

|  |
| --- |
| ZÜRCHER HOCHSCHULE FÜR ANGEWANDTE WISSENSCHAFTEN DEPARTEMENT LIFE SCIENCES UND FACILITY MANAGEMENT INSTITUT FÜR BIOTECHNOLOGIE |
|  |
| **Bestimmung der Biomasse mit Hilfe von Handy-**  **Fotos** |
|  |
| Semesterarbeit |
| **von** |
| **Memeti Nurdzane und Sabani Besmira** |
| Bachelorstudiengang 2016 |
| Studienrichtung Biotechnologie |
| Abgabedatum: 27. September 2018 |
| Fachkorrektoren: |
| Dr. Elias August  ZHAW Life Sciences und Facility Management  Campus Grüental  8820 Wädenswil |
|  |
| Prof. Dr. Caspar Demuth  ZHAW Life Sciences und Facility Management  Campus Grüental  8820 Wädenswil |

**Abstract (Zusammenfassung) in Bearbeitung**

Diese Studie beschreibt eine bildbasierte Methode um die Biomasse einer Hefekultur aus der Bildanalyse von selbstständig erfassten Farbbildern zu bestimmen. Der Verarbeitungsalgorithmus beginnt mit der Umwandlung der RGB-Bilder einer braunfarbigen Masse, welches in einen Schüttelkolben kultiviert wird, und wird in eine Vielzahl von Farbräumen transformiert. Eine Modifikation der ursprünglichen HSV-, XYZ-, usw. Farbräume wurde für Anforderung der Farberkennung im Bild angewendet.

**Inhaltsverzeichnis**

[1 Einleitung 4](#_Toc523663250)

[2 Material und Methoden 8](#_Toc523663251)

[2.1 Überblick 8](#_Toc523663252)

[2.2 Vorversuch: Kaffeeuntersuchung 9](#_Toc523663253)

[2.3 Hefekultivierung 10](#_Toc523663254)

[2.4 Bildaufnahmesystem 10](#_Toc523663255)

[2.5 Bildverarbeitung 12](#_Toc523663256)

[2.6 Bestimmung der optischen Dichte 13](#_Toc523663257)

[3 Ergebnisse IN BEARBEITUNG 14](#_Toc523663258)

[4 Diskussion IN BEARBEITUNG 26](#_Toc523663259)

[5 Schlussfolgerung 27](#_Toc523663260)

[6 Literaturverzeichnis 28](#_Toc523663261)

# Einleitung

Die Bestimmung Biomasse spielt eine wichtige Rolle für die meisten biotechnologischen Verfahren. Sie liefert wesentliche Aussagen über die Produktivität eines Prozesses. Es gibt mehrere Methoden zur Messung des Wachstums von Zellen. Eine indirekte Methode ist die photometrische Methode, sie ermittelt die Trübung, welche Zellen einer Population im Wachstumsmedium mittels der Wechselwirkung von Strahlung im sichtbaren (VIS)-Bereich mit Materie verursachen. Dabei wird durch den Mechanismus der Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge λ der Lichtstrahl geschwächt und erhält eine bestimmte Intensität (Analytik Jena AG, unbekannt). Das Resultat ist die sogenannte „optische Dichte (OD)“ (Hahnemann, Eibl, & Poggendorf, 2011). OD kann nur durch Probenahme und offline Analyse durchgeführt werden, mit dem Nachteil, dass sich der Arbeitsaufwand und die Möglichkeit einer Kontamination sich erhöhen (Schmidt-Hager et al., 2015).

Während des Zellwachstums von Mikroorganismen ist die Trübung und die Farbänderung des Mediums sogar mit dem menschlichen Auge erkennbar. Ziel dieser Arbeit ist es, unter Verwendung dieser Farbänderung eine weitere Methode für die Biomassenbestimmung zu entwickeln. Dabei werden Handy-Fotos von Hefekulturen im Schüttelkolben gemacht. Der Vorteil dieser einfachen bildbasierten Methode ist der niedrige Arbeitsaufwand und eine geringere Gefahr von Kontaminationen. Die Bilder werden durch Computer Vision oder Computer Imaging weiterverarbeitet, in dem Sinne, dass theoretische und algorithmische Techniken, um den Bilder Informationen zu entnehmen und diese zu analysieren, entwickelt werden. Eine geeignete Software dafür Computer ist MATLAB (Matrix Laboratory), eine Programmierplattform mit einer matrixbasierten Sprache, die den natürlichen Ausdruck der Computermathematik ermöglicht.

ZWEITER TEIL IN BEARBEITUNG

Trotz der sehr hohen Bedeutung der Biomasse in der Biotechnologie, wurde noch keine bildbasierte Methode zur deren Bestimmung entwickelt. Denn wurde bislang keine Studie ausfindig gemacht, die das Computer Imaging für die Biomassenidentifikation näher erläutert. In den letzten Jahren wurde die Verwendung von Computer Imaging und Bildverarbeitung vor allem für die Bestimmung der Lebensmittelfarbe gefördert (Segura et al., 2017). Die Studie von Bora et al. (2015) verwendet die Bildverarbeitung um Veränderung der Bananenqualität bezüglich der Farbänderung während der Bananenreifung. In der Studie von Khoshroo et al. (2014) wurde eine Methode gemäss Computer Imaging entwickelt, um rote Tomaten in ein Treibhaus zu entdecken (Khoshroo, Arefi, & Khodaei, 2014). In allen bisherigen Studien wurden Aufnahmegeräte verwendet, die kostenintensiv und nicht benutzerfreundlich sind. Durch die Anwendung des Handys können diese Schwierigkeiten verhindert werden trotzdem können qualitativ hochwertige Foto aufgenommen werden. Ausserdem sind Handys überall zu finden und leicht zu benutzen, diese Aspekt macht die bildbasierte Methode

und seitdem die Hälfte von der Weltpopulation ein oder mehrere Handys besitzt, ist die Methode der Biomassebestimmung mittels Handy-Fotos sehr attraktiv.

DRITTER TEIL IN BEARBEITUNG

Zielsetzung der vorliegenden Semesterarbeit ist es eine bildbasierte Methode zur Bestimmung der Biomasse eines Hefestammes zu entwickeln. Insbesondere wurden Handy-Fotos von Hefekulturen in Schüttelkolben aufgenommen und mit dem Software MATLAB konnten die Bildfarbwerten hergeleitet. Gleichzeitig wurde die optische Dichte gemessen und den Zusammenhang zwischen die Bilderfarbwerte und die OD-Werte wurde geprüft. Die Details sind in der Kapitel Material und Methoden beschrieben. Die experimentellen Ergebnisse zeigen, dass die Ermittlung einer Korrelation vielversprechend ist. Weiter wurde die Stärke der Korrelation diskutiert sowie die Vor- und Nachteile, die Durchführbarkeit, die Reproduzierbarkeit und die Zuverlässigkeit der dokumentierten Methode.

Zielsetzung der vorliegenden Semesterarbeit ist es, die aktuellen wissenschaftlichen bildbasierten Methoden zur Bestimmung der Biomasse eines Hefestammes zu recherchieren, die erfolgreichsten Versuche zu beschreiben und sie zu bewerten. Diese Arbeit beschränkt sich dabei auf dem Computer Imaging mit der studenten-freundlichen Software MATLAB und verwendet neben Excel keine weitere Software. Der erste Teil dieser Arbeit widmet sich zunächst der Methodik im Labor und gibt eine Übersicht über die Anzahl Versuche sowie Fotos vor. Der zweite Teil beschreibt die Ergebnisse der zweimonätigen Semesterarbeit eines Zusammenhangs zwischen der indirekten Messung (OD – Messung) und der bildbasierten Methode (Farberkennung). Aufbauend auf diesen Ergebnissen werden in der Diskussion das Zusammenhang, die Unterschiede, die Vor- und Nachteile, die Durchführbarkeit, die Reproduzierbarkeit und die Zuverlässigkeit der dokumentierten Methode zur Bestimmung der Biomasse mittels Handy-Aufnahmen bewertet und diskutiert.

3) wie kann man diese zusammenhang hereusfinden zw. OD und farbwerte.

1. Während der Produktentwicklung oder Prozessoptimierung in Entwicklungslaboren wird die optische Dichte bisher meist offline bestimmt, um dadurch Rückschlüsse auf den Prozessfortschritt, die Zellzahl oder die Biomasse abzuleiten
   1. Daher ist die Suche nach einer schnellen, automatischen und kostengünstigen Methode zur Bestimmung der Biomasse von grosser Bedeutung. (Anami, Pujari, & Yakkundimath, n.d.)
   2. Ausserdem fordert es gut ausgebildete Fachpersonal ((Anami et al., n.d.)
2. Durch die Bestimmung der Biomasse mit Hilfe von Handy-Fotos kann der Arbeitsaufwand und die Kontaminationsgefahr gering gehalten werden.

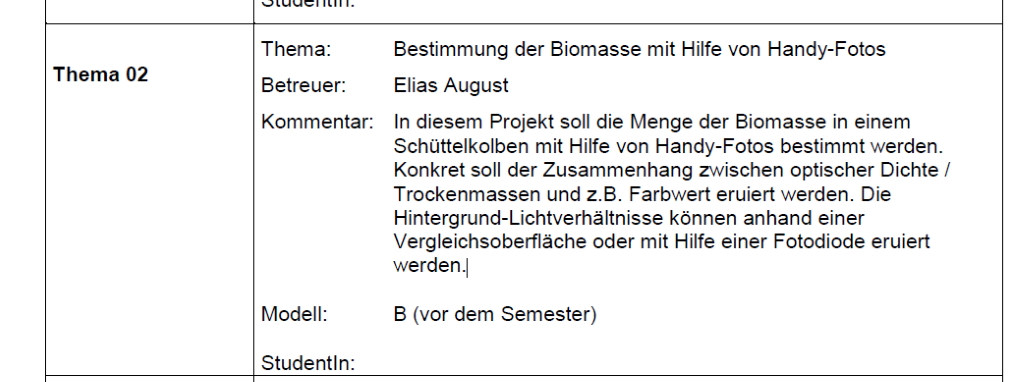
Die vorliegende Arbeit hat Bilder von einer Hefekultur betrachtet. Dieser bildbasierten Aufnahme der Biomasse wir ein Pre-processing unterzogen, bei welchem die Aufnahmen in chronologischer Reihenfolge im Computer abgelegt werden.

Diese Arbeit ist in vier Kapitel gegliedert. Im zweiten Kapitel werden verschiedene Methoden für die vorliegende Fragestellung beschrieben. Die Schlussergebnisse und die Diskussion werden im dritten Kapitel näher betrachtet. Schliesslich werden die wichtigsten Punkte in der Schlussfolgerung erläutert.

*In der Einleitung sollen drei Teile enthalten sein. In einem ersten Teil wird der Hintergrund, das Problem oder die Situation dargelegt und der aktuelle Stand der Technik/Wissenschaft beschrieben. Hierbei ist auch aktuelle Primärliteratur zu verwenden.*

*In einem zweiten Teil wird die Nische, Lücke für die vorliegende Arbeit geöffnet. Es gilt dabei aufzuzeigen, welche Bereiche bisher vernachlässigt wurden oder erst kürzlich an Bedeutung gewonnen haben.*

*In einem dritten Teil wird die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit angegeben (mit Verweis auf die Kopie der Aufgabestellung im Anhang) und die eigene Aufgabe möglichst präzis formuliert – allenfalls in der Form von prüfbaren Hypothesen. Bei ausführlicheren Darlegungen des aktuellen Stands der Technik bzw. einer Literaturübersicht ist ein separates Kapitel (Literaturübersicht oder Theorieteil, s.u.) sinnvoll.*



# Theorie

## Computer Imaging

Ein Computer kann nur mit Zahlen arbeiten, d.h. wenn ein Bild auf einem Computer importiert wird, sieht der Computer es als eine Anhäufung von Zahlen (Luijten, 2005). Diese Zahlen entsprechen dem Farbwert des kleinsten Elements eines Bildes, das Pixel, und ein Bild kann durch eine Matrix bestehend aus diesen Pixel-Werten dargestellt werden (Goel, Singhal, Jain, & Kole, 2017) (Ramaraj & Niraimathi, 2017). Diese Werte kodieren mittels Verwendung eines Farbraums die entsprechenden Farben.

## Farbräume

Ein Farbraum ist eine Methode, welche Farben spezifizieren, erzeugen und visualisieren kann. In der Regel wird eine Farbe über drei Koordinaten, welche die Position der Farbe im verwendeten Farbraum bestimmen, definiert. Die Festlegung einer Farbe hängt vom gewählten Farbraum ab (Ford & Roberts, 1998). Der RGB-Farbraum ist der am häufigsten verwendete Standardfarbraum zur Speicherung und Darstellung digitaler Bilder. RGB stellt die drei Grundfarben Rot, Grün und Blau dar. Ein Bild wird in drei Matrizen umgewandelt, wenn es auf einem Computer importiert wird und jede Matrix entspricht den Farbwerten einer Grundfarbe. Ausserdem kann ein Farbraum durch eine lineare oder nichtlineare Transformation aus dem RGB – Farbraum gewonnen werden (Kakumanu, Makrogiannis, & Bourbakis, 2007).

Ein weiterer Farbraum ist der HSV-Raum, welcher als lineare Transformation von RGB erzeugt werden kann. Der HSV – Raum beschreibt die Farben als «Hue» den Farbton, «Saturation» die Farbsättigung und «Value» die Helligkeit, welche nicht direkt durch den RGB-Farbraum beschrieben werden (Kakumanu et al., 2007; Luijten, 2005). Für die Bildverarbeitung kann ein weiterer Farbraum verwendet werden. Der CIELAB oder CIE L\*a\*b Farbraum besteht ebenfalls aus drei Parametern. L definiert die Helligkeit, a\* die Rötung (von grün nach rot) und b\* der Gelbheit (von blau nach gelb). CIELAB Farbraum kann als lineare Transformation von RGB erzeugt werden (Segura, Salvadori, & Goñi, 2017). Bildinformationen werden oft aufgrund von Umweltbedingungen, wie z.B. der Beleuchtung, beeinflusst. Um diesem Umstand gerecht zu werden, werden in dieser Arbeit verschiedene Farbräume zu Analyse verwendet.

## Optische Dichtemessung

Die optische Dichtemessung – OD-Messung – wird in der Biotechnologie oft für die Bestimmung der Konzentration einer Lösung oder der Zelldichte in Suspensionskulturen verwendet. Sie beruht auf die Lichtstreuung, die mit Hilfe eines Spektralphotometers erfasst wird. Dieser besteht aus einer Lichtquelle, einem Monochromator, einer Küvette für die Messprobe und einem Detektor. Der wichtige Abschnitt der Photometrie ist der Monochromator, der nur Licht einer bestimmten Wellenlänge weiterleitet und dieses Licht dann in die Spektralfarben aufgeteilt wird und in die Küvette durchdringt. Diese Küvette, die mit der Probenlösung gefüllt ist, wird mit einem Volumen von 1 – 2 mL für die Messung entnommen. Ein Teil des Lichtstrahles wird von den gelösten Substanzen in der Küvette absorbiert und das restliche Licht wird vom Medium durchgelassen. Mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes Formel 1 kann das spektrale Absorptionsmass berechnet werden.

## Korrelationsanalyse

# Material und Methoden

## Überblick

In dieser Arbeit wurde Hefestamm *H022* kultiviert und in Schüttelkolben gezüchtet. Um eine Korrelation zwischen Biomasse und Handy-Bildern zu erhalten, wurden während des Versuches die optische Dichte einer Probe und die Farbwerte der Fotos bestimmt. Pro Tag wurden je zwei Schüttelkolben 13 Stunden lang kultiviert. Die Entnahme von Proben fand alle 30 Minuten statt, gelichzeitig wurden vier Aufnahmen gemacht. Für diese Studie wurden insgesamt 9 Schüttelkolben kultiviert und 1412 Aufnahmen erfasst (Tabelle 1). Es wurde ein Bildaufnahmesystem im Verlaufe des zwei-monatigen Praktikum erarbeitet, welches in Kapitel 2.4 – Bildaufnahme – detaillierter beschrieben wird. Dabei wurden unscharfe Bilder manuell von Hand entfernt. Ab dem 23.08.2018 wurden zusätzliche Referenzbilder erfasst, um die Lichtverhältnisse in der Bildaufnahme mitberücksichtigen zu können.

Tabelle 1: Zusammenfassung der durchgeführten Versuche.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Versuchstyp | Datum | Anzahl Fotos | Anmerkung |
| OD Flasche 1A  0 Position | 14.08.2018 | 46 | 250 ml Nährmedium, erste Hefezellen |
| OD Flasche 2  0 Position | 15.08.2018 | 60 | 250 ml Nährmedium, welches mit 4 ml Hefezellen beimpft wurde. |
| OD Flasche 3  0 Position | 15.08.2018 | 60 | 200 ml Nährmedium, welches mit 10 ml Hefezellen beimpft wurde. |
| OD Flasche 4  1 Position | 21.08.2018 | 112 | 250 ml Nährmedium, welches mit 10 ml Hefezellen beimpft wurde. |
| OD Flasche 4  2 Position | 21.08.2018 | 112 | 250 ml Nährmedium, welches mit 10 ml Hefezellen beimpft wurde. |
| OD Flasche 5  1 Position | 21.08.2018 | 112 | 200 ml Nährmedium, welches mit 10 ml Hefezellen beimpft wurde. |
| OD Flasche 5  2 Position | 21.08.2018 | 112 | 200 ml Nährmedium, welches mit 10 ml Hefezellen beimpft wurde. |
| OD Flasche 6  1 Position | 23.08.2018 | 219 | 250 ml Nährmedium, welches mit 15 ml Hefezellen beimpft wurde. |
| OD Flasche 7  2 Position | 23.08.2018 | 219 | 200 ml Nährmedium, welches mit 15 ml Hefezellen beimpft wurde. |
| OD Flasche 8  1 Position | 30.08.2018 | 180 | 250 ml Nährmedium, welches mit 20 ml Hefezellen beimpft wurde. |
| OD Flasche 9  2 Position | 30.08.2018 | 180 | 220 ml Nährmedium, welches mit 25 ml Hefezellen beimpft wurde. |
| OD Flasche 1B | 30.08.2018 |  | 250 ml Nährmedium, geimpft mit 2 ml Cryo-Vial Hefezellen und während drei Tagen für die weitere Verarbeitung kultiviert. |
| OD Flasche 10  1 Position | 03.09.2018 | 183 | 200 ml Nährmedium, welches mit 15 ml Hefezellen aus Flasche 1B beimpft wurde. |
| OD Flasche 11  2 Position | 03.09.2018 | 192 | 250 ml Nährmedium, welches mit 15 ml Hefezellen beimpft wurde. |
| OD Flasche 12  1 Position | 04.09.2018 | XX | 230 ml Nährmedium, welches mit 15 ml Hefezellen aus Flasche 1B beimpft wurde. |
| OD Flasche 13  1 Position | 04.09.2018 | XX | 250 ml Nährmedium, welches mit 15 ml Hefezellen aus Flasche 1B beimpft wurde. |
| OD Flasche 14  1 Position | 05.09.2018 | XX | 250 ml Nährmedium, welches mit 15 ml Hefezellen aus Flasche 1B beimpft wurde. |
| OD Flasche 15  2 Position | 05.09.2018 | XX | 250 ml Nährmedium, welches mit 15 ml Hefezellen aus Flasche 1B beimpft wurde. |
| OD Flasche 16  1 Position | 05.09.2018 | XX | 250 ml Nährmedium, welches mit 15 ml Hefezellen aus Flasche 1B beimpft wurde. |
| OD Flasche 17  2 Position | 05.09.2018 | XX | 250 ml Nährmedium, welches mit 15 ml Hefezellen aus Flasche 1B beimpft wurde. |

In folgenden Kapitel werden die verschiedenen Schritte für die Bestimmung der Biomasse beschrieben.

## Vorversuch: Kaffeeuntersuchung

Das folgende Unterkapitel beschreibt wie eine unterschiedlich starke Kaffeemischung im Becherglas und Schüttelkolben untersucht wurde. Dieser Vorversuch diente der Sammlung von ersten Erfahrungen in der Benutzung des Aufnahmegerätes. Die Farbe des «Mediums» (Wasser) wurde durch Eingiessen von mehr und mehr Kaffees verändert. Es wurde darauf geachtet, dass die Fotografin dabei dieselbe Position beibehält. Das Fotografieren des Becherglases stellte die grösste Herausforderung dar, da sich die Glaswölbung und die Lichtreflexion negativ auf die Bildaufnahme auswirkten. Die Vogelperspektive wurde darauf gewählt. Diese Methode eignete sich jedoch nicht für den Schüttelkolben, welche für die Laboruntersuchung verwendet wird und wurde wieder verworfen. Ein weiteres Versuchsobjekt war der Schüttelkolben, der zu Hause auf dem Schreibtisch gestellt und aus allen Perspektiven fotografiert wurde. Sieben Fotos wurden erstellt und in MATLAB importiert. Diese und weitere MATLAB Skriptabläufe werden im Kapitel 2.5 beschrieben.

## Hefekultivierung

Stamm H022 von *Saccharomyces cerevisiae* wurde bei –80°C in Cryovial (2 ml) zur Verfügung gestellt. Die Hefezellen wurden zuerst in der Hand aufgetaut und dann wurden 250 ml YEPD-Medium (Yeast Extrakt 10 g/L, Lotnummer 505230309, Pepton 5 g/L, Lotnummer BCBR2574V und Glucose 10 g/L) im autoklavierten (121°C, 20 min) Schüttelkolben mit diesen geimpft (tabelle 1 zeile 1); zusätzlich wurden drei bis vier Tropfen PPG (Polypropylenglycol) Antischaummittel unter sterilen Bedingungen beigefügt. Die Schüttelkolben wurden im Brutschrank bei 30°C und 160 rpm inkubiert. Die ersten Schüttelkolben wurden nach der Kultivierung im Kühlschrank gelagert und für die weiteren Versuche wurde aus diesen Proben zum Impften entnommen.

## Bildaufnahmesystem

Das Bildaufnahmesystem bestand aus zwei Smartphones «Iphone 6» und «Iphone 7», welche von den Studentinnen zur Verfügung gestellt wurden. Aufgenommen wurde an drei verschiedenen Arbeitsplätzen: Position 0, der in Abbildung 1 erkennbar ist; Position 2 (Abbildung 2: ), mit vier Wänden (drei seitliche und eine Abdeckung); und Position 2 (Abbildung 3: Darstellung der BildaufnahmePosition 2), welcher einer weiteren eher lichtgeschützten Position im Raum entspricht.

Um die Reproduzierbarkeit der Versuche zu gewährleisten, wurde die Positionierung des Aufnahmegerätes und eines Podests mit dem Schüttelkolben darauf am Boden mit Klebestreifen markiert. Der Abstand zwischen Schüttelkolben und Smartphone betrug an jedem Position circa 11 cm. Damit die Biomasse gut mit der Handykamera erfasst werden konnte, wurden Schüttelkolben auf einen circa 3 cm hohen Podest gestellt. Dann legte die Studentin das Smartphone auf den Klebestreifen und das Aufnahmegerät wurde so stationiert, dass in der Kamerabildfläche der untere Deckelboden noch ersichtlich war (Abbildungen 1 bis 3).

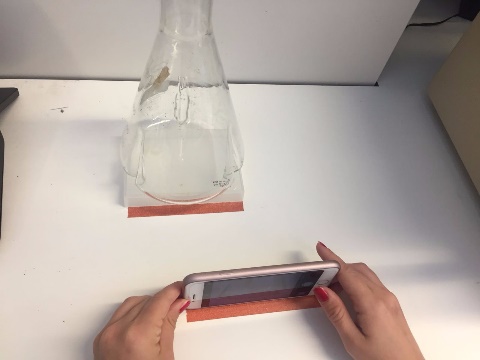
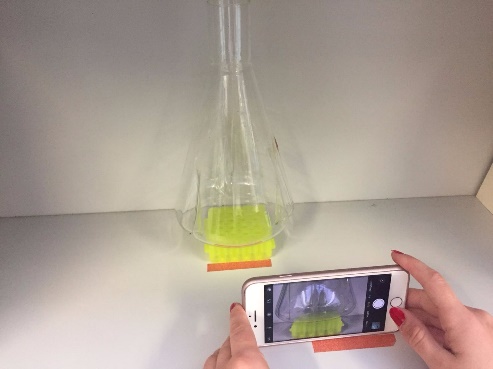


Abbildung 1: Darstellung der Bildaufnahme von Position 0

Abbildung 2: Darstellung der Bildaufnahme von Position 1

Abbildung 3: Darstellung der Bildaufnahme von Position 2

Für die weitere Versuchsreihe wurden neben den vier Fotos, welche pro Messung erstellt wurden, zusätzliche Referenzbilder erfasst, um die Geräusche des Raumes zu identifizieren. In der Regel waren 20 s oder weniger erforderlich, um ein gutes Bild aus der aufgenommenen Bildsequenz pro Messung zu erfassen. Die Position der Kamera konnte nicht konsequent gleich gehalten werden, da die Bilder der Flaschen 1 – 7 von Hand gehalten wurden. Schliesslich wurde eine Halterung – das Popsocket - gekauft und hinter dem Smartphone geklebt.

## Bildverarbeitung

Im vorherigen Kapitel wurde die Bildaufnahme mit unseren Smartphones erläutert. Diese Handy-Aufnahmen wurden während der Durchführung automatisch im IOS System gespeichert und später im Computer für die weitere Bildanalyse mit der MATLAB Software abgelegt. Für die Bildverarbeitung wurde die Toolbox in MATLAB angewendet, welche nun weiter beschrieben wird. Als erstes wurden die Bilder in die Software eingefügt und mit der Funktion «imread» eingelesen. Mittels dieses Befehles werden die Bilderinformationen in das binäre System von 8 Bit, das ebenfalls dem RGB-Format der Farberkennung entspricht, umgewandelt. Weiter musste die entsprechende Biomasse gekennzeichnet und ausgewählt werden. Das Ausschneiden des Bildes war notwendig, da der ganze Schüttelkolben fotografiert wurde und diese die Farbänderung in der visuellen Auswertung negativ auswirkten. Basierend auf Schätzung der 2D-Lokalisierung der Biomasse wurden die Eckpunkte (Pixel im Bild) festgelegt und einzeln geprüft, ob es das gewünschte Bildfeld erfasste. Der nächste Schritt ist die Farbidentifikation von Rot, Grün und Blau in unseren Bildern. Um die drei Farbwerte von Rot, Grün und Blau zu separieren, wurden drei unterschiedliche Matrizen erstellt und einzeln bewertet. Damit man diese Farbwerte analysieren kann, wurde für jede Grundfarbe der Durchschnittswert berechnet und in einer Grafik dargestellt.

Um einen Zusammenhang zwischen der optischen Dichte und dem Farbwert zu erhalten, wurde ein wichtiger Befehl im MATLAB, nämlich «corr», angewendet. Falls der Korrelationskoeffizient in der Nähe von +1 oder -1 liegt, kann ein linearer Zusammenhang von diesen zwei Variablen (OD – Messung und Farbwerte von der Biomasse) angenommen werden. Nachdem der Zusammenhang überprüft wurde, kann eine lineare Regression in Farbwerten und der optische Dichte angewendet werden. Dazu wird der Befehl «polyfit» verwendet, der die Steigung und den Y-Achsenabschnitt der linearen Funktion berechnet.

## Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte wurde mit einem Spektralphotometer *CECIL 1011* Gerät gemessen. Die Welllänge wurde im 600nm eingestellt und YEPD-Medium wurde als Referenz benutzt bzw. als Null Wert eingesetzt. Jede halbe Stunde wurden 2 ml kulturflüssiges Probe unter sterilen Bedingungen entnommen und in eine Makro-Küvette eingefügt. Die Küvette wurden in dem Gerät eingestellt und die optische Dichte wurde bestimmt. Sobald die abgelesenen OD-Werte 0.7 überschreiten, musste die Probe mit destilliertem Wasser verdünnt werden. Die Verdünnungen in den durchgeführten Versuchen lagen zwischen 1:1 und 1:20. Für jeden Schüttelkolben wurde ein Excel® Arbeitsblatt erstellt, um deren Messwerte zu notieren.

# Ergebnisse IN BEARBEITUNG

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Versuch | Korrelation | OD | | Farbwert | | Verhältnis |
|  |  | a | b | a | b | OD/Farbwert |
| Flasche 2 |  | 0.3543 | -2.6572 |  |  |  |
| Flasche 3 |  | 0.3715 | -1.9064 |  |  |  |
| Flasche 4 |  | 0.2877 | -1.9853 |  |  |  |
| Flasche 5 |  | 0.3243 | -2.5757 |  |  |  |
| Flasche 6 |  | 0.3118 | -1.1933 |  |  |  |
| Flasche 7 | R (0.9455) | 0.3007 | -1.3307 | 0.0574 | 4.3904 | 5.2387 |
| Flasche 7 | G (0.9437) |  |  | 0.1087 | 3.6254 | 2.7663 |
| Flasche 7 | B (0.7719) |  |  | ~~0.0250~~ | ~~2.9857~~ | ~~12.0280~~ |
| Flasche 7 | H (0.8381) |  |  | 0.0890 | -2.9665 | 3.3787 |
| Flasche 7 | S (-0.1016) |  |  | - | - | - |
| Flasche 7 | V (0.9455) |  |  | 0.0574 | -1.1509 | 5.2387 |
| Flasche 7 | L (0.9442) |  |  | 0.0854 | 3.0296 | 3.5211 |
| Flasche 7 | a (-0.8429) |  |  | -0.1021 | 3.0951 | -2.9452 |
| Flasche 7 | b (0.8662) |  |  | 0.0836 | 3.0416 | 3.5969 |
| Flasche 7 | X (0.9619) |  |  | 0.1417 | -3.2006 | 2.1221 |
| Flasche 7 | Y (0.9627) |  |  | 0.1706 | -3.4963 | 1.7626 |
| Flasche 7 | Z (0.9435) |  |  | 0.1192 | -4.6193 | 2.5227 |
| Flasche 8 | R (0.8801) | 0.3489 | -1.2522 | 0.0757 | 4.3744 | 4.6090 |
| Flasche 8 | G (0.9209) |  |  | 0.1280 | 3.4918 | 2.7258 |
| Flasche 8 | B (0.3334) |  |  | - | - | - |
| Flasche 8 | H (0.9137) |  |  | 0.1245 | -3.3485 | 2.8024 |
| Flasche 8 | S (0.5380) |  |  | - | - | - |
| Flasche 8 | V (0.8801) |  |  | 0.0757 | -1.1669 | 4.6090 |
| Flasche 8 | L (0.9037) |  |  | 0.1020 | 2.9649 | 3.4205 |
| Flasche 8 | a (-0.9332) |  |  | -0.0375 | 3.1369 | -9.304 |
| Flasche 8 | b (0.9041) |  |  | 0.1151 | 2.8820 | 3.0313 |
| Flasche 8 | X (0.9104) |  |  | 0.1745 | -3.2506 | 1.9994 |
| Flasche 8 | Y (0.9253) |  |  | 0.2005 | -3.5995 | 1.7401 |
| Flasche 8 | Z (0.8187) |  |  | 0.1177 | -4.5433 | 2.9643 |
| Flasche 10 | R (0.9260) | 0.3885 | -0.9309 | 0.0496 | 4.7474 | 7.8327 |
| Flasche 10 | G (0.9552) |  |  | 0.0794 | 4.2885 | 4.8929 |
| Flasche 10 | B (0.9168) |  |  | 0.1856 | 2.9130 | 2.0932 |
| Flasche 10 | H (0.9192) |  |  | 0.0135 | -2.3591 | 28.7778 |
| Flasche 10 | S (-0.8613) |  |  | -0.0583 | -0.1174 | -6.6638 |
| Flasche 10 | V (0.9260) |  |  | 0.0496 | -0.7939 | 7.8327 |
| Flasche 10 | L (0.9503) |  |  | 0.0661 | 3.5538 | 5.8775 |
| Flasche 10 | A (-0.9279) |  |  | -0.1116 | 2.7128 | -3.4812 |
| Flasche 10 | B (-0.1189) |  |  | - | - | - |
| Flasche 10 | X (0.9517) |  |  | 0.1317 | -2.3611 | 2.9499 |
| Flasche 10 | Y (0.9584) |  |  | 0.1475 | -2.4864 | 2.6339 |
| Flasche 10 | Z (0.9411) |  |  | 0.2426 | -4.1569 | 1.6014 |
|  |  |  |  |  |  |  |

# Diskussion IN BEARBEITUNG

In unserer Studie haben wir eine automatische bildbasierte Analyse entwickelt um die Biomasse mittels Handy-Aufnahmen zu bestimmen. Methoden zur Abschätzung der Hefezellenentwicklung aus den Bildern wurden untersucht.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass die bildbasierte Methode zur Bestimmung der Biomasse eine höhere/tiefere Genauigkeit aufweist wie die OD-Messung. Daher ist unsere Methode eine genauere Messung um eine keimfreie Bestimmung der Biomasse zu gewährleisten.

Das Ausschneiden des Bildes war notwendig, da der ganze Schüttelkolben fotografiert wurde und diese die Farbänderung in der visuellen Auswertung negativ auswirkten. Streng genommen ist die bildbasierte Studie eine Schätzung der Farbänderung, da auf dem Bild viele Geräusche einwirkten und eine einzelne Messung nicht aussagekräftig war. Wenn die Hintergrundeffekte wie z.B. Lichteinwirkung, RGB, HSV und LAB-Veränderung mitberücksichtigt werden, ist eine Schätzung der Biomasse möglich.

Statistischer Vergleich dieser Methoden wurde unter der Annahme, dass jedes Bild unabhängig ist, ebenfalls durch Matlab ® durchgeführt.

Problemstellung Segmentation: dort wo rot ist, dann nehme ich den durchschnitt und es zeigt eine dunkle fläche an 1-255. einmal für reihen dann für spalten

Bei der Anzucht von Bakterien ist es in Abhangigkeit

vom Experiment haufig erforderlich, das Wachstum

in regelmasigen Abstanden zu uberprufen.

schlus wert warum ist es gut fantasie

werte zusammenführen und diskutieren

dann wie sicher sind wir?

es korreliert meistes mit 0.95 keine streuung, was bedeutet 0.95? es ist nicht stark.. eine korrelatiosmethode pearson->methode

wie gut sind unserer methoden – statistik, warum blau nicht funktioneir tmacht sinn, papers. warum rot und grün,

wir gehen davon aus dass es normalverteilt sind . nature

:::: wie wird die farbe unterteilt, braun.

v ist maximum und bei uns rot

Für die Bildverarbeitung wird ein einfacher Schüttelkolben als Objekt gezählt. Die Schüttelkolben werden häufig in den ersten Schritten der Bioprozessentwicklung eingesetzt, da sie mit geringem Aufwand Ergebnisse erzielen und es erlauben, eine Mehrzahl von Versuchen parallel laufen zu lassen. Jedoch ist es durch die kleinen Abmessungen der Schüttelkolben schwierig wichtige Kulturparameter zu überwachen und zu kontrollieren. Zum Beispiel ist das Monitoring der Biomasse bisher nur durch Probennahme und offline Analysen möglich, mit dem Nachteil, dass sich sowohl der Arbeitsaufwand als auch die Gefahr einer Kontaminierung erhöhen.

# Schlussfolgerung

# Literaturverzeichnis

**Abbildungsverzeichnis**

**Tabellenverzeichnis**

**Anhang A**