

# Depth-from-Focus Verfahren zur absoluten Größen- und Konzentrationsbestimmung kleiner Teilchen

P. GEISSLER, B. JÄHNE, T. SCHOLZ

Interdisziplinäres Zentrum für wissenschaftliches Rechnen der Universität Heidelberg

C. SCHMIDT

ABB Forschungszentrum Heidelberg

H. SUHR

Fachhochschule Mannheim

G. WEHNERT

Fachhochschule Nürnberg

Symposium Bildverarbeitung '95, Forschen, Entwickeln, Anwenden  
Technische Akademie Esslingen, 29.11 - 01.12.1995, R.-J. Ahlers (Hrsg.)  
doi: 10.5281/zenodo.14710

## Zusammenfassung

Der Verlust der Tiefeninformation einer dreidimensionalen Szene durch die Projektion auf zweidimensionale Bilddaten stellt ein prinzipielles Problem der Bildverarbeitung dar. Die Rekonstruktion ist anhand der mit dem Abstand von der Fokusebene zunehmenden Unschärfe im Bild möglich. In diesem Beitrag werden zwei neuartige Depth-from-Focus Verfahren vorgestellt, die die Tiefenrekonstruktion anhand eines einzigen Bildes erlauben. Dies wird durch die Kenntnis sowohl der Punktantwortfunktion der abbildenden Optik als auch der Eigenschaften der abgebildeten Objekte ermöglicht.

Das erste Verfahren wurde zur Untersuchung einer ozeanographischen Fragestellung entwickelt: Um den Einfluß von durch brechende Wellen in den Ozean eingetragenen Gasblasen auf den Gasaustausch zwischen Ozean und Atmosphäre abzuschätzen, ist es notwendig, deren Größenverteilung und Konzentration zu messen. Mittels eines schnellen Algorithmus werden sowohl die absolute Größe als auch die Entfernung der Objekte von der Fokalebene aus Parametern wie der scheinbaren Größe und der mittleren Helligkeit bestimmt. Durch ein Unschärfekriterium wird ein virtuelles Meßvolumen festgelegt. Damit kann die Konzentration und Größenverteilung der untersuchten Teilchen bestimmt werden.

In Zusammenarbeit mit ABB Heidelberg wurde ein weiteres Depth-from-Focus Verfahren entwickelt. Es wird zur Bestimmung der Zellkonzentration in Bioreaktoren anhand mikroskopischer in-Situ Aufnahmen eingesetzt. Die durch zunehmende Unschärfe verursachte Abnahme hoher Ortsfrequenzen im Fourierspektrum wird durch eine räumliche Bandpasszerlegung detektiert. Sie wird mittels einer Laplacepyramide durchgeführt und liefert ein mehrdimensionales Unschärfemaß, anhand dessen Meßvolumen und Zellkonzentration ermittelt werden.

# 1 Konzentrationsmessung mittels Depth-from-Focus

## 1.1 Der Depth-from-Focus Ansatz

Ein prinzipielles Problem der Bildverarbeitung ist der Verlust der Tiefeninformation bei der optischen Abbildung. Durch die Projektion der 3D-Szene auf den zweidimensionalen Sensor geht zwangsläufig Information verloren, so daß die Rekonstruktion der ursprüngliche aufgenommenen Szene nicht möglich erscheint. Durch die Zuhilfenahme zusätzlicher Information wird dies in vielen Fällen dennoch möglich. Erstes und prominentestes Beispiel ist die Tiefenrekonstruktion durch Stereoaufnahmen. Die Zusatzinformation aus dem zweiten Bild erlaubt innerhalb gewisser Grenzen die Rekonstruktion der Entfernung der aufgenommenen Objekte.

Wenig Aufmerksamkeit wurde bisher der Möglichkeit der Tiefenrekonstruktion aufgrund der Abbildungsunschärfe gewidmet. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß unter Tiefe hier der Objektstand von einem geeigneten Punkt, i. a. von der Ebene der scharfen Abbildung, verstanden wird. Während eine Lochkamera jeden Gegenstand "scharf" abbildet, ist dies bei einer realen Abbildung mit dem Linsensystem eines Kameraobjektivs nicht der Fall. Nur Punkte auf der zur Bildebene optisch konjugierten Gegenstandsebene werden noch scharf abgebildet. Mit zunehmender Entfernung von dieser Ebene wächst die Unschärfe der Abbildung an. Daher läßt sich die Entfernung eines Objekts von der Gegenstandsebene aus seiner Unschärfe errechnen. Solche Rekonstruktionsverfahren werden daher üblicherweise als Depth-from-Focus oder genauer Depth-from-Defocus Verfahren bezeichnet. Die dabei erreichbare Genauigkeit wird von der Stärke der Zunahme der Unschärfe mit der Entfernung und der Auflösung des Sensors bestimmt. Verfügt die verwendete Optik beispielsweise über eine sehr große Tiefenschärfe, so ist eine Entfernungsbestimmung aufgrund der Unschärfe nur schwer möglich. Daher sind Depth-from-Focus Verfahren insbesondere im Bereich mikroskopischer Problemstellungen geeignet, da Mikroskopoptiken typischerweise äußerst geringe Tiefenschärfen aufweisen.

## 1.2 Depth-from-Focus mit einem und mehreren Bildern

Die meisten bisher entwickelten Depth-from-Focus Verfahren bestimmen die Entfernung anhand mehrerer, mit unterschiedlichen Kameraparametern aufgenommenen, Bildern derselben Szene. Zwei solcher Ansätze sollen hier kurz vorgestellt werden. Das von [Darell und Wohn,1990] entwickelte Verfahren basiert auf der zunehmenden Unterdrückung hoher Ortsfrequenzen durch wachsende Unschärfe. Durch Auffinden der maximalen Filterantwort in einem begrenzten Ortsfrequenzband in der Serie wird die Entfernung bestimmt. [Ens und Lawrence,1991] und [Pentland,1987] benutzten mehrere mit unterschiedlichen Blendenzahlen aufgenommen Bilder. Aus dem Vergleich der Unschärfe in den einzelnen Bildern kann die Tiefe direkt rekonstruiert werden.

Warum gerne mehrere Bilder zur Tiefenrekonstruktion herangezogen werden läßt sich aus einem einfachen Modell der defokussierten Abbildung verstehen. Bei defokussierter optischer Abbildung ist das Bild eines Punktes nicht wieder ein Punkt, sondern eine ausgedehnte Helligkeitsverteilung um den ideal fokussierten Bildpunkt. Diese Helligkeitsverteilung wird als *Punktantwortfunktion* (engl. *point-spread-function*, *PSF*) bezeichnet. Ist das System rauminvariant, so kann die Eingangspunktquelle auf der Objektebene bewegt werden, ohne

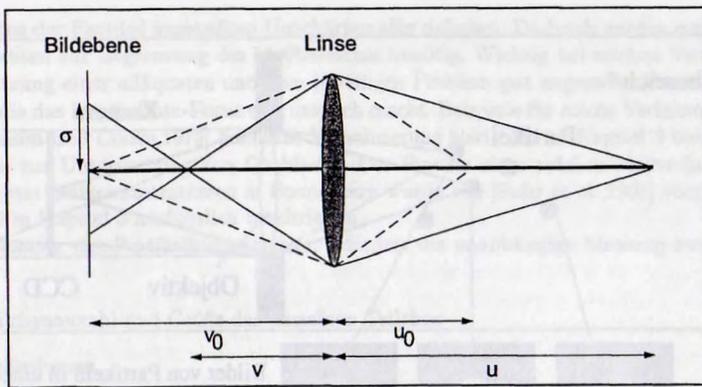


Abbildung 1: Defokussierte optische Abbildung. Der Objektpunkt bei  $u_0$  wird in einen Punkt auf der konjugierten Bildebene bei  $v_0$  abgebildet. Ein bei  $u \neq u_0$  befindlicher Objektpunkt wird in einen Punkt bei  $v = v_0$  abgebildet und erzeugt eine Helligkeitsverteilung der Breite  $\sigma$  auf der Bildebene.

daß sich - bis auf den Bildort - etwas ändert. Das bedeutet, daß die PSF ortsunabhängig ist. Die Helligkeitsverteilung auf der Bildebene ergibt sich nun als Überlagerung der Punktantworten aller Objektpunkte. Bei inkohärenter Beleuchtung handelt es sich dabei direkt um eine Addition der Intensitäten. Insgesamt läßt sich bei defokussierter Abbildung daher die Bildfunktion  $G$  als Faltung der Objektfunktion  $O$  mit der PSF beschreiben. Unter der Objektfunktion versteht man dabei die ideal scharfe Abbildung des Objekts.

$$\begin{array}{l}
 \text{Ortsraum} \quad G(\vec{x}) = PSF(\vec{x}) \otimes O(\vec{x}) \\
 \qquad \qquad \qquad \uparrow \qquad \qquad \uparrow \qquad \qquad \uparrow \\
 \text{Fourierraum} \quad \hat{G}(\vec{k}) = \widehat{PSF}(\vec{k}) \cdot \hat{O}(\vec{k})
 \end{array} \quad (1)$$

Im Fourierraum stellt sich die Defokussierung als Multiplikation der Fouriertransformierten mit der der PSF, der Optischen Transferfunktion (OTF) dar. Aufgrund der Kommutativität dieses Prozesses ist es prinzipiell unmöglich im defokussierten Bild zwischen Eigenschaften des Objekts und Eigenschaften der PSF zu unterscheiden. Unschärfe im Bild kann daher sowohl von der Defokussierung als auch vom Objekt selbst, wie z.B. langsamen Helligkeitsänderung an den Objektkanten, bewirkt werden. Die Messung der Entfernung aus der Unschärfe ist aber gleichbedeutend mit der Messung der Ausdehnung der PSF. Daher darf die aus Objekteigenschaften resultierende scheinbare Unschärfe in die Messung nicht eingehen. Prinzipiell sind zwei Lösungsweg möglich. Bei mehrmaliger Aufnahme der selben Szene mit unterschiedlichen Kameraeinstellungen wie z.B. Blendenzahl erhält man eine Bildserie mit konstanter scheinbarer und variierender aus der Defokussierung resultierender Unschärfe. Im einfachsten Fall kann man sich vorstellen daß das Bild einmal mit einer Lochkamera und einmal mit endlicher Blende aufgenommen wird. Das Bild der Lochkamera enthält keine Defokussierungsunschärfe und liefert die Information über die Objekteigenschaften. Aus dem zweiten Bild kann damit die Tiefeninformation gewonnen werden. In der Praxis benutzt man

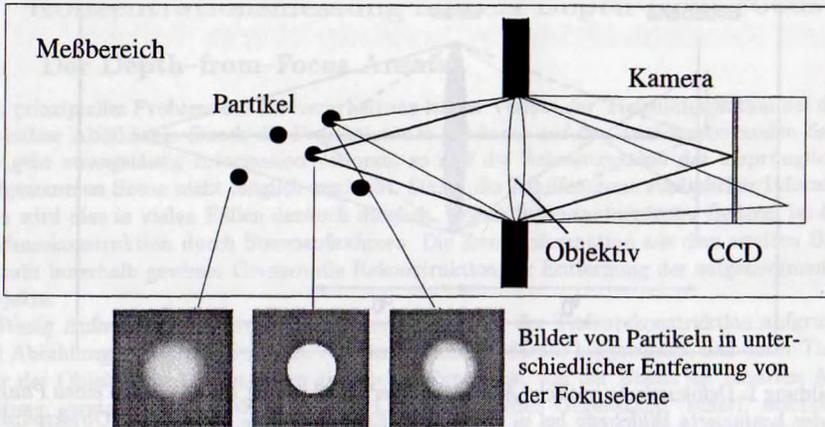


Abbildung 2: Prinzip der Konzentrationsmessung mittels Depth-from-Focus. Mit Hilfe der Abbildungsunschärfe wird die 3D-Position jedes Partikels bestimmt.

Anordnungen mit zwei oder mehr Kameras unterschiedlicher Blendenzahl. Dieser Ansatz versagt jedoch bei der Vermessung schnell bewegter Objekte. Die gleichzeitige Aufnahme aller Bilder würde dann einen hohen apparativen Aufwand mittels Strahlteilern verlangen. Für diese Anwendungen ist ein Depth-from-Focus Verfahren, das nur ein einziges Bild benötigt, von großem Vorteil.

In vielen Applikationen ist die Art der zu untersuchenden Objekte bekannt. Damit steht eine weitere Informationsquelle zur Verfügung, die zur Bestimmung der Defokussierung herangezogen werden kann: die a priori bekannten Objekteigenschaften. Dieses Zusatzwissen erlaubt die Messung der Defokussierung aus der Messung der Abbildungsunschärfe in einem einzigen Bild. Ist beispielsweise die Form der PSF zusätzlich bekannt (oft wird ein gaußförmiger Verlauf angenommen) so kann an idealen Kanten direkt die Halbwertsbreite der PSF geschätzt werden ([Pentland,1987],[Lai et al.,1992]).

Im vorliegenden Beitrag werden zwei unterschiedliche Verfahren beschrieben, die objektglobale Merkmale zur Tiefenschätzung benutzen. Sie basieren auf der konsequenten Ausnutzung der Eigenschaften der zu untersuchenden Objekte und erfordert deshalb nur eine Aufnahme jeder Szene zur Auswertung. Es ist dabei nicht nötig, die Form der PSF zu kennen.

### 1.3 Konzentrationsmessung

Beide in diesem Beitrag vorgestellte Meßverfahren beschäftigen sich mit der Bestimmung der Konzentration von Partikeln in flüssigen Medien. Die Grundidee bei der Anwendung von Depth-from-Focus auf Konzentrationsmessungen liegt in der Möglichkeit der Verwendung eines virtuellen Meßvolumens. Das Bildaufnahmesystem blickt dabei frei in das Medium hinein, wobei auch weit außerhalb des Meßbereiches befindliche Partikel beobachtet werden. Durch geringe Tiefenschärfe der aufnehmenden Optik erreicht man eine unscharfe Abbildung. Die Grenzen des Volumens werden dann durch einen Minimalwert eines geeigneten und den Ei-

enschaften der Partikel angepaßten Unschärfemaßes definiert. Dadurch werden mechanische Komponenten zur Begrenzung des Meßbereiches unnötig. Wichtig bei solchen Verfahren ist die Benutzung einer adäquaten und dem jeweiligen Problem gut angepaßte Visualisierungstechnik, die das Depth-from-Focus erst möglich macht. Beispiele für solche Verfahren sind die von [Johnson und Cooke,1979] benutzte Visualisierung sowie das in Kapitel 2 beschriebene Verfahren zur Untersuchung von Gasblasen. Der Einsatz eines solchen Meßverfahrens zur Messung von Zellkonzentrationen in Fermentern wurde von [Suhr et al.,1990] vorgeschlagen und wird in Kapitel 3 ausführlich beschrieben.

Die Messung der Partikelkonzentration erfordert die unabhängige Messung zweier Parameter:

- Teilchenanzahl und Größe der einzelnen Teilchen
- Meßvolumen

Die Messung der Teilchengröße ist i.a. nicht direkt möglich, da sie durch die Unschärfe verändert sein kann. Darüber hinaus ist bei unscharf abgebildeten Objekten die Definition des Randes und damit der Größe nicht mehr von vorneherein klar. Man definiert daher ein geeignetes Maß als scheinbare Größe des Objekts. In den hier vorgestellten Verfahren wurden diejenigen Objektpunkte, bei denen der Grauwert auf  $1/2$  bzw.  $1/e$  des maximalen Grauwerts abgesunken war, als Randpunkte definiert. Die so gemessenen Objektgrößen werden im folgenden als Halbwerts- bzw. e-Wertsflächen bezeichnet. Aus der Unschärfeinformation wird dann die Entfernung von der Fokusebene für jedes Objekt berechnet. Aufgrund dieser Information kann aus der scheinbaren Größe die wahre Größe errechnet werden.

Zur Bestimmung des Meßvolumens wird ebenfalls die Unschärfeinformation benötigt. Da der Meßbereich nicht durch Wände begrenzt wird, ist er viel größer als die Tiefenschärfe der verwendeten Optik. So blickt z.B. der in Kapitel 3 beschriebene Biomassensensor direkt in den mehrere Liter fassenden Innenraum eines Fermenters. Die Tiefenschärfe des benutzten Mikroskopobjektivs umfaßt dagegen nur etwa  $10 \mu m$ . Durch die Messung der Tiefe aufgrund der Unschärfe kennt man für jedes beobachtete Teilchen seine genaue 3D-Position. Aus den 3D-Positionen aller in einer Messung beobachteten Teilchen kann man dann das Meßvolumen berechnen. Dieses wird i.a. von der Größe der Teilchen abhängen, da ein größeres Objekt bei gleicher Entfernung von der Fokusebene weniger unscharf wirkt als ein Kleines.

Durch die Vorgabe einer maximalen erlaubten Unschärfe wird das Meßvolumen auf einen sinnvollen Bereich begrenzt. Das so definierte "virtuelle Meßvolumen" stellt einen großen Vorteil der Konzentrationsmessung durch Depth-from-Focus dar. Da das Volumen nicht durch mechanische Elemente begrenzt wird, tritt keine Störung der Strömung im Medium auf. Die zu untersuchenden Prozesse werden durch das Meßgerät daher sehr wenig beeinflusst.

## 2 Applikation 1: Messung der Größenverteilung von Gasblasen unter brechenden Wellen

Diese Applikation wurde zur Untersuchung einer ozeanographischen Fragestellung entwickelt: der Untersuchung der Mechanismen und Eigenschaften des Gasaustausches zwischen Ozean und Atmosphäre. Dieser wird bei niedrigen Windgeschwindigkeiten durch Diffusionsprozesse kontrolliert. Bei hohen Windgeschwindigkeiten werden durch brechende Wellen Gasblasen in den Wasserkörper eingetragen. Diese verstärken die Nettotransfargeschwindigkeit für klimarelevante Gase wie Kohlendioxid und Sauerstoff. Die genaue Art des Einflusses auf den Gasaustausch ist jedoch physikalisch noch nicht geklärt. Daher sind genaue und schnelle Messungen der Größenverteilung von Gasblasen in Abhängigkeit von Parametern wie der Windgeschwindigkeit und der Tiefe unterhalb der Wasseroberfläche erforderlich. An ein dafür geeignetes Meßverfahren werden die folgenden Anforderungen gestellt:

- Messung der Größe einzelner Gasblasen
- Berührungsfreiheit
- geringe Störung der umgebenden Strömung

Diese Anforderungen werden von einem Depth-from-Focus basierten optischen System hervorragend erfüllt. Darüber hinaus ergibt sich aus dem mit dem Blasenradius anwachsenden Meßvolumen eine gute Statistik auch bei den seltener auftretenden großen Blasen.

### 2.1 Meßgerät

Zur Visualisierung der Luftblasen wird eine kurzzeitgepulste Durchlichtanordnung verwendet. Aufgrund der Lichtstreuung an der Blasenoberfläche werden die Luftblasen als dunkle Objekte vor hellem Hintergrund sichtbar (Abb. 3). Das Meßgerät besteht aus zwei unabhängigen Teilen, von denen das eine das Beleuchtungssystem und das andere die Kamera enthält. Durch die geringe Tiefenschärfe der bildaufnehmenden Optik werden nur Blasen in der Nähe der Schärfenebene, die sich genau zwischen den beiden Geräteteilen befindet, scharf abgebildet. Daher kann die Position entlang der optischen Achse aus der Unschärfe bestimmt

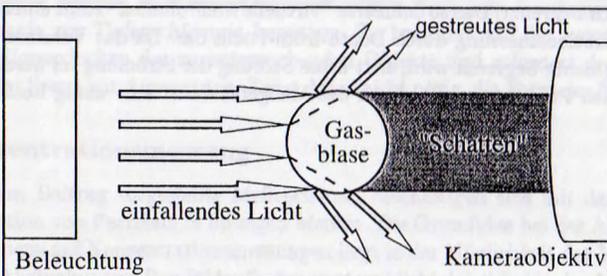


Abbildung 3: Prinzip der Hellfeldvisualisierung: das von den Luftblasen gestreute Licht gelangt nicht ins Objektiv.

werden. Die Entfernung zwischen den Geräten beträgt etwa 50 cm, die Tiefe des Meßvolumens auch für große Blasen nur einige cm. Aufgrund der hohen Strömungsgeschwindigkeiten ist eine Belichtungszeit von nur  $20 \mu\text{s}$  notwendig um zusätzliche Bewegungsunschärfe zu verhindern. Der gesamte Meßaufbau wird in wasserdichten Gehäusen unter Wasser angebracht. Er ist in [Geißler und Jähne,1995b] ausführlich beschrieben.

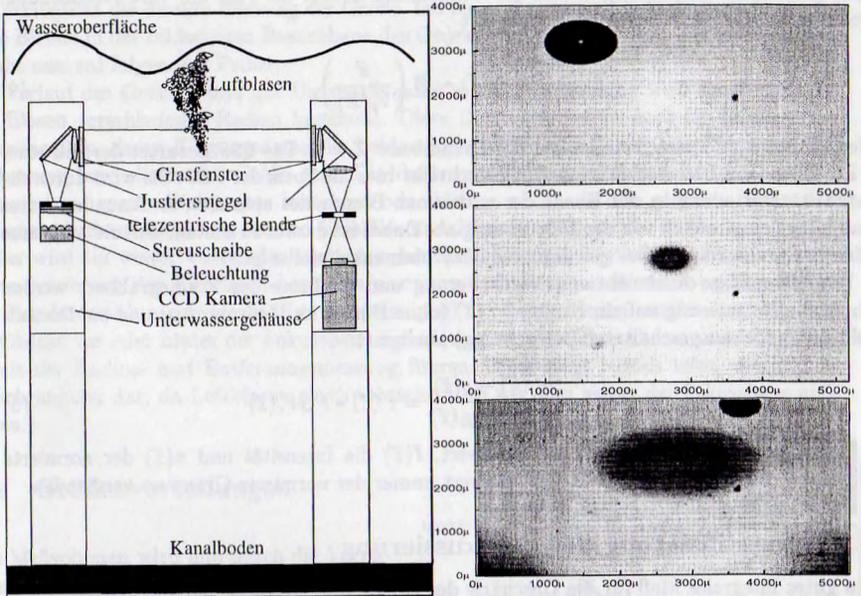


Abbildung 4: links: Schemazeichnung des Meßgeräts. rechts: Typische Bilder die mit der beschriebenen Anordnung aufgenommen wurden. Man erkennt scharf abgebildete und defokussierte Blasen.

## 2.2 Punktantwortfunktion

Entscheidend für das Depth-from-Focus Verfahren ist das Verständnis und die genaue Modellierung der Bildentstehung. Eine Luftblase kann durch ihre Lichtabsorptionsfunktion  $\tau(\vec{X})$  in der Objektebene beschrieben werden. Eine kugelförmige Blase mit Radius  $R$  an der Stelle  $\vec{X}_0$  entspricht dann einer Kastenfunktion  $\tau(\vec{X}) = \Pi(|\vec{X} - \vec{X}_0|/2R)$ .  $\Pi(x)$  ist dabei die eindimensionale Kastenfunktion. Die  $Z$ -Achse möge der optischen Achse des Systems entsprechen. Bei ideal scharfer Abbildung ist das Bild (d.h. die Intensitätsverteilung auf der CCD-Ebene) durch die geometrische Vergrößerung  $V_g(Z)$  gegeben:

$$I(\vec{x}) = 1 - \tau\left(\frac{\vec{x}}{V_g(Z)}\right) \quad (2)$$

Großbuchstaben bezeichnen dabei Weltkoordinaten, Kleinbuchstaben Koordinaten auf der CCD-Ebene. Die Abbildungsunschärfe wird jetzt durch Faltung mit der Pointspreadfunction beschrieben.

$$I(\vec{x}) = [1 - \tau \left( \frac{\vec{x}}{V_g(Z)} \right)] \otimes PSF_z(\vec{x}) \quad (3)$$

Mit wachsender Entfernung  $Z$  von der Fokusebene ändert die PSF nur ihre Ausdehnung, behält aber die gleich Form bei. Daher gilt

$$PSF_z(\vec{x}) \sim B \left( \frac{\vec{x}}{V_p(Z)} \right) \quad (4)$$

Der Faktor  $V_p(Z)$  verschwindet bei der Fokusebene  $Z = 0$ . Die PSF entartet dort zu einer  $\delta$ -Funktion. Die Blendenfunktion  $B(\vec{x})$  beschreibt hier die Form der PSF. Sie wird durch die Intensitätsverteilung in der Ebene der wirksamen Blende des optischen Aufbaus bestimmt und hängt empfindlich von der Beleuchtung ab. Daher ist darauf zu achten, daß die wirksame Blende für alle Punkte des gewünschten Meßvolumens dieselbe ist.

Ungleichmäßige Ausleuchtung, Vignettierung und Einflüsse des Framegrabbers werden durch die Normierung auf ein Nullbild  $g_z(\vec{x})$  (ohne Blasen im Meßvolumen) und ein Dunkelbild  $g_b(\vec{x})$  (bei ausgeschalteter Beleuchtung) korrigiert:

$$n(\vec{x}) = \frac{g_z(\vec{x}) - g(\vec{x})}{g_z(\vec{x}) - g_b(\vec{x})} = \tau(\vec{x}) * PSF_z(\vec{x}) \quad (5)$$

Dabei ist  $g(\vec{x}) = aI(\vec{x}) + b$  der Grauwert,  $I(\vec{x})$  die Intensität und  $n(\vec{x})$  der normierte Grauwert. Im folgenden wird unter Grauwert immer der normierte Grauwert verstanden.

### 2.3 Quantifizierung der Defokussierung

Ein gutes integrales Maß für die Unschärfe des Bildes einer Blase ist der mittlere (normierte) Grauwert über der Halbwerts- bzw. e-Wertsfläche. Er ist maximal für ideal fokussierte Blasen und nimmt mit zunehmender Defokussierung ab. Abbildung 5 zeigt den Verlauf des Unschärfemaßes für unterschiedliche Blasenradien.

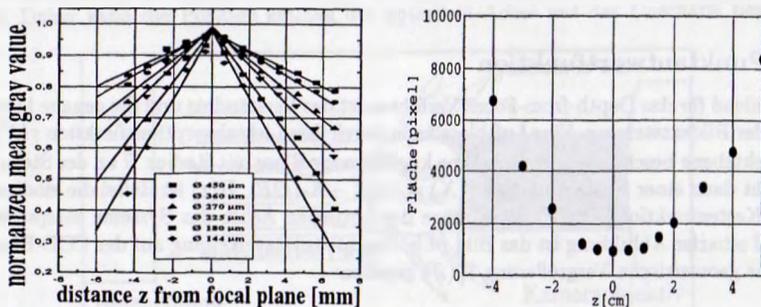


Abbildung 5: Abhängigkeit des mittleren Grauwerts über der Halbwertsfläche und des e-Wertsfläche (nicht-telezentrische Anordnung) von der Entfernung  $Z$  zur Fokusebene.

Aufgrund der Abhängigkeit des Unschärfemaßes von der Blasengröße ist eine Aussage über die Entfernung zur Fokusebene nur bei gleichzeitiger Messung der Größe möglich. Den Verlauf der als e-Wertsfläche gemessenen Größe zeigt Abbildung 5 rechts. Dabei wurde eine nicht-telezentrische Optik verwendet, bei der (wie bei den meisten Objektiven) die Blende in der Nähe der Hauptebenen des Linsensystems liegt. Benutzt man dagegen einen telezentrischen Strahlengang, so wird die Halbwertsfläche weitgehend unabhängig von der Defokussierung und ermöglicht die direkte Messung der Größe. Bei dieser Anordnung befindet sich die wirk-same Blende in der bildseitigen Brennebene des Objektivs. Das Depth-from-Focus Verfahren beruht nun auf folgendem Prinzip:

Der Verlauf des Größen- und des Unschärfemaßes mit der Entfernung wird für eine Reihe von Blasen verschiedener Radien bestimmt. Diese Daten werden in *Look-Up-Tabellen* zusammengefaßt, deren Eingangsdaten die beiden Kenngrößen und deren Ausgangsdaten die Entfernung bzw. die wahre Größe sind. Die dafür notwendigen Eichdaten werden aus Fokussierungen geeigneter Eichtargets bestimmt oder können auch aus den genauen Daten des optischen Aufbaus berechnet werden ((Geißler und Jähne,1995a)).

Hier wird ein weiter Vorteil der telezentrischen Strahlführung deutlich. Sie führt zu einer Symmetrisierung der Eichdaten bezüglich positiven und negativen Werten von  $Z$ , was bei der Standardoptik nicht der Fall ist. Da prinzipiell nicht entschieden werden kann ob sich ein Objekt vor oder hinter der Fokusebene befindet, kann diese Tatsache zu einer Zweideutigkeit der Radius- und Entfernungsmessung führen. Diese stellt jedoch keine wesentliche Einschränkung dar, da Luftblasen gleichwahrscheinlich vor oder hinter der Fokusebene auftreten.

## 2.4 Größenverteilungen

Das Meßvolumen wird nun durch die Vorgabe einer unteren Schranke für den Defokussierungsparameter definiert. Sinnvoll ist eine Begrenzung auf den Bereich in dem die Ausdehnung der PSF nicht größer als die des Objekts ist. Jenseits dieses Bereichs ist eine zuverlässige Bestimmung der Objektgröße kaum mehr möglich. Da der mittlere Grauwert für große Blasen nicht so schnell mit der Entfernung abnimmt als für kleinere Blasen führt diese Art der Volumendefinition zu einem mit dem Blasenradius anwachsend Meßvolumen. Damit wird gleichzeitig eine gute Statistik für die viel seltener auftretenden großen Blasen erzielt. Abbildung 6 zeigt beispielhaft die Abhängigkeit des Blasenspektrums von der Windgeschwindigkeit. Der Abbruch bei Radien um  $25 \mu\text{m}$  wird durch die Auflösungsgrenze des CCD verursacht.

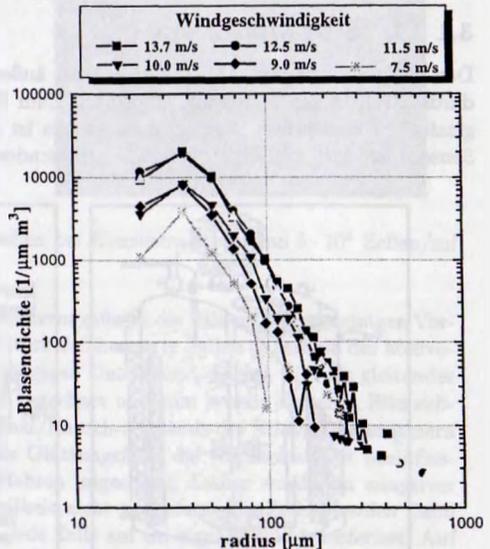


Abb. 6: Größenverteilung von Gasblasen in Süßwasser. Die Messungen wurden am großen Wind/Wellenkanal von Delft Hydraulics, Niederlande, durchgeführt.

### 3 Applikation 2: In-Situ Messung der Biomasse in industriellen Fermentationen

Viele biotechnische Verfahren werden heute industriell genutzt. Hauptaufgabe der Biotechnologie ist dabei die Produktion von Stoffen sowie die Nutzung enzymatischer Leistungen durch Mikroorganismen und Zellkulturen. Häufig werden dabei Fermenter eingesetzt: Gefäße, die der planmäßigen Kultivierung von Mikroorganismen unter kontrollierten Bedingungen dienen. Die meisten benutzten Kultivierungsverfahren sind äußerst empfindlich und benötigen ständige Kontrolle und Steuerung der relevanten Prozessparameter wie z.B. pH-Wert, Temperatur und Sauerstoffgehalt der Nährlösung. Eine der bedeutendsten Größen ist die Masse der Mikroorganismen (Biomasse) oder äquivalent die Zellkonzentration. Mittels eines Depth-from-Focus basierten bildgebenden Verfahrens ist die zuverlässige On-Line Bestimmung der Biomasse möglich. Dabei liefert ein an den Fermenter angebrachtes Fluoreszenzmikroskop ständig Bilder aus dem Reaktorinneren. Im Gegensatz zu Off-Line Verfahren entfällt bei diesem Verfahren die aufwendige und problematische Probennahme aus der Kulturbrühe. Durch die direkte Visualisierung einzelner Zellen entfällt die z.B. bei Trübungssensoren typische Fehleranfälligkeit aufgrund der Unmöglichkeit zwischen Eigenschaften des Nährmediums und der Zellen zu unterscheiden. Die Entwicklung dieses In-Situ Mikroskops wurde von ABB Heidelberg initiiert und in Zusammenarbeit mit der Technischen Universität Hannover durchgeführt.

#### 3.1 In-Situ Mikroskop

Das In-Situ Mikroskop (IMS) wird in einer äußeren Edelstahlhülle an einem 25 mm Standardstutzen in den Fermenter eingeführt. Zum Reaktorinneren hin ist es durch ein Quarzglasfenster abgedichtet. Der gesamte Aufbau ist heißdampfsterilisierbar. An der Spitze des Sensors befindet sich ein 100-fach vergrößerndes Mikroskopobjektiv. Die Beleuchtung er-

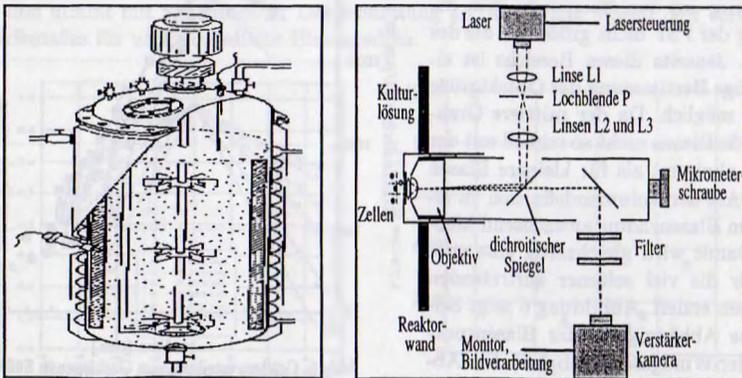


Abbildung 7: links: Schemazeichnung eines typischen Bioreaktors. rechts: Schemazeichnung des In-Situ Mikroskops.

folgt mittels eines Stickstofflasers mit einer Wellenlänge von 337 nm durch das Objektiv. Der Laser wird mittels eines dichroitischen Strahlteilers in den Abbildungsstrahlengang eingekoppelt. NADP(H)-Moleküle im Zellinneren absorbieren diese Wellenlänge und fluoreszieren dann im sichtbaren Bereich bei 460 nm. Das schwache Fluoreszenzlicht wird mit einer Bildverstärkerkamera beobachtet. Die Bildaufnahme erfolgt synchronisiert mit dem Laserpuls mit einer Wiederholfrequenz von 50 Halbbildern pro Sekunde. Aufgrund der hohen Strömungsgeschwindigkeit im Reaktor ist eine äußerst kurze Belichtungszeit Voraussetzung für die Aufnahme geeigneter Bilder. Die Pulsdauer von 3 ns des Stickstofflasers ist dafür gut geeignet. Aufgrund der Tatsache, daß NADP(H) nur in lebenden Zellen produziert wird, werden tote Zellen nicht beobachtet und verfälschen daher das Meßergebnis nicht. Die etwa 4 - 6  $\mu\text{m}$  großen Zellen werden als kreisförmige Objekte mit näherungsweise gaußscher Helligkeitsverteilung abgebildet. Die geringe Tiefenschärfe des Mikroskopobjektivs begrenzt die Tiefe des Meßvolumens auf einige  $\mu\text{m}$ . Eine genaue Beschreibung des ISM findet sich in [Suhr et al.,1995]

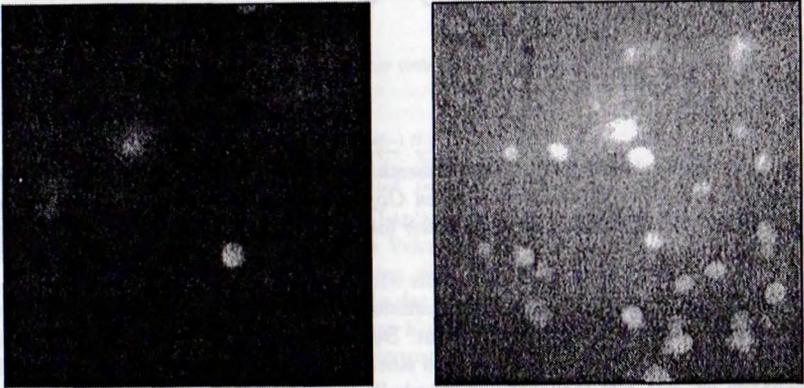


Abbildung 8: Momentaufnahmen von Hefezellen bei Konzentrationen von  $5 \cdot 10^6$  Zellen/ml (links) und  $5 \cdot 10^8$  Zellen/ml (rechts).

Vor Anwendung des Depth-from-Focus Verfahrens müssen die Bilder zunächst einigen Vorverarbeitungsschritten unterworfen werden. Stark defokussierte Zellen außerhalb des Meßvolumens verursachen einen konzentrationsabhängigen Untergrund. Dieser wird als gleitendes Mittel aus den zuletzt ausgewerteten Bildern berechnet und vom jeweils aktuellen Bild subtrahiert. Zur Verbesserung des schlechten Signal/Rausch-Abstands der Bildverstärkerkamera wird eine Glättung durchgeführt. Da globale Glättungsfiler die Kantensteilheit beeinflussen, sind sie für das Depth-from-Focus Verfahren ungeeignet. Daher wurde ein adaptiver Glättungsfiler entwickelt der die Kantensteilheit nicht verändert. Die Zellen werden dann segmentiert und voneinander separiert, d.h. jede Zelle auf ein eigenes Bild transferiert. Auf diese Bilder wird dann das Depth-from-Focus Verfahren angewendet.

### 3.2 Depth-from-Focus mittels Laplacepyramide

Bei dem für diese Applikation entwickelten Depth-from-Focus Verfahren wird ausgenutzt, daß Defokussierung im wesentlichen die zunehmende Unterdrückung hoher Ortsfrequenzen bedeutet. Abbildung 9 veranschaulicht dies an einem einfachen Beispiel. Sie zeigt ein mit gaußförmigen Punktantwortfunktionen unterschiedlicher Breite defokussiertes kleines Objekt sowohl im Orts- als auch im Fourierraum. Die Faltung mit der PSF entspricht gerade der Anwendung eines Tiefpassfilters, wodurch die niedrigen Ortsfrequenzen erhalten bleiben und die feinen Strukturen verschwinden.

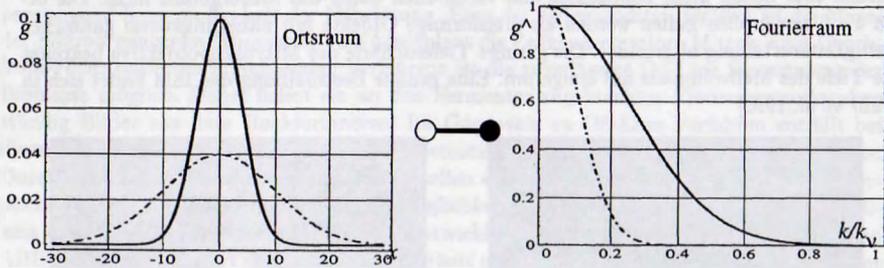


Abbildung 9: Unterschiedlich stark defokussierte Objekte im Orts- und Fourierraum. Das Frequenzspektrum des unscharf abgebildeten Objekts zeigt einen geringeren Anteil hoher Ortsfrequenzen im Vergleich zu dem des besser fokussierten Objekts (durchgezogene Linie).

Diese Änderung des Ortsfrequenzspektrums wird durch eine Bandpasszerlegung parametrisiert ([Scholz et al.,1995]). Die Laplacepyramide stellt eine effektive Methode der Bandpasszerlegung eines Bildes im Oktavabstand dar. Das Konzept der Pyramiden geht von dem Grundgedanken aus, daß man, wenn ein Bild einer Glättungsoperation unterzogen wird die so beschaffen ist, daß alle Wellenzahlen unterhalb der halben Nyquist-Grenzwellenzahl  $k_v$  bleiben, das Bild unter Ausnutzung des Abtasttheorems ohne jeglichen Informationsverlust auch auf einem doppelt so groben Gitter darstellen kann. Wird nun die Kombination aus Glättungsoperation und Unterabtasten iterativ fortgesetzt, so erhält man eine Folge von Bildern deren Fläche sich jeweils um den Faktor vier verringert. Man bezeichnet sie als die Gaußpyramide des Ursprungsbilds. Jede Stufe der Gaußpyramide enthält die gesamte Bildinformation unterhalb einer bestimmten Ortsfrequenz. Subtrahiert man nun je zwei aufeinanderfolgende Stufen der Gaußpyramide voneinander, so erhält man eine Bandpasszerlegung: die Laplacepyramide. Die  $k$ -te Stufe der Laplacepyramide ist daher:

$$L^{(k)} = [I^{(k)} - \epsilon^{(k+1)}(RB)^{(k)}] \left( \prod_{l=0}^{k-1} (RB)^{(l)} \right) G^{(0)} \quad (6)$$

- |                          |                                 |
|--------------------------|---------------------------------|
| $G^{(0)}$ : Originalbild | $B$ : Glättungsoperator         |
| $R$ : Reduktionsoperator | $\epsilon$ : Expansionsoperator |
| $I$ : Identität          |                                 |

Der hochgestellte Index eines Operators (z.B.  $R^{(l)}$ ) bedeutend dabei daß der Operator auf der  $l$ -ten Pyramidenstufe wirkt. Jede Stufe der Pyramide repräsentiert einen bestimmten

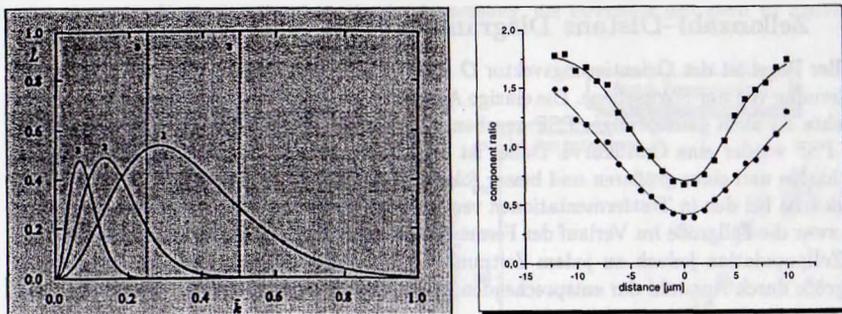


Abbildung 10: links: Transferfunktionen der Laplacepyramide (entnommen [Jähne, 1993]). rechts: Abhängigkeit der Orientierung des Merkmalsvektors von der Entfernung  $z$  von der Fokusebene.

Wellenzahlbereich. Die Transferfunktionen der unteren drei Stufen der Laplacepyramide zeigt Abb. 10 links.

Im folgenden wird mit

$$|L^{(k)}|^2 = \sum_{i=0}^{M-1} \sum_{j=0}^{N-1} (L_{i,j}^{(k)})^2 \quad (7)$$

die Impulsantwort auf der  $k$ -ten Stufe der Laplacepyramide bezeichnet. Sie errechnet sich als Summe der quadrierten Grauwerte. Der Vektor der  $|L^{(k)}|^2$  stellt einen Merkmalsvektor der Defokussierung dar, dessen Komponenten sich mit der Unschärfe ändern. Nimmt die Unschärfe im Bild zu, so nehmen die Werte der ersten Komponenten im Vektor monoton ab im Vergleich zu den anwachsenden höheren Komponenten. Insbesondere die Orientierung des Vektors im  $R^n$  hängt von der Defokussierung ab. Sie ergibt sich aus den Verhältnissen der einzelnen Komponenten zueinander

$$O_{i,j} = \tan \phi_{i,j} = \frac{|L^{(j)}|^2}{|L^{(i)}|^2} \quad i, j \in [0, 1, \dots, n] \quad \forall i \neq j \quad (8)$$

und ist unabhängig von der absoluten Helligkeit des Objekts. Das ist deshalb von Bedeutung, da die Zellhelligkeit nur vom metabolischen Zustand und nicht von der Defokussierung bestimmt wird. Abbildung 10 rechts zeigt den Verlauf der Komponenten  $O_{0,1}$  und  $O_{0,2}$  für ein Eichobjekt von  $4.5 \mu\text{m}$  Durchmesser. Als Eichobjekte wurden in Gel eingebettete Latex-Kugeln verwendet, die einen sehr gut definierten Durchmesser besitzen und deren Form der der untersuchten Zellen sehr gut entspricht. Deutlich ist der nahezu symmetrische Verlauf zu erkennen, das Minimum liegt bei der Fokusebene der Optik. Da die Kurven mit zunehmender Distanz monoton ansteigen ist eine eindeutige Zuordnung möglich. Zwischen Zellen die sich vor, und solchen, die sich hinter der Fokusebene befinden, kann nicht unterschieden werden. Dies ist zur Bestimmung des Meßvolumens auch nicht notwendig, da aufgrund der Symmetrie bei entsprechender Beachtung des Abstands zwischen Quarzglas und Fokusebene zu seiner Berechnung das Doppelte einer Grenzdistanz, innerhalb derer Zellen sichtbar sind, herangezogen werden kann.

### 3.3 Zellanzahl-Distanz Diagramme

In aller Regel ist der Orientierungsvektor  $O$  eindeutig für eine Zelle bestimmter Größe und Entfernung von der Fokusebene. Die einzige Ausnahme ist bei Vorliegen sowohl gaußförmiger Objekte als auch gaußförmiger PSF gegeben. Dann ergibt die Faltung von Objektfunktion und PSF wieder eine Gaußkurve. Daher ist es nicht mehr möglich, zwischen einer kleinen unscharfen und einer größeren und besser fokussierten Zelle zu unterscheiden. Diese Problematik tritt bei den in Testfermentationen verwendeten Hefezellen auf. Man weiß jedoch, daß sich zwar die Zellgröße im Verlauf der Fermentation verändert, die Variation der Größe über die Zellpopulation jedoch zu jedem Zeitpunkt nur gering ist. Daher kann die momentane Zellgröße durch Auswahl der entsprechenden Eichkurve aufgrund folgender Nebenbedingung bestimmt werden:

Dazu trägt man die Anzahl der unterhalb einer bestimmten Entfernung gefundener Zellen in einem Anzahl/Distanzdiagramm (s. Abb. 11) auf. Parameter dieser Kurvenschar ist die Zellgröße. Die Zellgröße kann dann aus der durch den Koordinatenursprung gehenden Kurve bestimmt werden.

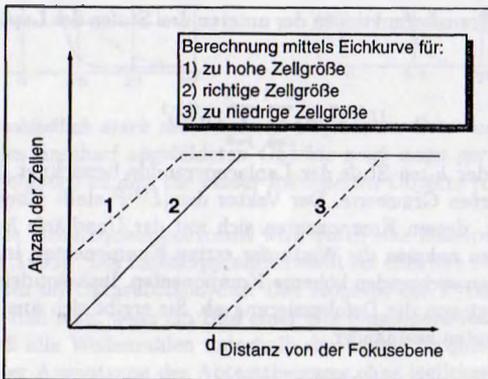


Abbildung 11: Zellanzahl-Distanz Diagramm. Die Abflachung ist auf die endliche Ausdehnung des Meßvolumens zurückzuführen.

### 3.4 Messung der Biomasse

Das beschriebene Verfahren wurde erfolgreich an einigen Standardfermentationen mit Hefezellen eingesetzt. Gleichzeitig wurde eine unabhängige off-line Messung der Zellkonzentration zu Vergleichszwecken durchgeführt. Im Verlauf einer solchen 24 h dauernden Fermentation werden ca. 25.000 Bilder aufgenommen und ausgewertet. Zu Beginn der Kultivierung wird alle 2 Sekunden ein Bild aufgenommen, später genügt aufgrund der steigenden Zellkonzentration ein Intervall von 10 Sekunden. Abbildung 12 zeigt den Verlauf der Zellkonzentration in einer Fed-Batch Fermentation, bei der den Zellen ständig Nahrung zugeführt wird, und einer Batch-Fermentation mit einmaliger Nahrungsgabe zu Beginn der Fermentation. Die Daten

zeigen eine gute Korrespondenz zur Vergleichsmessung, die ihrerseits mit etwa 10 Prozent Ungenauigkeit behaftet ist.

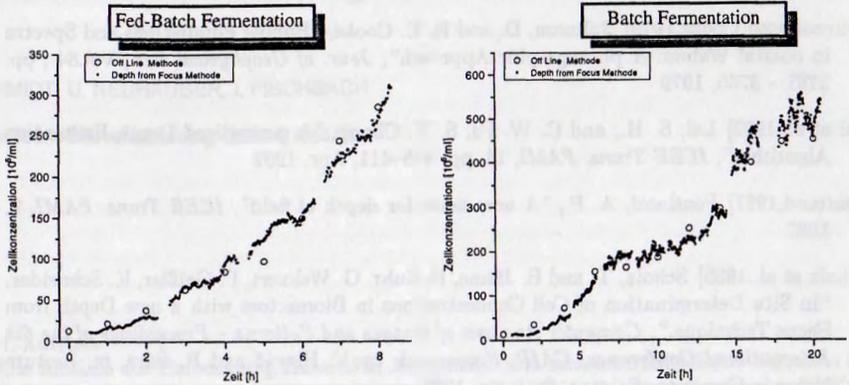


Abbildung 12: Zellkonzentrationen während der Fermentation von Hefezellen. Die Fed-Batch Fermentation zeigt einen exponentiellen Verlauf, während bei der Batch-Fermentation der typische Wechsel von exponentiellem Wachstum und stationären Phasen zu beobachten ist. Das starke Schwanken der Meßwerte zum Ende der Batch-Fermentation ist auf ein Kamera-Problem zurückzuführen.

**Danksagung:** Wir bedanken uns bei der Europäischen Gemeinschaft für die Unterstützung der Forschungsarbeit und Messungen im großen Wind/Wellenkanal von Delft Hydraulics im Rahmen des Large Installation Programs. Weiterhin danken wir dem Forschungszentrum der Asea Brown Boveri für die im Rahmen des Projekts 'In-Situ Mikroskopie in Bioreaktoren' erfolgte Unterstützung.

## Literatur

- [Darell und Wohn,1990] Darell, T., and K. Wohn, "Depth from focus using a pyramid architecture", *Pattern Recognition Letters*, 11, pp. 787-796, 1990.
- [Ens und Lawrence,1991] Ens, J. and P. Lawrence, "An investigation of methods for determining depth from focus", *IEEE Trans. PAMI*, 15, 1991.
- [Geißler und Jähne,1995a] Geißler, P. and B. Jähne, "One-Image Depth from Focus for Concentration Measurements", *Proc. of ISPRS Intercommission Workshop 'From Pixels to Sequences'*, Zurich, March 22 - 24. In *Int'l Arch. of Photog. and Rem. Sens.*, Vol 30, Part 5W1, 1995
- [Geißler und Jähne,1995b] Geißler, P. and B. Jähne, "Measurements of bubble distributions with an optical technique based on depth from focus", *Air-Water Gas Transfer - Selected Papers from the Third International Symposium of Air-Water Gas Transfer, Heidelberg*, ed. by B. Jähne and E. Monahan, Aeon Verlag Hanau, ISBN 3-9804429-0-X, 1995

- [Jähne, 1993] Jähne, B. , "Digitale Bildverarbeitung", Springer Verlag Berlin, ISBN 3-540-56926-X, 1993
- [Johnson und Cooke,1979] Johnson, D. and R. C. Cooke, "Bubble Populations and Spectra in coastal Waters: A photographic Approach", *Jour. of Geophysical Res.*, Vol.84 , pp. 3761 – 3766, 1979
- [Lai et al.,1992] Lai, S. H., and C. W. Fu, S. Y. Chang, "A generalized Depth Estimation Algorithm", *IEEE Trans. PAMI*, 14, pp. 405-411, Apr. 1992
- [Pentland,1987] Pentland, A. P., "A new sense for depth of field", *IEEE Trans. PAMI*, 9, 1987.
- [Scholz et al.,1995] Scholz, T. and B. Jähne, H. Suhr, G. Wehnert, P. Geißler, K. Schneider, "In Situ Determination of Cell Concentrations in Bioreactors with a new Depth from Focus Technique.", *Computer Analysis of Images and Patterns – Proceedings of the 6th International Conference, CAIP, Prague*, ed. by V. Hlaváč and R. Šára, in: Lecture Notes in Computer Science, Springer, 1995
- [Suhr et al.,1990] Suhr, H. und P. Speil, G. Wehnert, H. Sorhas, "In-situ-Mikroskopsonde und Meßverfahren", *Deutsche Offenlegsschrift 4032002*, 1990
- [Suhr et al.,1995] Suhr, H. and C. Bittner, P. Geißler, B. Jähne, K. Schneider, T. Scherper, T. Scholz, G. Wehnert, "In Situ Microscopy for On-Line Characterization of Cell-Populations in Bioreactors, Including Cell-Concentration Measurements by Depth from Focus", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 47, pp. 106-116, 1995