrast bei dem Forschungsmikroskop deutlich besser.

### 3.3.4 Aufnahmen von BHK-Zellen

Während der Entwicklung des In-situ Mikroskops wurden zunächst Bilder von BHK-Zellkultivierungen offline akquiriert und mit dem vorhandenen Forschungsmikroskop IX-50 zeitgleich aufgenommenen Bildern verglichen. Ein Beispiel für diese Bilder ist in Abbildung 4.36 dargestellt.

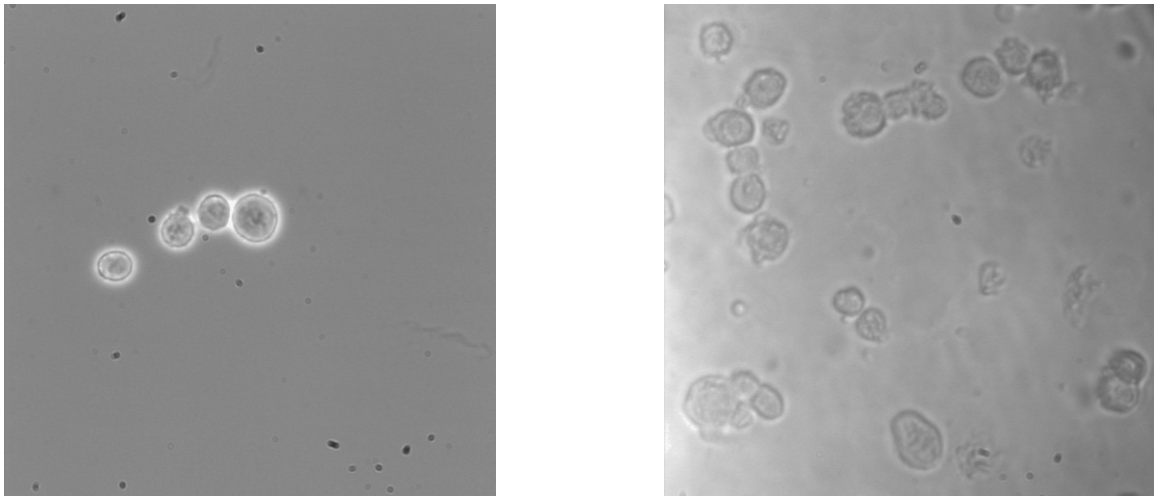


Abbildung 4.36: Aufnahmen von BHK-Zellbildern mit dem Forschungsmikroskop Olympus IX-50 (links) und mit dem In-situ Mikroskop (rechts).

Weitere Aufnahmen von BHK-Zellen unter Verwendung des In-situ Mikroskops zeigt Abbildung 4.38. Diese Aufnahmen entstanden während eines Aufenthaltes bei Bayer Corporation, Berkeley, USA. Die Bilder repräsentieren Untersuchungen an einer Verdünnungsreihe, die unter realen Bedingungen durchgeführt wurde. Wie bereits erwähnt, war das In-situ Mikroskop in diesem Fall aus technischen Gründen nicht direkt in den Fermenter eingesetzt, sondern wurde in einem Bypass betrieben, siehe Abbildung 4.37.

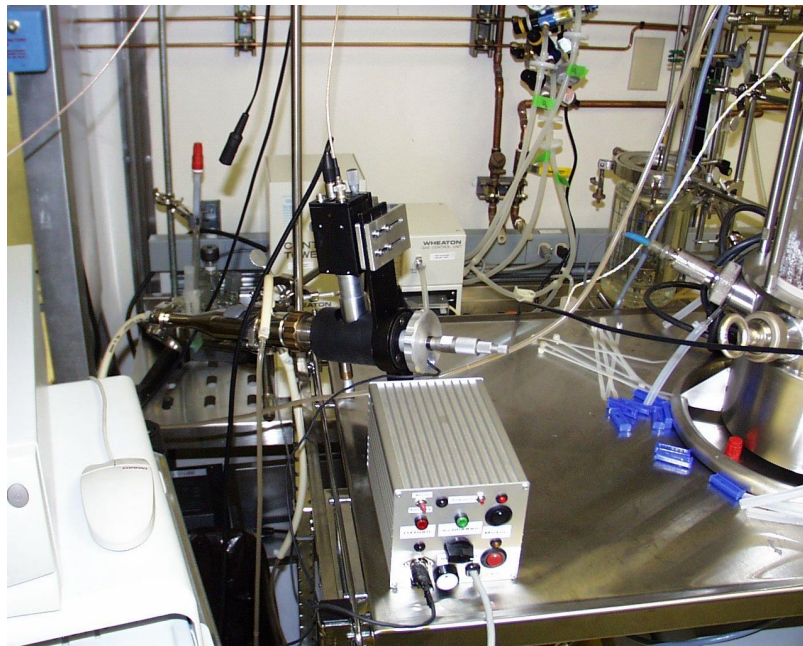


Abbildung 4.37: Erster Prototyp des In-situ Mikroskops, eingesetzt in einen Bypass.

Die Zellen sind auch hier gut zu erkennen. Im Hintergrund des Bildes befindet sich ein defokussierter größerer Dreckpartikel, der eine korrekte Bildanalyse erschwert. Solche Probleme entstehen u.a. auch dann, wenn Zellen an den Glasflächen von dem Objektträger oder dem Deckglas anhaften. In diesen Fällen muss eine manuelle Reinigung der Probenahmezone erfolgen. Ab einer Zellkonzentration von ca.  $10^7$  Zellen/mL liegen die Zellen zu dicht zusammen. Daher ist eine Detektion einzelner Zellen mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Bildverarbeitungsverfahren nicht mehr möglich.

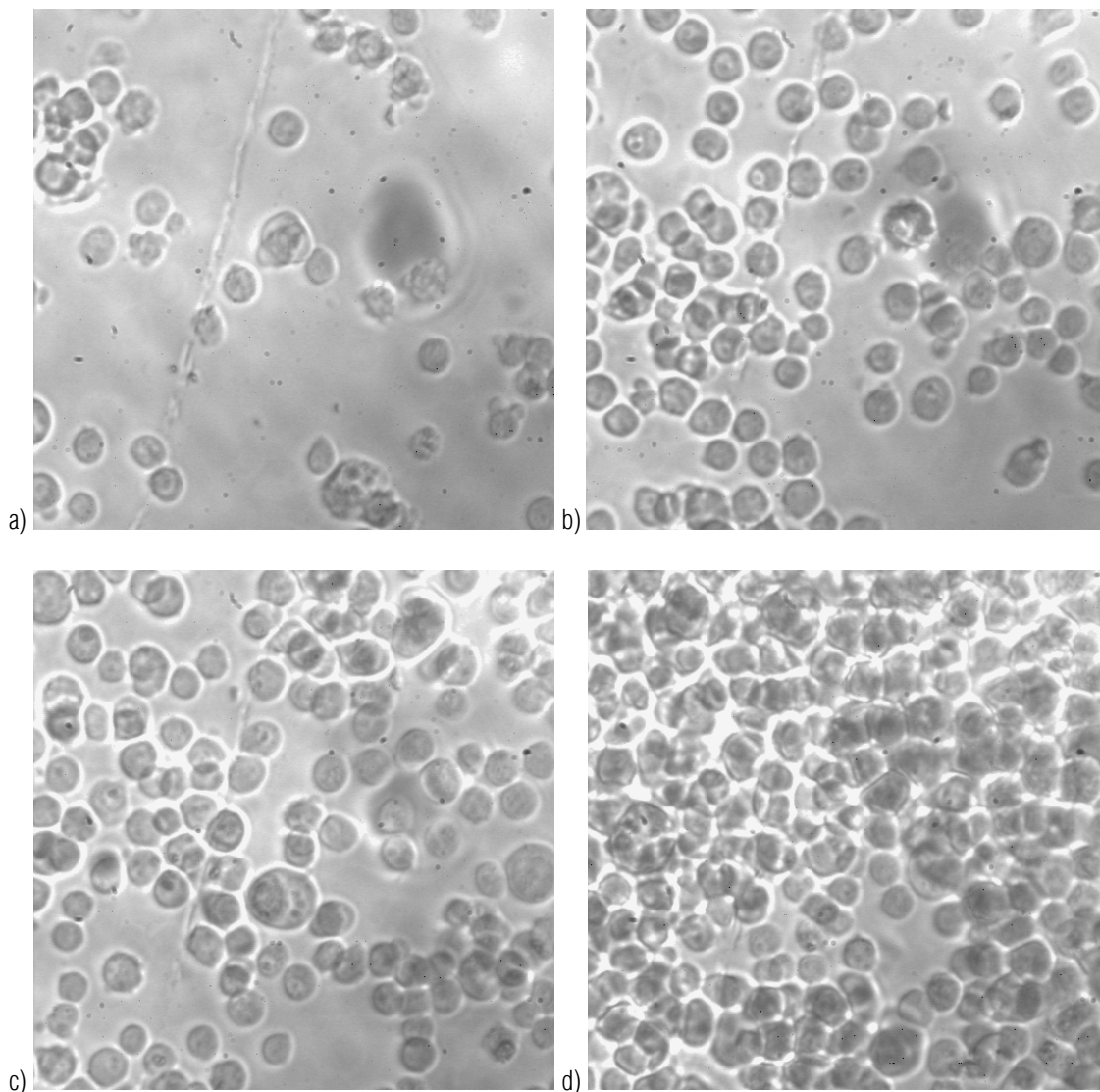


Abbildung 4.38: Aufnahmen von BHK-Zellen. Zellkonzentrationen: a)  $1 \cdot 10^6$  Zellen/mL, b)  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen/mL, c)  $5 \cdot 10^6$  Zellen/mL, d)  $1 \cdot 10^7$  Zellen/mL.

Anhand dieser Aufnahmen soll auf die auftretende Problematik bei der Verwendung eines zu großen Probenahmevolumens eingegangen werden. Im vorliegenden Fall (Abbildung 4.39) hat die Probenahmezone eine Tiefe von ca. 100  $\mu\text{m}$ . Daher besteht bei Tierzellen mit einem Durchmesser um ca. 20  $\mu\text{m}$  die Möglichkeit, dass Zellen innerhalb dieser Probenahmezone in verschiedenen Ebenen übereinander zu liegen kommen. Daher ist es sinnvoll, die Höhe der Probenahmezone an die Größe des zu beobachtenden Organismus anzupassen.

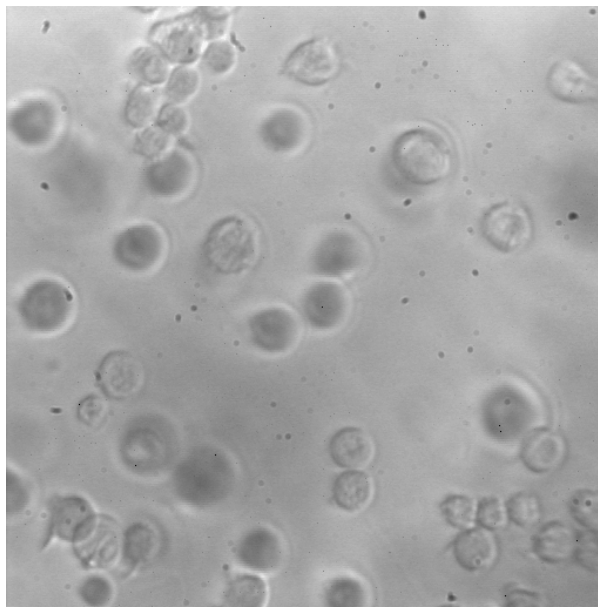


Abbildung 4.39: BHK-Zellbild, aufgenommen mit dem In-situ Mikroskop. Erkennbar sind die verschiedenen Zellebenen innerhalb der zu tiefen Probenahmezone.

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

### 4.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde mit der In-situ Mikroskopie ein Verfahren vorgestellt, das es erlaubt, Bioprozesse online und in-situ zu überwachen und zu steuern. Dazu wird ein spezielles, sogenanntes In-situ Mikroskop verwendet, das in Verbindung mit einer CCD-Kamera und einem Framegrabber Bilddaten zur Verfügung stellt, die mit geeigneten Bildverarbeitungsverfahren auf einem Personal Computer ausgewertet werden können. In dieser Arbeit wurden Untersuchungen an Hefezellen (*S. cerevisiae*) und Tierzellen (CHO- und BHK-Zellen) vorgenommen. Durch Anpassung der Optik und des Bildverarbeitungsverfahrens ist die In-situ Mikroskopie an andere Problemstellungen adaptierbar.

In-situ Messungen sind Methoden, bei denen das Mess-Signal direkt im Reaktor erfasst wird [Dremel et al., 1992]. Daher muss der verwendete Sensor sterilisierbar sein und über eine Sterilbarriere verfügen. Mit Hilfe der In-situ Mikroskopie ist es möglich, den Kultivierungsverlauf einer Fermentation online zu überwachen. Dabei sind sowohl für Tier- als auch für Hefezellen Aussagen über folgende Zellcharakteristika möglich:

- Zellkonzentration
- Zellgrößenverteilung
- Einzel-, Doppelzellen oder Zellcluster
- Zelltextur bei Tierzellen
- Zellvitalität bei Tierzellen

Es ergeben sich folgende Vorteile gegenüber konventionellen Offline-Verfahren:

- Ermüdungsfrei
- Sehr schnell im Vergleich zur Zellzahlbestimmung über die Biotrockenmasse
- Probenahmezone im Reaktionsraum
- Gefahr einer Kontamination der Kulturflüssigkeit entfällt
- Fehler des Personals werden vermindert

Besonderer Wert wurde im Rahmen dieser Arbeit auf die technische Realisierbarkeit und die Möglichkeit des industriellen Einsatzes des gesamten Systems gelegt. Sämtliche mit dem Inneren des Fermenters in Kontakt tretenden Teile sind heißdampfsterilisierbar bzw. autoklavierbar. Alle äußeren empfindlichen Teile, beispielsweise die Optik des Mikroskops und die CCD-Kamera, sind vor der Sterilisation leicht entfernbar. Alle Komponenten sind durch Schraubverbindungen miteinander verbunden, es existieren keine Klebeverbindungen. Die Probenahmezone ist von außen zugänglich und einfach zu reinigen. Da keine Spezialbauteile verwendet werden, ist das In-situ Mikroskop verglichen mit z. B. einem Durchflusszytometer relativ preiswert. Das In-situ Mikroskop ist modular aufgebaut. Die Vergrößerung beispielsweise kann durch Austausch der Optik an den zu beobachtenden Mikroorganismus angepasst werden. Zurzeit wird eine Durchlicht-Hellfeld Beleuchtung eingesetzt. Die Verwendung anderer Optiken und Beleuchtungsverfahren ist denkbar.

Entwicklung der Mikroskop-Hardware und der Bildverarbeitungssoftware mussten aufgrund des großen Zeitbedarfs für die Konstruktion parallel ablaufen. Daher wurden zunächst offline Proben der zu beobachtenden Modellorganismen aufgenommen. Von diesen wurden mit einem kommerziellen Forschungsmikroskop Bilder akquiriert, um erste Daten für die Bildverarbeitungsalgorithmen zu bekommen.

Das so gewonnene Bilddatenmaterial ist jedoch nicht mit den realen Bildern eines In-situ Mikroskops vergleichbar. Diese besitzen eine deutlich niedrigere Qualität, da Bildschärfe und Ausleuchtung des Bildbereiches beim In-situ Mikroskop noch nicht optimal sind. Hier sind noch Verbesserungen notwendig. Dennoch zeigen die Online-Experimente mit dem In-situ Mikroskop das große Potential dieser Methode, da auch die für eine automatische Bildanalyse mit den hier verwendeten Verfahren nicht ausreichende Bildqualität dennoch bereits einen guten Eindruck vom Verlauf des Zellwachstums während des Kultivierungsprozesses liefert.

Ein noch näher zu untersuchender Parameter ist die optimale Größe der Probenahmezone. Hier ist eventuell die Realisierung einer variablen Probenahmezone notwendig, damit Zellkonzentrationen über einen größeren Bereich beobachtet werden können. Bei geringeren Zellkonzentrationen wird eine größere Probenahmezone benötigt, um mehr Medium für die Beobachtung aufnehmen zu können. Bei höheren Zellkonzentrationen hingegen ist eine kleinere Zone vorteilhaft, damit nicht zu viele Zellen im Bildausschnitt sichtbar sind.



## 4.2 Ausblick

### 4.2.1 Autofokussierung

Für die weitere Entwicklung des Mikroskops ist die Erweiterung um ein Autofokussystem geplant. Dieses ist sinnvoll, da durch das wiederholte Auf- und Zufahren der Probenahmezone ständig eine geringe Defokussierung eintritt. Das Autofokussystem besteht aus einer Hardware-Software Kombination. Ein Schrittmotor fährt dabei verschiedene Ebenen innerhalb der Probenahmezone an. In jeder Ebene wird ein Bild aufgenommen und aus allen Bildern ein Schärfeprofil erstellt, aus dem sich dann die optimale Schärfeneinstellung ermitteln lässt. Für das dazu auszuwertende Kriterium gibt es unterschiedliche Ansätze, z.B. die Auswertung des Bildkontrastes, der Bildschärfe, der Summe der Quadrate eines Bildgradienten oder die Bearbeitung mit einem Laplace-Filter [Wilkinson et al.; 1998].

### 4.2.2 Schließmechanismus der Probenahmezone

Des Weiteren ist angedacht, den bisher elektrischen Schließmechanismus durch eine Druckluftsteuerung zu ersetzen, die wesentlich kompakter realisiert werden kann. Dadurch wird ein Einbau auch in kleineren Fermentern möglich. Außerdem befinden sich dann keine elektrischen Komponenten im Fermenterinnenraum.

### 4.2.3 Internetanbindung

Um die Steuerung und Kontrolle des Mikroskops auch dezentral zu ermöglichen, soll eine Internet-basierte Kontrollsoftware entwickelt werden. Damit ist eine komplette Trennung von Bildaufnahme und Bildverarbeitung möglich. Die Bildverarbeitung kann vollständig außerhalb des Laborbereichs erfolgen. Außerdem könnten Kultivierungsprozesse weltweit beobachtet und diskutiert werden [Parvin et al., 1996].

### 4.2.4 Verbesserte Texturanalyse

Insbesondere die Leistungsfähigkeit des Bildverarbeitungsverfahrens für Tierzellen lässt sich durch eine Verfeinerung der Texturanalyse noch weiter steigern. Als Ansatz sei an dieser Stelle nur die Verwendung fraktaler Texturmerkmale angedacht, die bei der Analyse weniger hochwertiger Bildaufnahmen bereits in mehreren Anwendungsfällen zu vielversprechenden Ergebnissen führten [Wu et al., 1993].

Insgesamt stellt die In-situ Mikroskopie ein vielversprechendes, robustes, zuverlässiges und zukunftsweisendes Verfahren zur online Beobachtung von Prozessen direkt im Bioreaktor dar.

## 5 Literaturverzeichnis

Bässmann, H. et al.; „Bildverarbeitung Ad Oculos“; Springer 1998, 3. Auflage

Beuse et al.; „Effect of dilution rate on the mode of oscillation in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*“; Journal of Biotechnology, Vol. 61, 1998; S. 15-31

Beyer et. al.; „Handbuch der Mikroskopie“; VEB Verlag Technik, Berlin 1988, 3. Auflage

Bitterle et al.; „Messdatenerfassung und -verarbeitung mit dem PC“; Franzis Verlag 1993

Bittner, C.; „In-situ Mikroskopie: Ein neues Verfahren zur On-line Bestimmung der Biomasse bei Kultivierungsprozessen“; Universität Hannover, Dissertation 1994

Bittner, C. et al.; „In-situ Microscopy for On-line Determination of Biomass“; Biotechnology and Bioengineering; Vol. 60 No. 1, 1998; S. 24-35

Bock, H.; „Automatische Klassifikation“; Vandenhoeck und Ruprecht 1974, S. 250 ff.

Darzynkiewicz, H. et al.; „Measurement of Apoptosis“; Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology; Vol. 62, Springer 1998

Diekmann, H. et al.; „Grundlagen und Praxis der Biotechnologie“; Gustav Fischer Verlag 1992

Dremel, B. B. A. et al.; „Optische Sensoren für die Bioprozeß-Kontrolle“; Chemie-Ingenieur-Technik 64, 1992; S. 510-517

Frerichs J.-G.; „Entwicklung von Bildverarbeitungsroutinen für die Insitumikroskopie bei Mikroorganismen“; Diplomarbeit, Universität Hannover 1997

Gerlach, D.; „Das Lichtmikroskop“; Georg Thieme Verlag 1985, 2. Auflage

Göke, G.; „Moderne Methoden der Lichtmikroskopie“; Franckh 1988

Haberäcker, P.; „Praxis der Digitalen Bildverarbeitung und Mustererkennung“; Hanser Verlag 1995

Hänsel et al.; „Physik: Elektrizität, Optik, Raum und Zeit“; Spektrum Akademischer Verlag 1993

Hüners, M.; „Einfluss glykolytischer und proteolytischer Enzyme auf die Antithrombin III-Aktivität einer rekombinanten Säugerkultur“; Diplomarbeit, Universität Hannover 1996

Jacobson, M.D.; „Programmed Cell Death in Animal Development“; Cell; Vol. 88, 1997, S. 347-354

Jaggi, B. et al.; „A Quantitative Microscope for Image Cytometry“; Proceedings of SPIE; Vol. 1448; Camera and Input Scanner Systems; S. 89-97

Joeris, K.; „Ortsaufgelöste Untersuchung von Stofftransportprozessen über fluide Phasengrenzen mittels laserinduzierter Fluoreszenz“; Dissertation, Universität Hannover 1999

Kainka, B.; „Wie misst und steuert man mit dem PC?“; Franzis Verlag 1997

Kittler, J. et al.; „Minimum Error Thresholding“; Pattern Recognition; Vol 19, No. 1, 1986; S. 41-47

Konstantinov, K. et al.; „Real-time biomass-concentration monitoring in animal-cell cultures“; Tibtech, Vol.12, Elsevier 1994

Kurita, T. et al.; „Maximum Likelihood Thresholdings Based On Population Mixture Models“; Pattern Recognition; Vol. 25, No. 10, 1992; S. 1231-1240

Liedtke, C.-E et al.; „Wissensbasierte Bildverarbeitung“; Springer 1987

Loa, A.; „Untersuchung über die Auswirkung verschiedener Parameter auf die Kultivierung von CHO-Tf70R-Suspensionszellen in Batch-Kulturen und Chemostaten“; Diplomarbeit, Universität Hannover 1997

Lodish, H.; et al.; „Molekulare Zellbiologie“; Walter de Gruyter Verlag 1996, 2. Auflage

Marose, S.; „Bioprocessanalytik mit zweidimensionaler Fluoreszenzspektroskopie“; Dissertation, Universität Hannover 1999

Meiners, M.; „Biotechnologie für Ingenieure: Grundlagen-Verfahren-Aufgaben-Perspektiven“; Vieweg 1990

Michel, K.; „Die Grundzüge der Theorie des Mikroskops“; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft 1981, 3. Auflage

Niemann, H.; „Pattern Analysis and Understanding“; 2nd Edition; Springer 1989

Otsu, N.; „A Threshold Selection Method From Gray-Level Histograms“; IEEE Transactions on Systems, Man, And Cybernetics; Vol. SMC-9, No. 1, 1979; S. 62-66

Parvin, B. et al.; „Telepresence for In-situ Microscopy“; IEEE Proceed. of the International Conference on Multimedia Computing & Systems; 1996, S. 481-487

Phaff, H.J.; „Industriell nutzbare Mikroorganismen“; Spektrum der Wissenschaft 11, 1981

Pluta, M.; „Advanced Light Microscopy Vol. 1-3“; Elsevier 1988

Pons, M.N. et al.; „Morphological Characterization of Yeast by Image Analysis“; Biotechnology and Bioengineering; John Wiley and Sons; Vol. 42, 1993; S. 1352-1359

Pons, M.N. et al.; „Study of *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Cells by Field Flow Fractionation and Image Analysis; Separation Science and Technology, Vol. 32 (9), 1997, S. 1477-1492

Russ, J.C.; „Digital Image Processing“; CRC Press 1992

Schaper, J.; „Prozessüberwachung mit Hilfe von Insitumikroskopie“; Diplomarbeit, Universität Hannover 1999

Scheper, T.; „Messung zellinterner und zellexterner Parameter zur Fermentationskontrolle“; Dissertation, Universität Hannover 1985

Schlegel, H.G.; „Allgemeine Mikrobiologie“; Georg Thieme 1992

Schläger et al.; „Studies on Mammalian cell growth in suspension culture“; Advances in Animal Cell Biology and Technology for Bioprocesses, 1989; S. 386-396

Schneider, K.; „In-situ Mikroskopie: Entwicklung und Einsatz eines Auflicht-Fluoreszenz Sensors zur Bestimmung der Zellkonzentration in Bioprocessen“; Dissertation, Universität Hannover 1995

Scholz, T.J.; „Ein Depth from Focus Verfahren zur On-line Bestimmung der Zellkonzentration bei Fermentationsprozessen“; Dissertation, Universität Heidelberg 1995

Singh, R.P. et al.; „Apoptosis and its control in cell culture systems“; Cytotechnology 23, 1997; S. 87-93

Singh, R.P. et al.; „Cell Death in Bioreactors: A Role for Apoptosis“; Biotechnology and Bioengineering; Vol. 44, 1994; S.720-726

Suhr, H.; „In-situ Mikroskopsonde und Messverfahren“; Patentschrift DE 40 32 002 C2, 22.05.1997

Suhr, H.; „In-situ Mikroskopsonde für die Partikelmesstechnik“; Offenlegungsschrift DE 197 26 518 A1, Offenlegungstag: 04. 02. 1999

Thieser, M.; „PC-Schnittstellen“; Franzis Verlag 1993

Vecht-Lifshitz, S. et al.; „Biotechnological Applications of Image Analysis: Present and Future Prospects“; Journal of Biotechnology; Vol. 23, 1992; S. 1-18

Westerkamp, D.: „Optimierung von interpretierbaren Merkmalsätzen zur Klassifikation von Zellbildern“; Diplomarbeit, Universität Hannover 1992

Wheals, A.E.; „Biology of the Cell Cycle in Yeasts“; The Yeasts, Academic Press Inc.; Vol. 1, 1987

Wierzba, A. et al.; „Adhesion of Mammalian Cells to a Recombinant Attachment Factor, CDB/RGD, Analyzed by Image Analysis“; Biotechnology and Bioengineering; John Wiley and Sons; Vol. 46, 1995; S. 185-193

Wilkinson et al.; „Digital Image Analysis of Microbes“; Wiley & Sons 1998

Wu, K. et al.; „Live Cell Image Segmentation“; IEEE Transactions on Biomedical Engineering; Vol. 42 No. 1, 1995; S. 1-12

Wu, C. et al.; „Multi-Threshold Dimension Vektor for Texture Analysis and its Application to Liver Tissue Classification“; Pattern Recognition Vol. 26, No. 1, 1993; S. 137-144

Wyllie, A.H. et al.; „Cell Death: The Significance of Apoptosis“; International Review of Cytotechnology; Vol. 68, 1980; S. 251-306

Zalewski, K.: „Entwicklung eines Bildanalyse-Systems zur on-line Charakterisierung von Hefesuspensionen“ VDI Verlag 1995, Reihe 17: Biotechnik, Nr. 127

Zalewski, K et al.: „Morphological Analysis of Yeast Cells Using an Automated Image Processing System“; Journal of Biotechnology Vol. 48, 1996; S. 43-49

## 6 Anhang

### 6.1 Verwendete Formelzeichen

$B$	Zellbild
$C_\varphi$	Klasse $\varphi$ , $\varphi=1,2$
$D$	Verdünnungsrate
$d_B, g$	Grauwert im Zellbild
$\bar{g}$	Mittlerer Grauwert im Zellbild
$g^{\min, \max}$	Maximaler und minimaler Grauwert im Zellbild
$h(d_B), h(g)$	Grauwert histogramm des Zellbildes
$L$	Anzahl der Grauwerte des Zellbildes
$M$	Maskengröße
$M_{ob}$	Objektiv-Vergrößerung
$\mu_\varphi$	Mittelwert einer Klasse $\varphi$
$n$	Anzahl der Zellteilungen
$n_b$	Brechungsindex
$N$	Anzahl der Bildelemente (Pixel) des Zellbildes
$N_0$	Zellzahl zum Zeitpunkt $t=0$
$N_t$	Zellzahl zum Zeitpunkt $t$
$P_\varphi$	Auftretenswahrscheinlichkeit einer Klasse $\varphi$
$p(d_B)$	Wahrscheinlichkeitsverteilung der Grauwerte des Zellbildes
$p(d / Z)$	Bedingte Auftretenswahrscheinlichkeit
$p(d, Z)$	Verbundwahrscheinlichkeit
$\Theta_\varphi$	Parametervektor
$\sigma_\varphi$	Standardabweichung einer Klasse $\varphi$
$th$	Schwellwert
$V_M$	Mikroskopvergrößerung
$V_{Ok}$	Okularvergrößerung
$Z_\eta = (z_{1\eta}, z_{2\eta})$	Klassifizierungsvektor für ein Bildelement $\eta=1\dots N$

## 6.2 Verwendete Abkürzungen

BHK	Baby Hamster Kidney
CCD	Charged Coupled Device
CHO	Chinese Hamster Ovary
DCU	Digital Control Unit
ISA	Industrial Standard Architecture
LED	Light Emitting Diode
NA	Numerische Apertur
PCD	Programmed Cell Death
RISP	Real-time Integration Software Platform
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett

### 6.3 Schatzmann-Medium

Das Schatzmann-Medium [Scheper, 1985] ist ein vollsynthetisches Medium folgender Zusammensetzung:

Mineralien:

MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,34 g/L
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,42 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,5 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,9 g/L
KCl	0,9 g/L
Na-Citrat	5,9 g/L

Spurenelemente:

FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	15 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	9 mg/L
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	10,5 mg/L
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	2,4 mg/L

Vitamine:

m-Inosit	60 mg/L
Ca-Pantothenat	30 mg/L
Thiamin · HCl (Vitamin B 1)	6 mg/L
Pyridoxol · HCl (Vitamin B 6)	1,5 mg/L
Biotin (Vitamin H)	30 µg/L

Kohlenstoffquelle:

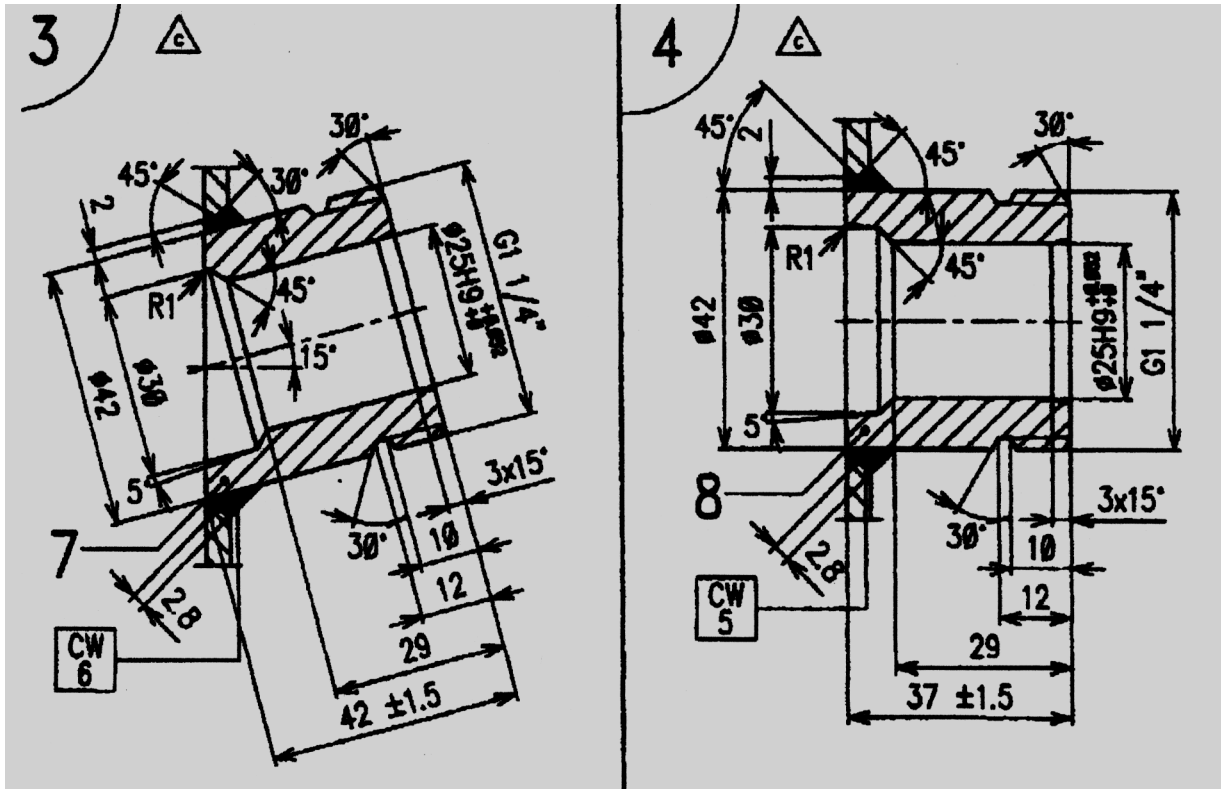
Glucose	30 g/L
---------	--------



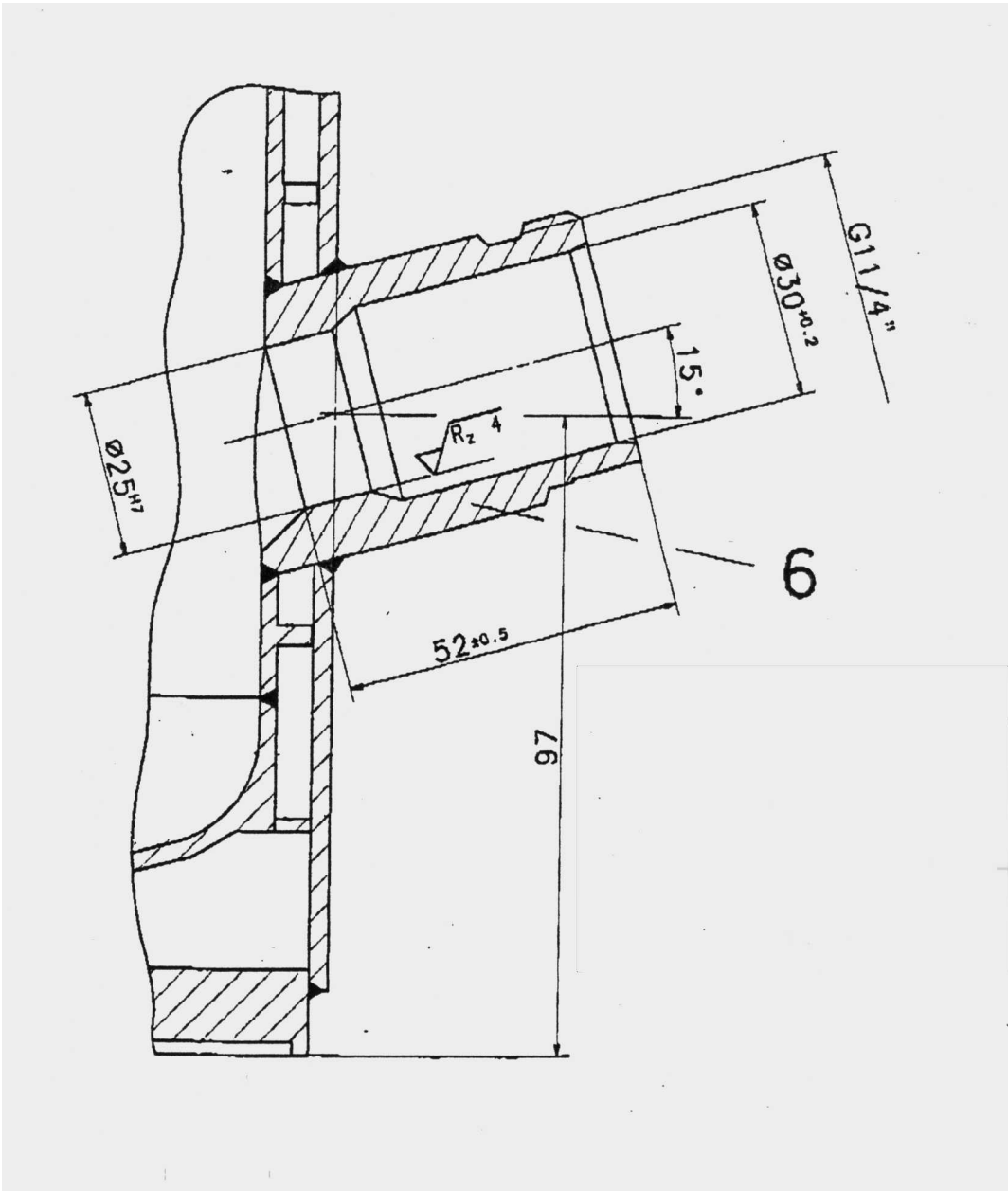
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  und  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  und die Spurenelemente werden in destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert wird mit konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  auf 2 eingestellt. Danach werden die restlichen Mineralien hinzugegeben, und der pH-Wert wird mit Natronlauge auf 6 gebracht. Die so erhaltene Lösung wird autoklaviert. Die Glucose und die Vitamine werden in destilliertem Wasser gelöst und durch einen Sterilfilter unter der Sterilbank zugegeben.

## 6.4 Bauformen von Fermenterports

### 6.4.1 Applikon



6.4.2 Braun Biotech International





## Lebenslauf

Name: Jan-Gerd Frerichs

Geburtsdatum: 14. März 1969

Geburtsort: Hannover

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1975 - 1979 Grundschule Wasserkampstraße, Hannover  
1979 - 1981 Orientierungsstufe Anderten, Hannover  
1981 - 1988 Gymnasium Schillerschule, Hannover  
Abschluss mit Abitur

Wehrdienst: Grundwehrdienst in Munster

Studium: 1989-1997 Studium der Elektrotechnik an der Universität Hannover  
Schwerpunkt Nachrichtentechnik/Nachrichtenverarbeitung  
08/1997 Diplom  
09/1997 Beginn der Promotion

Berufliche Tätigkeiten: 1997-1999 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover  
seit 1.11.1999 Mitarbeiter bei debis Systemhaus GEI, Hamburg