

„Regelung biotechnologischer Prozesse mit In-situ Mikroskopie“

Geovanni Martínez, Institut für Technische Chemie, Callinstr. 3, 30167 Hannover

Einleitung

Für eine optimale Prozessführung von Fermentationsprozessen ist es unabdingbar, ohne Zeitverzögerung Informationen über den Prozeß zu sammeln und diese in Echtzeit auszuwerten. Wichtige Parameter für eine Kontrolle von Fermentationsprozessen sind u. a. die Zellzahl und Zellgrößenverteilung. Bis heute ist es üblich, die Zellzahl offline zu bestimmen, beispielsweise durch Handzählung. Moderne Inline-Systeme zur Bestimmung der Zellzahl bzw. Biomasse basieren momentan z.B. auf Messungen der Fluoreszenz oder der Kapazität. Ein direkter Zellparameter wie die Zellgrößenverteilung kann bisher nicht inline bestimmt werden. Ein System, welches diesen Nachteil kompensiert, stellt die In-situ Mikroskopie dar. Bei der In-situ Mikroskopie werden Zellbilder eines definierten Volumens direkt im Kulturmedium aufgenommen. In Kombination mit Bildverarbeitungsrouitinen können die gewünschten Informationen ohne Zeitverzögerung bestimmt werden und stehen einer Prozeßregelung zur Verfügung. Voraussetzung für eine stabile Regelung ist eine hohe Bildqualität und eine zuverlässig arbeitende Bildverarbeitung.

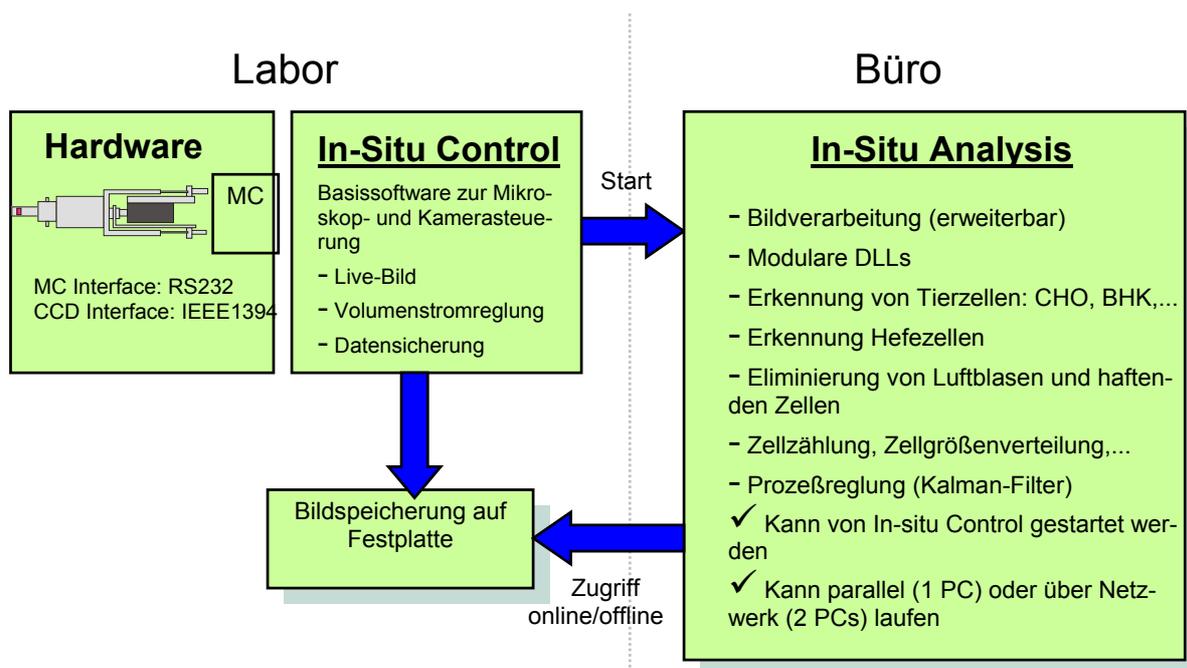


Abbildung 1: Konzept der In-situ Mikroskopie.

Das In-situ Mikroskop (ISM), basierend auf [1] wurde im letzten Jahr am Institut für Technische Chemie kontinuierlich weiterentwickelt. Durch die rasante Entwicklung von digitalen Industrie-CCD-Kameras und dem damit verbundenen Preisverfall wurde die bisher verwendete analoge CCD-Kamera durch eine digitale CCD-Kamera mit IEEE 1394 Interface (iLink-Schnittstelle) ersetzt. Durch deren hohe Datenübertragungsrate (400 MBit/s) sowie die überflüssig gewordene Umrechnung von analogen in digitale Bildinformationen durch einen Frame Grabber ist nun die Darstellung eines Live-Bildes realisiert.

Darüber hinaus haben Kultivierungen bei Partnern in der Industrie (Bayer, PDL, Glaxo-Smith-Kline) gezeigt, daß personalbedingt eine Trennung in der Software zwischen der Mikroskopbedienung/Bildaufnahme (Laborant) und der Bildverarbeitung/Prozeßüberwachung und -reglung (Laborant oder Laborleiter) im Hinblick auf eine zukünftige Vermarktung wünschenswert sei. Das derzeitige Konzept der In-situ Mikroskopie (Abb. 1) sieht daher eine Mikroskopsoftware vor, die alle Mikroskopfunktionen inklusive der Bildaufnahme/Bilddatensicherung beinhaltet, sowie eine modular aufgebauten Bildverarbeitungssoftware, welche die Daten online auswertet und ggf. in den Prozeß regelnd eingreifen kann. Beide Programme können wahlweise auf einem Rechner parallel oder auf zwei über ein Netzwerk verbundenen Rechnern laufen. Das ISM-System ist in Abb. 2 dargestellt.



Abbildung 2: Das In-situ Mikroskop, eingesetzt in einen 1.5 L Testreaktor. Im Hintergrund auf dem Monitor ist die Steuersoftware erkennbar.

Weiterentwicklung der Bildverarbeitungsalgorithmen

Die Verwendbarkeit der bestehenden Bildverarbeitungssoftware In-situ Control für Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* (Hefe) wurde geprüft. Die bestehende Software ist durch modifizierte Schwellwerte zwar grundsätzlich in der Lage, Hefezellen zu erkennen, in der Praxis treten allerdings andere Problemstellungen auf als bei der Kultivierung von tierischen Zellen.

Die Unterschiede liegen in einem anderen Mitoseverhalten, da sich Hefezellen bei der Mitose nicht wie bei Tierzellen üblich in zwei gleichgroße Tochterzellen teilen, sondern nach Knospung als kleinere Tochterzelle von der größeren Mutterzelle abspalten. Ein weiterer Unterschied liegt in der Bildung von Zellclustern mit steigender Kultivierungsdauer. Sowohl die Häufigkeit der Zellcluster als auch die Anzahl der Zellen in einem Cluster (3 bis max. 10 Zellen) sind geringer als bei Tierzellen. Darüber hinaus neigen vereinzelte Hefezellen auch bei höheren Rührgeschwindigkeiten zum Anhaften an den Saphirscheiben der Meßzone. Die Summe dieser Unterschiede führt bei In-situ Control einen so großen Fehler in der Zellzählung, daß eine Verwendung der Bildverarbeitungsalgorithmen für Hefen nicht in Frage kam.

Im Rahmen dieser Problemstellung wurden verschiedene Konsolenanwendungen zur Erkennung von Hefezellen implementiert und getestet. Zur Erkennung der Hefezellen wurden zwei grundsätzlich verschiedene Verfahren umgesetzt: zum einen wurde ein statistisches Verfahren, ein sog. Hidden-Markov-Modell [2, 3], an die Erfordernisse der Bildverarbeitung angepaßt, umgesetzt und getestet und zum anderen wurden die Hefezellen deterministisch beschrieben [4, 5], die zugehörigen Algorithmen entwickelt, umgesetzt und ebenfalls getestet.

Das Hidden-Markov-Modell erwies sich grundsätzlich als geeignet, die Hefezellen vom Hintergrund zu trennen. In der praktischen Umsetzung zur Auswertung einer gesamten Fermentation konnten jedoch nicht alle notwendigen Parameter in der erforderlichen Präzision bereitgestellt werden. Daher wurde das Hidden-Markov-Modell nicht in die Module zur Hefezellerkennung integriert.

Die deterministische Erkennung der Hefezellen ist eine Kombination zweier Methoden. Zum einen wird der dunklere und der hellere Teil einer Hefezelle anhand der Grauwertdifferenz zum häufigsten Wert des Histogramms erkannt. Weiterhin werden die Teile der Hefezellen, deren Grauwerte sich nicht vom Hintergrund unterscheiden, mit Hilfe einer speziellen Suchmaske gefunden. Diese Methoden kommen in den Anwendungen `YeastCellCounter`, `YeastCellCounter_with_Wiper` und `DoubleYeastCell-Counter` zur Ausführung.

Haftende Zellen und örtliche Bildstörungen werden durch den Vergleich von zwei aufeinanderfolgenden Bildern erkannt. Dabei werden die beiden Bilder jeweils an den gleichen Koordinaten auf Grauwertdifferenzen überprüft. Die zulässige Grauwertdifferenz wird mit Hilfe eines Schwellwertes definiert. Bleiben die Grauwerte der beiden Bilder an den entsprechenden Stellen innerhalb dieser zulässigen Differenz, handelt es sich um ein Pixel des Hintergrundes oder um ein Pixel in einem unbewegten Objekt. Im Falle der Anwendung von CellWiper (Abb. 3) wird dieses Pixel auf den häufigsten Wert gesetzt und auf diese Weise aus dem Bild entfernt.

Alle erkannten Pixel eines Objekts werden mit Hilfe einer Kantendetektion als identifiziertes Objekt in einem Array zusammengefasst. Objekte einer bestimmten Mindestgröße können nun mit allen ihren Eigenschaften in einer Textdatei ausgegeben und in einem Kontrollbild markiert werden, ohne daß das ganze Bild mit allen Pixeln erneut durchlaufen werden muß.

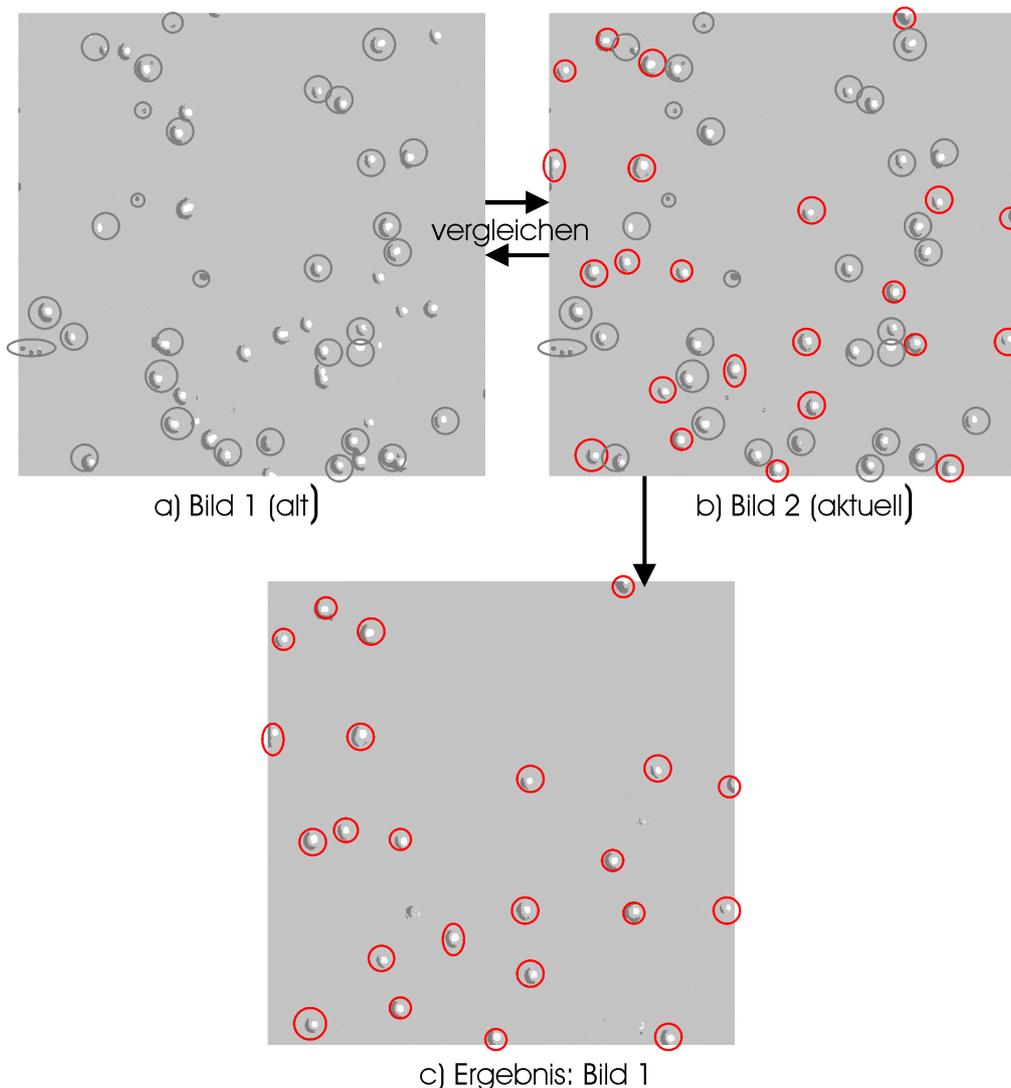


Abbildung 3: CellWiper eliminiert vor der Zellzählung haftende Zellen (schwarz umkreist) durch den Vergleich von zwei aufeinanderfolgenden Bildern. Das Ergebnisbild beinhaltet nur noch bewegte Zellen (rot umkreist).

Die entstandenen Programmodule sind auf verschiedene Hefefermentationen angewandt und getestet worden. Es wurden die Bilder einer kompletten Fermentation manuell ausgezählt und an diesen Werten die Bildverarbeitungsroutinen für Hefezellen von In-situ-Control (Abb. 4) mit den Routinen von YeastCellCounter verglichen (Abb. 5). Die Applikation erkennt Hefezellen auf zwei verschiedene Methoden, erstellt für jedes Bild eine Textdatei mit den Ergebnissen und faßt diese Ergebnisse in einer weiteren Textdatei zusammen. Die Pixelzählmethode ermittelt die Zellzahl über die Größe der Objekte, die Kernzählmethode zählt die „hellen Zellkerne“. Beide Methoden haben unterschiedliche Vorteile, wenngleich die Kernzählmethode mit fortlaufender Kultivierungsdauer die genauere Methode ist.

Dabei haben sich die neuentwickelten Objekterkennungs- und Objektanalysealgorithmen als deutlich überlegen gegenüber den Routinen von In-situ Control gezeigt. Das betrifft sowohl die Genauigkeit der Auszählung, als auch die Rechenzeit.

Das Modul YeastCellCounter_with_Wiper (Abb. 6) vereint die Funktionen der Module CellWiper und YeastCellCounter. Die Anwendung ignoriert bei der Objekterkennung haftende Zellen, entfernt sie aber nicht aus dem Bild. Es können nun auch Datensätze mit relativ schlechter Bildqualität ausgewertet werden. Das plötzliche Auftreten von haftenden Zellen während einer Fermentation und/oder das Auftreten von kleinen oder großen Bildstörungen ist kein Grund mehr, den Datensatz zu verwerfen bzw. die Fermentation zu wiederholen.

Die Auswertung der Objekte in Modul DoubleYeastCellCounter ist differenzierter. Die Auszählung der Zellzahl pro Objekt erfolgt hier nur nach der Kernzählmethode. Um eine Zellgrößenverteilung über den gesamten Kultivierungsverlauf zu erhalten, wird die Pixelanzahl der Objekte benutzt, um Einzelzellen in klein, mittel und groß zu klassifizieren. Da allerdings eine Klassifizierung der Clusterzellen bisher noch nicht implementiert wurde, und die Anzahl der Cluster im Verlauf einer Kultivierung stark zunimmt, ist dieses Modul für eine genaue Größenverteilung momentan noch ungeeignet.

Bildauswertung mit In-situ-Control (ISC)

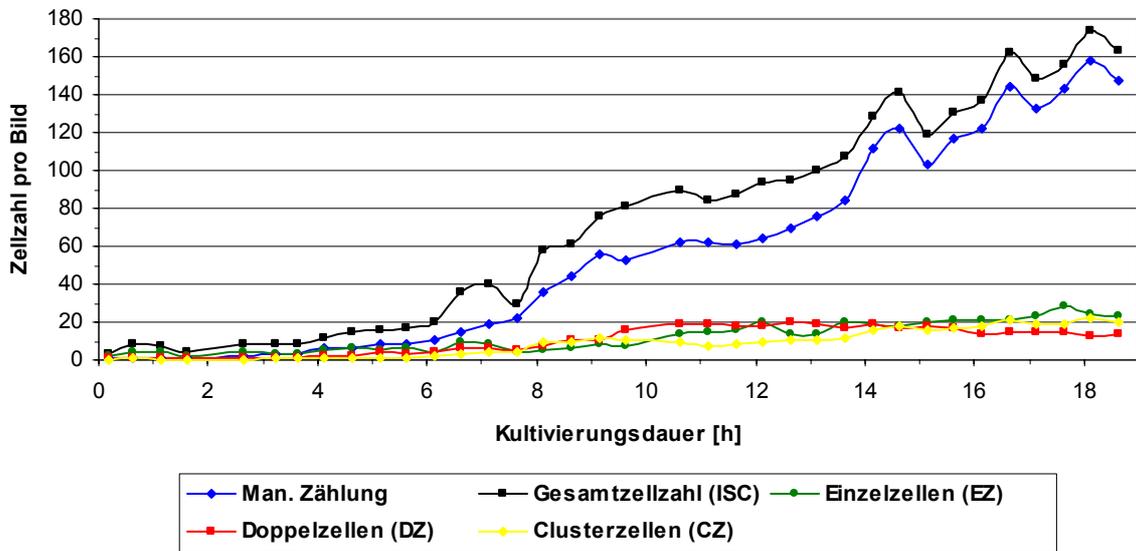


Abbildung 4: Auswertung einer Batch-Fermentation von *Saccharomyces cerevisiae* mit der alten Bildverarbeitungssoftware In-situ Control. Es werden deutlich mehr Zellen detektiert als in der manuellen Auszählung. Die Rechenzeit für 20 Bilder (512x512 Pixel) beträgt 22 Minuten (Pentium III 1,5 GHz).

Bildauswertung mit YeastCellCounter (YCC)

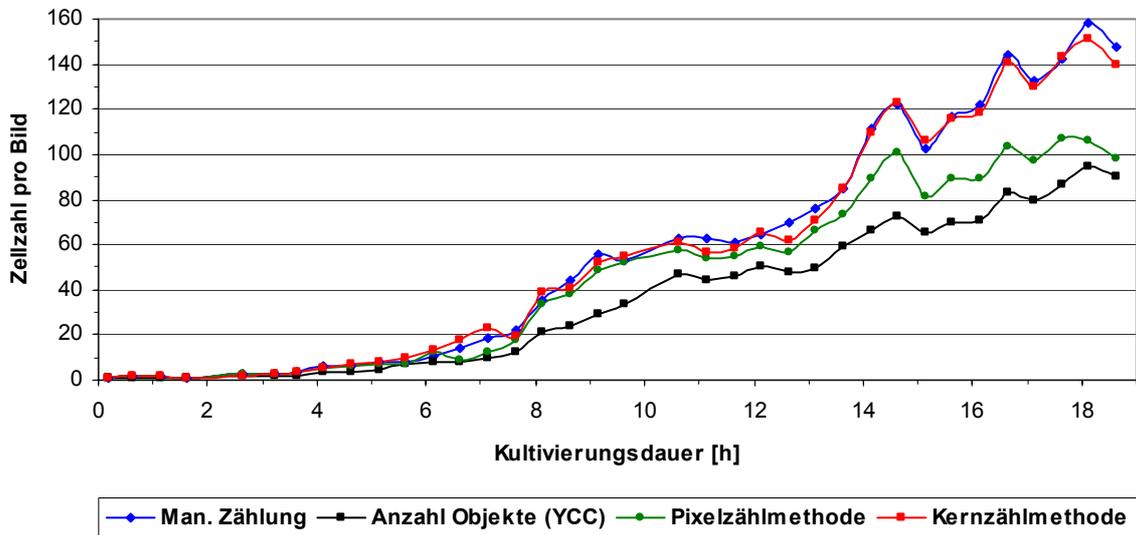
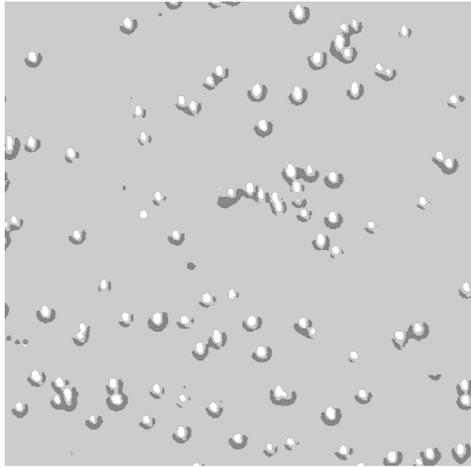


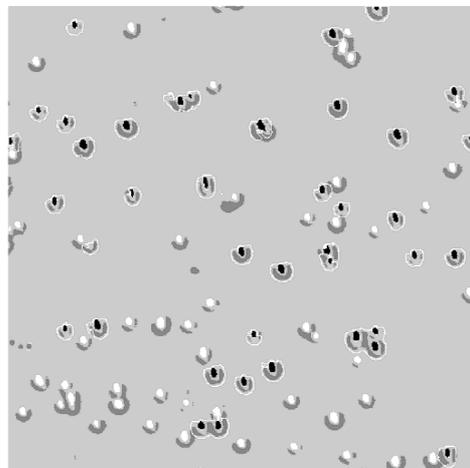
Abbildung 5: Auswertung der Batch-Fermentation mit dem neuen Bildverarbeitungsmodul YeastCellCounter ohne Vorverarbeitung durch CellWiper (keine Berücksichtigung von haftenden Zellen). Die Kernzählmethode von YCC ist deutlich präziser als ISC. Die Rechenzeit für 20 Bilder (512x512 Pixel) beträgt 30 Sekunden.



a) Bild 1



b) Bild 2



c) Ergebnis: Bild 2_YCCwW

Abbildung 6: Bildauswertung durch das Bildverarbeitungsmodul YeastCellCounter_with_Wiper, welches die Funktionen von CellWiper und YeastCellCounter vereint. Haftende Zellen werden durch den Vergleich von zwei Bildern erkannt und bei der Zellzählung ignoriert, aber aus dem Ergebnisbild herauseliminiert.

Ausblick

Die in Abb.1 gezeigte Software-Trennung von Mikroskopsteuerung und Bildverarbeitung ist bereits umgesetzt worden. Während das neue In-situ Control bereits fertiggestellt ist, müssen die einzelnen Programmodule zur Tier- und Hefezellerkennung noch in eine anwenderfreundliche Programmoberfläche implementiert werden. Eine Prozeßregelung konnte aufgrund der Umstrukturierung bisher nicht implementiert und getestet werden.

Im Hardware-Bereich kann das In-situ Mikroskop vor allem in der Steriltechnik verbessert werden. Versuche mit der Spülkammer haben gezeigt, daß die Sterilität nach einer Meßzonen-Reinigung nicht immer gegeben ist. Die Verwendung eines zusätzlichen Dichtringes erscheint sinnvoll. Außerdem ist die Konstruktion des Retrac-Systems so abgeändert worden, daß eine

Sterilisierung der gesamten Wegstrecke möglich ist, die der Außentubus beim Herausziehen aus dem Reaktor in die Spülkammer zurücklegt.

Literatur

- [1] Suhr, H.; In-situ Mikroskopsonde und Messverfahren. Deutsches Patent DE 40 32 002 C2, 1997.
- [2] Müller, S.; Segmentation und Klassifizierung von Bildern und Bildsequenzen mit Hidden-Markov-Modellen; Dissertation, Gerhard-Mercator-Universität Duisburg, 2001.
- [3] Fink, G. A.; Mustererkennung mit Markov-Modellen, Teubner-Verlag Wiesbaden, 2003.
- [4] Paulus, D., Hornegger, J.; Applied Pattern Recognition, 4th Edition, Vieweg-Verlag Braunschweig/Wiesbaden, 2003.
- [5] Böckenhauer, H.-J., Bongartz, D.; Algorithmische Grundlagen der Bioinformatik, Teubner-Verlag Wiesbaden, 2003.