

Neues Konzept für ein modulares Robotersystem zur automatischen Untersuchung von Zebrabärblingen in Hochdurchsatzverfahren

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Ingenieurwissenschaften

von der Fakultät für Maschinenbau
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

Dissertation

von

Dipl.-Ing. Alexander Pfried

aus Ludwigshafen am Rhein

Hauptreferent:

Prof. Dr.-Ing. habil. Georg Bretthauer

Korreferenten:

Prof. Dr.-Ing. Sven Matthiesen

Tag der mündlichen Prüfung:

26. April 2016

Kurzfassung

In der vorliegenden Dissertation wird ein neues Konzept für die automatische Durchführung von Hochdurchsatzuntersuchungen mit Zebrafärbungen beschrieben. Es wird ein modulares Roboterkonzept entwickelt und umgesetzt, mit dem Einzelschritte einer Untersuchungsprozesskette automatisch realisiert werden. Als Grundroboter kommen Linearachsenroboter, angetrieben durch Schrittmotoren, zum Einsatz. Die Grundroboter werden für verschiedene Aufgaben mit unterschiedlichen Zusatzmodulen ergänzt. Bisher manuell erledigte Arbeitsschritte wie die Vorbereitung der Zebrafärbungslarven und -eier in Mikrotiterplatten und die positionsunabhängige Bildaufnahme von interessierenden Details innerhalb einer Probe werden mit dem Fischsortierroboter und dem Herzschlagmikroskop automatisch durchgeführt. Mit dem Parallelmikroskop mit mehreren parallelen Detektoren sowie mit dem Fluoreszenzmikroskop zur Detektion von Fluoreszenzmarkern können zur Vorauswahl für detailliertere Untersuchungen schnelle Voruntersuchungen durchgeführt werden. Ein auf die entwickelten Einzelroboter abgestimmtes Transportsystem mit Parallelgreifer ermöglicht den Transport von Mikrotiterplatten zwischen den Funktionseinheiten.

Für die Entwicklung der genannten Roboter, die einen automatischen Untersuchungsablauf ermöglichen, werden folgende mechanische Komponenten entwickelt. Es wird ein kartesischer Linearachsenroboter mit Zahnriemenachsen entwickelt, der durch verschiedene Komponenten für die jeweilige Funktion ergänzt wird. Mit einem Mikroverstelltisch wird eine Feinpositionierung zum Fokussieren von Kameras ermöglicht. Ein Spindelaktor mit Pipettierspitze und angeschlossener Pumpe ermöglicht die Handhabung von Flüssigkeiten. Mittels Zylinderhubmagneten werden verschiedene Mechaniken aktuiert, so unter anderem ein Parallelgreifer und eine Endpositionierung für Mikrotiterplatten. Mit einem Rollenkettenantrieb wird ein Transportsystem realisiert.

Die automatische Umsetzung der bisher manuell durchgeführten Arbeitsschritte erfordert neben Hardwareentwicklungen auch Softwarebausteine. Die bei manuellen Tätigkeiten vom Menschen erbrachte Wahrnehmungs- und Analyseleistung muss mit technischen Mitteln abgebildet werden. Hierfür werden im Rahmen der Arbeit Bildverarbeitungsmittel zur Erkennung von Informationen in Bildern angewendet. Mit Segmentierung, morphologischen Operatoren, Kantenenerkennung usw. werden Informationen aus Bildern herausgearbeitet und weiterverarbeitet. Aufbauend auf den theoretischen Grundlagen werden in der vorliegenden Arbeit speziell auf Zebrafärbungsuntersuchungen angepasste Softwaremodule entwickelt.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen des Helmholtz-Programms Bio-Interfaces am Institut für Angewandte Informatik (IAI) des Karlsruher Instituts für Technologie. Ich danke Herrn Prof. Dr.-Ing. Georg Bretthauer für die Betreuung der Arbeit und die wertvollen Hinweise bei der Erstellung dieser Dissertationsschrift. Bei Herrn Prof. Dr.-Ing. Sven Matthiesen bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats. Weiter danke ich Herrn Dr.-Ing. Stefan Schulz, dem Leiter der Fluidgruppe am IAI, für die Begleitung der Arbeit. Auch danken möchte ich meinen Kollegen Dr. Artem Kargov, Dipl.-Ing. Tino Werner, Wolfgang Rössler und Dipl.-Math. Reinhold Oberle für die gute Zusammenarbeit. Besonderer Dank gilt meinen Mitdoktoranden Dipl.-Ing. Immanuel Gaiser, Dipl.-Ing. Roland Wiegand und Dipl.-Ing. Bastian Schmitz, mit denen ich mich immer über die großen Fragen der Promotion austauschen konnte. Extra bedanken möchte ich mich bei Dipl.-Inf. Helmut Breitwieser, der sich bereitwillig und interessiert über Monate im Rahmen der Übergabe in die entwickelten Roboter hat einarbeiten lassen. Besonders danken möchte ich Herrn PD. Dr. Christian Pylatiuk, von dem ich viel über wissenschaftliches Arbeiten gelernt habe. Außerdem danke ich ihm für die zahlreichen Gespräche bezüglich der Entwicklung der einzelnen Funktionsroboter. Ich danke Herrn Prof. Dr.-Ing. Ralf Mikut, dem Leiter der Arbeitsgruppe Biosignalanalyse am IAI, für die gute Zusammenarbeit und die fachlichen Anregungen im Bereich Bildverarbeitung. Weiter danke ich Herrn Dipl.-Ing. Rüdiger Alshut für die Unterstützung beim Einarbeiten in die Bildverarbeitung. Ich danke Herrn Eduard Gursky für die fruchtbare Zusammenarbeit und die Unterstützung bei der Entwicklung der Software. Weiter möchte ich mich bei Herrn Dr. Urban Liebel, dem Leiter einer Arbeitsgruppe am Institut für Toxikologie und Genetik (ITG), für die zahlreichen Diskussionen und Anregungen bezüglich Laborautomatisierung für Zebrabärblingsuntersuchungen bedanken. Außerdem möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bei der Entwicklung des Fischsortierers sowie des Parallelmikroskops bedanken. Bei Dr. Clemens Grabher, dem Leiter einer Arbeitsgruppe am Institut für Toxikologie und Genetik (ITG), möchte ich mich für die Kooperation bei der Entwicklung des Fischsortierers und des Fluoreszenzmikroskops mit seiner Arbeitsgruppe bedanken. Auch bedanken möchte ich mich bei Tanja Sims und Dipl.-Biol. Christine Wittmann für die zuverlässige Bereitstellung von Zebrafischeiern und die Anwendungstests mit dem Fischsortierer. Besonders möchte ich mich auch bei den von mir betreuten Studenten und Hiwis Uli Delventhal, Coli Celik, Bertram Ziegner, Markus Hirtler, Matthias Grabowski, Rodrigo del Alcazar von Buchwald, Christian Stan, Waldemar Spomer, Gregor Graf, Martin Ungerer, Sebastian Hamsch, Ali El Zein, Jordan Oudot und Daniela Sanchez für ihr engagiertes und

professionelles Arbeiten bedanken. Sie haben mit ihren Arbeiten wichtige Beiträge zur vorliegenden Dissertation geleistet. Mein herzlicher Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer unterstützt haben. Besonders meinen Eltern, meinem Bruder Matthias und meiner Frau Marta möchte ich danken, dass sie mir immer geholfen haben, alle meine Vorhaben erfolgreich umzusetzen.

Dreieich, im Januar 2015

Alexander Pfriem

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	7
Danksagung	9
1 Einleitung	1
1.1 Bedeutung von Hochdurchsatzverfahren	2
1.1.1 Biologische Untersuchungen mit Modellorganismen	4
1.1.2 Modellorganismus Zebrafisch	6
1.1.3 Untersuchungsmethoden mit Zebrafisch	8
1.2 Entwicklungsstand Hochdurchsatzverfahren mit Zebrafisch	11
1.2.1 Aktuell genutzte Roboterfunktionstypen in Biolabors	12
1.2.2 Neue Forschungsansätze für spezielle Roboter für Zebrafischun- tersuchungen	16
1.3 Ziele und Aufgaben	27
2 Neues Konzept für ein automatisches Hochdurchsatzverfahren	31
2.1 Übersicht	31
2.2 Anforderungen	33
2.3 Komponenten	36
2.3.1 Linearachsenroboter	36
2.3.2 Grundlagen optischer Komponenten	41
2.3.3 Bildverarbeitung zur Informationsgewinnung	48
2.3.4 Softwaregrundkonzept und Kommunikation PC Roboter	51
3 Entwicklung des Fischsortierers	55
3.1 Konzept Fischsortierer	55
3.2 Hardwarekomponenten	58
3.3 Funktionsmodule zur Realisierung des automatischen Ablaufes	59
3.3.1 Auswahl der Kamera und des Objektivs	59
3.3.2 Beleuchtungskonzept	61
3.3.3 Fluidtechnik/Pumpe	62
3.4 Entwickelter Pipettiersensor	66

3.5	Clustervereinzelung	69
3.5.1	Strömungsformen und ihr Einfluss auf die Verteilung der Fische .	72
3.5.2	Entwicklung einer Mechanik zur Vereinzelung von Fischclustern .	74
3.6	Software des Fischsortierers	78
3.6.1	Bildverarbeitung zur Fischerkennung	80
3.6.2	Fallerkennung nach Auswertung der Bildverarbeitung	84
3.6.3	Fallerkennung nach Auswertung des Pipettiersensors	85
3.6.4	Koordinatenberechnung und Fischauswahl	86
3.6.5	Automatische Protokolldatei	89
3.7	Evaluierung des Fischsortierers	91
4	Entwicklung der Mikroskope	95
4.1	Entwicklung des Parallelmikroskops	95
4.1.1	Konzept Parallelmikroskop	95
4.1.2	Hardwarekomponenten	97
4.1.3	Software	101
4.1.4	Evaluierung des Parallelmikroskops	102
4.2	Entwicklung des Herzschlagmikroskops	104
4.2.1	Konzept Herzschlagmikroskop	104
4.2.2	Hardwarekomponenten	107
4.2.3	Software	110
4.2.4	Evaluierung des Herzschlagmikroskops	118
4.2.5	Berechnung der Herzfrequenz anhand der erzeugten Videos . . .	119
4.3	Entwicklung des Fluoreszenzmikroskops	122
4.3.1	Konzept Fluoreszenzmikroskop	124
4.3.2	Hardwarekomponenten	126
4.3.3	Software	131
4.3.4	Evaluierung des Fluoreszenzmikroskops	131
5	Entwicklung des Transportsystems	135
5.1	Konzept Transportsystem	136
5.2	Hardwarekomponenten	139
5.2.1	Schienensystem mit Antrieb	139
5.2.2	Greifarm	141
5.2.3	Aktive Plattenhalterung zur Endpositionierung	146
5.3	Ereignissteuerung mit einer einfachen, elektrischen Schaltung	150
5.4	Evaluierung des Transportsystems	154
6	Zusammenfassung	157

A	Anhang	161
A.1	Versuchsdokumentationen	161
A.1.1	Vorgehensweise bei der Ermittlung der Größen von Zebrafischen und -larven	161
A.1.2	Versuche Berstdruck Fischeier	164
A.1.3	Beleuchtungsversuche für den Fischsortierer	166
A.1.4	Nachweis Unschädlichkeit Fischsortierer	170
A.2	Datenblätter	173
B	Abbildungsverzeichnis	185
C	Tabellenverzeichnis	191
D	Literaturverzeichnis	193

1. Einleitung

In der vorliegenden Dissertation wird ein neues Konzept zur Automatisierung von Hochdurchsatzverfahren in der Bioanalysetechnik vorgestellt. In der Bioanalysetechnik werden Grundlagen zu biologischen Entwicklungsprozessen untersucht und Krankheitsmechanismen werden erforscht. Zum Verständnis von normalen und krankhaften Prozessen, wie sie gesteuert werden und wie die Steuerung beeinflusst werden kann, ist Bioanalysetechnik essentiell.

Anhand von Grundlagenuntersuchungen sollen biologische Vorgänge nachvollzogen werden. Das abgeleitete Grundverständnis kann dann dazu genutzt werden, komplexere Systeme zu analysieren, um dann möglicherweise auch biologische Prozesse beeinflussen zu können. Mit den erzielten Erkenntnissen über biologische Systeme können auch beim Menschen zielgerichtet Heilmittel und -methoden gegen Krankheiten entwickelt werden. Im besten Fall könnten krankhafte Prozesse wie Fehlentwicklungen oder gar Krebs gezielt korrigiert werden. Die Motivation biologische Abläufe zu erklären, ist der Leitgedanke des Helmholtz-Programms *Bio-Interfaces*. In dem interdisziplinären Programm werden biologische Schnittstellen, interzelluläre Kommunikation und genetische Steuerung biologischer Vorgänge erforscht. Neben der Biologie wird in verschiedenen Fachgebieten an Technologien geforscht, die die Durchführung der biologischen Untersuchungen vorantreiben, erleichtern und verbessern können. So arbeiten Chemiker an der effizienten Synthese von nötigen Untersuchungssubstanzen, Informatiker an schneller, systematischer Datenverarbeitung und Ingenieure an Automatisierungstechnik zur Beschleunigung der Untersuchungen.

Die vorliegende Dissertation leistet einen Beitrag zur Automatisierung von Hochdurchsatzverfahren. Hochdurchsatzuntersuchungen (engl.= high throughput screens, HTS) mit Zebrafärbliingen haben sich seit den 1990er Jahren zu einem sehr wichtigen Arbeitsfeld entwickelt. Aktuelle Untersuchungen mit Zebrafärbliingen sind im Durchsatz dadurch beschränkt, dass einige Prozessschritte nur manuell durchgeführt werden können. Die Dissertation beschäftigt sich mit der Konzeption und Entwicklung von Automatisierungslösungen für Hochdurchsatzuntersuchungen mit Zebrafärbliingen. Ziel der Automatisierung von biologischen Untersuchungen ist es, den nötigen Personal- und Kostenaufwand zu reduzieren und wissenschaftliche Erkenntnisse schneller und leichter erreichbar zu machen. Durch Automatisierung werden systematische Untersuchungen mit großem Umfang ermöglicht, die mit manuellem Aufwand unwirtschaftlich und langwierig sind. Das Verstehen von biologischen Zusammenhängen sowie die Suche nach biologisch aktiven Wirkstoffen kann damit beschleunigt werden.

1.1. Bedeutung von Hochdurchsatzverfahren

Hochdurchsatzverfahren sind Untersuchungsmethoden, bei denen systematisch eine Vielzahl von Proben auf bestimmte Kriterien geprüft wird. Hochdurchsatzverfahren bestehen aus Einzeltätigkeiten, die nacheinander ausgeführt werden. Zu Beginn der Untersuchung werden die Proben in geeigneten Untersuchungsgefäßen vorbereitet. Die eigentliche Untersuchung ist meist die Zugabe von Substanzen oder das Einwirken chemischer oder physikalischer Einflüsse, so dass eine Reaktion mit den Proben statt findet. Nach der Reaktion werden die Proben begutachtet und die Reaktion wird ausgewertet. Systematische Untersuchungen der Bioaktivität von Substanzen mit Probendurchsätzen von mehr als 10 000 Proben pro Tag werden als Hochdurchsatzscreens bezeichnet [64]. Zellbasierte Screens können schon ab wenigen 100 Proben pro Tag als Hochdurchsatzuntersuchung gelten, da die Handhabung von lebenden Zellen wesentlich anspruchsvoller ist [9].

Hochdurchsatzverfahren mit riesigen Probenumfängen sind von großer Bedeutung bei der Entschlüsselung biologischer Prozesse und deren Steuerungsmechanismen, bei toxikologischen Untersuchungen in Medikamentenzulassungsverfahren und bei Untersuchungen von Umweltstoffen auf ihre Schädlichkeit. Die technische Analyse biologischer Prozesse wird als Biotechnologie bezeichnet. Die Biotechnologie beschäftigt sich mit der kommerziellen Nutzung von biologischem Grundlagenwissen [27]. Zur Anwendung des Grundlagenwissens sowie zur Erlangung neuer Grundlagenkenntnisse wird Bioanalysetechnik verwendet. Der Einsatz von Bioanalysetechnik erstreckt sich von entwicklungsbiologischer Grundlagenforschung über Medizintechnik zum Verständnis von Krankheiten bis hin zu kommerziellem Einsatz in der Medikamentenentwicklung. Zur Aufdeckung und zum Verstehen von biologischen Prozessketten werden normale und krankhafte Abläufe untersucht. Normal ablaufende entwicklungsbiologische Prozesse zu verstehen und zu entschlüsseln, ist ein wichtiges Forschungsgebiet in der Bioanalysetechnik. Ein weiteres Arbeitsgebiet ist das Verstehen der Entstehung von Krankheiten und darauf aufbauend die Suche nach Methoden, um Heilmittel zu finden. Normale Entwicklungsprozesse, die es zu verstehen gilt, sind beispielsweise die Embryonalentwicklung, die Spezialisierung von Zellen während der Embryonalentwicklung sowie Regenerationsprozesse und Selbstheilung. Für krankhafte Prozesse wie Fehlentwicklungen, Tumorbildung und Krebs sollen gezielte Heilmittel entwickelt werden. Die genannten Prozesse funktionieren über komplexe Biosignalwege, die durch Genetik und Botenstoffe gesteuert werden. Die Herausforderung ist es, die Entwicklungsprozesse zu entschlüsseln und das erworbene Wissen im Kampf gegen verschiedenste Krankheiten und Defekte einzusetzen [118].

Die Anforderung hohe Probenumfänge untersuchen zu müssen, ergibt sich aus der Komplexität biologischer Prozesse. Biologische Prozesse funktionieren über komplexe Steuerungsmechanismen und Signalwege. Gene beinhalten die Information zur Synthese von Proteinen. Proteine erfüllen diverse Funktionen als Botenstoffe, Rezeptoren oder Zellbausteine. Während

ein biologischer Prozess abläuft, kommt es meist zur Umwandlung und Reaktion diverser Substanzen. Dabei werden häufig Zwischenstadien eingenommen, die sich gegenseitig beeinflussen. Kleine Änderungen von einzelnen Reaktanten können weitreichende Folgen haben. Unbekannte Biosignalwege müssen häufig nach dem Trial and Error Prinzip entschlüsselt werden. Dabei entstehende Zwischenstadien können nicht einfach simuliert werden, sondern müssen experimentell bestimmt und nachgewiesen werden. Wirkungen von bioaktiven Substanzen zur Beeinflussung biologischer Prozesse können rein aufgrund der Molekülstruktur der zu betrachtenden Substanz nicht vorhergesagt werden [27, 124]. Daher sind zur Entschlüsselung der Zusammenhänge zwischen Chemikalien und ihrer biologischen Aktivität riesige Probenumfänge nötig [47, 63]. In sogenannten *small molecule screens* werden ganze Molekülbibliotheken auf ihre Wirkung überprüft [33, 110, 124]. Jeder möglicherweise bioaktive Stoff wird dabei in verschiedenen Konzentrationen in Experimenten an Modellorganismen getestet. Ein solches, flächendeckendes Vorgehen dient dazu, bisher unbekannte bioaktive Stoffe zu identifizieren, um in weiteren Untersuchungen deren Wirkung genauer zu erforschen. Die beschriebene Vorgehensweise des Testens von Substanzen auch in verschiedenen Konzentrationen hat große Probenumfänge zur Folge [96, 120]. Auf Grund der Notwendigkeit des Tests vieler Tausend Substanzen, da keine a priori Abschätzung zur Wirkung gemacht werden kann, sind Probenumfänge von mehreren Zehntausend Proben schnell erreicht. Beispielsweise wurden in einem small molecule screen systematisch 5000 Substanzen mit Zebrafischmutanten auf ihre Eignung getestet, eine bestimmte Entwicklungsstörung zu heilen [48, 124]. Es wurden dabei zwei neue Substanzen gefunden, die eine vielversprechende Wirkung hatten. In einer weiteren Versuchsreihe wurde eine Molekülbibliothek mit 16 320 Stoffen (engl.= compounds) untersucht. Pro Woche wurden 1000 Substanzen an Zebrafischmutanten auf ihre Wirkung getestet. Die Durchführung der Testreihe dauerte also 16 Wochen lang. Als Ergebnis wurde ein Molekül gefunden, das die Krebshäufigkeit bei den getesteten Mutanten erniedrigt hat [124]. Mit entsprechender Automatisierungstechnik können solche Untersuchungen mit weniger Personalaufwand und schneller durchgeführt werden.

Ein weiterer Aspekt, der hohe Probenumfänge nötig macht, ist die Existenz gesetzlicher Regelungen für die Sicherheit verschiedener Produkte und Stoffe. In Medikamentenzulassungsverfahren müssen beispielsweise mit potenziellen Wirkstoffen gegen Krankheiten weitere, zahlreiche Untersuchungen durchgeführt werden. Auch durch verschiedene gesetzliche Vorgaben und Richtlinien für Standardtestverfahren werden immense Probenumfänge gefordert. Die EU Verordnung Nr. 1907/2006 „REACH“ gibt Testvorschriften für die Toxizität von Stoffen, die in der Umwelt vorkommen, vor [23]. Neben anderen Modellorganismen eignet sich der Zebrafisch (Danio rerio) auf Grund seiner herausragenden Eigenschaften besonders für Hochdurchsatzuntersuchungen. Es wurden für Zebrafische Untersuchungsprotokolle in Standards und Richtlinien definiert. Durch solche Standarduntersuchungsmethoden werden ebenfalls große

Probenumfänge erforderlich. So wird z.B. mit *DarT* [67] ein Standardtestverfahren beschrieben, mit dem toxikologische Untersuchungen von Abwässern vorgenommen werden können. Die Testsystematik wurde von der OECD in der Richtlinie *fish embryo test FET* [76] umgesetzt. Auch die deutsche Norm DIN EN ISO 15088 [20] beschreibt die Eignung und Besonderheiten beim Einsatz von Fischembryos zur Bestimmung der Toxizität von Abwässern. In der Norm werden sogenannte toxikologische Endpunkte an Zebrabärblingen definiert, anhand derer Schäden in der Entwicklung des Organismus erkannt werden können. Toxikologische Endpunkte sind u.a. Koagulation¹ (Denaturierung der Proteine in einem abgestorbenen Fischei), fehlender Herzschlag und fehlende Spontanbewegung. Die Vorgabe eines Kataloges an typischen Erkennungsmerkmalen ermöglicht die Untersuchung von großen Probenumfängen mit standardisierten Methoden.

Die Größe der Probenumfänge ist im Normalfall schon durch die Eingangsfragestellung vorgegeben, sodass zur wirtschaftlichen und rationellen Durchführbarkeit von Hochdurchsatzverfahren die nötige Zeit sowie die zu erzeugenden Datenmengen auf ein notwendiges Minimum beschränkt werden sollen. Hochdurchsatzvorhaben sind ohne Automatisierungstechnik nicht mit rationellem Personaleinsatz durchführbar. Auch bei niedrigeren Durchsatzgeschwindigkeiten ist der Einsatz von Robotern sehr vorteilhaft, da monotone, tausendfach zu wiederholende Tätigkeiten zuverlässig und schnell erledigt werden. Ein Hauptaspekt zur Eröffnung der Möglichkeit von Hochdurchsatzscreens mit großen Probenumfängen ist das Substituieren von manuellen Arbeitsschritten durch automatische Abläufe [32, 59]. Die Aufgabe für Ingenieure liegt darin, Automatisierungslösungen zu entwickeln, die Eingriffe durch Menschen vermeiden, die Untersuchungszeit reduzieren und die Möglichkeit zum parallelen Untersuchen mehrerer Proben bieten [69].

1.1.1. Biologische Untersuchungen mit Modellorganismen

Für toxikologische, genetische und entwicklungsbiologische Untersuchungen kommen in der Biologie häufig Modellorganismen zum Einsatz. Modellorganismen sind Ersatzsysteme, mit deren Hilfe biologische Prozesse nachvollzogen werden können. Typische Modellorganismen sind Bakterien, Pilze, Ratten, Fruchtfliegen, Würmer und seit einigen Jahren auch Zebrabärblinge. Bei der Untersuchung an einem Modellorganismus wird ein im Modellorganismus ablaufender Prozess beobachtet und analysiert, um beispielsweise dessen Struktur und Steuerung zu verstehen.

Drei verschiedene Einsatzmöglichkeiten von Modellorganismen werden unterschieden und zwar *in vitro*, *in vivo* und *in situ*. *In vitro* Untersuchungen, also im Reagenzglas und damit außerhalb eines biologischen Organismus, eignen sich besonders gut für Hochdurchsatzverfahren, da Untersuchungen immer in Petrischalen auf Nährböden statt finden. Hierfür eigenen

¹lat. koagulare = gerinnen

sich einzelne Zellen oder Bakterien. Auf Grund der geringen Komplexität der Organismen sind aber auch die Ergebnisse nur bedingt auf den Menschen übertragbar. *In vivo* Untersuchungen finden mit kompletten Organismen statt. Beliebte Vertreter sind die Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), der Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*), die Maus (*Mus musculus*) und der Zebrafisch (*Danio rerio*) [118]. Ein Vorteil bei *In vivo* Untersuchungen ist, dass parallel ablaufende Prozesse und ihre gegenseitige Beeinflussung zur gleichen Zeit untersucht werden können. Die Untersuchung kann damit unter Realbedingungen durchgeführt werden. Durch die gegenüber Bakterien oder Einzelzellen höhere Komplexität der genannten Organismen können wesentlich mehr Fragestellungen bearbeitet werden und die Aussagekraft der Informationen bezüglich der Übertragbarkeit auf den Menschen ist höher. Gleichzeitig wird aber die Haltung und Handhabung der Organismen erschwert und dadurch die Hochdurchsatzfähigkeit herabgesetzt. Bei *in situ* Untersuchungen werden Modellorganismen in ihrem natürlichen Lebensraum untersucht. Hierbei ist es jedoch besonders schwierig, reproduzierbare Messbedingungen zu erzielen.

Die Auswahl eines geeigneten Modellorganismus hängt stets von der Fragestellung ab [95]. Modellorganismen können anhand der Kriterien Komplexität, Handhabung, Kosten und Eignung für Hochdurchsatz gegliedert werden. Je höher die Komplexität eines Modellorganismus ist, desto aussagekräftiger werden die Erkenntnisse bezüglich der Übertragung auf den Menschen. Gleichzeitig werden aber der Schwierigkeitsgrad, der Aufwand und die Kosten der Untersuchung erhöht, weil meist im Umgang mit komplexen Organismen keine Hochdurchsatzmethoden angewendet werden können. In einfachen Modellorganismen können möglicherweise bestimmte Aspekte einer Fragestellung gar nicht erzeugt werden, wodurch die Aussagekraft der Versuchsreihe abnimmt. Verschiedene Modellorganismen haben spezifische Vor- und Nachteile. Ein Vorteil von *Drosophila* ist, dass sich ca. 60% der Gene von *Drosophila* in ähnlicher Form auch beim Menschen finden [32]. Somit können sich Versuchsergebnisse gut auf den Menschen übertragen lassen. Solche ähnlichen Gene werden Homologe genannt. In vielen Jahren der Arbeit mit *Drosophila* wurden viele tausend Mutantenlinien erzeugt, was eine große Bandbreite an Untersuchungen ermöglicht. Nachteilig für die Hochdurchsatzeignung ist, dass *Drosophila* sich nicht in wässrigem Medium entwickeln [118]. Die Handhabung der Individuen sowie das Aufbringen von flüssigen Testsubstanzen ist dadurch wesentlich erschwert. Nachteilig ist weiter, dass keine Untersuchungen an nur in Wirbeltieren vorkommenden Organen wie Niere oder Mehrkammerherz möglich sind, da diese Organe in *Drosophila* nicht vorhanden sind [21]. Der Fadenwurm *C. elegans* besitzt 50% homologe Gene bezogen auf den Menschen. Ein wesentlicher Vorteil an *C. elegans* ist die Transparenz des Körpers, sodass von außen die Entwicklung von inneren Organen beobachtet werden kann. Außerdem kann der Wurm im wässrigen Medium gehalten werden und eignet sich für Untersuchungen in Mikrotiterplatten. Weiter können *C. elegans* lange Zeit im Kryozustand konserviert werden [32]. Nachteilig ist jedoch, dass nicht

alle Krankheiten von Wirbeltieren modelliert werden können. Beispielsweise können Wirbellose wie *C. elegans* nicht in ähnlicher Weise an Krebs erkranken wie Wirbeltiere [5]. Die Maus (*Mus musculus*) hat mit 90% den höchsten Anteil homologer Gene mit dem Menschen [32]. Von großem Nachteil bei der Maus ist jedoch die sehr aufwändige Haltung sowie die schwierige Zugänglichkeit von frühen Entwicklungsstadien [21]. Da sich die Nachkommen im Uterus der Mutter entwickeln, können die Entwicklungsprozesse nur sehr schwer beobachtet werden.

Beim Einsatz von wenig komplexen Organismen reduzieren sich Kosten, Aufwand und Schwierigkeit der Untersuchungen. Je höher die Komplexität, desto höher ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen. Die genannten Trends sind in Abbildung 1.1 erkennbar. Es ist zu erkennen, dass der Zebrafisch gerade die Grenze zu Hochdurchsatzuntersuchungen darstellt. Seine Komplexität ist hinreichend hoch, um eine gute Übertragbarkeit der Ergebnisse zu erwarten, gleichzeitig ist er auch relativ einfach in großer Anzahl zu halten. Weiter ist durch die geringe Größe und durch die Tatsache, dass die Larven sich im Wasser entwickeln, eine Hochdurchsatzzeichnung gegeben. Zebrafische stellen daher einen sehr guten Kompromiss dar zwischen Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen und der Eignung für Hochdurchsatzverfahren, die bei Zebrafischen ähnlich der von Wirbellosen ist [33]. Die Vorteile des Zebrafisches als Modellorganismus werden im Folgenden beschrieben.

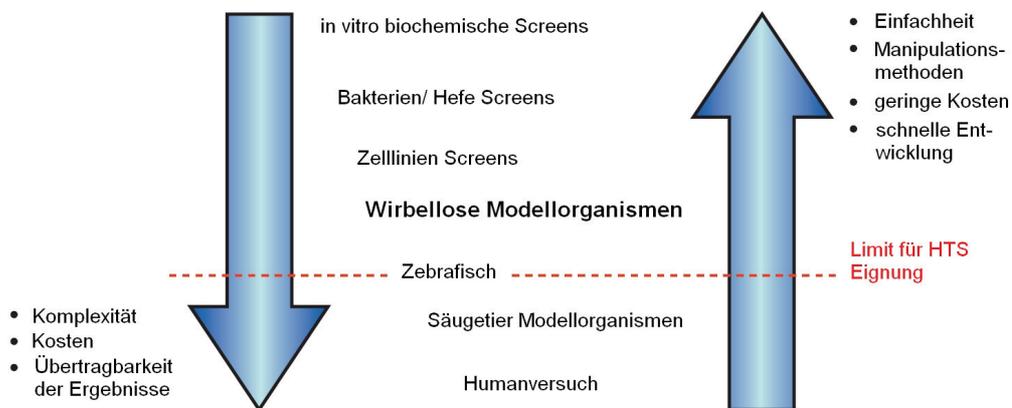


Abb. 1.1.: Komplexität eines Modellorganismus gegenüber seiner Eignung für Hochdurchsatzuntersuchungen ([95])

1.1.2. Modellorganismus Zebrafisch

Der Zebrafisch (*Danio rerio*), umgangssprachlich wegen des englischen Namens *zebrafish* auch häufig als Zebrafisch bezeichnet, hat sich seit Mitte der 90er Jahre als hervorragender Modellorganismus für biologische Untersuchungen etabliert. Die diversen Vorteile von Zebrafischen als Modellorganismus wurden in zahlreichen Veröffentlichungen dargestellt [21, 56, 119]. Die herausragendsten Vorteile sind die Transparenz im Larvenstadium und die

Embryonalentwicklung außerhalb der Mutter. Dadurch können Prozesse, die im Innern ablaufen, ohne besonderen Aufwand von Außen beobachtet werden. Somit können auch Phenotypen, also die äußere Erscheinung eines Organismus, leicht erkannt und klassifiziert werden. Die Erkennung und Klassifizierung von verschiedenen Phenotypen sind wichtige Untersuchungsergebnisse (engl.= read outs) in biologischen Untersuchungen. Zebrafische bekommen eine hohe Anzahl an Nachkommen. Ein Zebrafischpärchen erzeugt ca. 100 bis 200 Fischeier pro Gelege [33]. Außerdem ist die Generationszeit sehr kurz, eine befruchtete Eizelle wächst innerhalb von 24 Stunden zur vollausgebildeten Zebrafischlarve und schlüpft bereits nach 48 bis 72 Stunden aus dem Chorion² [52]. Verschiedene Entwicklungsstadien von Zebrafischlarven sind in Abbildung 1.2 zu sehen. Die Larve ist noch nicht vollständig entwickelt und ernährt sich aus ihrem Dottersack, ist jedoch soweit entwickelt, dass sie selbstständig schwimmt. In der weiteren Entwicklung werden die Organe voll ausgebildet und der Dottersack wird dabei aufgebraucht. Nach 120 h ist die Larve soweit entwickelt, dass sie mit der eigenständigen Nahrungsaufnahme beginnt. Erst ab dem Stadium, indem die Larve externe Nahrung aufnimmt, gilt sie der Definition nach als Tier. Dementsprechend sind Versuche mit den Embryos im Chorion oder mit Larven bis 120 h per Definition keine Tierversuche [108]. Nach 100 Tagen ist der junge Zebrafisch selbst fruchtbar. Die Erzeugung von homozygoten Mutanten rezessiver Merkmale (zwei Generationen nötig) ist daher schnell erreichbar [38]. Die Fische können in großen Gruppen in Wassertanks leben, die Haltung ist daher wenig aufwändig und kostengünstig. Die Haltung ist 100 bis 1000 mal günstiger als die Haltung von Mäusen [33]. Daher eignen sich Zebrafische auch für Hochdurchsatz mit großem Probenumfang („large scale screens“). Die Organismen sind hinreichend komplex, sodass die erzielten Untersuchungsergebnisse gut auf den Menschen übertragbar sind. Zebrafische sind dem Menschen sehr ähnlich, über 70% des Genoms sind vergleichbar [32]. Gleichzeitig sind Zebrafische groß genug für chirurgische Eingriffe. Außerdem konnten bisher eine Vielzahl an genetisch veränderten Exemplaren, sogenannte Mutanten, erzeugt werden, in denen Krankheiten modelliert wurden. Es wurden Mutanten zur Erforschung von Krebs, Diabetes, Alzheimer, Herzerkrankungen und vielen weiteren Krankheiten erzeugt [5, 21, 33, 99, 109, 110, 124]. Nachkommen der Mutanten können durch Verpaarung jederzeit erzeugt werden und so können diverse Fragestellungen bearbeitet werden. Es gibt ähnlich wie bei Mäusen sehr viele Arbeitstechniken wie beispielsweise Induzierung von Genmutationen durch Strahlung oder Einbringung von Fremd-DNA, Exposition von Toxinen bis hin zu Transplantationen [56, 94, 110]. Auch die Nutzung von fluoreszenten Markern ist in Zebrafischen möglich und eröffnet damit die Möglichkeit, Prozesse beobachten zu können, die ohne Marker nicht sichtbar sind. Aufgrund ihrer Größe können Untersuchungen in Mikrotiterplatten durchgeführt werden, was eine weitere Voraussetzung für Hochdurchsatzuntersuchungen erfüllt. Ihre im Vergleich zu anderen Wirbeltieren kleine Körpergröße und die Tatsache, dass sie sich im

²Das Chorion, auch Fruchthülle genannt, umgibt als Schutzhülle Embryos von Wirbeltieren

Wasser entwickeln, führt zu geringen Mengen an für Tests nötige Substanzen, außerdem lassen sich die Substanzen über Wasser als Medium leicht verabreichen [118]. Da in Zebrafischlarven schon nach 48 h alle Organe entwickelt sind und der Organismus auf Umwelteinflüsse reagiert, können Tierversuche zu Umweltgiftstoffen oder Toxizität von neuen Chemikalien in Zulassungsprozessen ersetzt werden [39, 67, 108].

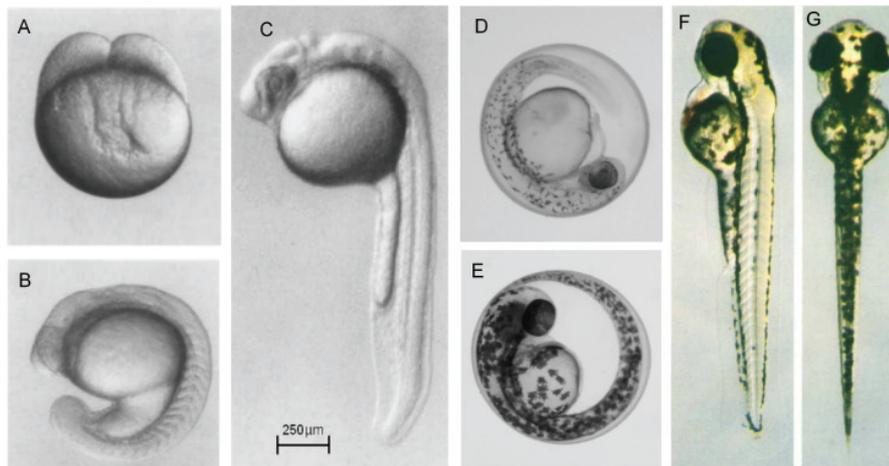


Abb. 1.2.: Entwicklung eines Zebrafischembryos, Altersangabe in hpf (=Stunden nach Befruchtung), (A,B,C (ohne Chorion) aus [52]) A: 45 min nach Befruchtung, B: 17,5 hpf, C: 24 hpf, D: 36 hpf (im Chorion), E: 48 hpf (im Chorion), F: 60 hpf von links (lateral), G: 60 hpf, Rückenansicht (dorsal)

1.1.3. Untersuchungsmethoden mit Zebrafischlingen

Seit Jahren gibt es umfassende Standardwerke, in denen beschrieben ist, wie Zebrafische gehalten werden sollen und wie die normale Entwicklung eines Zebrafisches im Detail statt findet [8, 52, 55]. Mit dem Wissen über den normalen Entwicklungsverlauf können in Untersuchungen Abweichungen im Entwicklungsprozess erkannt werden. Außerdem wurden bereits diverse Anweisungen zum tierschutzgerechten Umgang mit Zebrafischen und Fischen im Allgemeinen beschrieben [19, 72, 98].

Für den Zebrafischling können grundsätzlich drei Untersuchungsmethoden unterschieden werden:

- toxikologische Untersuchungen
- genetische Untersuchungen
- pharmazeutische Untersuchungen.

Toxikologische Untersuchungen

In toxikologischen Untersuchungen wird der Einfluss von Umweltstoffen und neu zuzulassenden, synthetischen Stoffen auf biologische Organismen getestet. Ein typisches Beispiel für eine toxikologische Untersuchung ist eine LC50 Versuchsreihe (letale Konzentration für 50% der Versuchsorganismen). Dabei werden Zebrafische unterschiedlichen Konzentrationen des zu untersuchenden Stoffs ausgesetzt. Nach einer bestimmten Inkubationszeit wird ausgewertet, wie viele Zebrafische sich normal entwickeln, wie viele Entwicklungsstörungen zeigen und wie viele tot sind. Aus den Daten wird der LC50-Wert berechnet, also der Wert, der für 50% der Fische tödlich ist. Der LC50-Wert ist ein wichtiger Indikator zur Einschätzung der Toxizität eines Stoffs [96].

Genetische Untersuchungen

Genetische Untersuchungen sind wichtig zum Verständnis von biologischen Prozessen. Hierbei werden auf verschiedene Art und Weise genetische Veränderungen vorgenommen und deren Wirkung erforscht. Genetische Screens können in *forward genetics* und *reverse genetics* gegliedert werden [94]. In der *forward genetics* Arbeitsweise werden durch Bestrahlung, Exposition von Chemikalien oder Einbringen von Fremd-DNA zufällige Mutationen hervorgerufen. Die entstehenden Fischlarven werden dann auf Veränderungen gegenüber dem Wildtypen hin untersucht. So können beispielsweise für weitere Analysen wertvolle Mutanten erzeugt werden. So z.B. Mutanten, die einen bestimmten Defekt aufweisen, der einer Krankheit beim Menschen ähnelt. Anhand eines Krankheitsmodells können Substanzen getestet werden und es wird versucht, den normalen Phenotyp wieder herzustellen. Eine solche Form der Untersuchung nennt sich Rettungsexperiment. Die Substanzen, die zur Heilung der Krankheit in Frage kommen, retten den Phenotyp. Beispielsweise wurde ein Mutant erzeugt, der genetisch bedingt Herzrhythmusstörungen aufweist [7]. In einem Rettungsexperiment wird dann nach Substanzen gesucht, nach deren Zugabe sich der Herzschlag wieder normalisiert [94].

Beim *reverse genetics* Ansatz wird ein Gen, dessen Funktion unbekannt ist, ausgeschaltet und der entstehende Mutant wird auf Veränderungen gegenüber dem Wildtyp untersucht [109]. Fehlt beispielsweise ein Merkmal im Mutanten, so kann angenommen werden, dass die veränderte Gensequenz für das beeinflusste Merkmal verantwortlich ist. Die Untersuchungsform wird *Knockout-Screen* genannt. Ein unbekanntes Gen kann sogar gezielt ausgeschaltet werden mit speziellen Bindungsmolekülen, sogenannte Morpholinos [117].

Wichtig bei toxikologischen und bei genetischen Untersuchungen sind *small molecule screens*. Hierbei werden große Bibliotheken von Substanzen zusammengestellt. Von jeder Substanz wird nur sehr wenig Material eingesetzt, was die Kosten niedrig hält. Das ist mit dem Zebrafisch möglich, da er im Wasser lebt. Die Substanz wird im Wasser gelöst und wird vom Zebrafisch durch die Haut sowie die Kiemen und den Mund aufgenommen. Die Substanzen werden dar-

auf untersucht, ob sie bioaktiv sind. Sogenannte *Hits*, die im ersten Screen eine Auffälligkeit zeigen, können dann im Nachhinein mit weiteren Versuchsreihen untersucht werden. Das Vorgehen eignet sich sowohl zur Bestimmung der Toxizität von vielen Substanzen gleichzeitig als auch bei der Suche nach Wirkstoffen in Rettungsexperimenten [110, 118, 124].

Pharmazeutische Untersuchungen

Pharmazeutische Untersuchungen zielen auf die Entwicklung neuer Medikamente und werden unter kommerziellen Gesichtspunkten durchgeführt. In pharmazeutischen Untersuchungen werden gefundene bioaktive Substanzen auf ihre Nutzbarkeit als Wirkstoff für Medikamente getestet. Es wird ermittelt, ob die Bioaktivität des Stoffes konzentrationsabhängig ist und es müssen diverse Zulassungstests durchgeführt werden, so unter anderem die Prüfung der möglichen Nebenwirkungen des Wirkstoffs [61, 118].

Die drei genannten Untersuchungsmethoden können als Hochdurchsatzuntersuchung auf verschiedene Art durchgeführt werden [64]. Es gibt Hochdurchsatzverfahren zum schnellen Abarbeiten von großen Probenumfängen in kurzer Zeit mit geringer Auflösung. Weiter gibt es *high content* Untersuchungen, bei denen ein geringer Probenumfang bearbeitet werden kann, dafür ist jedoch der Informationsgehalt der Aufnahmen sehr hoch. Je nach Fragestellung muss die richtige Untersuchungsmethodik gewählt werden, also die Wahl zwischen hohem Durchsatz und hoher Detailtiefe. Bei der Fokussierung auf Hochdurchsatz muss jedoch immer die Qualität der Ergebnisse mit betrachtet werden. In [47] wird gezeigt, dass kleine Änderungen von Versuchsparametern schon zu einer Fülle an nichtssagenden Werten führen können. Sogenannte „*false positives*“, also vermeintliche Treffer, die aber keine sind und „*false negatives*“, also eigentliche Treffer, die jedoch in der Untersuchung nicht erkannt wurden, da sie keine Wirkung zeigten, machen eine wissenschaftlich fundierte Deutung der Daten schwierig. In [47, 61] werden Vorgehensweisen beschrieben, mit denen unbrauchbare Ergebnisse vermieden werden können.

Den drei genannten Untersuchungsmethoden ist gemein, dass zur Auswertung der Ergebnisse meistens bildgebende Verfahren wie Lichtmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden. Das anhand des Bildmaterials abgelesene Untersuchungsergebnis (engl.= read out), ist dann beispielsweise der erkennbare Phenotyp oder toxikologische Endpunkte wie Koagulation, fehlender Herzschlag, fehlende Spontanbewegung und Missbildungen (siehe DIN 15088 [20]). Außerdem haben die verschiedenen Methoden gemeinsam, dass eine Grundvoraussetzung die massenhafte Vorbereitung von Zebrafischlarven oder -eiern in Mikrotiterplatten ist. Mikrotiterplatten sind Standardprobenträger mit vielen Einzelkammern auf kleiner Grundfläche. Die Außenmaße sind immer ca. 120 x 80 mm und die Anzahl der Einzelkammern ist entweder 6, 24, 96, 384 oder 1534. Demnach haben die Einzelkammern Volumina von 5ml (6), 3ml (24), 300 μ l (96), 100 μ l (384), 10 μ l (1534). Die Einzelkammern werden auch *wells* genannt. Durch

die systematische Benennung der einzelnen Kammern ist eine lückenlose Dokumentation der durchgeführten Untersuchungen möglich. In den Einzelkammern können alle Fische mit unterschiedlichen Substanzen oder Konzentrationen behandelt werden. Der dritte charakteristische Teil der meisten Zebrafischuntersuchungen ist Liquidhandling zum Einen zum Handling der Zebrafische, die in Wasser gehalten werden, und zum Anderen zum Aufbringen von Substanzen.

1.2. Entwicklungsstand Hochdurchsatzverfahren mit Zebraabärblingen

Zur Durchführung von biologischen Experimenten mit Zebraabärblingen als Modellorganismus müssen eine Vielzahl von Arbeitsschritten nacheinander durchgeführt werden. In Biolabors werden bisher die meisten der Einzeltätigkeiten manuell durchgeführt [32]. Zu Beginn jeder Untersuchung müssen die Proben für die Untersuchung vorbereitet werden. Zur wissenschaftlichen Dokumentation der Experimente müssen alle Proben einzeln so präpariert werden, dass sich die Experimente nicht gegenseitig beeinflussen. Im Falle von Zebraabärblingsuntersuchungen kommen zur Probenpräparation häufig Einzelkammerplatten, sogenannte Mikrotiterplatten (engl. well plate), zum Einsatz. In jede Probenkammer wird ein Zebraabärbling sortiert und pro Kammer wird ein Experiment durchgeführt. Als eigentliches Experiment werden im nächsten Schritt meist chemische Substanzen, deren Wirkung untersucht werden soll, mit Pipetten in die Kammern gebracht. Um die Wirkung der aufgetragenen Substanzen sehen zu können, werden die Kammern einzeln unter hochauflösenden Mikroskopen begutachtet. Anhand des aufgenommenen Bildmaterials werden von Biologen Aussagen über die Wirkung der Substanzen getroffen.

Ein Beispiel für eine Prozesskette eines Zebrafischscreens ist in Abbildung 1.3 zu sehen. Wie zu erkennen ist, ist die Prozesskette gekennzeichnet von manuellen Arbeitsschritten. Manuelle Arbeitsschritte sind z.B. Pipettieren von Fischeiern in Mikrotiterplatten, Herstellen und Aufbringen von Toxinlösungen in Einzelkammern, Aufnahmen von Bildern oder Videos mit Mikroskopen, Dokumentation der aufgenommenen Datensätze und Auswertung des erzeugten Bildmaterials und Schlussfolgerung bezüglich der Eingangsfragestellung [57, 103].

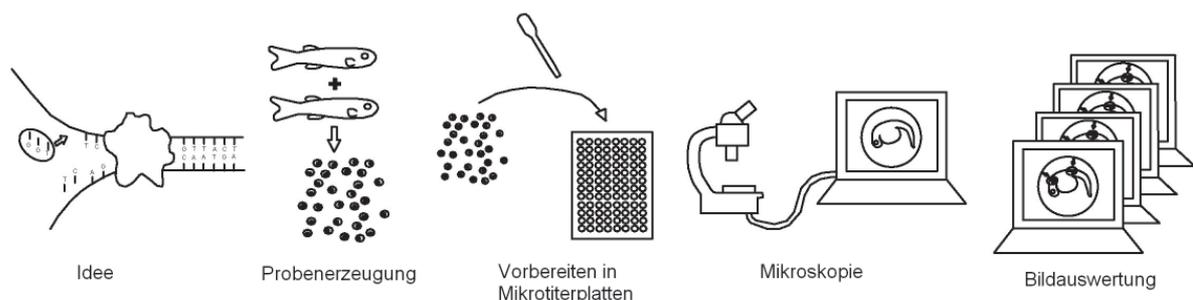


Abb. 1.3.: Prozesskette eines Zebrafischscreens [86](modifiziert nach [2])

In großen Pharmakonzernen, in denen die Wirtschaftlichkeit von Forschungsvorhaben von großer Wichtigkeit ist, kommen zur gezielten Wirkstoffentwicklung seit einigen Jahren Robotersysteme zum Einsatz. Es handelt sich dabei meist um Pipettierautomaten, die automatisiert ganze Molekülbibliotheken auf Nährböden oder Toxine auf Proben aufbringen können. Auch Handhabungsroboter zum Probentransport und zur Bestückung der Pipettierautomaten kommen zum Einsatz. Die vorherrschenden Trends hierbei zielen auf Miniaturisierung der Proben und damit auf geringen Verbrauch von teuren Testsubstanzen und auf Erhöhung des Durchsatzes [9, 64].

In den meisten Biolabors dagegen haben Automatisierungslösungen nur zu einem geringen Teil Einzug gehalten. Mit Robotern zum Handhaben von Flüssigkeiten werden automatisiert Substanzen in Mikrotiterplatten pipettiert. Außerdem wurden bereits Mikroskope teilautomatisiert, sodass viele Proben nacheinander aufgenommen werden können. Über das reine Pipettieren von Substanzen hinaus bringt jedoch der Umgang mit ganzen Organismen wie dem Zebrafischbesatz besondere Anforderungen an die Probenvorbereitung mit sich. Eine mechanisch zu unvorsichtige Handhabung einer Zebrafischlarve oder eines Zebrafischeis kann zu Verletzungen und Einflüssen auf die weitere Entwicklung führen. Im Gegensatz dazu stellt der Umgang mit Bakterien weniger Anforderungen an die Automatisierungstechnik. Beim Testen von Chemikalien an Bakterienkulturen kann ein gesteuerter Liquidhandlingroboter die Substanzen zielgerichtet platzieren, ohne Schaden an der Kultur hervorzurufen. In [54] wird über zwei Verfahren berichtet, in denen erstmals Gewebe und Mikroorganismen automatisch für Untersuchungen vorbereitet wurden.

Immer größer werdende Probenumfänge bei gleichzeitiger Verkürzung der angestrebten Prozesszeiten machen einen effizienten Einsatz von Laborrobotik unumgänglich [59]. Laborautomatisierung umfasst neben der Laborrobotik auch die aus der Robotik entstehenden Anforderungen an Messungen, Datenhandhabung, Dokumentation sowie Probenvorbereitung [26]. So muss auf Grund der schnellen Entwicklung der Zebrafischbesatz durch Software ein Zeitmanagement für die Untersuchungen umgesetzt werden. Weiter müssen Konzepte erarbeitet werden, um die großen Datenmengen, die automatisch erzeugt werden, auszuwerten. Der Stand der Technik für aktuelle Laborautomatisierung in Biolabors kann in zwei Themenfelder gegliedert werden. Zum Einen in allgemeine Laborrobotik mit kommerziell verfügbaren Robotern und zum Anderen in Automatisierungsanwendungen speziell für Untersuchungen mit Zebrafischbesatz. Beide Themengebiete werden im Folgenden betrachtet.

1.2.1. Aktuell genutzte Roboterfunktionstypen in Biolabors

In manchen Biolabors kommen Roboter zur Handhabung von Flüssigkeiten zum Einsatz. Mit solchen Pipettierautomaten werden Konzentrationsreihen hergestellt oder Toxine aufgebracht. Die kommerziell verfügbaren Roboter sind meist Portalroboter und haben Pipettierköpfe mit

einer oder mehreren Pipettenspitzen. Hersteller solcher Roboter sind unter anderem die Firmen Caliper, Tecan, Zinsser Analytic, Analytic Jena, Perkin Elmer und CTC Analytics.

Ein weiteres Aufgabengebiet, in dem vermehrt Roboter eingesetzt werden, ist die Handhabung von Mikrotiterplatten. Hierbei kommen zum Greifen und Positionieren der Platten meist Roboterarme in Scarakonfiguration mit Parallelgreifern zum Einsatz. Mikrotiterplatten können somit automatisch von einer Prozessstation zur nächsten gebracht werden. Um eine große Anzahl an Mikrotiterplatten nacheinander abarbeiten zu können, gibt es auch automatische Magazine, in denen die Mikrotiterplatten gestapelt werden und nach Bedarf auf einer Abholplattform zur Verfügung gestellt werden. Für den linearen Transport über größere Strecken gibt es Transportsysteme. Hersteller robotischer Funktionselemente für die Handhabung von Mikrotiterplatten sind beispielsweise Hamilton Robotics, Hudson Robotics, KBioscience, Agilent, Coulter Beckman, HighRes Biosolutions.



Abb. 1.4.: Übersicht Laborrobotik allgemein: oben v.l.n.r.: Plattenhandhabungsroboter „plate crane EX“ von Hudson Robotics, Multikanalpipettierroboter „Zephyr“ von Caliper Life Science, Pipettierroboter „FasTrans“ von Analytik Jena; unten v.l.n.r.: Plattenhandhabungsroboter „ACell“ von HighRes Biosolutions, Pipettierroboter „PAL“ von CTC Analytics, automatisches Mikroskop „ScanR“ von Olypmus, Bildquelle: Internetseiten der Hersteller (www.olympus-europa.com, www.highresbio.com, www.analytik-jena.de, www.palsystem.com, www.perkinelmer.com, www.hudsonrobotics.com, 20.05.2013)

Zur bildgestützten Auswertung der Experimente kommen Mikroskope zum Einsatz. Einige wenige Mikroskope wurden teilautomatisiert, indem Probenstische integriert wurden, die mo-

torbetrieben verschoben werden können. Zur automatisierten Experimentdurchführung können je nach Aufgabestellung des Experiments z-Achse, x- und y-Kreuztisch, Kondensator, Fluoreszenzfilterrevolver, Filterräder, Objektivrevolver sowie Shutter motorisiert werden [90]. Mit entsprechend erweiterter Software können so alle Kammern einer Mikrotiterplatte nacheinander unter dem Objektiv positioniert werden und die Inhalte der Kammern werden mikroskopisch aufgenommen. Filterwechsel bei Fluoreszenzmikroskopen oder Beleuchtungswechsel müssen automatisiert ablaufen können. Hersteller sind Leica mit dem *LSI* oder Olympus mit dem *ScanR*.

Neben hochauflösenden Mikroskopen gibt es auch sogenannte *plate reader* mit Fluoreszenz. Hierbei wird kein Bild von den Proben aufgenommen, sondern es wird quantitativ die Menge der Fluoreszenz gemessen. Solche Fluoreszenzmikroskope können für ganze Mikrotiterplatten die Intensität der Fluoreszenz der Proben in jeder Kammer messen. Solche Geräte gibt es von den Firmen Thermo Scientific, BioTek und Perkin Elmer.

Zur Analyse von Proben, die nur einige Mikrometer groß sind und die in flüssigen Medien vorbereitet werden, wurde die sogenannte Durchflusszytometrie (engl. flow cytometry) entwickelt. Die zu untersuchenden Proben werden mit dem flüssigen Medium durch eine Messstrecke gepumpt und dabei analysiert. Ein Hersteller eines solchen Systems ist die Firma Union Biometrica.

Auch für das Bestücken der automatischen Mikroskope wurden kommerzielle Lösungen entwickelt. Das ScanR von Olympus beispielsweise wird zusammen mit einem Standsäulenroboter der Firma Hamilton Robotics als automatische Workstation vertrieben. Der Hamilton Roboter besitzt einen Parallelgreifer, mit dem Mikrotiterplatten gehandhabt werden können. In speziellen Regalen vorgehaltene Mikrotiterplatten werden nach einander zum Mikroskop gebracht und gescannt.

Fazit aktuell genutzte Robotertypen

Die aktuell in Biolabors eingesetzten, kommerziell verfügbaren Roboter sind Pipettierautomaten, Handhabungssysteme für Mikrotiterplatten und teilautomatisierte Mikroskope. Mit ihnen werden Standardaufgaben wie das Pipettieren von Substanzen in Mikrotiterplatten und das Transportieren von Mikrotiterplatten durchgeführt. Es können damit viele Mikrotiterplatten automatisch, nacheinander mit Flüssigkeiten befüllt werden. Eine Spezialisierung der kommerziell verfügbaren Roboter auf die besonderen Anforderungen von biologischen Proben wie Zebrafische gibt es nicht. Das heißt eine Hochdurchsatzuntersuchung mit Zebrafischen erfordert immer die manuelle Vorbereitung der Proben in Mikrotiterplatten. Jedoch ist gerade das Befüllen von Mikrotiterplatten mit tausenden Proben sehr aufwändig und zeitintensiv. Ein weiteres Hindernis für einen flächendeckenden Einsatz von Automatisierungstechnik ist, dass die Pipettierautomaten und Handhabungssysteme für eine Vielzahl von Biolabors durch die hohen

Anschaffungskosten nicht bezahlbar sind.

Die kommerziell verfügbaren automatischen Mikroskope sind hochpräzise Analysegeräte, die Aufnahmen von hoher Qualität ermöglichen. Im Hinblick auf Hochdurchsatzuntersuchungen sind sie aber recht langsam und außerdem sehr teuer. In der Natur von biologischen Experimenten liegt, dass aufgrund des Trial and Error Prinzips große Mengen an Proben keine interessante Information beinhalten. Nur die Experimente, die als Treffer eingestuft werden, sind interessant. Für Hochdurchsatzuntersuchungen muss die Durchlaufzeit pro Probe reduziert werden. Eine Möglichkeit, das zu erreichen, ist, die Experimente ohne signifikantes Ergebnis auf schnellere Art und Weise zu erkennen. Die Trefferexperimente dagegen werden weiter mit der erforderlichen Qualität mit den kommerziell verfügbaren Geräten aufgenommen. Zur Realisierung von hohen Durchsätzen müssen also Geräte entwickelt werden, die dazu in der Lage sind, eine schnelle Vorsortierung der Experimente durchzuführen. Voruntersuchungen mit parallelisierten Aufnahmeprozessen und geringer Auflösung und anschließende hochauflösende Aufnahmen nur bestimmter Bereiche wurden von Starkuviene et al. [103] als Herausforderungen identifiziert.

Mit den automatischen Mikroskopen können nacheinander alle Kammern einer Platte aufgenommen werden. Für bestimmte Untersuchungen ist es jedoch nötig, dass nicht nur eine Übersicht der gesamten Kammer aufgenommen wird, sondern, dass Teilregionen eines Fisches mikroskopiert werden sollen. Die Auswahl und Aufnahme eines bestimmten Ausschnitts kann bisher nur von Biologen manuell gemacht werden, indem die Proben solange unter dem Objektiv verschoben werden, bis der gewünschte Bereich im Bild erscheint. Eine automatische Erkennung gewünschter Bereiche und eine Anpassung der Optik auf den aufzunehmenden Detailbereich wird die manuelle Arbeit wesentlich verringern.

Die Pipettierroboter und die automatischen Mikroskope wurden bisher nicht zu kommerziell verfügbaren Gesamtanlagen verbunden, sodass Pipettieren und Mikroskopieren nicht automatisch nacheinander ablaufen. Ein Bediener muss die Platten nach dem Befüllen durch den Pipettierroboter dann dem Mikroskop zuführen. Die verfügbaren Roboter zur Handhabung von Mikrotiterplatten wurden von keinem Hersteller bisher dazu genutzt, einen Pipettierautomaten mit einem Mikroskop zu verbinden, sodass Mikrotiterplatten ausgetauscht werden können.

Um einen vollständigen Untersuchungsablauf mit den vorgestellten Einzelfunktionsrobotern möglich zu machen, müssen die verschiedenen Roboter der verschiedenen Hersteller mit einander in Software und Hardware verbunden werden. Hierbei entstehen Herausforderungen in der Kompatibilität der Hardware sowie der Softwareschnittstellen zur gemeinsamen Steuerung des Ablaufs. Sollen Zebrafischuntersuchungen vollständig automatisch durchgeführt werden können, müssen die Konzepte der einzelnen Stationen des Untersuchungsprozesses aufeinander abgestimmt werden und auf die Besonderheiten von Zebrafischuntersuchungen zugeschnitten werden.

1.2.2. Neue Forschungsansätze für spezielle Roboter für Zebrafischuntersuchungen

Die bisherigen Ansätze zur Automatisierung von Zebrafischuntersuchungen können gegliedert werden in ganzheitliche Ansätze, die eine vollständige Automatisierung einer Untersuchung zum Ziel haben und spezielle Technikentwicklungen, die Einzelelemente einer Untersuchung automatisch umsetzen. Wenige solcher Lösungen sind bisher kommerziell verfügbar. Aktuell gibt es verschiedene akademische Forschungsansätze und Entwicklungen für die Handhabung von Zebrafischen, die in aktuellen Veröffentlichungen von internationalen Forschungsgruppen vorgestellt werden. Die automatischen Untersuchungstechnologien sowie die Ansätze zur Automatisierung der Handhabung von Zebrafischen werden im Folgenden näher betrachtet.

Forschungsansätze für automatische Prozessketten

Die Firma Festo arbeitet an einem modularen Konzept zur automatischen Durchführung von biologischen Untersuchungen. Verschiedene Funktionseinheiten können flexibel auf einer speziellen Grundoberfläche ergänzt oder entfernt werden. In Abbildung 1.5 ist das *LabFab* Konzept zu sehen. Die Funktionseinheiten sind um eine erweiterbare Grundfläche angeordnet. Die speziellen Labortische haben im Randbereich universelle Anschlüsse für die Funktionseinheiten (dunkle Ovale). Die Fläche im Innenbereich der Labortische ist der Bewegungsraum der Probentransporter. Die Probentransporter, genannt Läufer, sind motorisiert und können Proben, z.B. auch Mikrotiterplatten, zu den entsprechenden Einheiten bringen. Je nach Anforderung können somit spezielle Funktionseinheiten auf dem Tisch installiert werden und mit Hilfe der Probentransporter kann ein Austausch der Proben zwischen den Einheiten passieren. Die Handhabung von Zebrafischen ist nicht explizit vorgesehen.

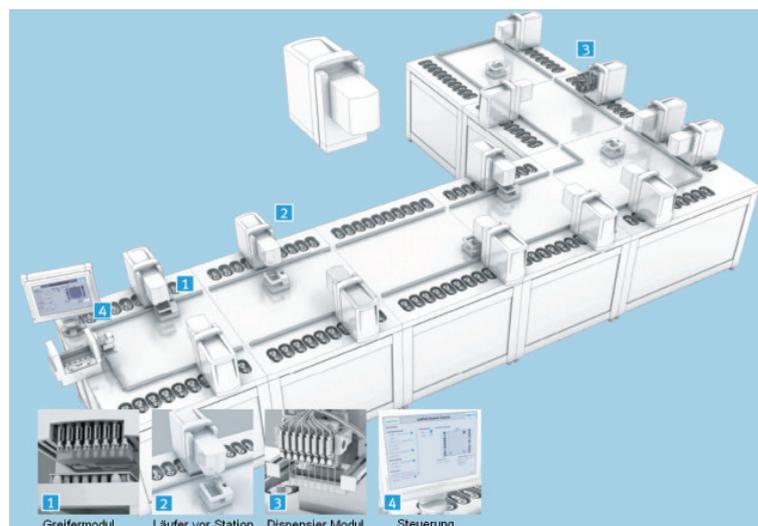


Abb. 1.5.: Festo LabFab, Quelle: www.Festo.de, 18.12.2012

Ein ganzheitliches Konzept für Zebrafischuntersuchungen wird von Pardo et al. [78] beschrieben. Das System, genannt "VAST- vertebrate automated screening technology", kann Zebrafischlarven automatisch handhaben, auf Fluoreszenz untersuchen und sogar laserchirurgische Eingriffe vornehmen. Zebrafischlarven werden dabei aus einem Tank entnommen und über ein Schlauchsystem der Untersuchungskammer zugeführt. Zum Abheben der Larven vom Boden des Tanks wird Luft vom Boden eingeblasen. Die Untersuchungskammer ist ein Röhrchen, das drehbar gelagert ist und dessen optische Eigenschaften so ausgelegt wurden, dass es bei der Beugung mit Kameras nicht zu optischen Fehlern führt. Die Larve wird durch Drehung des Röhrchens zu den feststehenden Kameras ausgerichtet. Auch für chirurgische Eingriffe werden die Larven so ausgerichtet. Nach der Untersuchung wird die Larve aus der Untersuchungskammer über das Schlauchsystem gespült und kann zurück in den Tank oder in eine Mikrotiterplatte gebracht werden. Das Holen aus dem Tank, Durchführen der hochauflösenden Mikroskopie und anschließende Transportieren des Fisches in die Mikrotiterplatte, dauert für eine Larve ca. 19 sek. Die Untersuchung von 96 Fischen und das Füllen der Platte dauert 34 Minuten. Der prinzipielle Aufbau des Systems ist in Abbildung 1.6 zu sehen.

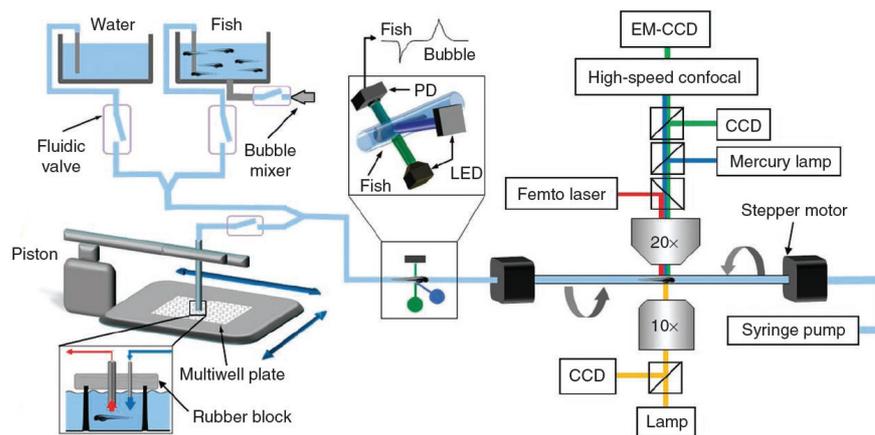


Abb. 1.6.: Automatisches Zebrafisch-Untersuchungssystem VAST (aus [78])

Den Umstand, dass kommerzielle Laborautomatisierung für Labors mit kleinen Budgets nicht erreichbar ist, haben sich einige wenige Firmen zu Nutze gemacht und haben sich auf die Durchführung von Zebrafischscreens spezialisiert. Sie führen als Dienstleistung eine Untersuchung durch, die der Kunde entwickelt hat. Das heißt, die Definition aller Prozessparameter wird vom Kunden entwickelt. Nur die Durchführung passiert beim Dienstleister. Zwei der Anbieter solcher Dienstleistungen sind BioBide in San Sebastian [58], Spanien und DanioLabs in Cambridge, Großbritannien [33].

DanioLabs in Cambridge [33] ist auf dem Gebiet der Medikamentenentwicklung tätig und untersucht hierfür verschiedene Krankheiten mit Hilfe des Zebrafisches. Es wurden diverse Krankheitsmodelle mit dem Zebrafisch entwickelt, die auch für externe Kunden für Untersu-

chungen zur Verfügung gestellt werden. Neben den erzeugten, krankheitsbehafteten Zebrafischen selbst werden Kunden auch die Untersuchungsmethoden und die Laborgeräte als Dienstleistung zur Verfügung gestellt.

Im Ansatz der Firma BioBide [58] wird eine automatische Screeningprozesskette entwickelt. Es werden hierfür kommerzielle Automatisierungslösungen angepasst und ergänzt durch individuelle Komponenten. Gesteuert durch einen Master PC können mit dem kommerziellen Fischsortierer COPAS von Union Biometrica [58] Fischembryos in Mikrotiterplatten sortiert werden. Die Platten können in automatischen Hotels oder Inkubatoren aufbewahrt werden. Mittels Robotern zum Handhaben von Flüssigkeiten können Toxine aufgebracht werden. Zur Untersuchung der Proben wird COPAS eingesetzt oder ein Mikroskop. Die verschiedenen Stationen werden durch einen Roboterarm zum Plattentransport verbunden. Mit dem Aufbau bietet die Firma BioBide die automatische Durchführung von Zebrafischuntersuchungen im Kundenauftrag als Dienstleistung an. Ein Skizze der Konfiguration des Systems ist in Abbildung 1.7 zu sehen.

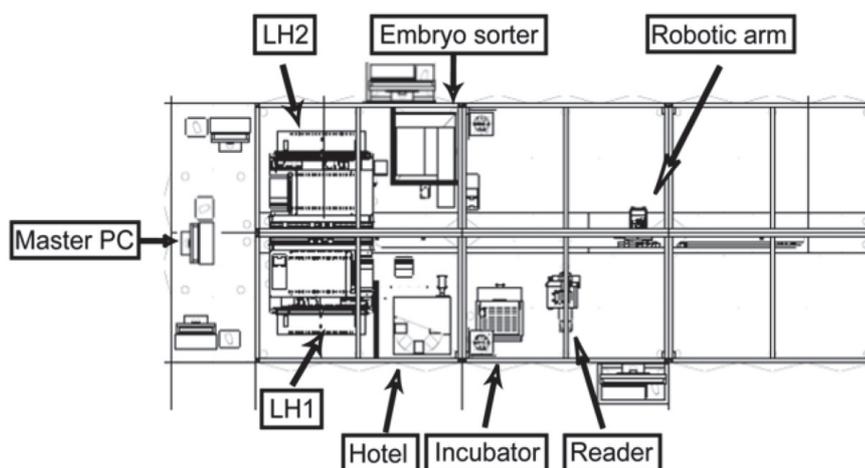


Abb. 1.7.: Prozesskette aus kommerziellen Laborrobotern der Firma BioBide (aus [58])

In der Forschungsgruppe von Hermann Spaink in Leiden (NL) wurde ein Screeningprotokoll zur Untersuchung von Tuberkulose an Zebrafischen erarbeitet [11]. Es wird ein Injektionsapparat zur automatischen Probenvorbereitung entwickelt. Mit dem entwickelten System können 1024 Embryos in 30 Minuten mit einer Erfolgsquote von 99% injiziert werden. Weiter kommt das kommerziell verfügbare Sortier- und Analysegerät COPAS der Firma Union Biometrica zur optischen Untersuchung der injizierten Larven zum Einsatz. Mit dem dargestellten in vivo Untersuchungsprotokoll sollen große Molekülbibliotheken untersucht werden können. Der Ablauf des Screeningprotokolls ist in Abbildung 1.8 zu sehen.

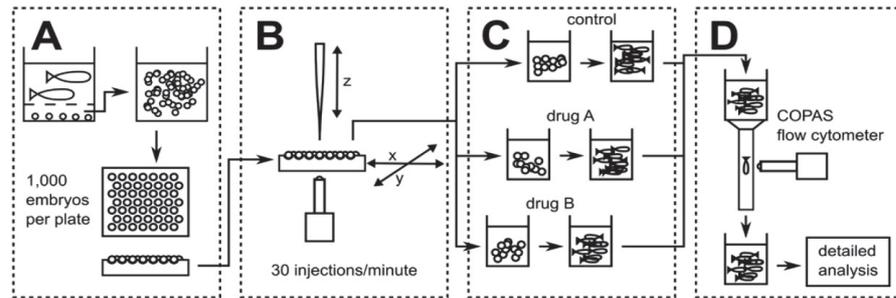


Abb. 1.8.: Ablauf des Screeningprotokoll mit automatischem Injektionsapparat von Carvalho und Spink (aus [11])

Forschungsansätze für Einzelelemente für Zebraabärlingsuntersuchungen

Für die automatische Handhabung von Zebrafischen wurden in einigen Forschungsgruppen Konzepte erarbeitet, die im Folgenden beschrieben werden. Um Zebrafische mit Genmaterial oder chemischen Substanzen zu behandeln, wurde ein System entwickelt, mit dem Zebrafische automatisch durch Unterdruck an Bohrungen fixiert werden und nachfolgend eine Mikroinjektion in die Fischeier vorgenommen werden kann [45, 116]. Das Fixieren und Injizieren ist eine wichtige Arbeitstechnik, um zuverlässig genetische Veränderungen an den Embryonen vornehmen zu können. Eine Übersicht über die Technik findet sich in Abbildung 1.9.

Außerdem wurde ein kommerzielles Produkt entwickelt, mit dem in großen Mengen Fischeier erzeugt werden können. Die Firma Tecniplast hat einen Tank entwickelt, mit dem eine Vielzahl an Zebraabärlingpärchen unter günstige Paarungsbedingungen gebracht werden kann [1]. Der technische Aufbau des *iSpawn* ist in Abbildung 1.10 zu sehen. So wird ein effektives Erzeugen von großen Mengen an Zebrafischeiern des selben Alters gewährleistet. Werden damit aber über 8000 Eier in einer Stunde erzeugt, muss die große Menge an Fischeiern in Mikrotiterplatten gelegt werden. Ohne automatischen Sortierer werden dafür viele Laborantinnen und Laboranten gebraucht, da der Zeitrahmen auf Grund der schnellen Entwicklung der Embryos beschränkt ist.

In der durch [28] beschriebenen Technologie werden Fischlarven in einen Schlauch gesaugt, getrennt durch Zwischenflüssigkeit. Die Larven entwickeln sich normal im Schlauch. So können Experimente im Schlauch durchgeführt werden. Die Technik verzichtet auf den Einsatz von Mikrotiterplatten. Hierdurch entsteht auch ein Einfluss auf die Handhabung der Proben während dem Experiment. Mikrotiterplatten müssen von Roboter zu Roboter transportiert werden. Wenn die Fische schon im Schlauch sind, können sie im Schlauch zur Untersuchungskammer gepumpt werden. Die beschriebene Technik wird auch im System VAST verwendet [78]. Somit kann ein indirektes Transportieren durch ein zentrales Fluidtechnikelement entwickelt werden. Ein Vorteil der beschriebenen Methode ist weiter, dass der Schlauch, in dem sich die Fische befinden, aufgerollt werden kann und somit nur wenig Platz verbraucht wird. Jedoch muss hierbei darauf

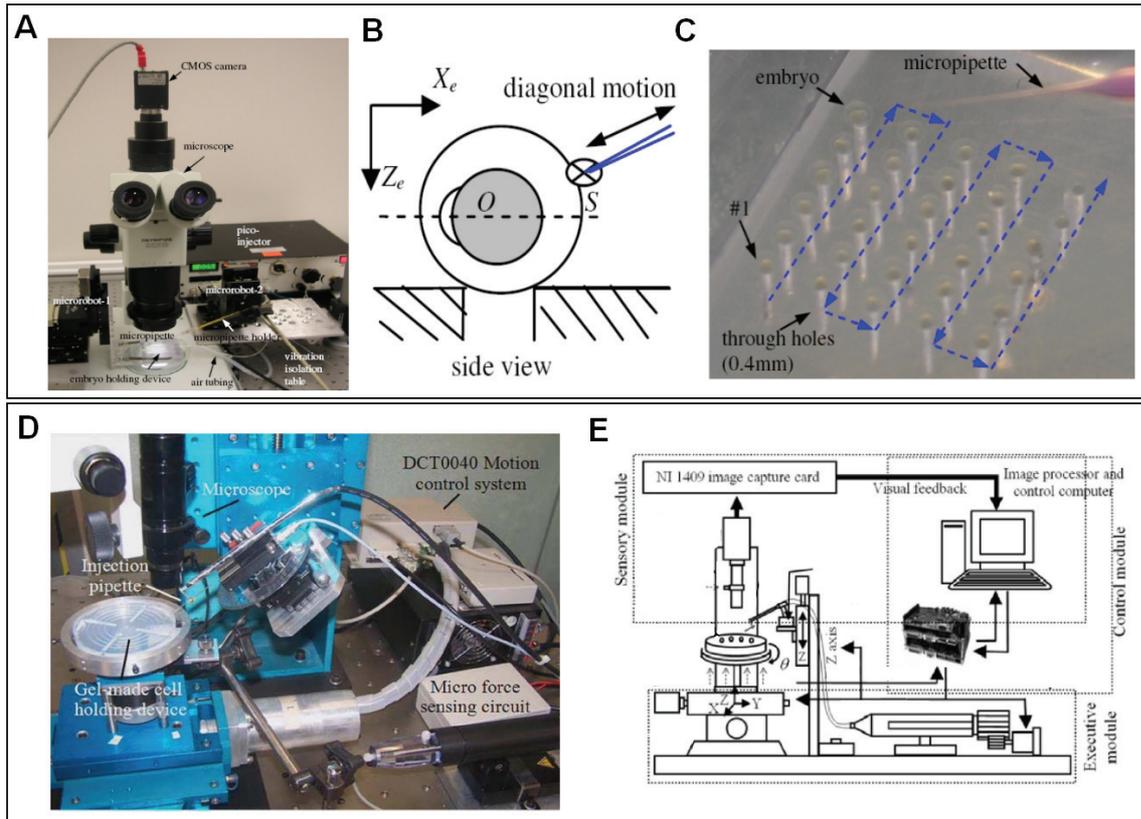


Abb. 1.9.: oben: Mikroinjektionssystem von Wang [116], A = Gesamtaufbau aus Mikroskop, Mikroinjektor und Fluidtechnik, B = Prinzip fixierte Injektion, C = fixierte Fischeier in Halter; unten Mikroinjektionssystem mit Kraftsteuerung von Huang [45], D = Überblick Hardware, E = Schema des Aufbaus

geachtet werden, dass die Innenwand des Schlauchs so beschaffen ist, dass die Fluidsegmente, in denen sich die Fische befinden, fehlerfrei im Schlauch bewegt werden können. Die Trennung der einzelnen Fische im Schlauch wird durch Einsaugen einer Trennflüssigkeit gewährleistet. Der Schlauch ist demnach abwechselnd gefüllt mit Trennflüssigkeit und Fischflüssigkeit inkl. Fisch. Das System ist in Abbildung 1.11 zu sehen.

Eine weitere Handhabungstechnik für Zellen und ganze Organismen sind sogenannte Elektrosprüh-Verfahren [75]. Die Zellen oder Organismen befinden sich in Flüssigkeit und werden aus einer Kapillare mittels Hochspannung und dem dadurch entstehenden elektrischen Feld herauskatapultiert. In [13] wird ein solches Elektrospray-Verfahren mit Zebrafischen beschrieben. Die Zebrafische werden in Wassertropfen aus einer Düse mit 4 mm Durchmesser geschossen. Das Prinzip ist in Abbildung 1.10 ersichtlich. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass weder die mechanische Beanspruchung noch der Einfluss des starken elektromagnetischen Feldes einen negativen Einfluss auf die Entwicklung von Zebrafischen hat.

In Desai et al. [18] werden spezielle Methoden zur Manipulation von biologischen Proben

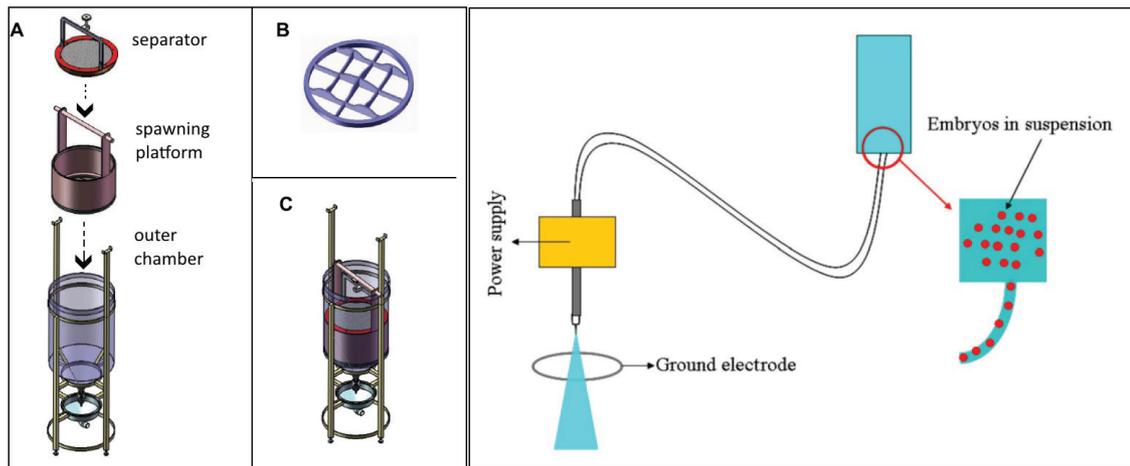


Abb. 1.10.: links: Fischverpaarungstank iSpawn [1], A = Einzelemente, B = Grundgitter für den Laichboden, C = Fischverpaarungstank zusammengesetzt; rechts: Handhabungstechnik Elektrosprühen [13]

gezeigt. Dabei werden Techniken zur Manipulation von einzelnen Zellen erklärt. Ein Beispiel hierfür ist die künstliche Befruchtung. Ein reproduzierbares und schonendes Handhaben ist dabei sehr wichtig, weil die Zelle nicht beschädigt werden darf. Weitere beschriebene Techniken beziehen sich auf die Handhabung von Kleinstteilchen. Durch optische Kräfte kann eine Mikromanipulation erzielt werden. Zum Beispiel kann mit einem Laserstrahl auf ein Teilchen der Größe eines Mikrons eine Kraft aufgebracht werden. Kleine Teilchen können auch magnetisch manipuliert werden. In Partikel der Größe eines Mikrons können magnetische Partikel eingebracht werden, wodurch sie sortiert werden können. Beispielsweise in eine Gruppe ohne Partikel und eine mit magnetischen Partikeln. In [51] wird eine Technik gezeigt, mit der eine Injektion in ein Zebrafischei vorgenommen werden kann. Interessant ist dabei die Kontrolle des Prozesses über eine Kraftmessung und gleichzeitig eine optische Positionskontrolle.

Wie bereits beschrieben, ist zur Durchführung von Hochdurchsatzuntersuchungen mit Zebrafischen das Handhaben der Fischeier und -larven, insbesondere das Einfüllen in Standardmikrotiterplatten, von großer Bedeutung. Der wichtige Vorbereitungsschritt des Befüllens ist zeitkritisch, da sich die Fischeembryos so schnell entwickeln, und ist arbeitsintensiv, da die Fische einzeln gehandhabt werden, ohne sie dabei zu verletzen. Als unumgängliche Vorbereitung für eine Vielzahl von Untersuchungstypen mit Zebrafischen entscheidet das Befüllen von Mikrotiterplatten daher maßgeblich über den erzielbaren Durchsatz und den dafür nötigen Personalaufwand.

Kommerziell verfügbar gibt es bisher nur den Biosorter *COPAS* der Firma Union Biometrica. Das so genannte Flow-Cytometer kann Objekte in Flüssigkeit in einem Größenbereich von $20\ \mu\text{m}$ bis $2\ \text{mm}$ erkennen. Sogar noch größere Elemente wurden erfolgreich analysiert, so z.B. Larven des Fadenwurms *C. elegans* [87]. Die Hardware und das Funktionsprinzip sind

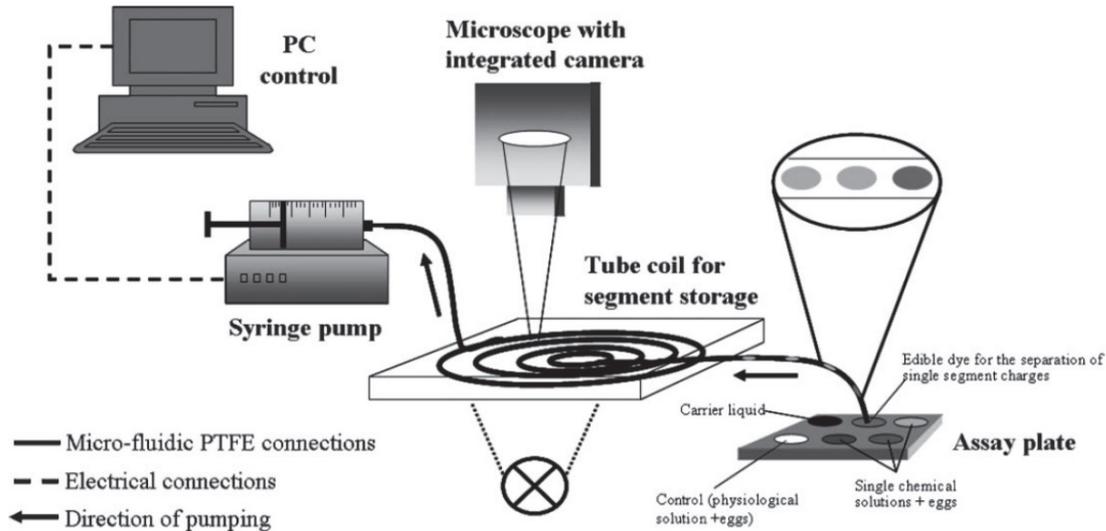


Abb. 1.11.: Zebrafische im Schlauch (Funfak et al.)[28]

in Abbildung 1.12 zu sehen. Die Objekte werden durch eine Messstrecke gepumpt, in der sie mit drei verschiedenen Laserwellenlängen bestrahlt werden. Detektoren nehmen das reflektierte Licht auf. Unterhalb der Messstrecke am Ausgang des Röhrchens befindet sich ein motorisierter Verstelltisch. Er kann so verschoben werden, dass nacheinander die Messstrecke passierende Objekte in verschiedene Behältnisse gepumpt werden können. Weiter befindet sich am Schlauchende eine Luftdruckdüse, mit welcher aus dem Schlauch austretende Objekte horizontal weggeblasen werden können. Sie fallen dementsprechend nicht in das Behältnis nach unten, sondern werden aussortiert. So können Objekte während der Messung klassifiziert und dann dem Ergebnis entsprechend sortiert werden. Die als korrekt eingestuft Objekte können beispielsweise automatisch in eine Mikrotiterplatte gefüllt werden. Die Messstrecke verfügt über Fluoreszenzlasern, sodass die Proben auf Fluoreszenz untersucht werden können. Es können diverse Kriterien zur Klassifizierung der Objekte definiert werden, so z.B. das Vorhandensein von Fluoreszenz, die Länge des Objekts oder der Anteil an Fluoreszenz im Objekt. Zu Beginn einer Untersuchung werden die zu untersuchenden Proben in einen Tank gefüllt. Aus dem Tank werden sie einzeln in einen Schlauch abgesaugt. Im Schlauch werden die Proben durch die Messstrecke gespült und dann unten mit Luftdruck in ein Ausschussgefäß geblasen oder bei Erfüllen des Sortierkriteriums in die Mikrotiterplatte gepumpt. Das Gerät ist zum Befüllen von Mikrotiterplatten mit Zebrafischen geeignet. Die Flüssigkeitsmenge ist dabei nicht einstellbar. Mit der Möglichkeit der Fluoreszenzanalyse hat es noch mehr Funktionen als nur das Sortieren und hat daher auch einen hohen Preis. Wird die Fluoreszenzanalysefunktion nicht benötigt, sondern es sollen nur Zebrafische in die Mikrotiterplatte gefüllt werden, ist das Gerät zu teuer und macht wirtschaftlich keinen Sinn. Das Befüllen einer 96er Platte dauert 120 sek [121].

Der CSEM Zebrafactor [36] ist ein Sortiergerät für Fischeier. Es kann Mikrotiterplatten mit

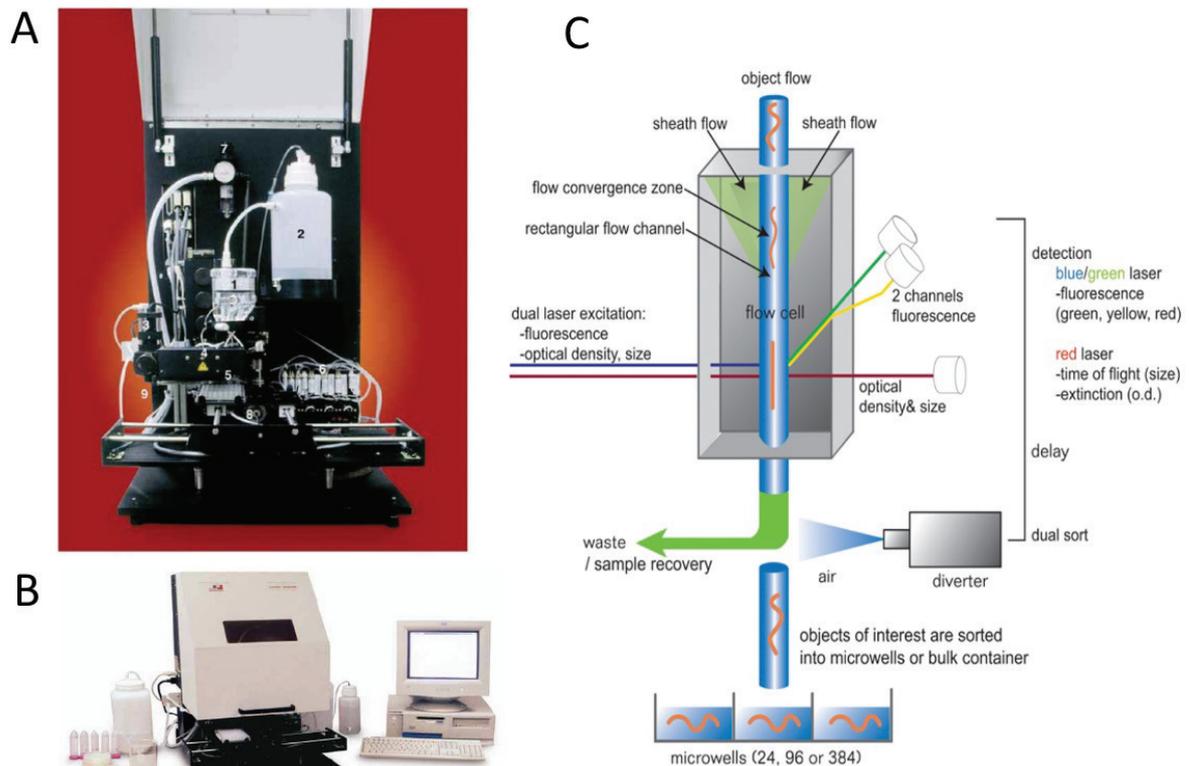


Abb. 1.12.: Flow Cytometer COPAS von Union Biometrica [87], A = Hardware bei geöffneter Gehäuseabdeckung, B = COPAS mit PC und Zubehör, C = Funktionsprinzip

Fischeiern befüllen. Ein fluidisches System, basierend auf einem Rundkanal, in dem eine konstante Kreisströmung erzeugt wird, wird dazu genutzt, die Fischeier an einer am Kanal befestigten Kamera vorbei zu führen. Mit Bildverarbeitung wird ausgewertet, ob auf dem aktuellen Bild ein einzelnes Fischei abgebildet ist. Das System ist in Abbildung 1.13 zu sehen. Ist ein Fischei erkannt, so wird mit einem Fluidimpuls aus einer Düse das Ei aus seiner Kreisbahn katapultiert und in einen Nebenschlauch abgelenkt. Von dort aus wird es über ein Schlauchsystem und verschiedene Schlauchventile zu einem Dreiachsroboter geführt. Mit dem Dreiachsroboter wird das untere, vertikal hängende Schlauchende in die Kammern einer Mikrotiterplatte geführt. Die Fischeier können somit direkt in die Kammern gepumpt werden. Systembedingt wird bei jedem Pumpvorgang ein fixes Volumen ausgegeben, die Kammern sind daher immer bis zum Rand gefüllt. Je nach durchzuführender Untersuchung muss daher vor dem nächsten Schritt etwas Volumen entfernt werden, sodass eine gewünschte Konzentration in der Kammer eingestellt werden kann. Das Befüllen einer 96er Mikrotiterplatte dauert 13 Minuten.

Weiter wird an der Oregon State University an einem System zum Fischeiersortieren gearbeitet. In [62] wird eine erste Hardwarestudie beschrieben. Eine Glaspipette, die durch einen Scara Roboter im Raum bewegt wird, und eine Kamera kommen zum Einsatz (siehe Abbildung 1.14). Mittels Software werden die Eier in einer Petrischale erkannt und dann aufgesaugt. Zum

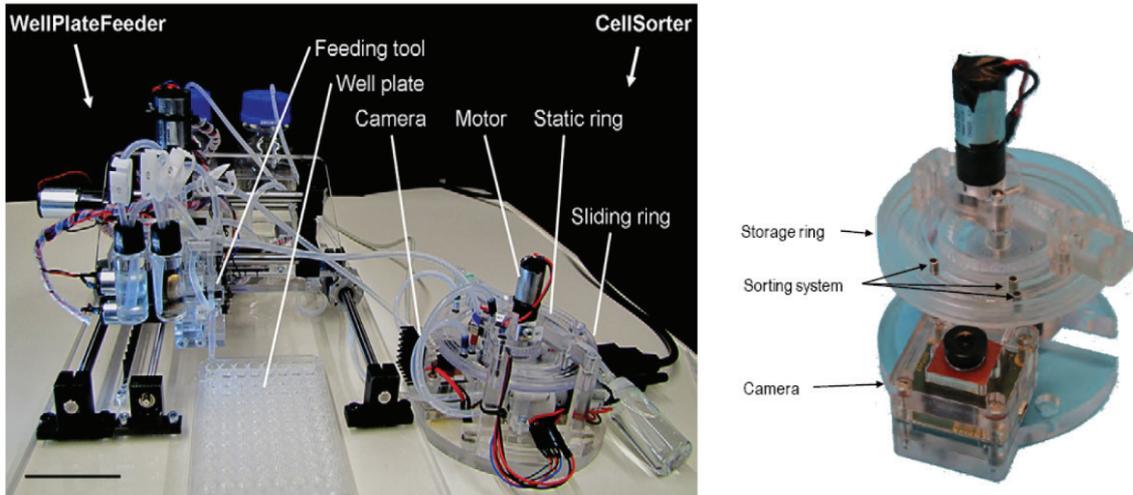


Abb. 1.13.: Fischsortierer Zebrafactor des CSEM [36]

Erkennen der Eier wird seitlich beleuchtet, um einen guten Kontrast zwischen Hintergrund und Fischen zu erzielen. Zur Evaluierung des Sortierroboters wurden 16 Platten mit Hand und 16 Platten mit dem Roboter pipettiert. Das System benötigt 15 Minuten zum Befüllen einer 96er well plate. Sowohl beim manuellen Befüllen als auch mit dem Roboter wurden 94% erfolgreich befüllt. Erfolg heißt hierbei, dass genau 1 Embryo in der Kammer gelandet ist und der Embryo am Leben ist und nicht verletzt. 2,8% sind durch den Vorgang gestorben. 1,2% der Kammern waren leer und nur 3 von 1536 Kammern waren mit 2 Fischen besetzt.

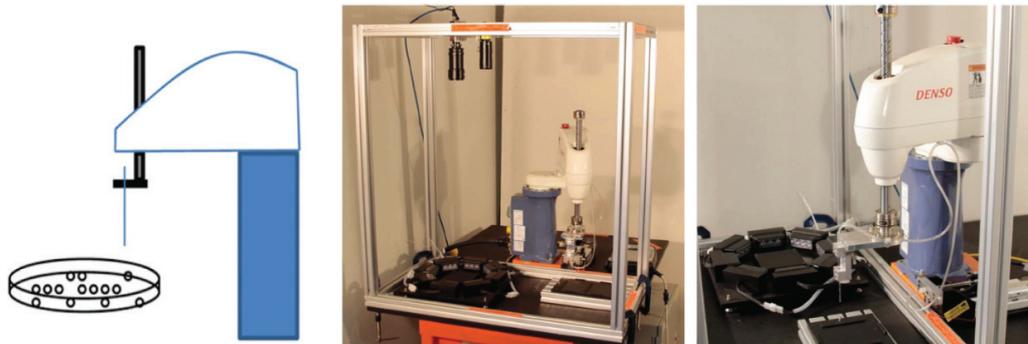


Abb. 1.14.: Fischsortierer von Mandrell (Oregon State University)[62]

Eine aktuelle Veröffentlichung von Zhang beschreibt ein System, mit dem Zebrafischeier im Bulk in Mikrotiterplatten gefüllt werden können [121]. Im Muster einer 96er well plate sind 24 Bohrungen angeordnet, durch die ein Unterdruck aufgebracht wird. Werden Fischeier und ausreichend Flüssigkeit auf die Oberfläche gegeben, werden sie zu den Löchern gesaugt und dort fixiert. Das Ansaugen der 24 Eier dauert weniger als 30 sek. Die überzähligen Fischeier werden dann abgespült und die Halterung wird um 180 Grad nach unten gedreht, sodass beim Abschalt-

ten des Unterdrucks die Eier nach unten abfallen. Aufgrund der Oberflächenspannung bleiben die Eier jedoch meist an den Bohrungen hängen. Um sie dennoch zuverlässig in die Kammern abzugeben, müssen die Kammern voll mit Flüssigkeit sein. Die Halterung wird dann soweit abgesenkt, bis die Fischeier Kontakt mit dem Wasser der Kammer bekommen. Bei gleichzeitigem Abschalten des Unterdrucks sinken die Fischeier dann in die Kammern. Das Ablegen der 24 Fische dauert ca. 60 Sekunden. Mit vier dieser Übertragungsprozesse kann somit eine 96er Platte befüllt werden. Der Gesamtprozess aus Ansaugen (30 sek.) und Ablegen (60 sek.) dauert für eine viertel Platte 90 Sekunden. Das Befüllen einer ganzen Platte mit 96 Kammern dauert 6 Minuten. Einen Überblick über das System gibt Abbildung 1.15.

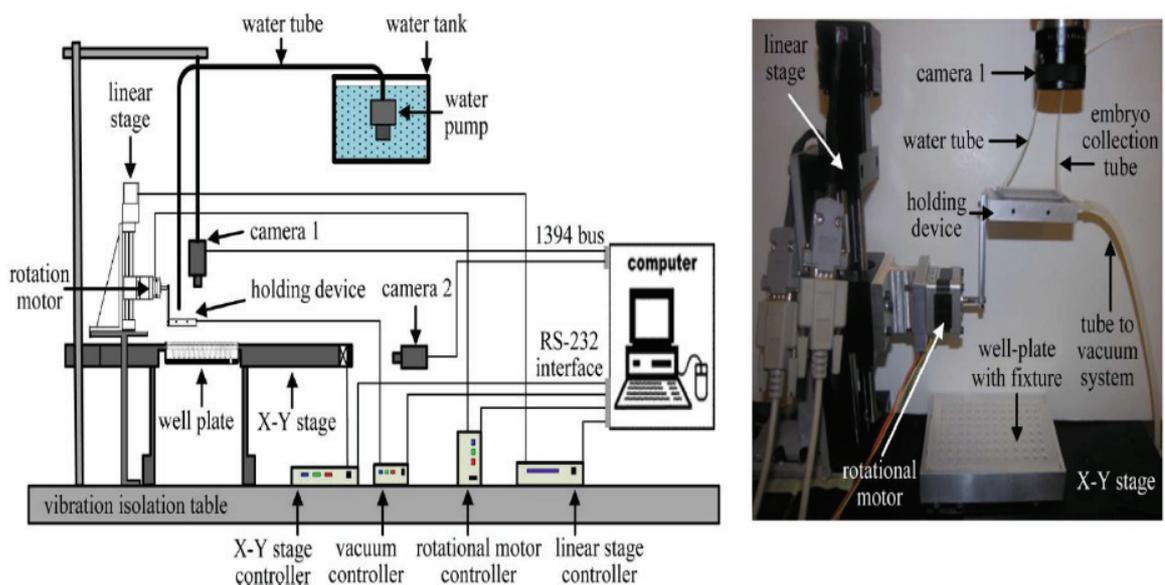


Abb. 1.15.: Befüllung von Mikrotiterplatten mit Zebrafischen von Zhang [121]

Fazit aktueller Forschungsansätze

Bisher wurden verschiedene Untersuchungsprotokolle und zugehörige Hardware entwickelt, mit denen ausgewählte Fragestellungen automatisch bearbeitet werden können [11, 33, 58]. Die speziell entwickelte Hardware ist nur mit hohem Aufwand anpassbar auf veränderte Fragestellungen mit veränderten Anforderungen. Die beschriebenen Untersuchungsanlagen können kommerziell als Dienstleistung genutzt werden. Das Erarbeiten eigener Untersuchungsabläufe ist hierbei schwierig, da die Hardware nur beim Dienstleister vorhanden ist und nicht experimentell im eigenen Labor getestet werden kann.

Um Hochdurchsatzuntersuchungen mit Zebrafärblingen durchführen zu können, müssen die verschiedenen Einzelschritte der Prozesskette sowie der Austausch der Proben zwischen den

Einzelstationen gewährleistet werden. Für die Probenvorbereitung, also das Befüllen von Mikrotiterplatten mit Zebrafärbungen wurden verschiedene Konzepte vorgestellt. Die beschriebenen Forschungsprojekte von Graf [36] und Zhang [121] haben den Nachteil, dass die Kammern der Mikrotiterplatten immer voll gefüllt werden. Um in einem nachgeordneten Analyseprozess weitere Flüssigkeiten zu ergänzen, muss dann erst Flüssigkeit aus den Kammern abgesaugt werden. Für die Systeme VAST und Funfak werden keine Mikrotiterplatten benutzt [28, 78]. Daher müssen neue Konzepte entwickelt werden, um die Untersuchungen durchzuführen und die Dokumentation der Einzelergebnisse zu gewährleisten. Für die konkreten Anwendungsfälle macht der Ansatz Sinn, jedoch ist die Flexibilität bezüglich alternativer Untersuchungsmethoden sehr eingeschränkt. Die Untersuchung mit einem bestimmten Mikroskop oder die wiederholte Aufnahme von Proben nach einer bestimmten Zeit sind hier nicht möglich. Die Arbeitsweise Zebrafische in Mikrotiterplatten zu untersuchen, ist Standard und bietet eine große Vielfalt an Einsatzmöglichkeiten. Bis auf das System COPAS von Union Biometrica befinden sich die Systeme noch in der Entwicklungs- bzw. Testphase. Damit Hochdurchsatzuntersuchungen für Biolabors umsetzbar sind, muss es kommerziell verfügbare Technologie geben, die bezahlbar ist. Kommerziell ist nur der Biosorter COPAS zur Handhabung von Zebrafischen verfügbar. Durch den sehr hohen Anschaffungspreis von 200 000 Euro ist ein Einsatz nur für spezielle Labors mit entsprechendem Budget geeignet. Der hohe Preis kommt zustande, da mit dem Gerät Fluoreszenzdetektion möglich ist. Zum reinen Befüllen von Mikrotiterplatten lohnt die Anschaffung nicht.

Verschiedene Techniken zur Durchführung von Einzelschritten von Untersuchungen wurden entwickelt und in Form von Prototypen aufgebaut. In Tests konnte die Funktion verschiedener Techniken zum automatischen Injizieren von Chemikalien oder Genmaterial in Zebrafärbungen nachgewiesen werden [45, 116, 51]. Außerdem wurde ein Elektrosprühverfahren zum Sortieren von Zebrafärbungen erfolgreich aufgebaut [13]. Zur Einbindung der Einzelmodule in eine Prozesskette ist ein Konzept für eine Übergabe der Proben und eine Interaktion mittels Software nötig. Hierzu gibt es bisher keine Ansätze.

Bei der Konzeption einer vollständigen Automatisierung einer Zebrafischuntersuchung, bestehend aus Probenvorbereitung, Untersuchung und dem Transport der Mikrotiterplatten zwischen den Einheiten, ist es wichtig, dass die einzelnen Komponenten so aufeinander abgestimmt sind, dass Kompatibilitätsprobleme vermieden werden. Die existierenden Einzellösungen sind weder in Hardware noch in Software standardisiert und daher kaum miteinander kompatibel. Damit die Nutzung von Hochdurchsatzuntersuchungen auch für Biolabors mit kleinen Budgets erschwinglich ist, müssen finanziell günstige Komponenten entwickelt werden.

1.3. Ziele und Aufgaben

Das Ziel der vorliegenden Dissertation ist es ein neues Konzept für eine vollautomatische Hochdurchsatzuntersuchung mit Zebrafischlarven zu entwickeln. Dazu soll ein ganzheitlicher Ansatz erarbeitet werden, mit dem verschiedene Funktionsmodule nacheinander die Teilprozessschritte durchführen können. Hierfür müssen bisher manuelle Einzelschritte der Prozesskette einer Zebrafischuntersuchung automatisiert werden und zwar so, dass durch bestmögliche Kompatibilität eine automatische Gesamtprozesskette möglich wird. In der automatischen Prozesskette soll kein Eingriff durch Bediener mehr nötig sein. Die zu entwickelnden Einzelelemente der Prozesskette müssen auf die Besonderheiten im Umgang mit Zebrafischen angepasst sein. So müssen zum Handhaben der Zebrafische spezielle Techniken entwickelt werden, um der geringen Größe und der geometrischen Form Rechnung zu tragen. Das Handhaben muss weiterhin sehr behutsam sein, damit sie weder Schaden nehmen noch das Untersuchungsergebnis durch die Handhabung verändert wird.

Manuelle Arbeitsschritte sollen automatisiert werden, denn eine Steigerung des Durchsatzes ist dadurch möglich, dass mehrere Untersuchungen parallel durchgeführt werden, ohne dass dafür mehr Personal benötigt wird. Außerdem zeichnen sich automatische Arbeitsschritte durch Schnelligkeit, Genauigkeit und Reproduzierbarkeit aus. Zur Umsetzung manueller Tätigkeiten in automatischen Modulen müssen Auswertungsvorgänge und Wahrnehmungen vom Menschen mit Software dargestellt werden. Fixe Probenumfänge können mit Hilfe von automatischen Abläufen in kürzerer Zeit durchgeführt werden.

Kommerziell verfügbare, teilautomatisierte Mikroskope sind qualitativ sehr hochwertig, gleichzeitig jedoch teuer und langsam. Die entstehenden digitalen Datensätze sind sehr groß, jedoch stellt der Großteil der Bilder nur einen Normalzustand dar, aus dem keine neuen Ergebnisse abgelesen werden können. Zum Erreichen eines möglichst hohen Durchsatzes bedarf es jedoch Untersuchungseinheiten, die hinreichende Qualität zur Beantwortung der Fragestellung bieten, jedoch finanziell günstig sind und schnell arbeiten. Mit solchen Mikroskopen können Voruntersuchungen zum Identifizieren der interessanten Proben aus der Masse der Proben ohne signifikante Information ermöglicht werden. Nachgeschaltet können nur die interessierenden Proben mit hochauflösenden Mikroskopen im Details untersucht zu werden. Damit kann sowohl Zeit gespart werden als auch die Größe der Datensätze reduziert werden.

Außerdem sollen die Systemkomponenten der Automatisierungskette preisgünstig sein, so dass die Technologie für viele Anwender zugänglich ist. Somit können verschiedene Funktionsmodule auch in mehrfacher Ausführung von Biolabors mit kleinen Budgets angeschafft werden. Die damit erreichbare wirtschaftliche Plausibilität des parallelen Arbeitens macht eine signifikante Erhöhung der Untersuchungsgeschwindigkeit möglich.

Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag sowohl für die Hardware als auch für die Software zur Durchführung von Hochdurchsatzuntersuchungen.

Zur Entwicklung eines neuen Konzepts für die Hochdurchsatzuntersuchung von Zebrabärblingen sind die folgenden wissenschaftlichen Teilziele zu erreichen:

- Entwicklung eines Gesamtkonzepts für die Automatisierung des Untersuchungsablaufes
- Entwicklung eines Fischsortierers zur automatischen Probenvorbereitung
- Entwicklung verschiedener Mikroskope zur automatischen Durchführung von Untersuchungen
- Entwicklung eines auf die anderen Komponenten abgestimmten, automatischen Transportsystems
- Evaluierung der Funktionsfähigkeit.

Zur Darstellung einer automatischen Prozesskette für eine Zebrafischuntersuchung müssen drei Grundelemente betrachtet werden. Zur Probenvorbereitung müssen Zebrabärblinge in Form von Fischeiern oder Fischlarven in Mikrotiterplatten gefüllt werden. Weiter muss es an die Fragestellung angepasste bildgebende Auswertungseinheiten geben. Das dritte Element ist die Transportkomponente, die den Wechsel der Mikrotiterplatten zwischen den Einzeleinheiten durchführt. Für den automatischen Ablauf der Prozesskette bedarf es neben der Steuerung der Roboter auch Softwareelemente, die bestimmte menschliche Fähigkeiten abbilden. So müssen mittels Bildverarbeitung Entscheidungen über Zustände von Proben und über das nötige weitere Verfahren getroffen werden können.

Für die Untersuchung der genannten wissenschaftlichen Fragestellungen wird im Kapitel 2 das Konzept für die Prozesskette sowie die nötigen Elemente beschrieben. In Kapitel 3 wird der im Rahmen der Arbeit entwickelte Fischsortierer beschrieben. Der Fischsortierer ist ein Roboter, der automatisch Zebrabärblingeier und -larven aus Petrischalen in Mikrotiterplatten sortieren kann. Die Erkennung der wahllos in der Petrischale liegenden Zebrabärblinge geschieht hierbei über Bildverarbeitung. In Kapitel 4 werden die im Rahmen der Arbeit entwickelten Mikroskope beschrieben. Mit dem Parallelmikroskop mit vier Kameras können schnell viele Mikrotiterplatten mit Einzelbildern oder Bildserien aufgenommen werden. Die Bildqualität ist hierbei ausreichend, um eine Grundaussage über den Zustand der jeweiligen Proben zu machen. Das Herzschlagmikroskop ermöglicht die automatische Aufnahme von Videos der schlagenden Herzen der Zebrafische in einer Mikrotiterplatte. Die manuellen Schritte des Erkennens von Strukturen in einem Bild und des Erzeugens einer Detailaufnahme des erkannten Bereichs werden mit dem Herzschlagmikroskop automatisiert. Hierbei wird mit Bildverarbeitung der Bildausschnitt, in dem sich das Herz befindet, erkannt, um dann mit Vergrößerung aufgenommen werden zu können. Das Fluoreszenzmodul detektiert Fluoreszenzeigenschaften in Zebrabärblingen und ermöglicht eine gezielte Vorauswahl der Proben, die die gesuchte Fluoreszenz tragen. In Kapitel 5 wird das entwickelte, auf die Einzelmodule des neuen Konzepts

zugeschnittene Transportsystem beschrieben. Mit einer einfachen dezentralen Steuerung wird der Austausch von Mikrotiterplatten durch eine spezielle Mechanik realisiert. Die erhaltenen Ergebnisse werden dann im Kapitel 6 zusammengefasst.

2. Neues Konzept für ein automatisches Hochdurchsatzverfahren

2.1. Übersicht

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wird ein modulares Roboterkonzept entwickelt, mit dem eine automatische Untersuchung durchgeführt werden kann. Das Konzept für einen gesamtheitlichen Ansatz für eine automatische Prozesskette beinhaltet die wichtigen Grundelemente Probenvorbereitung, bildgebende Untersuchung und automatischer Austausch von Mikrotiterplatten. Die Prozesskette soll einfach erweitert bzw. verändert werden können, sodass die Untersuchung von verschiedensten Fragestellungen möglich ist. Um einzelne Funktionseinheiten ergänzen oder entfernen zu können, werden die Funktionseinheiten als Module geplant, die mechanisch in die Prozesskette integriert werden können und auch softwareseitig definierte Schnittstellen zum Einbinden in die übergeordnete Steuerung haben.

Dazu werden einzelne Roboter auf Basis eines vom Autor entwickelten Grundroboters [85] entworfen. So wird eine möglichst hohe mechanische Kompatibilität zwischen den Einheiten erzielt. Auch softwareseitig bringt das Konzept des Grundroboters Vorteile, da wesentliche Steuerungselemente dadurch in allen Robotern gleich sind. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Funktionsmodule decken exemplarisch typische, häufig benötigte Untersuchungsprozesse wie die Handhabung von biologischen Proben sowie die Erzeugung von Bildaufnahmen ab.

Zur Darstellung einer automatischen Prozesskette eines Zebrabärblingscreens werden vier Funktionsroboter entwickelt. Zwei der Roboter automatisieren bisher manuell erledigte Aufgaben und zwei Roboter führen mit hohem Durchsatz bildgebende Voruntersuchungen durch. Um die einzelnen Funktionseinheiten zu einer funktionierenden, automatischen Prozesskette verbinden zu können, wird ein spezielles Transportsystem für den Austausch von Mikrotiterplatten zwischen den Funktionsrobotern entwickelt. Das Transportsystem kann einfach erweitert werden, um weitere Funktionseinheiten in den Gesamtablauf einbinden zu können. Das Konzept ist in Abbildung 2.1 zu sehen.

Der Fischsortierer (FS) füllt automatisch Zebrabärblingseier oder -larven in Mikrotiterplatten. Die Zebrabärblinge liegen dabei wahllos verteilt in Petrischalen vor, werden durch Bildverarbeitung erkannt und dann in die Mikrotiterplatte pipettiert. Nach der Probenvorbereitung wird die Mikrotiterplatte durch das Transportsystem (TS) übernommen und zur nächsten Roboter-einheit transportiert. Die bildgebende Untersuchung kann dann wahlweise oder nacheinander in den Modulen Parallelmikroskop (PM), Herzsclagmikroskop (HM) oder Fluoreszenzmikro-

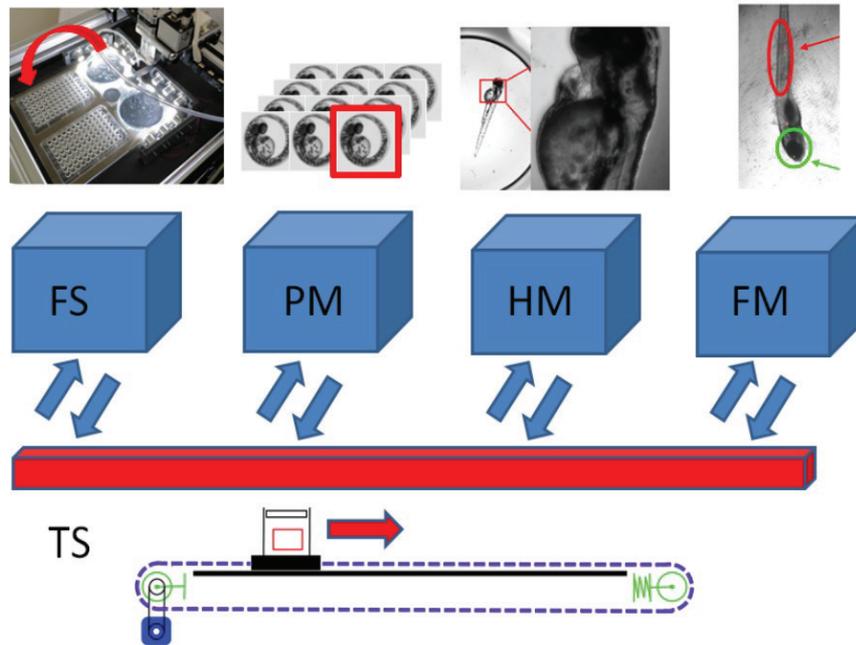


Abb. 2.1.: Neues Konzept für eine automatische Prozesskette; FS: Fischsortierer, PM: Parallelmikroskop, HM: Herzschlagmikroskop, FM: Fluoreszenzmikroskop, TS: Transportsystem

skop (FM) untersucht werden. Das Parallelmikroskop (PM) hat vier Digitalkameras, mit denen sehr schnell Einzelbilder oder Zeitreihen von den Fischen in den Mikrotiterplatten aufgenommen werden können. Anhand der Bilder können einfache Untersuchungsergebnisse abgeleitet werden oder es werden interessante Proben identifiziert, die auf hochauflösenden Mikroskopen im Detail betrachtet werden sollen. Das Herzschlagmikroskop (HM) nimmt automatisch Videos der Herzregion der Zebrafische auf. Hierfür wird mittels Bildverarbeitung die Position des Herzens anhand einer Übersichtsaufnahme ermittelt. Das Fluoreszenzmikroskop (FM) erstellt Falschfarbenbilder, auf denen erkannt werden kann, ob Fluoreszenz im Fisch vorhanden ist oder nicht. Es werden hierbei die beiden Fluoreszenzproteine *green fluorescence protein* (GFP) und *red fluorescence protein* (RFP) erkannt.

Zur Realisierung der dargestellten Prozesskette wurde ein modulares Roboterkonzept entwickelt. Ein kompakter Grundroboter aus elektrisch angetriebenen Achsen ermöglicht die dreidimensionale Bewegung der verschiedenen Funktionselemente. Neben der Entwicklung der Hardware ist für ein erfolgreiches Automatisieren wichtig, dass im manuellen Prozess vom Menschen erbrachte Analyseleistungen durch auf die Anforderungen angepasste Algorithmen ersetzt werden. Hierfür wurden im Rahmen der Dissertation Algorithmen entwickelt und implementiert, mit denen Fische in Petrischalen erkannt werden können und mit denen Sortiersituationen wie eine zu hohe Anzahl an Clustern erkannt und verarbeitet werden können. Weiter wurde ein Autofokus als Vorbereitung der Bildaufnahme implementiert. Bildsegmentierungsal-

gorithmen sowie Differenzbildanalysen kommen zur Strukturerkennung innerhalb eines Fisches zum Einsatz.

Zur Realisierung der genannten Funktionen mit Robotern sind folgende Komponenten nötig:

- Hardware:
 - Grundroboter für dreidimensionale Bewegungen der Funktionseinheiten
 - Kameras zur optischen Erfassung von Objekten als Information zur Robotersteuerung
 - Kameras zur Aufnahme von Bildern der Proben, die untersucht werden sollen
 - geeignete optische Komponenten zur Abbildung von Objekten in die Kamera
 - Beleuchtungskomponenten zur Erzeugung geeigneter Bildqualität.
- Software:
 - Software zur Steuerung der Roboterbewegung
 - Bildverarbeitungssoftware zur Informationsgewinnung aus den Kamerabildern.

Die für das Konzept nötigen Mechanik- und Optikkomponenten sowie die Softwaregrundelemente der Bildverarbeitung werden im Folgenden beschrieben.

2.2. Anforderungen

Bei der Entwicklung von Automatisierungslösungen für Untersuchungen mit biologischen Proben müssen verschiedene Anforderungen beachtet werden. Die Prozesse müssen zuverlässige und nachvollziehbare Ergebnisse liefern. Um einfach in Biolabors verwendet werden zu können, müssen die Einzeleinheiten sowie die Gesamtprozesskette auf normalen Labortischen Platz finden. Im Rahmen der Arbeit hat sich gezeigt, dass ein Bauraum von 500 mm x 500 mm x 500 mm für einen Einzelroboter genug Platz für die Funktion bietet, jedoch kompakt genug ist, um im Labor Platz zu finden.

Speziell im Umgang mit biologischen Proben entstehen noch weitere Anforderungen, da die lebenden Proben sich während des Prozesses weiterentwickeln und weil Umwelteinflüsse die Proben verändern können. Die Handhabung der Fische ist auf Grund ihrer stromlinigen Körperform schwer. Zur Abschätzung möglicher Handhabungsvarianten sind die geometrischen Abmaße der Fische wichtig. Die Fische sind für Zebrafischuntersuchungen in zwei unterschiedlichen Stadien zu betrachten. Das Alter der Fische wird in Stunden nach der Befruchtung angegeben (engl. hours past fertilization, Abkz. hpf). Zum Einen sind die Embryos bis 48 h nach der Befruchtung vom Chorion umschlossen. Zum Anderen schlüpfen die Embryos im Alter zwischen 48 h und 96 h und werden dann als Larven bezeichnet. Während der weiteren Entwick-

Alter[hpf]	Anzahl der Eier	Mittelwert des Durchmessers [mm]
3	50	1,13
5	50	1,12
20	50	1,13
22	50	1,10
25	50	1,11
27	50	1,11

Tab. 2.1.: Ergebnisse der durchgeführten Vermessung von Fischeiern

lung wächst die Larve und der Dottersack schrumpft, da er aufgebraucht wird. Die Geometrie der Larve ändert sich also über die Zeit.

Da sich der Fischembryo so schnell entwickelt, ist es für die Handhabung wichtig, die Abmessungen des Embryos in verschiedenen Stadien zu kennen. In der Literatur gibt es keine kompletten Datensätze, die die Größen der wachsenden Embryos zu verschiedenen Zeitpunkten darstellen. Daher wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Fischeier und geschlüpfte Larven vermessen. Die gemessenen Werte sind in den beiden Tabellen 2.1 und 2.2 dargestellt. Hierfür wurden Fotos von Fischeiern und Larven mit einer Digitalkamera aufgenommen und mit Hilfe eines Maßstabes wurde im Bild ihre Größe ermittelt. Die Eier haben im Durchschnitt einen Durchmesser von 1,1 mm und die Larve wächst zwischen 52 h und 75 h von 2,9 auf 3,2 mm. Die vollständige Beschreibung der Vorgehensweise bei der Vermessung ist im Anhang A.1 zu finden.

Durch die schnelle Entwicklung der Fische ist das Zeitfenster für die Untersuchung eines bestimmten Entwicklungsstadiums sehr begrenzt. Unterschiedliche Entwicklungsstadien reagieren auch unterschiedlich auf äußere Beeinflussungen, also die Experimente. Daher müssen alle Individuen für einen Versuch im selben Alter sein [57]. Es stehen also nur wenige Stunden als Zeitfenster für Untersuchungen zur Verfügung und es müssen daher schnell viele Fische gleichzeitig für die Untersuchungen vorbereitet werden.

Zur Abschätzung der möglichen Handhabungstechniken ist auch die mechanische Stabilität der Fischeier von Interesse. Von Kim et al. [50, 51] wurde bereits eine Studie zur Festigkeit des Chorions von Zebrafischen veröffentlicht. In der Fluidgruppe des Instituts für Angewandte Informatik wurde ein Versuchsaufbau entwickelt, mit dem Fischeier mittels Unterdruck an eine Spitze gesaugt werden und dann der Unterdruck bis zum Chorionbruch gesteigert wird. Die Ergebnisse finden sich im Anhang A1. Zur Einleitung des Schlüpfprozesses wird vom Embryo eine Substanz abgesondert, die das Chorion schwächt, um das Schlüpfen zu erleichtern. Das Enzym Pronase hat eine ähnliche Wirkung. Es wurden daher in der Fluidgruppe Tests durchgeführt, um die Abnahme der mechanischen Stabilität des Chorions nachzuweisen und quantitativ

Alter[hpf]	Anzahl der Larven	Ødes Dotters [mm]	Ødes Kopfes [mm]	Länge gesamt [mm]	Breite Schwanz (Dotter) [mm]	Breite Schwanz (Ende) [mm]
52	10	0,56	0,45	2,94	0,38	0,10
53	10	0,57	0,45	2,96	0,39	0,11
68	10	0,57	0,48	3,18	0,41	0,12
70	10	0,57	0,48	3,22	0,43	0,12
73	10	0,56	0,50	3,25	0,40	0,12
75	10	0,56	0,51	3,25	0,42	0,12

Tab. 2.2.: Ergebnisse der durchgeführten Vermessung von Fischlarven (die angegebenen Werte sind Mittelwerte)

zu erfassen [88].

Weiter sind für die Untersuchung von Zebraabräblingen bildgebende Verfahren von großer Wichtigkeit. Hierfür kommen meist starke Beleuchtungen zum Einsatz. Durch die Strahlung ist es möglich, dass die Entwicklung des Zebraabräblings gestört wird. Um den Einfluss der Lichttoxizität zu überprüfen, wurden in der Fluidgruppe Tests mit verschiedenen Beleuchtungsstärken durchgeführt. Ein schädlicher Einfluss von Lichtstärken bis zu 45000 Lux konnte nicht erkannt werden [88].

Die Entwicklung der Zebraabräblinge schreitet dann normal voran, wenn sie bei konstanten 28° C gehalten werden. Wird die Temperatur verringert, so verringert sich auch die Entwicklungsgeschwindigkeit. Bei zu geringen Temperaturen können die Embryos nicht überleben. Daher ist es für die Automatisierungstechnik wichtig, auch die Regelung der Temperatur zu betrachten.

Neben der Hardware zur Beschleunigung von manuellen Vorgängen und zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit ist für moderne Hochdurchsatzverfahren von großer Bedeutung, dass riesige Datenmengen gehandhabt werden müssen [40]. Müssen beispielsweise zum Nachweis der Wirkung einer bioaktiven Substanz kurze Videos von jeder Probe aufgenommen werden, so werden für die gesamte Untersuchung sehr große Datensätze aufgenommen. Da häufig hochauflösende bildgebende Verfahren zum Einsatz kommen, sind schon die Einzeldateien sehr groß. Zum Einen müssen die Einzeldateien gehandhabt werden können, das bedeutet, die IT-Infrastruktur muss die schnelle Speicherung und Verschiebung von Daten ermöglichen. Zum Anderen müssen die aufgenommenen Daten auch gesichtet und ausgewertet werden. Der große Probenumfang und die großen Datenmengen setzen Hochdurchsatzprojekten Herausforderungen und Grenzen.

Die beschriebenen allgemeinen und speziellen Anforderungen für Untersuchungen mit Zebraabräblingen müssen bei der Auswahl der Komponenten betrachtet werden. Die Auswahl der Komponenten für die automatische Prozesskette wird im Folgenden näher beschrieben.

2.3. Komponenten

Im Folgenden werden zunächst die für alle Roboter relevanten Grundelemente in Hard- und Software beschrieben. Die Roboter beinhalten jeweils einen Grundroboter aus Linearachsen, Optikkomponenten, Bildverarbeitungsalgorithmen sowie Steuerungsalgorithmen für den Funktionsablauf. In den Kapiteln 3, 4 und 5 werden die einzelnen entwickelten Roboter dann im Detail vorgestellt.

2.3.1. Linearachsenroboter

Die Einteilung von Robotern für industrielle Anwendungen kann nach der Konfiguration der Achsen (kartesisch, zylindrisch, Gelenkarm, SCARA¹), nach der Art des Antriebssystems (elektrisch, hydraulisch, pneumatisch), nach der Steuerungsart (Punkt zu Punkt, Vielpunkt, Bahnsteuerung) oder nach der Aufgabe (Schweißroboter, Lackierroboter, Montageroboter) vorgenommen werden [6, 70]. Die Hauptgruppen von Roboterkonfigurationen sind in Tabelle 2.3 zu sehen. Skizzen der Robotertypen und von deren Arbeitsräumen sind in Abbildung 2.2 zu sehen. Der Arbeitsraum eines Roboters ist das Volumen, das vom Endeffektor erreicht werden kann [97].

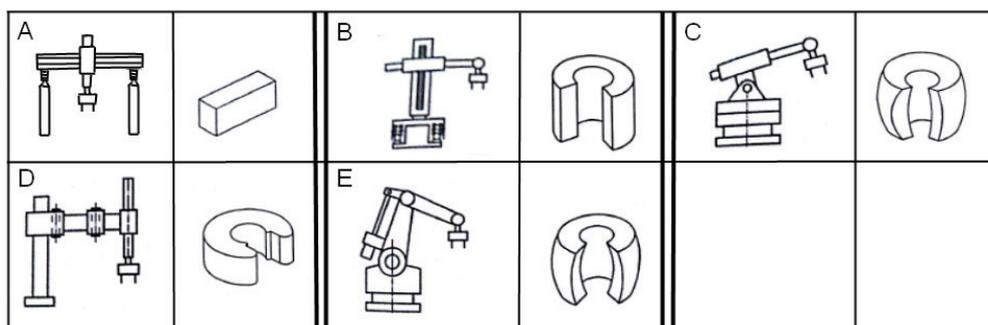


Abb. 2.2.: Robotergrundtypen und ihre Bewegungsräume nach [43]; A: kartesischer Roboter, B: zylindrischer Roboter, C: kugelförmig, D: SCARA, E: Gelenkarmkonfiguration

Zur Beschreibung der Genauigkeit eines Roboters werden nach der Norm VDI 2861 die Positions- und Wiederholgenauigkeit folgendermaßen definiert [115]. Die Positionsgenauigkeit bezeichnet die maximale Abweichung der Lage eines Handhabeobjektes von den absoluten Werten. Die Wiederholgenauigkeit bezeichnet den maximalen Unterschied bei sich wiederholenden gleichen Endlagen [53]. Nach VDI 2860 werden für automatische Handhabungsaufgaben wichtige Begriffe wie Orientierung und Position definiert. Die Lage eines Körpers kann vollständig beschrieben werden durch seine Orientierung und seine Position. Die Position wird

¹Montageroboter mit gezielter Nachgiebigkeit, SCARA = Selective compliance assembly robot arm

Tab. 2.3.: Grundtypen von Robotern nach [53, 70]

Robotertyp	Eigenschaften	Bewertung
Kartesisch	Achsen: 3 Translationen Arbeitsraum: quaderförmig typ. Geschwindigkeit: 1 m/s typ. Genauigkeit: $\pm 0,1\text{ mm}$	Sehr stabil; schwere Lasten; sehr genau; für Aufgaben mit orthogonalen Hauptrich- tungen.
Zylindrisch	Achsen: 1 Rotation, 2 Translationen Arbeitsraum: Segment eines Hohlzy- linders	Hauptanwendung zum Be- schicken von Maschinen
Kugelförmig	Achsen: 2 Rotationen, 1 Translation Arbeitsraum: Kugelsegment	Kleines Arbeitsvolumen; auf- wändige Steuerung
Gelenkarmkonfig	Achsen: alle Achsen rotatorisch Arbeitsraum: torusähnlich typ. Geschwindigkeit: 90 Grad/s typ. Genauigkeit: $\pm 0,15\text{ mm}$	Hohe Beweglichkeit, Positions- und Wieder- holgenauigkeit nicht so gut wie bei kartesischer Konfiguration, Komplizierte Steuerung
SCARA	Achsen: 3 Rotationen, 1 Translation Arbeitsraum: sichelförmig typ. Geschwindigkeit: $0,5\text{ m/s}$, typ. Genauigkeit: $\pm 0,05\text{ mm}$	Durch waagerechte Nachgie- bigkeit kleine Ungenauigkei- ten ausgleichbar, große Ge- schwindigkeit und Wieder- holgenauigkeit, relativ niedri- ger Preis

durch drei translatorische Verschiebungen beschrieben und die Orientierung durch relative Verdrehung bezüglich dreier Hauptachsen. Die sechs Größen zur Beschreibung der Lage stellen die sechs Freiheitsgrade eines Körpers im Raum dar [46].

Die Beschreibung der Position des Roboters kann in verschiedenen Koordinatensystemen vorgenommen werden. Bei der Formulierung im Raumkoordinatensystem ist das Koordinatensystem feststehend und unabhängig von den Bewegungen des Roboters. Weiter kann ein Roboterkoordinatensystem definiert werden. Dabei entsprechen die Achsen des Koordinatensystems den Roboterachsen. Eine weitere Form der Koordinatensysteme für Industrieroboter sind Werkzeugkoordinaten. Hierbei ist das Koordinatensystem mit dem Handgelenk des Endeffektors verbunden und wird mitbewegt. Für die Einrichtung und Kalibrierung eines Roboters eignet sich die Beschreibung der Koordinaten des Roboters in der Tool Center Point (TCP) Form, weil sie für den Bediener einfach zu verstehen und vorzugeben sind. Hierbei wird die Position des Punktes am Endeffektor als Referenz genommen, auf den es bei der Funktion ankommt [70].

Bestimmte Koordinatensysteme können durch zwei Drehungen und zwei Translationen ineinander überführt werden. Die genannten vier Schritte können in einer 4x4 Matrix beschrieben werden. Eine solche Matrix wird Denavit-Hartenbergmatrix (D-H-Matrix) genannt. Durch eine Multiplikation aller D-H-Matrizen der einzelnen Teilabschnitte eines Roboters, kann die Position des Endeffektors in Weltkoordinaten angegeben werden [46, 53].

Die Lage und die Orientierung des Endeffektors werden in der Robotik analytisch anhand der Stellung der Schub- und Drehgelenke beschrieben. Es existieren die beiden Beschreibungsformen der Vorwärtskinematik und der Rückwärtskinematik. Die Vorwärtskinematik, auch direkte Aufgabe der Kinematik genannt, berechnet Lage und Orientierung des Endeffektors anhand der vorgegebenen Stellungen der Schub- und Drehgelenke. Mit der Rückwärtskinematik, auch inverse Aufgabe der Kinematik genannt, werden zur Beschreibung einer bestimmten Lage und Orientierung des Endeffektors mögliche Stellungsvarianten aller Gelenke ermittelt. Es kann hierbei mehrere Stellungsvarianten der Gelenke geben, die zur selben Lösung führen [46, 97].

Es gibt verschiedene Steuerungsarten für Bewegungen von Robotern, namentlich Punkt-zu-Punkt-Steuerung (engl. point to point (PTP)), Bahnsteuerung und Vielpunktsteuerung. Die Punkt-zu-Punkt-Steuerung wird am häufigsten eingesetzt. Bei der PTP - Methode werden nur Endpunkte vorgegeben. Wie sie erreicht werden, ist uninteressant. Es gibt asynchrone und synchrone PTP. Bei asynchroner PTP bewegt sich jede Achse mit einer festen Geschwindigkeit. Die Endlage der einzelnen Achsen wird bei unterschiedlichen Verfahrenswegen daher nach unterschiedlichen Zeiten erreicht. Bei synchroner PTP werden die Geschwindigkeiten so berechnet, dass alle Achsen gleichzeitig die Endlagen erreichen. Bei Bahnsteuerung (engl. continous path (CP)) findet die Bewegung zwischen zwei Punkten auf einer Geraden oder einem Kreisabschnitt oder einer anderen mathematisch beschreibbaren Bahn statt. Eine solche Beschreibungsform ist zum Schweißen oder Kleben geeignet, da hierbei alle Punkte des Weges abge-

fahren werden müssen. Die Vielpunktsteuerung (engl. Multipoint (MP)) eignet sich für schwer zu beschreibende Bahnen. Zur Vorgabe der Punkte wird durch einen Bediener der Arm zum Lernen manuell entlang der Bahn geführt. In kurzen Zeitabständen werden Punkte während der Bewegung gespeichert. Die Bahn kann dann vom Roboter wiedergegeben werden [70].

Gewähltes Roboterkonzept

In [85] wurde ein Dreiachsroboter auf Basis von Schrittmotoren und Linearachsen aufgebaut. Das Konzept mit kartesischen Linearachsen ist einfach und bringt viele Vorteile mit sich. Die kartesische Anordnung zeichnet sich durch hohe Wiederholgenauigkeit und hohe Präzision aus, da die Bewegungen entlang der mechanischen Achsen erfolgen [6]. Der Roboter bewegt sich im asynchronen Punkt zu Punkt Modus. Bei der Steuerung sind die drei Bewegungskordinaten x,y,z voneinander unabhängig, was die Steuerung einfach macht, da die einzelnen Koordinaten unabhängig voneinander angefahren werden können. Die Koordinaten werden nach dem Tool Center Prinzip immer auf das jeweilige Funktionsmodul bezogen. Weiter sind die Koordinaten durch den kartesischen Dreiachsaufbau eindeutig, d.h. jeder Punkt im Raum wird durch eine eindeutige Kombination der drei Koordinaten bestimmt. Bei Schwenkarmrobotern (Scara) können mehrere mechanische Zustände die selbe Position des Endeffektors im Raum beschreiben. Die Stellungen der einzelnen Gelenke ist nicht eindeutig und es kann unterschiedliche Varianten geben [46].

Bei den gewählten mechanischen Komponenten wurde auf hinreichende mechanische Eigenschaften geachtet. Der Linearachsenroboter wird aufgebaut aus kugelumlaufgeführten Zahnriemenachsen, die von Schrittmotoren angetrieben werden. Die Zahnriemenachsen LEZ1 der Firma Isel (Datenblatt siehe Anhang A.2) bieten eine präzise, spielfrei einstellbare Lagerung und haben kompakte Abmaße. Gegenüber anderen Linearachsenkonzepten haben kugelumlaufgeführte Achsen den Vorteil der Spielfreiheit bei geringem Verschleiß. Durch die Rollreibung ist der Bewegungswiderstand kleiner als bei Gleitlagerachsen. Außerdem ist die Neigung zum Stick Slip Effekt gegenüber Gleitlagerungen wesentlich geringer [91].

Als Antrieb stehen grundsätzlich Gleichstrommotoren, Schrittmotoren oder Direktantriebe zur Wahl. Direktantriebe sind elektrische Antriebe mit Torque Motoren, hydraulische Antriebe oder pneumatische Antriebe. Für Positionierungsanwendungen eignen sich Schrittmotoren hervorragend auf Grund ihres einfachen mechanischen Aufbaus. Schrittmotoren können ohne Lagerrückmeldung betrieben werden, wodurch eine einfache Ansteuerung möglich ist. Ein preiswertes Antriebskonzept kann somit realisiert werden [53]. Es kommen 2-Phasen Hybrid-schrittmotoren zum Einsatz. Sie vereinen die Vorteile von Permanentmagnet- und von Reluktanzschrittmotoren. Es kann eine ähnlich hohe Schrittauflösung wie beim Reluktanzschrittmotor erzielt werden, gleichzeitig können sie hohe Drehmomente aufbringen und haben durch Permanentmagnete im Rotor ein Selbsthaltungsmoment im unbestromten Zustand [92]. Die verwendeten

Hybridschrittmotoren haben eine Auflösung von 200 Schritt pro Umdrehung (Schrittwinkel $1,8^\circ/\text{Schritt}$). Das maximale Drehmoment liegt bei $0,5 \text{ Nm}$, was zum Antrieb der Achsen ausreichend ist.

Zur Steuerung der Schrittmotoren werden Schrittmotortreiber benötigt, die den Bewegungsbefehl vom PC in eine getaktete Drehbewegung umsetzen können. Zum Einsatz kommen für jeden Schrittmotor eine Schrittmotorsteuerung SCMI33 der Firma Nanotec (Datenblatt siehe Anhang A.2). Die gewählten Schrittmotorsteuerungen können in einem Netzwerk über ein serielles RS485-Kabel betrieben werden. So können je nach Anforderung des Funktionsroboters und Anzahl der nötigen Aktoren Steuergeräte ergänzt werden, was den modularen Charakter des Systems unterstützt. Es können bis zu 32 Motorsteuerungen im Netzwerk installiert werden. Sie kommunizieren über die serielle Schnittstelle RS485/RS232 mit dem PC und die Befehle werden in Form von ASCII-Strings geschickt. Durch den internen EEPROM der Steuergeräte können Fahrprofile vordefiniert werden. Zur Aktivierung des Motors muss daher nur die aktuelle Anzahl der zu drehenden Schritte übermittelt werden. Die restlichen Parameter wie Drehgeschwindigkeit, Beschleunigungsrampen usw. werden aus dem Speicher abgerufen. Eine Übersicht über das beschriebene Grundroboterkonzept aus Linearachsen und Schrittmotoren ist in Abbildung 2.3 zu sehen.

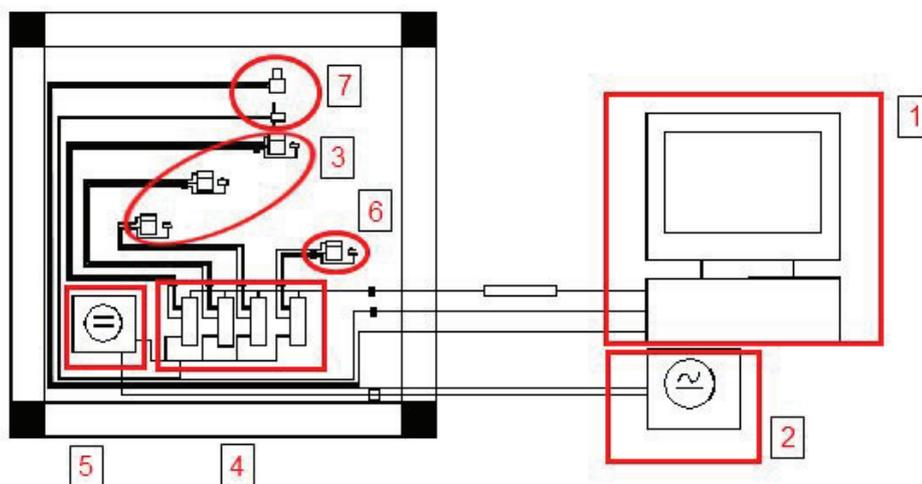


Abb. 2.3.: Überblick neues Roboterkonzept 1: PC, 2: Netzteil, 3: Aktoren, 4: Motorsteuergeräte, 5: 24V Netzteil, 6: zusätzliche Aktoren, 7: weitere Funktionsmodule

Zu den Grundachsen für eine zweidimensionale Bewegung werden verschiedene Funktionsmodule mit unterschiedlichen Aktoren (Pipettierspitze, Fokusverstellung, Greifer) (3)(7) ergänzt. Es wird je ein Steuergerät pro Schrittmotor verwendet (4). Die Steuergeräte kommunizieren über ein RS485/RS232 Netzwerk mit einem Windows-PC (1). Die Steuerungssoftware ist in Labview implementiert. Weitere Steuergeräte und damit weitere Aktoren können einfach als weitere Teilnehmer im Netzwerk ergänzt werden (6). Die Stromversorgung des Systems

wird über einen 240 V Netzanschluss (2) gewährleistet. Innerhalb des Roboters wird die Betriebsspannung mit einem Schaltnetzteil (5) auf einen Wert von 24 V angepasst.

Der Grundroboter, der zur Realisierung verschiedener Funktionsroboter entwickelt wurde, besteht aus einer x- und einer y-Achse sowie Schrittmotoren und zugehörigen Steuerungen. Der Rahmen des Roboters besteht aus Aluminiumprofilen, die einen Würfel mit 500 mm Kantenlänge bilden. Der Grundroboter ist in Abbildung 2.4 zu sehen. Darauf aufbauend werden verschiedene Funktionsmodule ergänzt.

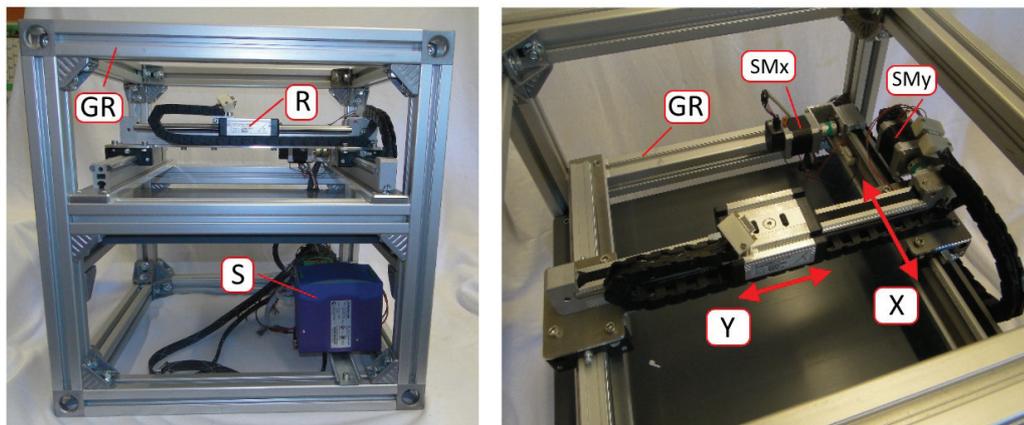


Abb. 2.4.: Überblick neuer Grundroboter: R: Roboter, GR: Grundrahmen, S: Steuerung, X: X-Achse, Y: Y-Achse, SMx: Schrittmotor x, SMy: Schrittmotor y

2.3.2. Grundlagen optischer Komponenten

Im folgenden Abschnitt werden die Grundlagen optischer Komponenten beschrieben. Zunächst wird die Technik konventioneller Mikroskope beschrieben, die aktuell in Biolabors zum Einsatz kommen. Darauf aufbauend werden die für eine digitale Abbildung nötigen Komponenten Digitalkameras, Objektive und Beleuchtung dargestellt. Die technischen Grenzen und die für die Auslegung der optischen Komponenten wichtigen Eigenschaften werden beschrieben, sodass eine Auswahl getroffen werden kann, mit der hinreichende optische Qualität und Auflösung erreicht werden können. Das vom Autor verfolgte Konzept ist das Erzielen von auf die Untersuchung von Zebrafischen abgestimmten optischen Aufbauten, die so einfach wie möglich und so hochwertig wie gerade nötig sind. Aus den im Abschnitt erarbeiteten Optionen werden für den Fischsortierer, das Parallelmikroskop, das Herzschlagmikroskop und das Fluoreszenzmikroskop die jeweils passenden Komponenten ausgewählt. Die ausgewählten Komponenten für die Funktionsroboter werden in den jeweiligen Abschnitten in Kapitel 3 und 4 genannt.

Lichtmikroskope

Zur Lichtmikroskopie werden häufig manuelle Stereomikroskope mit Digitalkameras verwendet. Grundsätzlich setzen sich sogenannte Hellfelddurchlichtmikroskope aus folgenden Komponenten zusammen: Okular, Objektiv, Objektträger, Kondensator, Objektisch und Beleuchtungsspiegel (siehe Abbildung 2.5) [30]. Das Okular vergrößert das Bild für den Betrachter. Das Objektiv ist meistens auswechselbar und bildet das Objekt mit einer Vergrößerung auf das Okular ab. Ein Kondensator ist ein Linsensystem, das einen möglichst großen Teil des Lichts der Lichtquelle in den Strahlengang bringt. Das Objekt wird dadurch heller beleuchtet. Die Beleuchtung kann auf verschiedene Art und Weise erzielt werden und der Lichtstrahl wird über den Spiegel in den Strahlengang geleitet. Der beschriebene Aufbau ist teuer, da viele optische Komponenten nötig sind.

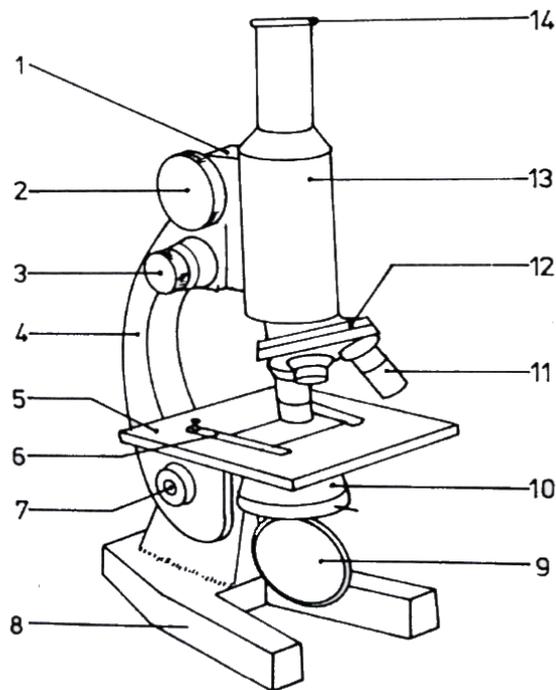


Abb. 2.5.: Komponenten von einfachen Lichtmikroskopen nach Gerlach [30], 1=Triebkasten, 2= grobe Scharfstellung, 3= feine Scharfstellung, 4= Tubusträger, 5= Objektisch, 6= Präparateklammer, 7= Scharnier zum Umlegen des Tubusträgers, 8= Mikroskopfuß, 9= Beleuchtungsspiegel, 10= Kondensator, 11= Objektiv, 12= Objektivrevolver, 13= Tubus, 14= Okular

Mikroskope können nach dem Aufbau des Stativs unterschieden werden. Bei aufrechten Mikroskopen befindet sich das Objektiv über dem Objektisch. Das Objekt wird also von der Oberseite betrachtet. Bei inversen Mikroskopen sind die Objektive unterhalb des Objektisches angebracht [90]. Die inverse Bauart kommt unter anderem zum Einsatz, wenn eine Probe an der Unterseite eines Probengefäßes liegt [30].

„Fluoreszenzmikroskopie ist heute eine der bedeutendsten Untersuchungsmethoden in den Naturwissenschaften“ und hat „große Bedeutung bei der Untersuchung biologischer Prozesse in Zellen, Geweben, Organen und Organismen“ [90]. Damit können Prozesse in lebenden Organismen beobachtet werden, während sie ablaufen. Die Hauptkomponenten eines Fluoreszenzmikroskops sind Anregungslichtquelle, Anregungs- und Emissionsfilter, dichroischer Spiegel als Strahlteiler (dadurch wird über das Objektiv die Probe beleuchtet und auch die Emission auf das Okular abgebildet). Als Anregungslichtquelle kommen meist Hochdruckmetalldampf lampen zum Einsatz. Auch eine Anregung über Laser ist möglich. Eine noch junge Technologie der Fluoreszenzanregung stellt die Anregung über LEDs (Light Emitting Diodes) dar. Ein modernes Lichtmikroskop mit Fluoreszenzfunktion ist in Abbildung 2.6 zu sehen [90].

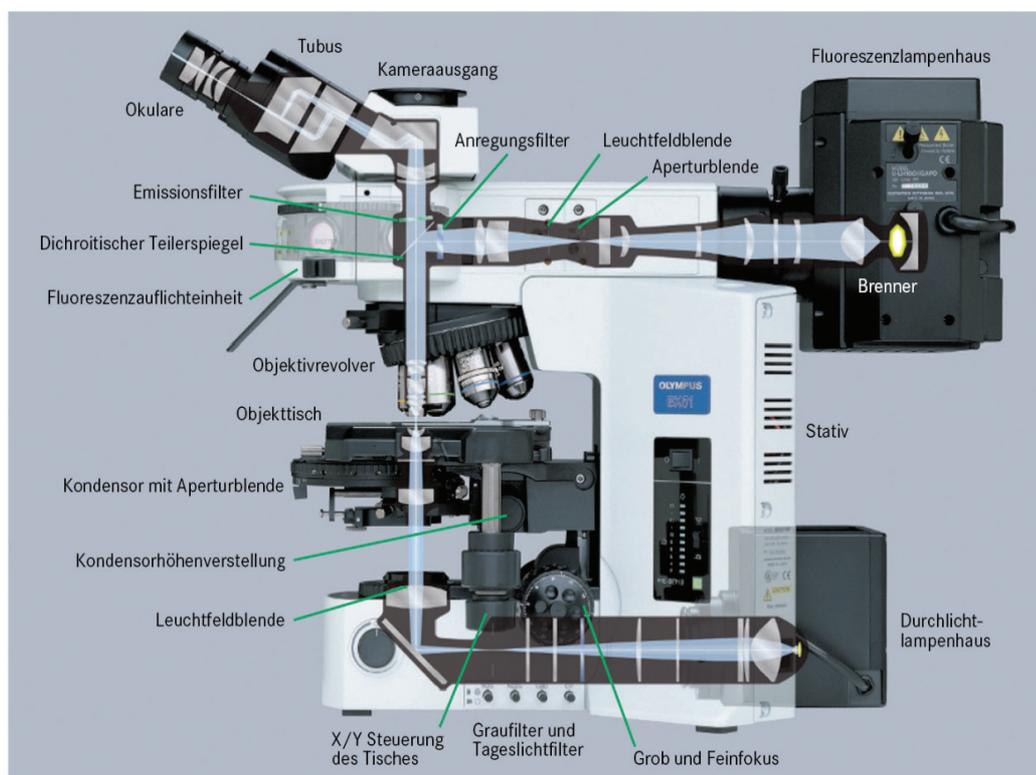


Abb. 2.6.: Komponenten von modernen Lichtmikroskopen nach Romeis [90]

Bei Fluoreszenzmikroskopie gibt es das Problem, dass durch die Fluoreszenzanregung auch Schichten in der Probe leuchten, die nicht der Fokusebene entsprechen. Das aufgenommene, scharfe Bild wird somit durch unscharfe Bilder überlagert. Abhilfe schafft der Einsatz von dünnen Proben, aber dabei können keine lebenden Proben verwendet werden. Daher wurde die konfokale Mikroskopie entwickelt. In konfokalen Mikroskopen werden in den durch den dichroitischen Spiegel geteilten Strahlengang zwei Lochblenden eingefügt. Eine Lochblende zwischen Lichtquelle und Objekt und eine zweite Lochblende im geteilten Strahl zum Detektor blenden alle unscharfen Bilder aus und lassen nur Lichtstrahlen durch, die von der Fokusebene

kommen [90].

Eine Voreinschätzung, ob eine Probe für eine weitere Untersuchung geeignet ist oder nicht, kann jedoch auch mit einfacheren Mitteln erzielt werden. Auf einige der hochspezialisierten und teuren optischen Komponenten von kommerziellen Mikroskopen kann für bestimmte Untersuchungen verzichtet werden. Im Folgenden werden Kennwerte und Auslegungspunkte von optischen Systemen beschrieben, mit denen ein ausreichender bildgebender Aufbau entworfen werden kann.

Digitalkameras

Eine Digitalkamera mit einem auf die Anwendung angepassten Objektiv reicht für eine Voruntersuchung auch aus, ergänzt um ein geeignetes Beleuchtungskonzept. Digitalkameras gibt es entweder mit CMOS (Complementary metal-oxide-semiconductor) Sensor oder mit CCD (charge-coupled device) Sensor. Die beiden Sensortypen gibt es in verschiedenen Größen. CMOS kommen aufgrund ihrer Vorteile im industriellen Einsatz häufiger vor. Sie haben einen geringen Leistungsbedarf und ein geringes Bildrauschen bei hoher Ausleserate. Durch den inneren Photoeffekt werden in den Halbleiterelementen einer CCD Kamera Ladungsträger durch einfallendes Licht erzeugt. Beim Abrufen der Bildinformation wird die Anzahl der Ladungsträger ermittelt und die Anzahl ist proportional zur Belichtung des Pixels. CCD Kameras haben diverse Nachteile, beispielsweise entstehen bei Überbelichtung Artefakte in Nachbarpixeln. Außerdem ist das serielle Auslesen des Pixelregisters ein limitierender Faktor für die Datenrate. Die jüngere Technologie der CMOS Sensoren funktioniert ebenfalls über den inneren Fotoeffekt. Je mehr Licht auf einen Pixel trifft, desto höher wird dessen Leitfähigkeit. Durch die Möglichkeit jedes Pixel einzeln abzufragen, wird der Flaschenhals des Ausleseregisters umgangen. Die einzelnen Pixel werden über MOS Transistoren an die Leseleitung angeschlossen. Der Stromverbrauch einer CMOS Kamera ist um ca. Faktor 100 geringer als bei CCD Kameras [22].

Verbreitete Schnittstellen für Industriedigitalkameras sind GigE Vision, USB, IEEE 1394 (FireWire, iLink) und CameraLink [17]. Nach CameraLink mit 6,8 GBit/s hat GigE Vision mit 1 GBit/s die zweitschnellste Übertragungsrates. Große Kabellängen sind mit GigE kein Problem und die GigaBit Ethernet Schnittstelle ist Standard in fast jedem PC. Aufgrund der genannten Vorteile ist GigE Vision der Standard in der industriellen Bildverarbeitung.

Linsensysteme

Bei der optischen Abbildung eines Gegenstandes mittels eines Linsensystems auf einen Detektor können Abbildungsfehler entstehen. Bei der Auslegung eines optischen Aufbaus zu beachtende Abbildungsfehler sind unter anderem sphärische Aberration, Sinusfehler, Bildfeldwölbung, Verzeichnung, chromatische Aberration und chromatische Vergrößerungsdifferenz [30]. Die chromatische Aberration beschreibt den Fakt, dass normale Sammellinsen unterschiedli-

che Wellenlängen unterschiedlich stark brechen. Kurzwelliges Licht wird stärker gebrochen als langwelliges. Um ein Objekt, das unter verschiedenen Wellenlängen begutachtet werden soll, scharf abzubilden, gibt es achromatische Objektive, die beispielsweise rotes und blaues Licht wieder auf einen Punkt fokussieren. Der chromatische Fehler wird somit korrigiert. Das ist wichtig zur Kolokalisierung von unterschiedlichen Fluorophoren [90]. Eine weitere Möglichkeit zur scharfen Abbildung mit verschiedenen Wellenlängen ist eine Fokusverstellung durch Anpassung des Arbeitsabstandes für jede Wellenlänge. Die Verzeichnung beschreibt die Verzerrung der Konturen am Rande des Bildes. Beim Durchtritt von Lichtstrahlen durch gewölbte Linsen werden die Lichtstrahlen in der Mitte und am Rand unterschiedlich gebrochen. Daher werden Objekte am Bildrand häufig verzerrt dargestellt (siehe Abbildung 2.7) [80].

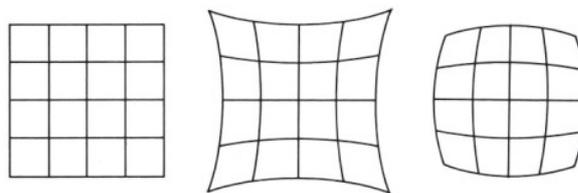


Abb. 2.7.: Bildfehler Verzeichnung im Randbereich, links: abzubildendes Gitter, Mitte: kissenförmige Verzeichnung, rechts: tonnenförmige Verzeichnung (aus [80])

Zur Beurteilung der Qualität und Leistungsfähigkeit eines optischen Aufbaus werden die Kenngrößen Auflösung und numerische Apertur (NA) verwendet. Verschiedene Objektiv- und Okularkombinationen können zum selben Bildausschnitt führen. Die Vergrößerung ist also trotz unterschiedlicher Linsen die selbe. Jedoch können die entstehenden Bilder unterschiedlich aufgelöst sein, d.h. kleine Strukturen können besser oder schlechter aufgelöst werden. Je mehr Licht in ein Objektiv kommt, desto mehr Information über das Objekt ist enthalten und desto besser ist das Bild. Wichtig hierbei ist der Öffnungswinkel des Objektivs (entspricht dem Dreieck aus Objektivdurchmesser und Punkt auf Probe in Entfernung des Arbeitsabstandes). Zur Beschreibung wird der halbe Öffnungsdurchmesser herangezogen. Beim Übergang in die Linse werden Lichtstrahlen gebrochen. Es gilt für den entstehenden Winkel α_1 in der Linse:

$$\sin(\alpha_1) = \sin(\alpha_2) * n_2 \quad [2.1]$$

$$A = n * \sin(\alpha) \quad [2.2]$$

n ist dabei der Brechungsindex des Mediums zwischen Präparat und Objektiv. Der Öffnungswinkel α_2 und der Brechungsindex beschreiben die numerische Apertur: $A = n * \sin(\alpha)$. Alpha ist hierbei der halbe Öffnungswinkel. Die numerische Apertur beschreibt das Auflösungsvermögen eines Objektivs. Je kleiner die Wellenlänge und je größer der Öffnungswinkel des Objektivs desto größer ist die mögliche Auflösung [31]. Mit Immersionsobjektiven können Öffnungswin-

kel größer 90 Grad erzielt werden. Hierfür wird ein Medium mit Brechungsindex größer 1 zwischen Objektiv und Probe gebracht [30].

Das Nyquistkriterium [90] beschreibt den Zusammenhang zwischen Abtastrate und Frequenz des zu erfassenden Signals. Bezogen auf die Abbildungsleistung digitaler Detektoren bedeutet das, dass die digitale Auflösung mindestens doppelt so groß sein soll wie die optische Auflösung. So werden Hell-dunkel-Übergänge benachbarter Bildpunkte optimal dargestellt [90].

Die Modulationstransferfunktion (MTF) macht eine Aussage über das optische Auflösungsvermögen. Die MTF beschreibt die Anzahl an schwarzen und weißen Linien, die pro Millimeter gerade noch differenziert werden können. Beim Abbilden geht grundsätzlich Detailfülle verloren [68]. Der Quotient aus Bilddetailkontrast und Objektdetailkontrast beschreibt die MTF. Je genauer ein optisches System ein Eingangssignal (Information des Objekts) wiedergibt, desto besser ist das optische System.

Das Rayleigh-Kriterium beschreibt den Abstand zweier Punktlichtquellen, die mit einem bestimmten optischen Aufbau gerade noch aufgelöst, d.h. getrennt wahrgenommen werden können [22, 80]. Liegen zwei Punkte näher zusammen, so überlappen sich die Beugungsmaxima und die Einzelmaxima verschwimmen zu einem einzigen Maximum. Mathematisch errechnet sich der maximal auflösbare Abstand a zweier benachbarter Teilchen anhand der numerischen Apertur NA und der Wellenlänge λ des Lichts (siehe Gl. 2.3) [80].

$$a = \frac{1,22 * \lambda}{2 * NA} \quad [2.3]$$

Zur Auswahl passender optischer Komponenten zur Untersuchung von Zebrafischen müssen die beschriebenen optischen Phänomene und charakteristischen Eigenschaften beachtet werden. Zur Bestimmung der nötigen Mindestauflösung muss betrachtet werden, wie groß die kleinste zu erkennende Struktur ist. Weiter muss entschieden werden, mit welcher digitalen Auflösung das Objekt abgebildet werden soll. Die lichtempfindlichen Elemente einer Digitalkamera, die die Pixel darstellen, haben eine bestimmte Größe (Fläche). Der sogenannte Pixelpitch ist die Grundlage für die Berechnung der nötigen Optik. Mit der Linsengleichung 2.4 wird der Zusammenhang von Vergrößerung ($A =$ Abbildungsmaßstab), Bildweite b und Gegenstandsweite g (Arbeitsabstand) beschrieben [17](siehe Abbildung 2.8). Ebenfalls ergibt sich die Vergrößerung A aus dem Verhältnis der Bildhöhe B zur Gegenstandshöhe G .

$$A = \frac{B}{G} = \frac{b}{g} \quad [2.4]$$

für die Brennweite f gilt

$$\frac{1}{g} + \frac{1}{b} = \frac{1}{f} \quad [2.5]$$

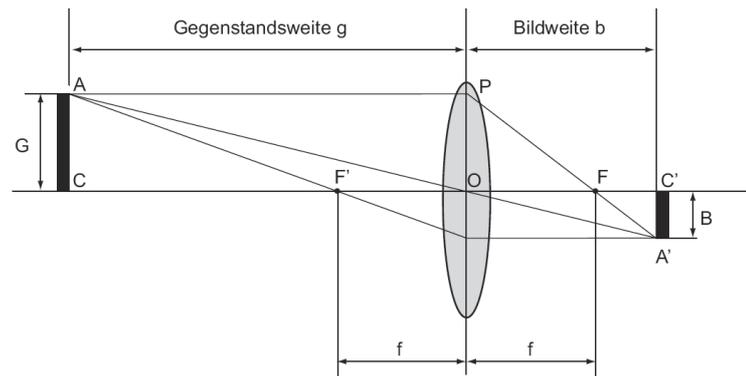


Abb. 2.8.: Strahlengang durch eine dünne Linse (aus [17])

aus der Gl. 2.5 und Gl. 2.4 ergibt sich die Vergrößerung A nach Gl. 2.6

$$A = \frac{B}{G} = \frac{b-f}{f} \quad [2.6]$$

Beleuchtung

Von großer Wichtigkeit für bildgebende Verfahren ist die Beleuchtung. Grundsätzlich gibt es die verschiedenen Beleuchtungsarten Auflicht, Durchlicht, Hellfeld und Dunkelfeld (siehe Abbildung 2.9). Beim Auflicht befinden sich Lichtquelle und Detektor (Kamera) auf der selben Seite des zu begutachtenden Objekts. Das Objekt erscheint in der tatsächlichen Farbe, da die Reflexion die Farbinformation beinhaltet. Bei glänzenden Oberflächen kann es zu Blendeffekten kommen. Beim Durchlicht dagegen befinden sich die Beleuchtung und der Detektor entlang einer optischen Achse auf gegenüberliegenden Seiten des Objekts. Die Beleuchtungsform Durchlicht eignet sich besonders für durchsichtige Proben. Transparente Körper erscheinen dabei als grauer Körper vor weißem Hintergrund. Je geringer die optische Dichte, desto weniger Licht wird vom Körper absorbiert und desto heller erscheint das Bild an der Stelle. Auf den entstehenden Bildern sind bei nichttransparenten Körpern die Umrisse zu erkennen, der Körper selbst wirft einen Schatten und erscheint dabei schwarz vor einem hellen Hintergrund. Weiter können die Beleuchtungsarten Hellfeld und Dunkelfeld unterschieden werden. Sowohl Auflicht- als auch Durchlichtaufbauten können als Hellfeld- oder Dunkelfeldbeleuchtung realisiert werden. Bei der Hellfeldbeleuchtung wird die Probe in der optischen Achse des Detektors (von oben oder von unten) bestrahlt. Das von der Probe reflektierte Licht trifft auf den Detektor. Bei der Dunkelfeldbeleuchtung trifft die Beleuchtung in einem flachen Winkel (zur optischen Achse) auf die Probe. Nur bestimmte Teile der Probe reflektieren Licht im richtigen Winkel, sodass es den Detektor erreicht. Die reflektierenden Strukturen erscheinen hell vor dunklem Hintergrund. So können beispielsweise Oberflächenstrukturen auf Werkstücken gut sichtbar gemacht werden [17, 22, 30].

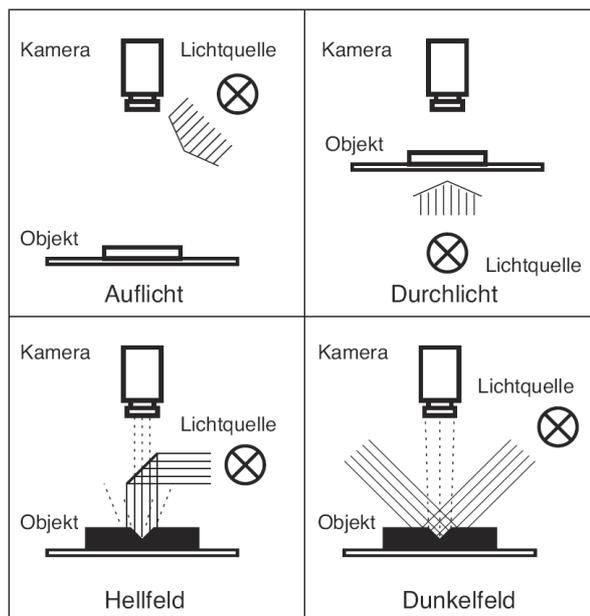


Abb. 2.9.: Beleuchtungsarten (aus [22])

Zur Realisierung der genannten Beleuchtungsarten kommen verschiedene optische Strahlungsquellen in Frage. Insbesondere für Bildverarbeitungsaufgaben ist die richtige Beleuchtung essentiell [22, 41]. Glühlampen emittieren Licht durch Wärmestrahlung des aufgeheizten Glühwendels. Das weiße Licht von Glühlampen entspricht Farbtemperaturen von etwa 2300 K bis 2900 K. Glühlampen werden im Betrieb sehr heiß. In Gasentladungslampen wird zwischen zwei Elektroden ein elektrisches Feld durch Stromfluss erzeugt. Durch das Feld werden Elektronen so stark beschleunigt, dass die vorhandenen Gasmoleküle ionisiert werden. Beim Übergang der angeregten Gasatome in den Grundzustand wird ein Photon emittiert. Nachteilig hierbei ist die nötige hohe Spannung sowie die entstehende Wärme. In Leuchtstoffröhren findet eine Quecksilberdampf-Gasentladung statt, bei der ultraviolette Strahlung entsteht. Durch die fluoreszente Innenbeschichtung der Röhre wird die UV-Strahlung in sichtbares Licht umgewandelt. Bei Halbleiterdioden (LED) wird das Licht in einem Halbleitermaterial durch Rekombination im pn-Übergang erzeugt. Je nach Halbleitermaterial können verschiedene Wellenlängen erzielt werden. LEDs sind sehr günstig, haben eine hohe Lebensdauer und sind in vielen Wellenlängenbereichen erhältlich. Laser erzeugen kohärentes, monochromatisches Licht. Laser benötigen meist einen großen Bauraum und die Komponenten sind teuer [80].

2.3.3. Bildverarbeitung zur Informationsgewinnung

Ein weiterer wichtiger Baustein zur Automatisierung von Untersuchungen mit Zebraabärblingen ist die Auswertung von Informationen durch Bildverarbeitung. Während verschiedener Einzelschritte der Prozesskette einer Untersuchung müssen Informationen aus Bildern gewonnen

werden, um einen weiteren Ablauf des jeweiligen Schrittes zu gewährleisten. Bildverarbeitung beinhaltet die Analyse und Interpretation von visueller Information. Ziel ist es, in Bildern Informationen zu erkennen, beispielsweise die Erkennung von Objekten durch Abgrenzung vom Hintergrund [106]. Im Folgenden werden die Grundlagen von digitaler Bildverarbeitung vorgestellt. Aus den beschriebenen Funktionen werden dann in den Kapiteln 3 und 4 die jeweils passenden Operationen ausgewählt.

Die im Bild enthaltene interessierende Information muss mit Mitteln der Bildverarbeitung herausgearbeitet werden. Es muss dabei anhand von charakteristischen Merkmalen zwischen Hintergrund und Vordergrund unterschieden werden. Das Aufteilen eines Bildes in unterschiedliche Teilbereiche wird Segmentierung genannt. Segmentierung kann auf Grund von verschiedenen Merkmalen durchgeführt werden. Beispielsweise über einen Schwellwert, über geometrische Merkmale wie Flächeninhalt oder Ausdehnung oder über Kantendetektion. Bei der Segmentierung mittels Schwellwert, wird ein Intensitätswert als Schwellwert definiert und alle Pixel im Bild werden überprüft, ob sie heller oder dunkler sind. So können beispielsweise helle Objekte im Vordergrund von einem dunklen Hintergrund getrennt werden. Die Schwellwertoperation macht aus dem Grauwertbild ein Binärbild. Jeder Grauwert unterhalb des Schwellwertes wird zu 0 gesetzt, wogegen die Grauwerte überhalb des Schwellwertes zu 1 gesetzt werden. Im entstehenden Binärbild ist der Kontrast zwischen Vordergrund (Wert 1) und Hintergrund (Wert 0) sehr hoch. Als Schwellwertmethode stehen verschiedene Typen zur Verfügung [17]. Es gibt manuelle Schwellwerte, lokale Schwellwerte, Schwellwerte nach geometrischer Formel und Schwellwerte nach Entropie. Mittels spezieller Bildverarbeitungsmethoden wie Geometrisches Formerkennen (geometric matching) werden Pixelobjekte in einem Bild erkannt, die einer Suchgeometrie ähnlich sind. So können beispielsweise einfache Strukturen wie Kreise mit bestimmten Durchmessern oder Rechtecke erkannt werden. Es können aber auch beliebige Pixelobjekte als Suchgeometrie vorgegeben werden. Diese aufwändigere Suchmethode nennt sich *template matching* und bezeichnet ein Kantendetektionsverfahren bei dem Filtermasken aus Musterkanten eingesetzt werden [22, 105]. Auch über Kantenerkennung können Objekte in digitalen Bildern erkannt werden. Kanten werden durch starke Intensitätsänderungen charakterisiert. Die Kanten eines Objekts im Vordergrund können damit vom Hintergrund getrennt werden [10, 17].

Die Zuordnung der erkannten Strukturen zu definierten Klassen nennt sich Klassifikation. Um im weiteren Prozess die Objekte einfach adressieren zu können, werden für die Objekte beim sogenannten *labeling* Namen vergeben. Beispielsweise bekommen dabei alle zusammenhängenden Regionen mit gleichem Grauwert einen eindeutigen Namen zugewiesen. Anhand des Namens kann das Objekt zweifelsfrei identifiziert werden [112].

Beim Herausarbeiten von Informationen aus digitalen Bildern kommen sogenannte morphologische Operatoren zum Einsatz [17, 22, 112]. Morphologische Operatoren sind Pixelopera-

tionen, bei denen mit Hilfe einer Matrix, alle Pixelwerte eines Bildes verändert werden. Die eingesetzte Matrix definiert dabei die Größe und Form der Umgebung, die zur Bestimmung des neuen Wertes eines jeden Pixels beachtet wird. Morphologische Operatoren können in Grauwertbildern und in Binärbildern eingesetzt werden. In Grauwertbildern ist ein wichtiger Vertreter der morphologischen Operatoren der Medianfilter. Bei einer Medianfilterung wird jedem Pixel ein neuer Grauwert zugeteilt, der sich aus den Grauwerten der benachbarten Pixel ergibt. Punktuelle Störungen im Bild können damit geglättet werden. In binären Bildern können komplexere Matrizen zur Veränderung der Bilder zum Einsatz kommen. Grundlegende morphologische Operatoren sind Dilatation, Erosion, Opening und Closing. Dilatation wird verwendet zum Schließen von Löchern in Pixelobjekten und zum Glätten von Konturen. Objekte im Bild werden von den Rändern her aufgedickt. Durch Anwendung von Erosion werden kleine Elemente gelöscht und Strukturen, die über schmale Verbindungen verbunden sind, voneinander getrennt. Pixelobjekte werden vom Rand her abgetragen. Die Wirkung von Dilatation und Erosion sind in Abbildung 2.10 erläutert. Opening und Closing sind Operationen, die sich aus Kombinationen von Erosion und Dilatation zusammensetzen. Beim Opening werden zuerst Erosionen durchgeführt, um kleine Objekte zu entfernen und dann Dilatationen, um verbleibende Objekte auf ihre Ursprungsgröße zurück zu bringen. Beim Closing werden zuerst Dilatationen und dann Erosionen durchgeführt. Dadurch werden Löcher in Vordergrundstrukturen geschlossen.

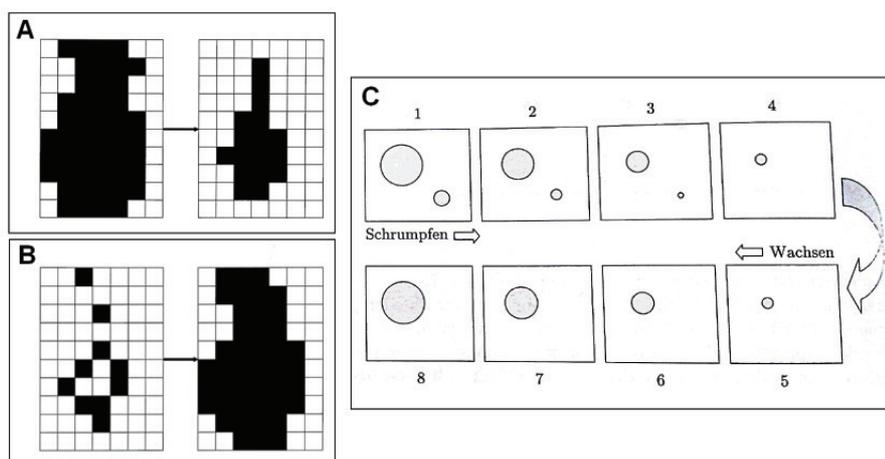


Abb. 2.10.: Effekte von morphologischen Operatoren: A= Erosion, B= Dilatation (aus [105]), C= opening and closing (aus [10])

Bildvorverarbeitung ist für Bildverarbeitung eine wichtige Vorbereitung. Die aufgenommenen Bilder können meist noch verbessert werden. Hierfür kommt zum Beispiel Kontrasterhöhung zum Einsatz. Eine Kontrasterhöhung kann beispielsweise über eine Anpassung des Histogramms, eine sogenannte Grauwertspreizung erreicht werden. Sind in einem Bild eine Vielzahl der Pixel in einem bestimmten Helligkeitswert repräsentiert, so ist der Kontrast gering. Eine Verbesserung des Kontrastes kann erreicht werden, indem der niedrigste vorkommende Hel-

ligkeitswert auf 0, also schwarz, gesetzt wird. Der höchste Grauwert wird auf 255, also weiß, gesetzt und die dazwischenliegenden Werte werden proportional über den Bereich verteilt. Das Ergebnis einer solchen Grauwertspreizung ist in Abbildung 2.11 zu sehen. Im Histogramm wird deutlich, dass im rechten Bild die Grauwerte über den gesamten Helligkeitsbereich verteilt sind, während sie vor der Anpassung im helleren Teil gehäuft auftraten. Die beschriebene Form der Kontrastverbesserung kann nur dann angewendet werden, wenn die Werte 0 und 255 nicht auftreten. Treten sie im Bild auf, so kann das Histogramm nicht weiter gespreizt werden. Auch hier ist eine Kontrastverbesserung mit der sogenannten Gammakorrektur [112] möglich.

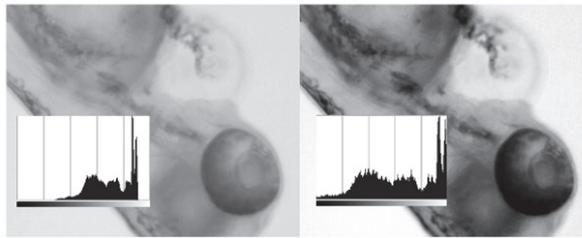


Abb. 2.11.: Beispiel Grauwertspreizung, links: Originalbild mit Histogramm, rechts: Bild nach Grauwertspreizung mit zugehörigem Histogramm (aus [100])

2.3.4. Softwaregrundkonzept und Kommunikation PC Roboter

Die Roboter bestehen aus Linearachsen, die von Schrittmotoren angetrieben werden. Zur Steuerung der Schrittmotoren sind Schrittmotortreiber nötig, die die Schrittmotoren zum richtigen Zeitpunkt mit Spannung versorgen. Weit verbreitet sind Schrittmotortreiber, die als Information Steuerungssignale aufnehmen und entsprechend Leistung in Form von Spannung und Strom an die Schrittmotoren mit der richtigen Taktung abgeben. Die Information über die Frequenz kann den Treibern in Form von pulsweiten-modulierten Signalen, als proportionale Spannung oder als einfacher binärer Befehl übermittelt werden.

Das vom Autor entwickelte Konzept für die Steuerung der modularen Linearachsenroboter beinhaltet Einzelsteuergeräte für jeden Schrittmotor. Somit können auf modulare Weise Steuergeräte je nach Bedarf ergänzt werden. Zur Steuerung der Schrittmotoren werden die Steuerungen SMCI33 der Firma Nanotec verwendet (Datenblatt siehe Anhang A.2). Sie haben neben der reinen Treiberfunktion auch erweiterte Funktionalitäten wie das Auslesen von Encodern zur Positionsrückmeldung, die Erkennung von Endlagenschaltern und eine entsprechende Verarbeitung dieser Informationen. Mehrere der Schrittmotortreiber werden über ein Netzwerkkabel miteinander verbunden und werden über einen windowsbasierten PC gesteuert. Die Kommunikation der Steuergeräte mit dem PC findet über die serielle Schnittstelle RS232 statt. Über die RS232 Schnittstelle werden Befehle an das Netzwerk von Schrittmotorsteuerungen geschickt, die von allen Schrittmotorsteuerungen gelesen werden. Die Steuergeräte verfügen über einen

internen EEPROM (electronically erasable programmable read only memory). In dem Speicher können Fahrprofile definiert und dann auf Befehl abgerufen werden. Hierfür wird von Nanotec eine Syntax vorgegeben, um Einzelparameter im EEPROM einzustellen oder Funktionen abzurufen. Ein gültiger Befehl hat immer folgende Syntax "#MPWWWW\r". Hierbei ist *M* die Motornummer, *P* der einzustellende Parameter oder Befehl und *WWWW* der einzustellende Wert. Der ASCII String wird über die serielle Schnittstelle an das Steuergerät mit einer Baudrate von 115200 geschickt (8 Bits, 1 Stoppbit, kein Paritätsbit). Die Befehlsbibliothek wird von Nanotec vorgegeben, in der Dokumentation finden sich alle erlaubten Befehle und deren gültige Werte. Dadurch, dass nur ein Übertragungskanal zur Verfügung steht, werden die einzelnen Steuergeräte nacheinander angesprochen. Die Zeit, die mindestens zwischen zwei Befehlen liegen muss, wird in den Funktionsmodulen eingestellt.

Zur Kontrolle des Datenverkehrs über die serielle Schnittstelle wurde am Institut für Toxikologie und Genetik am KIT ein Verbindungsmanager implementiert. Der Verbindungsmanager ist die einzige Instanz, die auf die serielle Schnittstelle schreiben und von ihr lesen kann. Das ist wichtig, damit nicht jedes Funktionsprogramm einzeln die serielle Schnittstelle öffnen und schließen muss. Der Verbindungsmanager arbeitet mit zwei globalen Variablen *command* und *response*, auf die auch andere Funktionsprogramme zugreifen können. Der Verbindungsmanager prüft alle 5 ms, ob *command* einen Wert hat. Wenn ja, wird der in *command* enthaltene ASCII String an die Steuergeräte geschickt. Nach einer Wartezeit wird die Antwort der Steuergeräte gelesen und in der Variable *response* zur Verfügung gestellt. Hat *command* keinen Wert, so bleibt der Verbindungsmanager für eine Wartezeit von 5 ms inaktiv. Das Konzept des Verbindungsmanagers sowie die Zusammenstellung der Einzelbefehle als ASCII String sind in Abbildung 2.12 dargestellt. In A ist zu sehen, dass die Grundbefehle wie Relativbewegung (rel mov) oder Absolutbewegung (abs mov) als ASCII String zusammengesetzt werden und in der *command* Variable abgespeichert werden. In B ist der Informationsfluss zwischen PC und Steuergeräten zu sehen. Hat die *command* Variable einen Wert, wird die Information an die Steuergeräte SMCI33 über das RS232 Netzwerk geschickt. Die Antwort wird vom PC gelesen und in der *response* Variable gespeichert.

Alle anderen implementierten Softwaregrundteile stellen aus den einzustellenden Parametern einen ASCII String zusammen und schreiben ihn in die Variable *command*. Der Verbindungsmanager übernimmt dann die Übermittlung an die Steuergeräte. Alle gültigen Befehle für die Steuergeräte werden in einzelnen Unterprogrammen erstellt. So werden alle Funktionen der Steuergeräte abgebildet, wie z.B. Einstellen der Fahrgeschwindigkeit, der Drehrichtung, des Drehmoments, der Schrittzahl und komplexere Funktionen wie die Definition von Beschleunigungsrampen, Prüfen eines Handshakes und Durchführen einer Referenzfahrt.

Aufbauend auf den Grundmodulen zur Steuerung der Schrittmotoren und Aktoren wird dann der Funktionsalgorithmus des jeweiligen Roboters implementiert. Der Algorithmus wird in

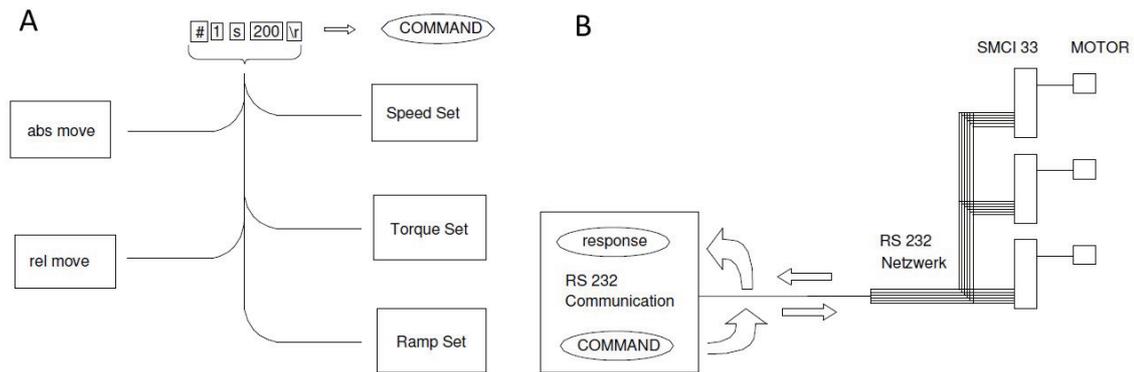


Abb. 2.12.: Softwarekonzept und Kommunikation. A= Grundbefehle als ASCII String erstellen, B= Senden und Empfangen von ASCII Befehlen zwischen PC und Steuergeräten

LabView implementiert und wird auf dem PC ausgeführt. An den Roboter werden dann die jeweiligen Steuerbefehle übermittelt und in der Gegenrichtung werden Sensorauswertungen ausgelesen. Die Zusatzfunktionen wie Kamerasteuerung, Bildauswertung, Informationsverarbeitung werden ebenfalls im PC umgesetzt.

In Kapitel 2 wurde das neue Konzept für die automatische Roboterprozesskette vorgestellt. Die allgemeinen Anforderungen der biologischen Untersuchungsmethoden bezüglich der Automatisierungstechnik wurden erarbeitet und dargestellt. Weiter wurden mögliche Robotikkomponenten bezüglich Führung und Antrieb vorgestellt und eine entsprechende Auswahl getroffen. Es wurden hierzu die Details mechanischer und elektrischer Komponenten beschrieben sowie die Grundlagen für optische Bauteile und Mikroskopie im Allgemeinen dargestellt. Hierbei wurden Digitalkameras, Linsensysteme und Beleuchtungstypen betrachtet. Anschließend wurden Grundelemente von Bildverarbeitungstechniken vorgestellt. Das neue Konzept für einen modularen Steuerungsansatz für die Hardware wurde ebenfalls dargestellt. In den Kapitel 3, 4, 5 werden die entwickelten Funktionsmodule, die auf den vorgestellten Grundkomponenten basieren, beschrieben. Im folgenden Kapitel 3 wird der entwickelte Fischartierer dargestellt.

3. Entwicklung des Fischsortierers

In Kapitel 3 wird der im Rahmen der Arbeit entwickelte Fischsortierer vorgestellt. Der Fischsortierer ist ein Handhabungsroboter für Zebrafischembryos. Bildbasiert werden mit einem speziellen Algorithmus wahllos verteilte Fischeier oder Fischlarven in Petrischalen erkannt, mit einer Pipettierspitze aufgenommen und in Mikrotiterplatten sortiert. Hierfür wird zuerst die entwickelte Hardware vorgestellt. Der Roboter hat eine Digitalkamera, die in x-y-Ebene bewegt werden kann. Außerdem hat er eine Pipettierspitze, die durch den Grundroboter in x-y-Ebene bewegt wird und durch einen zusätzlichen Aktor in z-Richtung abgesenkt und angehoben wird. Zur Überwachung des Sortierprozesses befindet sich an der Pipettierspitze ein ebenfalls im Rahmen der Arbeit entwickelter Sensor. Für das Pipettieren wurde außerdem eine lineare Schlauchpumpe entwickelt. Für den Sortierprozess ist es wichtig, die Zebrafischlinge in der Petrischale neu verteilen zu können. Hierfür wurde ein Umrührmechanismus entwickelt. Nach der Beschreibung der Hardware wird die Software beschrieben. Vom Autor wurde ein Steuerungsalgorithmus für den Fischsortierprozess entwickelt und implementiert, der auf sich verändernde Bedingungen reagiert. Zum Erkennen der Fische in der Petrischale wurde ein modifizierter Bildverarbeitungsalgorithmus implementiert. Die genannten Komponenten werden im Folgenden beschrieben.

3.1. Konzept Fischsortierer

In Hochdurchsatzverfahren mit Zebrafischen ist die manuelle Handhabung der Zebrafische ein Flaschenhals. Eine große Menge Zebrafische, gleichzeitig und in kurzer Zeit in Einzelkammern von Mikrotiterplatten zu sortieren, begrenzt den möglichen Durchsatz. In Abschnitt 1.2.1 wurden bereits aktuell zur Zebrafischhandhabung genutzte Robotertypen vorgestellt. Zwei Forschungsansätze und ein kommerzielles Produkt zum automatischen Befüllen von Mikrotiterplatten mit Zebrafischlarven wurden gezeigt. Die beiden Fischsortiergeräte CSEM Zebrafactor und COPAS von Union Biometrica lösen den Gesamtprozess anders als es im manuellen Prozess passiert. Der Ansatz in [62] ist dem manuellen Prozess ähnlich, da eine Kamera eine Auswertung der Petrischale ermöglicht und dann durch einen Roboter eine Pipettierspitze zu erkannten Fischeiern bewegt wird.

In der Fluidgruppe am Institut für Angewandte Informatik des KIT wird als Konzept für einen Fischsortierer ein Arbeitsprozess ähnlich dem manuellen Prozess gewählt. Vom Autor wurde hierzu ein Fischsortierer entwickelt, der mit Hilfe einer Kamera und einer Pipettierspitze

ze Zebrafische handhaben kann. Mit dem Fischsortierer werden Zebrafischeier und -larven aus Petrischalen in 96er oder 384er Standardmikrotiterplatten sortiert. Die Fische sind in der Petrischale wahllos verteilt und müssen so gehandhabt werden, dass sich in jeder Kammer der Mikrotiterplatte genau ein Fisch befindet.

Zum automatischen Darstellen des manuellen Prozesses des Fischsortierens ist eine genaue Analyse der erforderlichen Einzelelemente nötig. Zum Aufnehmen eines Fisches erkennt der Biologe durch einen Blick in die Petrischale, welcher der Fische alleine liegt und aufgesaugt werden kann. Dann platziert er die manuelle Pipette mit der Hand über dem aufzusaugenden Fisch und saugt ihn in die Pipette. Während des Prozesses prüft der Biologe visuell, ob der Aufnahmeprozess korrekt abläuft. Treten ungewollte Ereignisse wie das versehentliche Aufsaugen von zwei Fischen gleichzeitig oder Nichtaufsaugen eines Fisches auf, so wird der Pipetteninhalt zurück in die Petrischale entleert. Nur wenn sich genau ein Fisch in der Pipette befindet, wird er in eine Kammer einer Mikrotiterplatte pipettiert. Die genannten Einzelprozesse müssen technisch umgesetzt werden.

Der in der vorliegenden Arbeit verfolgte Ansatz für einen automatischen Fischsortierer geht vom oben beschriebenen manuellen Prozess aus und bildet ihn mit automatischen Teilprozessen ab. Neben dem Aufsaugen der Fische wurden in [12] auch andere Greifkonzepte betrachtet. Einige Verfahren der Mikrohandhabungstechnik wie beispielsweise das Gefriergreifen sind für den Umgang mit lebenden Organismen nicht geeignet. Das Aufsaugen der Fischeier und -larven in eine Pipette ist sehr einfach zu realisieren, ist schonend für die lebenden Objekte und wird daher als Handhabungsmethode gewählt. Der Fischsortierer wird mit einer Pipettierspitze ausgestattet. Zur bildgebenden Erfassung der Position der Eier in der Petrischale wird durch einen Dreiachsroboter eine Kamera bewegt. Mit der Kamera wird ein digitales Bild von der Petrischale gemacht. Durch einen modifizierten Bildverarbeitungsalgorithmus werden die Fische vom Bildhintergrund getrennt und deren Positionen innerhalb des Bildes können somit detektiert werden. Durch Abstandsberechnungen wird ein Fisch, der alleine liegt, zur Aufnahme ausgewählt. Durch den Dreiachsroboter wird nun die Pipettierspitze über dem ausgewählten Fisch positioniert. Daraufhin wird die Pumpe aktiviert und der Fisch wird zusammen mit einer bestimmten Menge Flüssigkeit in die Pipettierspitze gesaugt. Beim Einsaugen muss überprüft werden, ob der Fisch auch tatsächlich aufgenommen wurde. Dazu wurde im Rahmen der Arbeit ein Sensor entwickelt, der den Schlauch kurz nach der Pipettierspitze durchleuchtet und den Saugerfolg überprüft. Ist ein Fisch richtig aufgesaugt und erkannt worden, so wird er in die Mikrotiterplatte gebracht. Das entwickelte Konzept für den Ablauf des Sortierprozesses ist in Abbildung 3.1 zu sehen.

Beim Sortieren von Fischeiern ist es möglich, mehrere Fische nacheinander in den Schlauch zu saugen. Nach einer Flüssigkeitssäule, in der sich ein Fischei befindet, muss eine Luftsäule eingesaugt werden. Beim anschließenden Aufsaugen eines weiteren Fisches bleiben die beiden

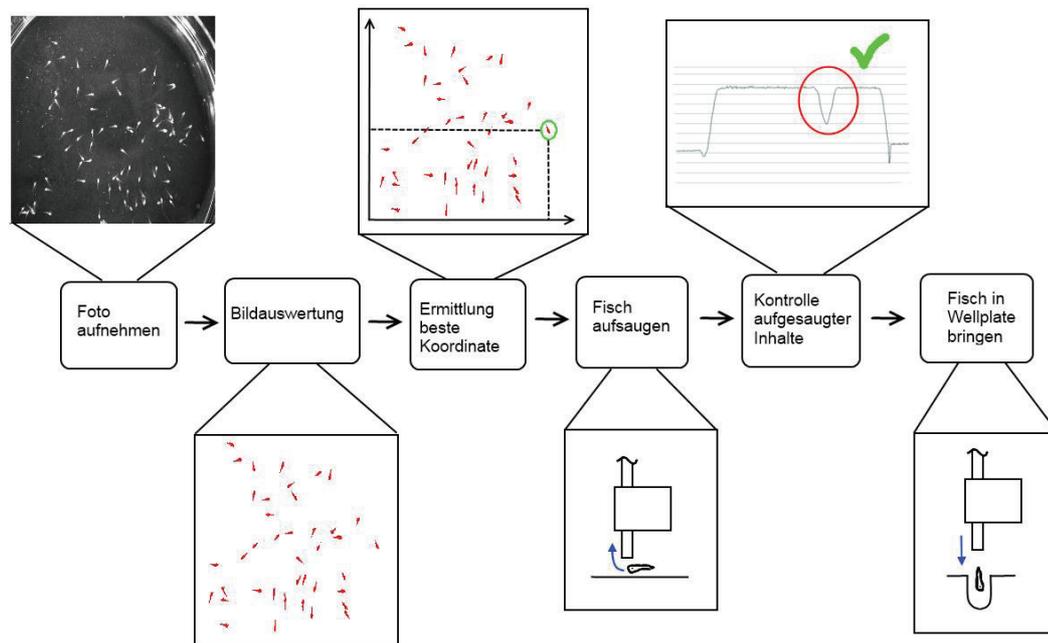


Abb. 3.1.: Neues Konzept für den automatischen Ablauf der Fischeaufnahme [82]

Flüssigkeitssäulen durch die Luftsäule getrennt und die Fischeier können einzeln in umgekehrter Reihenfolge der Aufnahme wieder abgegeben werden. Somit ist es möglich, bis zu 8 Eier in den Schlauch zu saugen und von einander getrennt zu halten. Beim Sortieren geschlüpfter Larven ist eine Trennung durch Luftsäulen nicht möglich. Versuche des Autors haben gezeigt, dass die Fische auf Grund ihrer strömungsoptimierten, länglichen Form nicht zuverlässig von der Flüssigkeitssäule mitgenommen werden. Beim Aufsaugen weiterer Fische kam es vor, dass Fischlarven Kontakt mit der Schlauchwand hatten und durch die auftretende Reibung der Strömungswiderstand nicht gereicht hat, um sie in der Fluidsäule mitzubewegen. Die Fische durchbrachen mit der Schwanzflosse die Oberflächenspannung der Wassersäule und verblieben an ihrer Position. Die Wassersäule wurde über sie hinweg bewegt und sie lagen somit in der Luftsäule. Ein sicheres Ausgeben von einzelnen Fischen ist daher nicht möglich, da Fische im Schlauch hängen bleiben können oder gemeinsam mit anderen Fischen zur falschen Zeit ausgegeben werden.

Zur technischen Realisierung des in Abbildung 3.1 beschriebenen Prozesses sind folgende Funktionsmodule nötig:

- Mechanik zur Bewegung in drei Dimensionen

- Kamera zur Bildaufnahme inkl. passender Beleuchtung
- Pumpe zum Aufsaugen der Fische
- Sensor zur Überwachung des Sortierprozesses
- Software zur Steuerung des Gesamtablaufs
- Bildverarbeitung zur Fischdetektion.

Die Funktionsmodule werden in den folgenden Abschnitten ausführlich beschrieben.

3.2. Hardwarekomponenten

Die Basis für den Roboter zur Bewegung der Pipettierspitze und der Kamera bildet der entwickelte Zwei-Achs-Grundroboter aus kugelumlaufgeführten Zahnriemenlinearachsen [85]. Der Grundroboter wird erweitert durch einen Schrittmotor mit Spindeltrieb zum vertikalen Positionieren der Pipettierspitze. Weiter wird eine Grundplatte in der Mitte des Grundroboters installiert. Auf der Ebene werden die Petrischalen- und Mikrotiterplattenhalterung angebracht. Die Ebene muss parallel zur aufgespannten Fläche der beiden Grundlinearachsen ausgerichtet sein und die Pipettierspitze muss alle Positionen in Petrischale und Mikrotiterplatte erreichen können. Zum Erkennen der Fische in der Petrischale kommt eine Digitalkamera zum Einsatz. Um eine scharfe, detailreiche Abbildung der Petrischale zu ermöglichen, wird eine Digitalkamera mit entsprechendem Objektiv ausgewählt. Wichtig für eine gut funktionierende Bildauswertung ist die Beleuchtung. Hierfür kommen LEDs mit Aluminiumreflektor zum Einsatz. Damit sich die Fischeier und -larven gut vom Hintergrund der Petrischale absetzen, werden die LEDs so angebracht, dass sie seitlich in die Petrischale einstrahlen. Durch die so realisierte Dunkelfeldbeleuchtung erscheinen die Fische hell vor dunklem Hintergrund, da fast nur Licht der Fische in die Kamera reflektiert wird. Zum Aufsaugen muss eine Dosierpumpe für kleine Flüssigkeitsmengen vorhanden sein. Da nur sehr geringe Flüssigkeitsmengen präzise gehandhabt werden müssen, darf die gewählte Pumpe nur eine sehr geringe Volumenstrompulsation haben. Pro Fisch müssen zwischen 20 und 100 μl pipettiert werden. Zur Überprüfung des Aufsaugprozesses ist ein Sensor nötig. Hierfür wird ein Schlauchsensor verwendet, der an der Pipettierspitze angebracht wird, und, der den aufgesaugten Inhalt ermittelt.

Neben der Hardware ist ein wichtiger Aspekt des Sortierprozesses die Software. Hierfür wurde eine Software entwickelt, mit dem die kognitiven Leistungen, die der Biologe während des Prozesses aufbringt, abgebildet werden können. Das Grundgerüst der Software ist ein Algorithmus zur Steuerung des Gesamtablaufs, mit dem die Kamera und die Pipettierspitze an die richtigen Positionen gebracht werden. Vom Grundalgorithmus aufgerufen wird dann ein modifizierter Bildverarbeitungsalgorithmus, der die einzelnen Fische in der Petrischale detektiert.

Der Aufbau des Fischsortierers ist in Abbildung 3.2 zu sehen. Links oben ist der Fischsortierer frontal in der Übersicht zu sehen. Im unteren Teil des Roboters befinden sich die Schrittmotorsteuergeräte und die Spannungsversorgung. Ebenfalls befindet sich die Schlauchpumpe im unteren Teil. Im oberen Teil des Roboters befindet sich der Dreiachsmechanismus sowie die Grundplatte mit Petrischale und Mikrotiterplatte. Im Bild rechts oben ist eine Detailaufnahme des oberen Bereichs des Roboters zu sehen. Der z-Aktor mit Pipettierspitze und die Kamera sind in einer gemeinsamen Halterung am Wagen der y-Achse befestigt. Der als z-Aktor eingesetzte Schrittmotor mit Verdrehsicherung ermöglicht einen maximalen Hub von 50 mm und eine Verfahrgeschwindigkeit von 4000 Hz oder 50 mm/s. Im Bild links unten ist der Arbeitsraum des Fischsortierers gezeigt. Zu sehen sind die Mikrotiterplatten, in die sortiert wird sowie die Petrischalen, in denen die Fische aufgesaugt werden müssen. Die überfahrbare Fläche beträgt mit den Linearachsen 210 x 210 mm. Die angetriebene x-Achse wird durch eine parallele, passive Linearschiene ergänzt. Somit wird gewährleistet, dass die y-Achse sich nicht durch das Gewicht des bewegten Wagens je nach Position des Wagens verbiegt. Im Bild rechts unten zu sehen ist eine Nahaufnahme des Pipettiersensors an der Pipettierspitze. Außerdem ist im Hintergrund die Beleuchtung zu erkennen, die seitlich als Dunkelfeldbeleuchtung in die Petrischalen strahlt. Die Details zur Auslegung der einzelnen Funktionsmodule des Fischsortierers werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

3.3. Funktionsmodule zur Realisierung des automatischen Ablaufes

3.3.1. Auswahl der Kamera und des Objektivs

Die Kamera kann von unten auf die Petrischale gerichtet werden oder von oben. Die Blickrichtung von unten hat den Vorteil, dass die Kamera unabhängig von den Bewegungen des Roboters Fotos machen kann. So kann Zeit gespart werden, wenn die Fotos gemacht werden, während der Roboter die bereits aufgenommenen Fische in die well plate bringt. Aber diverse Nachteile gibt es auch. Da die Pipettierspitze von oben in die Petrischale getaucht werden muss, kann über der Petrischale kein feststehender Hintergrund angebracht werden. Auf den Bildern sind daher im Hintergrund immer Teile des Roboters oder die Decke des Labors zu sehen. Ein inhomogener Hintergrund erschwert in hohem Maße die Bildauswertung. Aufgrund des begrenzten Bauraums ist der maximale Arbeitsabstand auf ca. 160 mm beschränkt. Zum Abbilden einer Petrischale mit einem Durchmesser von 90 mm muss ein Bildausschnitt von 90 x 90 mm aufgenommen werden. In einem solchen Bildausschnitt können nicht mehr als 300 Fische sein, da sie sonst zu dicht nebeneinander liegen. Die Fische müssen einen Mindestabstand von 1 mm zu einander haben, um zuverlässig von der Bildverarbeitung als Einzelobjekte erkannt zu werden. Auch für einen längeren Sortierprozess können demnach nicht mehr als 300 Fische in einer einzelnen Petrischale vorgelegt werden. Zum Vorlegen von mehr Fischen, muss eine weitere Petrischale

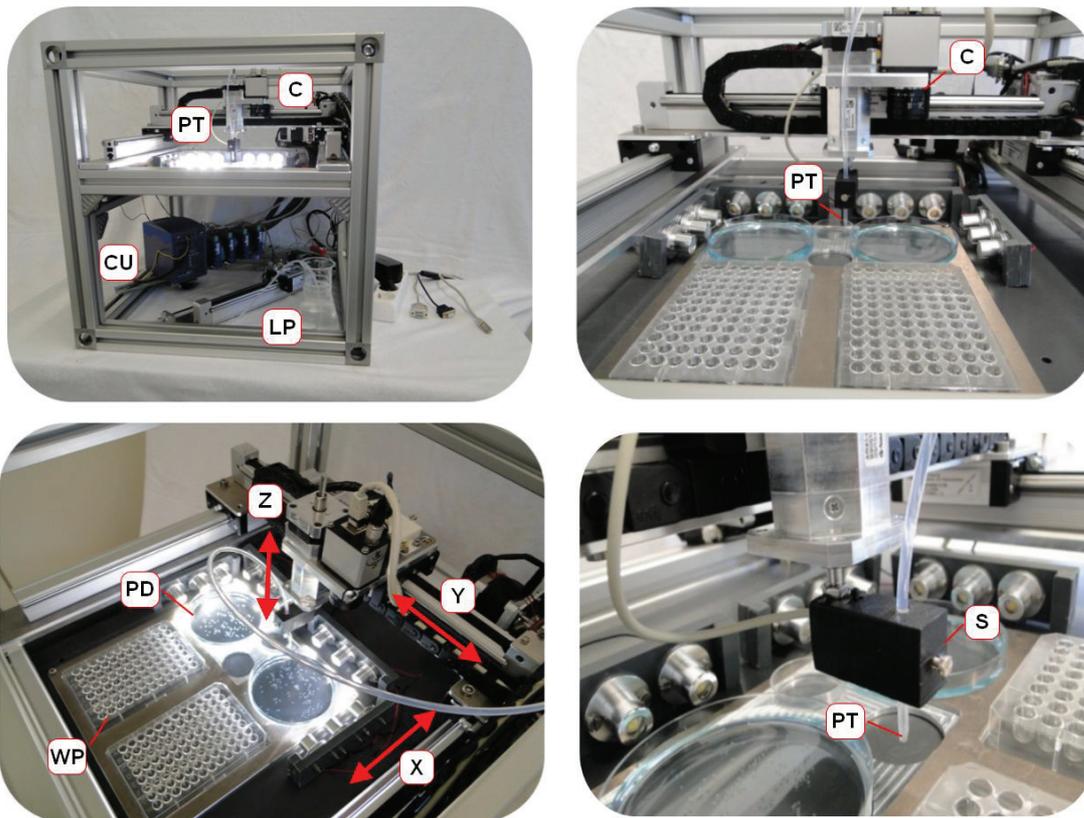


Abb. 3.2.: Hardware des entwickelten Fischsortierers, PT = Pipettierspitze, C = Kamera, CU = Steuerungseinheit, LP = lineare Pumpe, WP = well plate, X-,Y-,Z-Achse, PD = Petrischale, S= Sensor (modifiziert nach [82, 83])

verwendet werden. Die Kamera muss dann zu der zweiten Petrischale bewegt werden können. Eine Veränderung der Kameraposition ist jedoch nicht möglich, wenn sie statisch montiert ist.

Die Kamera kann auch oberhalb der Petrischale am Wagen der y-Achse befestigt werden. Der Nachteil hierbei ist, dass nach jeder Bewegung eine Pause von ca. 600 ms zum Ausschwingen der Mechanik eingehalten werden muss, bevor die Kamera ein wackelfreies Bild aufnehmen kann. Der wichtige Vorteil jedoch ist, dass mehrere Kamerapositionen möglich sind, die während des Betriebes vom Roboter angefahren werden können.

Die Kamera UEye 5480 (5 MP, CMOS) mit einer Auflösung von 2560 x 1920 von IDS wurde gewählt (Datenblatt siehe Anhang A.2). Mit dem Objektiv CMFA 1022 von Lensation (Datenblatt siehe Anhang A.2) ergibt sich bei einem Arbeitsabstand von ca. 160 mm die Größe des Bildausschnitts von ca. 80 x 80 mm. Die geschlüpften Larven haben auf den Bildern eine Länge von 120 Pixel und eine Fläche zwischen 1200 und 1800 Pixel. Eier haben einen Durchmesser von 1 mm und werden im Bild mit einem Durchmesser von 40 Pixel und einer Fläche von 1000 bis 1300 Pixel dargestellt. Mit dem Objektiv und der Sensorgröße ergibt sich damit eine digitale Auflösung von ca. 40 Pixel pro mm. Damit unterscheiden sich die Fische und Eier gut genug von Pixelartefakten mit Flächeninhalten von bis zu 200 Pixel. Die zu erkennenden Objekte mit einer

Größe von mehr 1200 Pixeln sind demnach um den Faktor 5 größer als die durchschnittlichen Artefakte mit 200 Pixeln. Das Verhältnis von 5:1 ist ausreichend, um Fische von Pixelartefakten zu unterscheiden. Mit der gewählten Kombination aus digitaler und optischer Auflösung sind die Fische somit im Bild detektierbar.

3.3.2. Beleuchtungskonzept

Essentiell für Bildverarbeitungsvorhaben ist eine geeignete Beleuchtung [22]. Mit der richtigen Beleuchtung kann ein hoher Informationsgehalt im Bild erzielt werden. Je nach Aufgabestellung ergeben sich daher verschiedene Konzepte.

Für die Untersuchung von Zebrafischen ist der Durchlichtaufbau geeignet, da die Eier transparent sind. Die Beleuchtungsform Durchlicht wird typisch für Mikroskopaufbauten gewählt. Für den Fischsortierer müssen sich die Fischeier von der Petrischale, in der sie sich befinden, möglichst kontrastreich abheben. Hierfür eignet sich die Dunkelfeldbeleuchtung am besten. Das flach, seitlich eingestrahelte Licht wird von den Eiern in die Kamera gestreut, die dunkle Unterlage unter der Petrischale dagegen bleibt fast unbeleuchtet und erscheint schwarz. In Bild 3.3 ist der Einfluss des Einstrahlwinkels durch Testbilder dargestellt. Der Einstrahlwinkel ist bezogen auf die optische Mittelachse der Kamera, wobei 0° bedeutet, dass die Beleuchtung hinter der Kamera ist und 180° , dass die Beleuchtung frontal in die Kamera leuchtet. Bei einem Winkel von 15° leuchten die Fischeier hell, aber die Spiegelung der Lichtquelle ist ebenfalls zu sehen. Bei 45° heben sich nicht alle Fischeier deutlich vom Hintergrund ab. Bei 60° ist der Helligkeitsunterschied zwischen den Fischeiern und dem Hintergrund stärker als bei 45° . Bei 90° ist der Helligkeitsunterschied zwischen Fischeiern und Hintergrund am größten. Der Hintergrund erscheint homogen schwarz und die Fischeier leuchten hell. Anhand der Versuchsreihe ist zu erkennen, dass ein seitliches Einstrahlen zur Beleuchtung der Petrischale am geeignetsten ist.

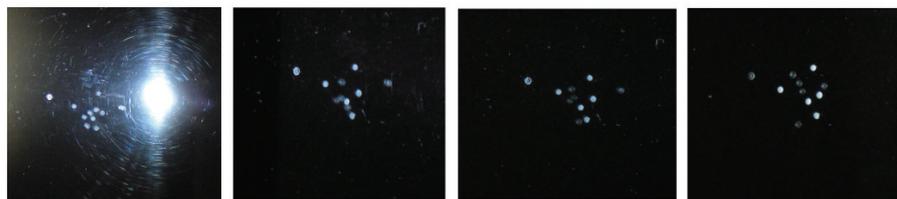


Abb. 3.3.: Beleuchtungsversuche mit verschiedenen Einstrahlwinkeln, von links nach rechts aufsteigend 15° , 45° , 60° und 90° (modifiziert nach [16])

In [16] wurde der Einfluss des Lichteinfallswinkels auf die Erkennung von Fischeiern in einer Petrischale überprüft. Weiterhin wurde überprüft, ob eine Differenzierung auf Grund verschiedener Beleuchtungswinkel zwischen lebendigen und koagulierten¹ Eiern durch schräges Licht

¹koagulare, lat. = gerinnen

möglich ist. In toten bzw. koagulierten Eiern verlieren Proteine durch Gerinnung ihre räumliche Terziärstruktur und die ansonsten transparenten Fischeier trüben ein. Dadurch verändern sich ihre Reflexionseigenschaften. In Abbildung 3.3 erscheinen die koagulierten Eier heller als die lebenden. In der Arbeit [16] wurden mittels eines entwickelten Teststands Aufnahmen von Fischeiern unter verschiedenen Beleuchtungseinfallswinkeln aufgenommen. Dabei zeigte sich, dass die Fischeier umso höheren Kontrast gegenüber dem dunklen Hintergrund der Petrischalen zeigten, je flacher der Einfallswinkel war. Auch der Einfluss der Wellenlänge auf die Unterscheidbarkeit zwischen koagulierten und lebendigen Eiern wurde überprüft. Weißes Licht hat dabei die besten Ergebnisse erzielt. Die Ergebnisse der Beleuchtungsversuche sind im Anhang A.1 zu finden.

3.3.3. Fluidtechnik/Pumpe

Für das sichere Aufsaugen eines Fischeis ist eine präzise Pumpe nötig. Da es meist in den biologischen Experimenten darauf ankommt, genaue Verdünnungen zu erzielen, muss die pipettierte Menge präzise und konstant sein. Auf Grund der Tatsache, dass immer nur eine geringe Menge gesaugt werden muss, sind Pumpen mit DC-Motoren ungünstig, da sie eher dazu bestimmt sind, kontinuierliche Durchflüsse zu erzeugen. Für kleine, definierte Drehwinkel eignen sich Schrittmotoren besser. Sie kommen in sogenannten Spritzenpumpen oder peristaltischen Pumpen im klinischen Bereich für Dosieraufgaben häufig zum Einsatz. Bei Spritzenpumpen wird ein Kolben in einem Zylinder linear bewegt und erzielt somit im angeschlossenen Schlauch eine Saug- oder Pumpwirkung. Die Hauptelemente peristaltischer Pumpen, auch Schlauchpumpen genannt, sind ein Rotor mit mehreren Rollenkörpern und ein Schlauch, der im Halbkreis um den Rotor in ein Gehäuse gelegt ist. Durch die Rollenkörper wird der Schlauch gegen die Gehäusewand gedrückt und dabei so gequetscht, dass ein Durchfluss nicht möglich ist. Durch einen Antriebsmotor wird der Rotor gedreht. Die Quetschstelle verschiebt sich dabei entlang des Schlauchs. Dadurch wird am Schlauchende eine Saug- bzw. Pumpwirkung erzeugt. Wird eine peristaltische Pumpe mit einem Schrittmotor als Antrieb betrieben, so können kleine Volumina gepumpt werden.

Ein großer Vorteil von peristaltischen Pumpen ist, dass das gepumpte Medium getrennt vom Pumpenmechanismus ist. So wird die Pumpe selbst durch das Medium nicht kontaminiert, es reicht, den Schlauch zu wechseln. Bei Spritzenpumpen muss der Kolben inklusive Dichtungen und der Zylinder von innen aufwändig gereinigt werden. Ein weiterer Vorteil von peristaltischen Pumpen ist die hohe Dichtigkeit. Saug- und Druckseite sind voneinander durch die Quetschstelle getrennt. Durch einen hohen Anpressdruck kann leichter als bei reibungsbehafteten, relativ bewegten Kolbendichtungen eine Dichtwirkung erzielt werden. Nachteilig an peristaltischen Pumpen ist die Volumenstrompulsation. Eigene Tests des Autors haben ergeben, dass bei einer solchen Pumpe eine merkliche Volumenstrompulsation auftritt und sich deren Betrag bei der

verwendeten Testpumpe quantitativ im Bereich der zu pipettierenden Menge von $20 \mu\text{l}$ bewegt. Hierdurch kommt es je nach Anzahl der Rollen, die den Schlauch quetschen, zu regelmäßig wiederkehrenden Saugunterschieden. Beim Eintreten eines Rollenkörpers in den Kontakt mit dem Schlauch, wird Flüssigkeit im Schlauch verdrängt. Gleichzeitig quetscht an einer anderen Stelle des Rotors noch ein anderer Rollenkörper den Schlauch, da er gerade für das Saugen oder Pumpen gesorgt hat. In die Richtung des zweiten Rollenkörpers kann also keine Flüssigkeit verdrängt werden. Die verdrängte Flüssigkeit muss also in die Richtung fließen, aus der angesaugt werden soll (siehe Abbildung 3.4). Je nach Schlauchdurchmesser unterscheidet sich das verdrängte Volumen. Vorversuche für den Fischsortierer haben gezeigt, dass der Effekt der Volumenstrompulsation beim einfachen Pipettieren von kleinen Volumina kritisch ist. Beim kontinuierlichen Pumpen führt der Effekt zu einer Volumenstrompulsation. Beim Pumpen von nur 30 bis $60 \mu\text{l}$ führt das verdrängte Volumen, das etwa in der selben Größenordnung ist, dazu, dass das Pumpen/Saugen an der Pipettierspitze nicht stattfindet und weder Saug- noch Pumpwirkung merklich ist. Bei zwei Rollenkörpern passiert das alle 180° , bei drei Rollenkörpern alle 120° .

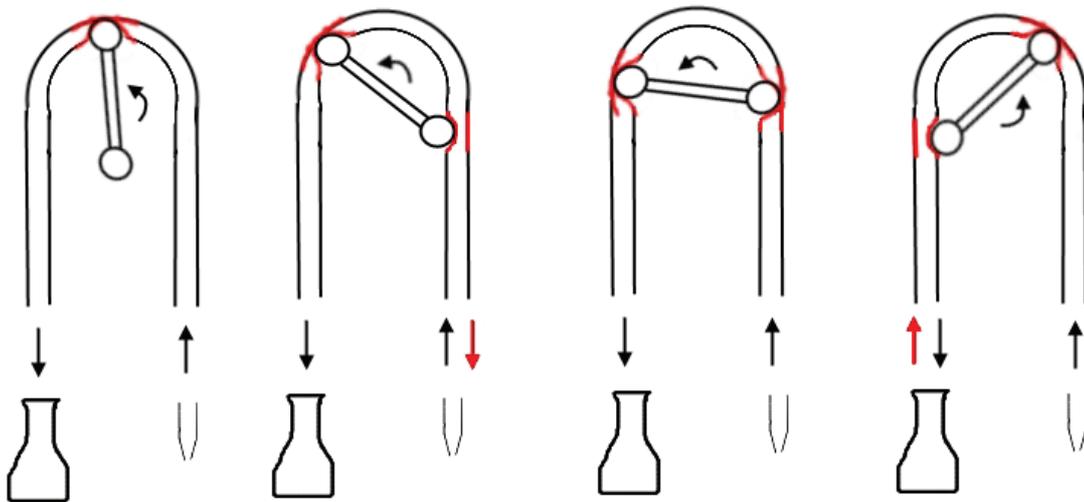


Abb. 3.4.: Erklärung Pulsation Schlauchpumpe

Um die Vorteile der Medientrennung von der Pumpmechanik und die einfache Trennung zwischen Saug- und Druckseite durch Rollenkörper nutzen zu können, ohne den Nachteil der Volumenstrompulsation zu haben, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine lineare Schlauchpumpe entwickelt. Hierbei wird ein Schlauch, der flach auf einer ebenen Unterlage liegt, an einer Stelle durch einen Rollenkörper gequetscht. Wie beim Rotor werden an der Stelle Saug- und Druckseite voneinander getrennt. Wird nun die Quetschstelle entlang des Schlauchs linear ver-

schoben, so entsteht an den offenen Schlauchenden eine Saug- und Pumpwirkung. In Bewegungsrichtung hinter dem Rollkörper wird der Schlauchquerschnitt durch die Eigenelastizität des Schlauches wieder auf den normalen Wert aufgespannt. Die Eigenelastizität des Schlauches ist daher für die Saugwirkung verantwortlich. Nachteilig hierbei ist, dass durch den linear maximal verfahrbaren Weg auch das maximal ansaugbare Volumen beschränkt ist. Das stellt für die Anwendung im Fischsortierer kein Problem dar, da der Ablauf so aussieht, dass ein Fisch aufgesaugt wird und das selbe Volumen dann in die Mikrotiterplatte wieder abgegeben wird. Die entwickelte Pumpe basiert auf einer Linearachse mit Schrittmotorantrieb, wie sie auch für die x-y-Bewegung des Roboters zum Einsatz kommt. Ein Schlauch, der parallel zur Linearachse befestigt ist, wird mit einem Rollkörper am Wagen der Achse an einer Stelle gequetscht. Wird der Wagen auf der Führungsschiene verfahren, so verschiebt sich die Quetschstelle ebenfalls. Hiermit wird eine Pump- bzw. Saugwirkung erzielt. Die lineare Schlauchpumpe eröffnet somit die Vorteile einer rotatorischen Schlauchpumpe und bringt gleichzeitig keine weitere Einschränkung in der Nutzung für den Einsatz im Fischsortierer. Der Aufbau der Schlauchpumpe ermöglicht einen einfachen und schnellen Wechsel des Schlauchs. Ein schneller Schlauchwechsel ist erforderlich, wenn Fischeier zusammen mit einer Toxinlösung pipettiert werden. Um eine Vermischung von Toxinen zu vermeiden, muss vor dem Pumpen der neuen Lösung der Schlauch getauscht werden. Der Aufbau der linearen Schlauchpumpe ist in Abbildung 3.5 zu sehen. Links im Bild ist die Schlauchpumpe von oben zu sehen. Der Wagen (W) der Linearachse (L) wird durch den Schrittmotor (M) bewegt. Dabei rollt der Rollkörper (R) auf dem Schlauch (S) ab. Ein Ende des Schlauches ist mit einem Ausgleichsgefäß (A) verbunden, aus dem Flüssigkeit nachgesaugt werden kann. Das andere Ende des Schlauches kann über das Ventil (V) verschlossen werden und führt im weiteren Verlauf zur Pipettierspitze.

Zur Auslegung des Pumpvolumens der Pumpe werden Schlauchquerschnitt und linearer Fahrweg betrachtet. Mit den Zahnriemen-Linearachsen, die für den Grundroboter ausgewählt wurden, steht ein günstiger Linearantrieb zur Verfügung. Ein Schlauch wird in einer Halterung parallel zur Linearachse fixiert und ein Kugellager, das am Wagen der Linearachse befestigt ist, quetscht den Schlauch in vertikaler Richtung. Beim linearen Verfahren gilt folgender Zusammenhang zwischen bewegtem Volumen V im Schlauch und zurückgelegtem linearem Weg l . Das bewegte Volumen hängt dabei von dem Schlauchdurchmesser ab.

$$V = l \cdot A = l \cdot r^2 \cdot \pi \quad [3.1]$$

Mit der bekannten mechanischen Übersetzung der Linearachse mit Schrittmotorantrieb entsprechen 400 Schritte 60 mm linearem Weg. Mit der Pumpe sollen Volumina in der Größenordnung von $30 \mu\text{l}$ pipettiert werden. Hierfür kommt ein Silikonschlauch der Firma Erbe (Typ EIP2) zum Einsatz, der im medizinischen Bereich häufig in peristaltischen Pumpen verwendet wird. Der Schlauch hat einen Innendurchmesser von 3,5 mm. Nach Gleichung 3.1 müssen 3,1 mm

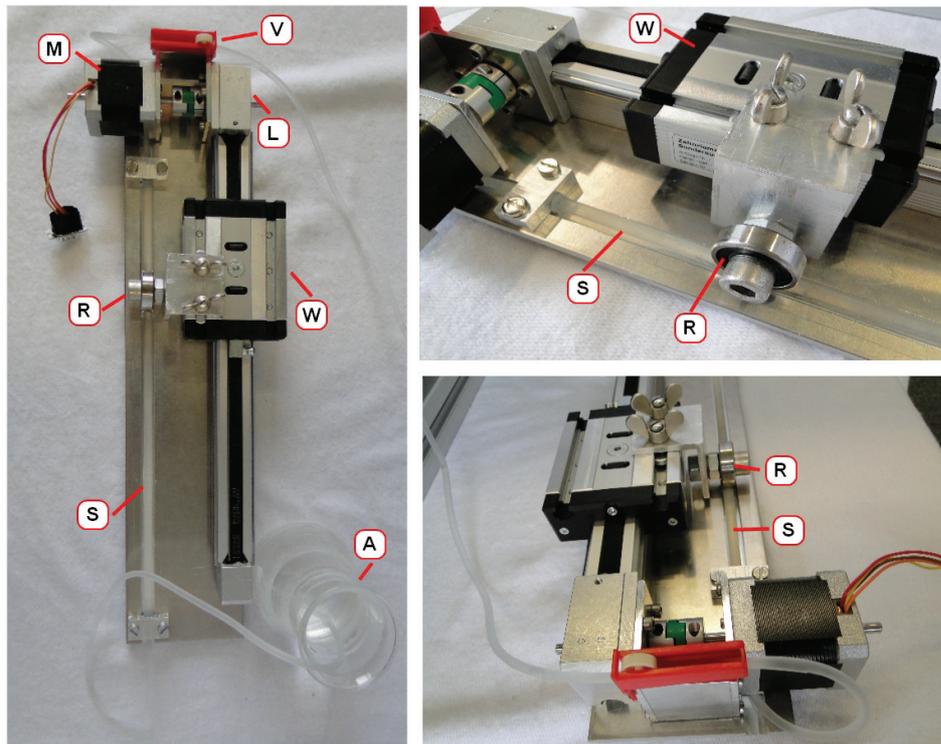


Abb. 3.5.: Neue lineare Schlauchpumpe: M= Motor, V=Schließventil, L= Linearachse, W= Wagen, R= Rollenkörper, S= Schlauch, A= Ausgleichsbehälter

linearer Weg zurückgelegt werden, um $30 \mu\text{l}$ pipettieren zu können. Werden mehrere Embryos seriell in den Schlauch eingesaugt, so muss der maximale Verfahrweg der Achse beachtet werden. Zum Saugen eines Embryos werden $3,1 \text{ mm}$ verfahren, zusätzlich wird die gleiche Menge Luft zur Trennung der Flüssigkeitssäulen im Schlauch eingesaugt. Insgesamt müssen also $6,2 \text{ mm}$ pro Embryo verfahren werden. Bei 8 Embryos entspricht das einem linearen Weg von $49,6 \text{ mm}$. Der maximale Verfahrweg von 150 mm ist dafür mehr als ausreichend.

Zum Nachweis der Präzision der Pumpe wurde sie auf zwei verschiedene Arten evaluiert. In [107] wird die Pipettierpräzision ermittelt, indem die Gewichtsänderung beim Pipettieren in Mikrotiterplatten gemessen wird. Entsprechend wurden in der vorliegenden Arbeit zur Evaluierung der entwickelten Schlauchpumpe einzelne Tropfen in eine Petrischale pipettiert und dann gewogen. Da die Tropfen so klein sind, fallen sie nicht allein durch die Schwerkraft von der Schlauchspitze ab. Um sie in der Petrischale abzusetzen, wird der Tropfen mit der Petrischale in Kontakt gebracht, wodurch er sich an die Oberfläche ansaugt. Die zweite Methode zum Messen der Genauigkeit der Pumpe wurde mit einer Glasmesskapillare durchgeführt. In die Messkapillare mit einer Skalierung von 0 bis $100 \mu\text{l}$ in einer Teilung von $1 \mu\text{l}$ wurden Flüssigkeitssäulen eingesaugt und der jeweilige Wert wurde abgelesen. Die Ergebnisse zeigten eine Schwankung von weniger als 5% um den gewünschten Wert der Fluidmenge. Zur Einschätzung des Wertes im Bezug auf die Eignung für den Einsatz in Biolabors wurde die manuelle

Einkanalpipette *Pipetman 200* des Herstellers Gilson ebenfalls untersucht. Die manuelle Pipette kommt standardmäßig in Biolabors zum Einsatz und kann daher als Referenz dienen. Mit der *Pipetman 200* wurden ebenfalls Tropfen in eine Petrischale gegeben und dann deren Gewicht bestimmt. Auch bei der *Pipetman 200* zeigte sich eine Schwankung von ca. 5%. Die Genauigkeit der entwickelten linearen Schlauchpumpe ist also vergleichbar mit der manuellen Standardpipette *Pipetman 200*. Ein Einsatz der linearen Schlauchpumpe im Fischsortierer ist daher gerechtfertigt.

3.4. Entwickelter Pipettiersensor

Der erste Aufbau des Fischsortierers funktionierte mit einem gesteuerten Algorithmus. Im Unterschied zu einer Regelung wurden keine Parameter während des Laufes erfasst und nicht als Rückinfo verwendet. Ein Fisch wird detektiert, die erkannte Koordinate wird angefahren, es wird Flüssigkeit aufgesaugt und die Flüssigkeit wird in die Mikrotiterplatte gebracht [84]. Hier erfolgt keine Rückinfo über den Erfolg des Saugprozesses. Mit dem Steuerungsalgorithmus konnte nach verschiedenen Verbesserungsmaßnahmen in Spitzengeometrie, Stabilität der Mechanik und Bildverarbeitung eine Erfolgsquote von 85% erzielt werden. Die Erfolgsquote ist dabei definiert als Verhältnis von richtig befüllten Kammern gegenüber der Gesamtanzahl an Kammern einer Platte. Eine Kammer ist dann richtig befüllt, wenn genau ein Fisch darin enthalten ist. Werden versehentlich mehrere Fische aufgesaugt und in eine Kammer verbracht oder wird ein Fisch nicht aufgesaugt und die Kammer bleibt leer, so gilt die Kammer als nicht richtig befüllt. Die 15% Fehlerquote teilen sich auf in Fehler in der Bildverarbeitung und beim Aufsaugen. Ein Fehler der Bildverarbeitung war, dass ein Fisch aufgesaugt wird, dessen naher Nachbar nicht detektiert und dann ungewollt der Nachbar mit aufgesaugt wird. Weiter kann es vorkommen, dass ein Lichteffect als Fisch detektiert wird, wenn die Erscheinung in Geometrie und Lichtintensität den Kriterien zur Fischerkennung entspricht. Ein Fehler beim Aufsaugen kann durch die Fischphysiologie entstehen, da die Körperform stromlinienförmig ist und wenig Strömungswiderstand in Längsrichtung bietet. Manchmal werden Fische nicht aufgesaugt, weil sie der Saugströmung durch ihre Lage nicht genügend Strömungswiderstand entgegen bringen. Selten kommt es vor, dass die Fische an der Petrischale haften, sodass sie beim Saugversuch unbewegt liegen bleiben. Die beschriebenen Fehlerquellen sind mit rationellem Aufwand nicht so weit beherrschbar, dass annähernd 100% Erfolgsquote erzielt werden können.

Daher wurde vom Autor das Steuerungskonzept mit Hilfe eines Pipettiersensors zu einer Regelung erweitert. Bei jedem Aufsaugprozess wird überprüft, ob tatsächlich ein Fisch aufgesaugt wurde. Anhand der Sensorinformation werden verschiedene Fälle unterschieden. Ist kein Fisch aufgesaugt worden, so wird die aufgesaugte Flüssigkeit zurück in die Petrischale pipettiert und ein neuer Aufnahmeprozess wird eingeleitet. Ist mehr als ein Fisch in den Schlauch aufgenommen, so wird der Inhalt ebenfalls zurück pipettiert. Wird im Falle von Fischeiern erkannt,

dass das Fischei koaguliert ist, so wird es in ein gesondertes Gefäße für Ausschuss pipettiert. Nur wenn genau ein Fisch erkannt wurde, wird der Inhalt in die Mikrotiterplatte pipettiert. Die Details des entwickelten Regelungsalgorithmus werden in Abschnitt 3.6 beschrieben.

Zur Prüfung, ob der Saugprozess richtig funktioniert hat, kommen verschiedene Konzepte in Frage. Ein an der Pipettierspitze angebrachter Sensor kann direkt den aufgesaugten Inhalt prüfen. Die Prüfung des Saugergebnisses kann jedoch auch indirekt vorgenommen werden, indem nach dem Aufsaugen ein neues Bild der Petrischale aufgenommen wird und die Veränderung zum ersten Bild ausgewertet wird. Das ist zeitaufwändig, da zur Prüfung die Kamera erneut über der Petrischale positioniert werden muss. Auf Grund der geringen Größe der Fische ist die Erkennung der Fische mittels Bildverarbeitung nicht 100%ig. Das ist ohne Nachteil für den Sortierprozess, wenn genügend Fische in der Petrischale sind, jedoch ist die Bildverarbeitung nicht geeignet über den Erfolg des Aufsaugens von Einzelfischen zu entscheiden. Eine weitere Möglichkeit der Überprüfung des Saugprozesses ist die visuelle Prüfung der Kammer nach dem Pipettieren. Der Vorteil hierbei ist, dass die Größe direkt ermittelt wird, die die Erfolgsquote bestimmt, also ob die Kammer richtig befüllt ist oder nicht. Eine solche visuelle Prüfung ist mit der bereits vorhandenen Kamera schwierig auf Grund diverser Reflexionserscheinungen in den transparenten Mikrotiterplatten, die meist auch runde Kammerböden haben. Eine entsprechende Beleuchtung der Mikrotiterplatte müsste ergänzt werden, damit eine Bilderkennung zuverlässige Informationen bringt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Lösung mit einem Pipettiersensor in direkter Nähe zur Pipettierspitze umgesetzt. Der Sensor muss soweit von der Pipettierspitze entfernt sein, dass sie noch in die Petrischale und die Mikrotiterplatte eingetaucht werden kann, ohne dass der Sensor dagegen stößt. Gleichzeitig muss er hinreichend nah an der Spitze sein, um den aufgesaugten Inhalt prüfen zu können. Im Rahmen der Arbeit wurde in [123] hierzu ein solcher Sensor speziell für die Anforderungen des Fischsortierers entwickelt. Zur Erkennung der aufgesaugten Fische im Schlauch wurde ein optisches Messprinzip gewählt. Resistive und kapazitive Messprinzipien eignen sich weniger für die Erkennung eines transparenten Körpers in einer bewegten Flüssigkeit. Durch ihre gegenüber Wasser unterschiedliche optische Dichte können die Fische mittels Intensitätsmessung im Wasser detektiert werden. Ähnlich dem Funktionsprinzip einer Lichtschranke durchleuchtet eine LED den transparenten Schlauch, das darin befindliche Medium (Flüssigkeit oder Luft) und eventuelle Fische im Schlauch. Mittels einer gegenüber der LED angebrachten Photodiode kann die Intensität des transmittierten Lichts durch die dazu proportionale Spannung an der Photodiode gemessen werden. Anhand des gemessenen Signals kann zwischen Luft, Wasser und Fisch unterschieden werden. Der Schlauch wirkt für den Strahlendurchgang je nach Medium, das sich darin befindet, als Sammellinse oder als Streulinse (siehe [123]). Mit Luft wirkt er als Streulinse, wodurch ein niedriger Signalpegel an der Photodiode gemessen werden kann. Mit Flüssigkeit wirkt er als Sammellinse, wodurch mehr Licht zur Pho-

todiode gelenkt wird und ein hoher Signalpegel entsteht. Die Präsenz einer Larve in der Messstrecke führt aufgrund von deren höheren optischen Dichte zu einer Verringerung der Intensität und damit zu einem Pegel zwischen Wasser und Luft. Die verschiedenen Messpegel sowie die als Peak im Signal erkennbaren Fischeier sind in Abbildung 3.6 zu sehen. Im Teil A ist die Messstrecke mit LED, Schlauch, Fischei im Wasser und Photodiode zu sehen. In Teil B ist das Sensorsignal dargestellt. Zu erkennen ist der niedrige Pegel von Luft, der hohe Pegel von Wasser und die beiden Peaks für die Fischeier. Weiter ist zu erkennen, dass ein koaguliertes Fischei (links) einen tieferen Peak erzeugt, als lebendige. Daher können mit dem Sensor lebende und koagulierte Fischeier unterschieden werden.

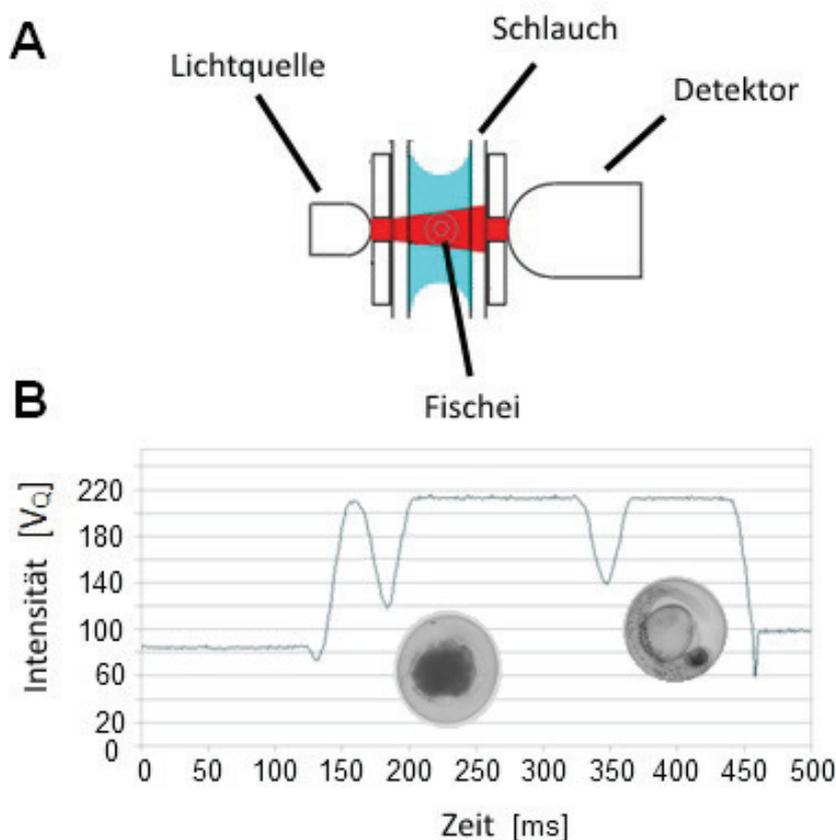


Abb. 3.6.: Signalcharakteristik Schlauchsensor: A= Aufbau der Messstrecke, B= Sensorsignal mit Pegeln für Luft, Wasser, lebendiges und koaguliertes Fischei (modifiziert nach [123])

Nach dem Aufsaugen des Fisches befindet er sich noch unterhalb der Messstrecke, da in die freie Länge der Pipettierspitze (Innendurchmesser $d_i = 2\text{mm}$) von 13 mm ca. $40\ \mu\text{l}$ passen. Nachdem die Pipettierspitze aus dem Wasser gehoben wurde, wird die aufgenommene Flüssigkeitssäule durch die Messstrecke gesaugt. Sie bewegt sich mit einer Sauggeschwindigkeit von 18 mm pro Sekunde und wird dabei abgetastet mit einer Frequenz von 1000 Hz. Es werden beim Durchsaugen der Fluidsäule 1000 Messpunkte aufgenommen.

Beim Aufsaugen von Fischeiern ist besonders zu beachten, dass sie bei Bewegung der Flüs-

sigkeitssäule im Schlauch an der in Bewegungsrichtung hinteren Phasengrenze zwischen Wasser und Luft hängen. Eine Erkennung an der Phasengrenze ist sehr schwierig, da der zu erkennende Pegel des Fisches zwischen dem von Wasser und Luft liegt. Um das Ei zum Zeitpunkt der Messung in die Mitte der Fluidsäule zu bringen, wird die Säule einmal in Pump- und einmal in Saugrichtung bewegt. Die Fluidsäule befindet sich danach wieder an der Ausgangsposition unterhalb der Messstrecke, das Ei jedoch konnte aufgrund seiner Trägheit der Bewegung nicht vollständig folgen und befindet sich noch mittig in der Säule. Beim nachfolgenden Durchsaugen durch die Messstrecke kann das Ei damit einfach detektiert werden, da es nun Abstand zu den Phasengrenzen hat.

In [123] wurde zur Realisierung der optischen Messstrecke ein Sensor entwickelt. Für den Sensoraufbau wurde ein Mikrokontroller gewählt, der die Messwerte aufnimmt, eine Analog/Digitalwandlung durchführt und die Werte an den PC senden kann. Zur Messung der Spannung an der Photodiode ist eine Verstärkerschaltung mit einem Transimpedanzwandler nötig. Die verstärkten analogen Spannungswerte werden dann an den Mikrokontroller weitergeleitet. Der Mikrokontroller wandelt die analogen in digitale Werte um. Die Wandlung des Signals in einem Bereich von 0 bis 3,3 Volt wird mit 8 Bit vorgenommen. Dadurch ergeben sich 256 Quantisierungsstufen, die je $12,89 \cdot 10^{-3}$ Volt entsprechen. Die digitalen Werte werden über eine UART IC über die serielle Schnittstelle an den PC geschickt. Da im Grundroboter als Versorgungsspannung 24 V vorliegen, muss für den Betrieb der LED und des Mikrokontrollers eine Spannungswandlung vorgenommen werden. Hierzu wird ein Step-Down Wandler aufgebaut. Zur flexibleren Gestaltung des Sensorgehäuses an der Pipettenspitze wird die Platine von der Photodiode und der LED getrennt. Die Platine wird auf dem Wagen der y-Achse befestigt. Die LED und die Photodiode, die in der Nähe der Pipettierspitze in einem zweiten Gehäuse angebracht werden, werden über Kabel angeschlossen. Die in [123] entwickelte Platine mit den genannten Komponenten ist in Abbildung 3.7 zu sehen. Links im Bild ist der Einbauort des Sensors an der Pipettierspitze sowie der Einbauort der Sensorplatine auf dem Wagen der y-Achse zu sehen. Rechts im Bild sind Detailaufnahmen des Sensors und der Platine zu sehen. Die LED (L) und die Photodiode (PD) befinden sich in einem Gehäuse zusammen mit dem Endschalter (ES), der für die Referenzfahrt der z-Achse genutzt wird. Die Sensorplatine (SP) ist im unteren Teil des Bildes ohne Gehäuse zu sehen.

3.5. Clustervereinzelung

Die Bildung von Fischgruppen stellt eine Schwierigkeit für den Sortierprozess dar. Ziel des Sortierprozesses ist es, in jeder Kammer genau einen Fisch zu platzieren. Um das zu gewährleisten, müssen die Fische einzeln in den Schlauch gesaugt werden. Wird ein Fisch aufgesaugt, dessen Nachbar zu nah daneben liegt, so besteht die Gefahr, zwei Fische auf einmal aufzusaugen (siehe Abbildung 3.8). Die Aufnahme von mehr als einem Fisch kann durch den Schlauchsensor

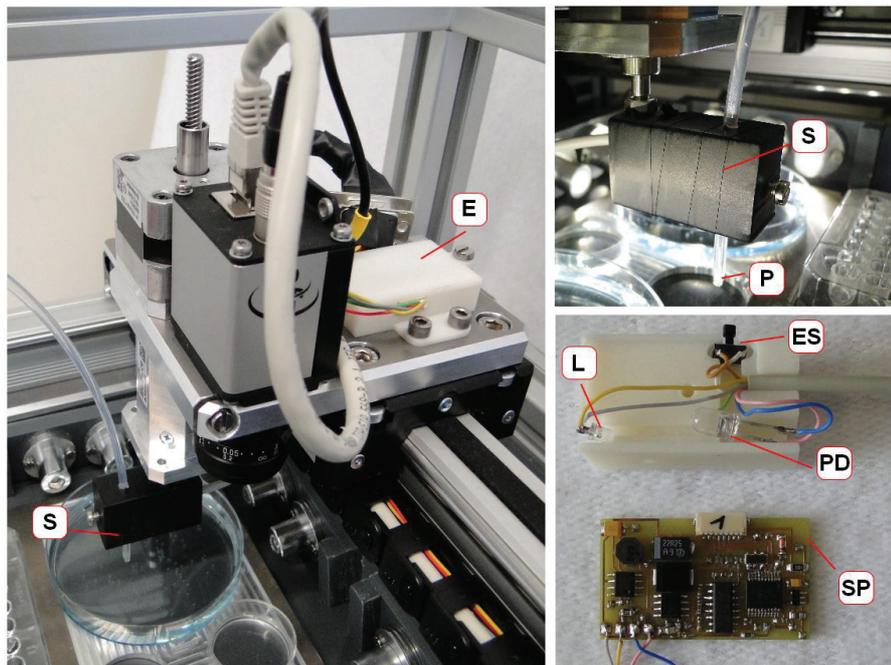


Abb. 3.7.: Hardware des entwickelten Schlauchsensors: links: Position im Sortierer S= Sensor, E= Elektronik; rechts oben: P= Pipettierspitze, S= Sensor; rechts unten: Sensorgehäuse und Platine: L= LED, PD= Photodiode, ES= Endschalter, SP= Sensorplatine

erkannt werden. Es kommt also nicht zu einer falschen Befüllung der Mikrotiterplatte, jedoch kostet das Zurückpipettieren und das erneute Aufnehmen eines Fisches Zeit. Für einen möglichst schnellen Sortierprozess ist daher anzustreben, so selten wie möglich mehrere Fische auf einmal aufzusaugen. Die Wahrscheinlichkeit einen einzelnen Fisch aufzusaugen, kann dadurch gesteigert werden, dass nach der Erkennung der Fische der Fisch identifiziert wird, der den größten Abstand zu seinen Nachbarn hat. Bei ihm ist die Gefahr am geringsten, versehentlich einen Nachbarn mit aufzusaugen.

Für Fische, die in Gruppen zu mehreren eng zusammen liegen, wird hier der Begriff Cluster eingeführt. Fischcluster können von der Bildverarbeitung erkannt werden und werden von Einzelfischen unterschieden. In Abbildung 3.8 ist eine Aufnahme des Fischsortierers von einer Petrischale zu sehen. Die Aufnahme zeigt sowohl einzeln liegende Fische (grüne Kreise) als auch Fischcluster (rote Rechtecke). Die Anzahl der Fischcluster ist über den Sortierprozess nicht konstant. Durch das Eintauchen der Pipettierspitze in die Petrischale entstehen kleine Wellen. Beim Zurückpipettieren eines falschen Inhalts trifft die Flüssigkeit in Tropfenform auf der Wasseroberfläche auf und erzeugt ebenfalls Wellen. Durch die Wellen werden die Positionen der Fische, die um den aufzunehmenden liegen, leicht verändert. Nach einer Vielzahl solcher kleinen Wellenereignisse sind Clusterbildungen zu erkennen. Bei Sortierbeginn sollen genügend einzelne Fische vorhanden sein. Mit fortschreitendem Prozess entstehen aber mehr und mehr Cluster. Das ist aus zwei Gründen nachteilig. Zum Einen gibt es weniger Fische, die

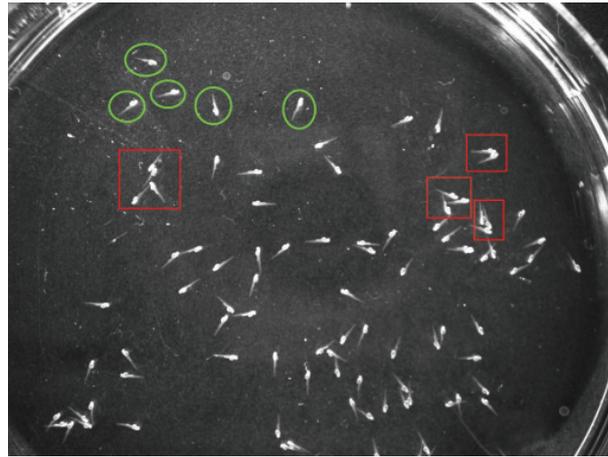


Abb. 3.8.: Erklärung Clusterproblematik anhand eines mit dem Fischsortierer aufgenommenen Bildes, grüne Kreise: Einzelfische mit genügendem Abstand zu ihren Nachbarn, rote Rechtecke: Fischcluster

genügenden Abstand zu ihren Nachbarn haben und zum Anderen werden weniger Fische als Einzelfische erkannt, da sie als Cluster erkannt werden. Es ist daher nötig, eine Möglichkeit vorzusehen, um Cluster aktiv vereinzeln zu können.

Um der Clusterproblematik Rechnung zu tragen, wurden zwei Konzepte zur Vereinzelung von Fischclustern entwickelt. In eigenen Versuchen wurde ermittelt, dass das Auftreffen von Tropfen auf der Wasseroberfläche direkt über einem Cluster dazu führt, dass die von der Auftreffstelle kreisförmig ausgehenden Wellen die Fische des Clusters vom Zentrum des Clusters wegbewegen. Das Fallenlassen von Tropfen direkt über den Clustern kann mit der bereits vorhandenen Hardware leicht umgesetzt werden. Hierfür muss eine bestimmte Menge Wasser in der Petrischale aufgesaugt werden. Das Wasser kann dann als Tropfen auf die Cluster abgeworfen werden. Zu beachten ist hierbei, dass die Tropfen aufgrund der Schwerkraft erst bei einer bestimmten Größe zuverlässig abfallen. Daher wird beim Aufsaugen ein Vielfaches der Mindesttropfenmenge aufgesaugt. Die Ermittlung der nötigen Tropfenanzahl und damit der aufzusaugenden Menge, je nach Anzahl der Cluster, wird von der Software erledigt. Die beschriebene Funktionalität wurde implementiert und in diversen Versuchen getestet. Da für das Tropfenfallenlassen die Pipettierspitze eingesetzt wird, kann der Prozess nicht parallel zum Sortierprozess passieren. Vor dem Aufsaugen der nötigen Fluidmenge müssen erst einmal alle sich im Schlauch befindlichen Fische aus dem Schlauch pipettiert werden. Die genannten Aspekte machen die Vereinzelungsmethode langsam. Das Aufsaugen der Flüssigkeit und das Vereinzeln von sechs Clustern mit je drei Tropfen dauert ca. 1 min.

Eine weitere Möglichkeit der Verteilung der Fische in der Petrischale sind Strömungen durch Schwenken der Petrischale. Die Petrischale kann linear oder kreisförmig bewegt werden. Verschiedene Bewegungen können auch kombiniert werden. Die verschiedenen Strömungen müssen zur Untersuchung sichtbar gemacht werden. Strömungen können durch Zugabe von Par-

tikeln, die sich schlupffrei mit der Flüssigkeit bewegen, sichtbar gemacht werden [73]. Kennzeichnend für Strömungen sind Stromlinien, Streichlinien und Bahnlinien. Für stationäre Strömungen sind sie identisch [77]. Stromlinien zeigen das Momentanbild einer Strömung durch Verbindung aller Teilchen, die eine Stelle passiert haben. Sie werden gebildet aus Kurven, die von Geschwindigkeitsvektoren tangiert werden. Sie können nur durch viele in die Strömung eingebrachte Teilchen oder Einbringung von Rauchfäden in einer Kurzaufnahme sichtbar gemacht werden. Zu diesem Zweck können die Zebrafischlarven selbst eingesetzt werden. Die länglichen Körper der ca. 72 h alten Larven richten sich entlang den Strömungslinien aus, sobald die Strömung am Abklingen ist und der Dottersack Kontakt mit dem Petrischalenboden bekommt. Bei schwacher Strömung wird die Reibung zwischen Dotter und Boden nicht mehr überwunden und der Dotter bleibt ortsfest. Um den Fixpunkt kann sich der längliche Körper der Larve jedoch drehen und sich somit entlang der Stromlinie ausrichten. Die Gestalt der Strömung kann somit kurz vor deren Ende erkannt werden.

3.5.1. Strömungsformen und ihr Einfluss auf die Verteilung der Fische

Im Rahmen der Arbeit wurden verschiedene, mögliche Strömungen in der Petrischale auf ihre Eignung untersucht. Dabei wurden translatorische und rotatorische Strömungen sowie die Überlagerung verschiedener Strömungsrichtungen und -typen untersucht. Da die Fische in der Petrischale vereinzelt werden sollen, werden zur direkten Nutzbarkeit der Ergebnisse die Strömungsuntersuchungen in Petrischalen gemacht.

Als erstes wurden lineare Strömungen untersucht. Die Petrischale wurde dazu einige Zentimeter linear bewegt und ohne Verzug in entgegengesetzter Richtung zum Ausgangspunkt gebracht. Die entstehende lineare Wellenfront bewegt sich in Richtung der Petrischalenbewegung. Die Fische werden dabei mitbewegt. Durch das Auftreffen auf den kreisförmigen Rand wird die Welle außen früher reflektiert als in der Mitte der Schale. Die reflektierte Welle zeigt daher ein parabolisches Profil. Beim Auftreffen auf die gegenüberliegende Wand bilden sich zwei Wirbel aus. Durch Fluidreibung werden die Wirbel verlangsamt und bei deren Verschwinden bleiben die Fische an den Stellen der Wirbel am Rand der Petrischale liegen. Eine Vereinzlung der Fische ist somit nicht eingetreten.

Weiter wurden kreisförmige Strömungen untersucht. Die Petrischale wurde auf einer Kreisbahn um einen Drehpunkt außerhalb der Petrischale bewegt. Die Flüssigkeit und mit ihr die Fische wurden in eine kreisförmige Strömung gezwungen. Durch Reibungseinflüsse klingt auch die kreisförmige Strömung ab. Die Fischlarven sammeln sich hierbei in der Mitte der Petrischale. Auch somit konnte keine Vereinzlung der Fische erreicht werden. Die charakteristischen Strömungen sind in Abbildung 3.9 zu sehen. Das Umrührergebnis ist in Abbildung 3.10 zu sehen.

Auch Überlagerungen von Strömungen wurden getestet. Wird die Petrischale zuerst linear in

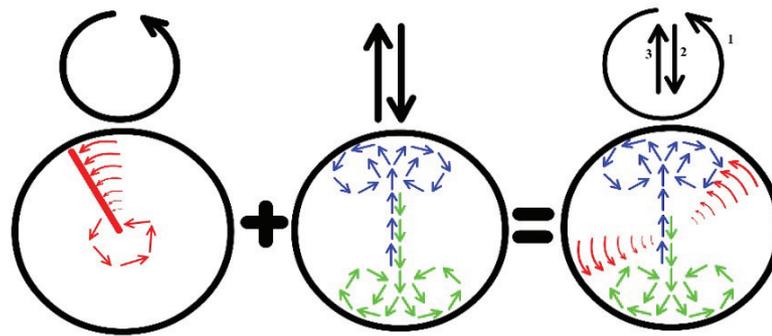


Abb. 3.9.: Strömungen einer kreisförmigen Bewegung (links), einer linearen Bewegung (Mitte) und deren Überlagerung (rechts) (aus [15])



Abb. 3.10.: Umrührerergebnisse nach Kreisbewegung (links), nach Linearbewegung (Mitte) sowie nach Überlagerung von Linear- und Kreisbewegung (rechts)

eine Richtung bewegt und darauf direkt in eine dazu senkrechte Bewegungsrichtung der Ebene, so überlagern sich die entstehenden Strömungen. Die Versuche haben gezeigt, dass damit acht Wirbel am Rand der Petrischale entstehen. Je vier pro Bewegungsrichtung. Auch die acht Wirbel führten zu Fischansammlungen im Randbereich. Die Überlagerung zweier linearer Bewegungen ist also auch nicht erfolgversprechend.

Eine Überlagerung von linearer und kreisförmiger Bewegung wurde ebenfalls untersucht (siehe Abbildung 3.9). Zuerst wird die Petrischale im Kreis bewegt. Nach einer Pause, in der sich die kreisförmige Welle ausbreiten kann, wurde die Petrischale linear hin und her bewegt. Die zusätzliche parabolische Strömung und die noch andauernde kreisförmige Strömung treffen aufeinander und es entstehen turbulente Strömungen. Durch das Aufeinandertreffen kommt es nicht zu einem Abklingen der Strömungen wie bisher beschrieben. Beim Aufeinandertreffen wird ein Teil der kinetischen Energie zur Richtungsumkehr der Flüssigkeit umgesetzt. Bei richtiger Wahl der Parameter treiben die Fische ausgehend von der Treffpunktposition kurz auseinander und bleiben schnell liegen. Durch die entstehenden turbulenten Strömungen und das Ausbleiben des Ausklingsens der linearen und kreisförmigen Strömungen sammeln sich die Fische nicht in neuen Gruppen, sondern bleiben gut verteilt liegen. Eine Überlagerung aus kreisförmiger Bewegung und anschließender linearer Bewegung ist also zum Vereinzeln der Fische

Bewertungspunkte	allein liegende Fische
1	0 - 25%
2	> 25%
3	> 50%
4	> 75%
5	100%

Tab. 3.1.: Punkteverteilung zur Bewertung der Verteilungstests (nach [15])

in Petrischalen geeignet. Der Vergleich der Umrührerergebnisse ist in Abbildung 3.10 zu sehen.

3.5.2. Entwicklung einer Mechanik zur Vereinzelung von Fischclustern

In [15] wurde eine Mechanik zur Vereinzelung der Cluster entwickelt. Hierbei wurde geprüft, welche Strömungen in einer Petrischale dazu genutzt werden können, um Fische zu vereinzeln. Weiter wurden verschiedene Konzepte erarbeitet, wie die entsprechenden Strömungen mechanisch erzeugt werden können. Dafür wurde ein Mechanismus entwickelt, der die Petrischale in einer bestimmten Bewegungsbahn schwenken kann. Die geeignetste Strömung ist eine Überlagerung aus linearer Welle und Kreiswelle. Beim Aufeinandertreffen der beiden Wellen werden, bei richtiger Wahl der Parameter, die Fische bestmöglich zerstreut (siehe Bild 3.10, rechts). Die Wellenenergien werden dabei fast komplett absorbiert, sodass die Fische nicht durch Trägheit wieder in Gruppen zusammen finden, wie es beim Abklingen sowohl linearer als auch kreisförmiger Wellen beobachtet wurde.

In [15] wurden außerdem Testreihen mit Variierung der bestimmenden Parameter Radius der Kreisbewegung, Länge der Linearbewegung, Geschwindigkeit und Füllhöhe durchgeführt. Die Tests wurden mit Petrischalen gemacht, in denen sich Fischlarven befanden. Die Fische wurden in der Mitte der Schale gesammelt und dann wurde das Bewegungsprofil mit der Hand abgefahren. Zur Bewertung der Verteilungsergebnisse wurde ein Bewertungssystem mit fünf Stufen festgelegt. Die Punkteverteilung zur Bewertung ist in Tabelle 3.1 zu sehen.

Aufgrund der Ungenauigkeiten in der Bewegung durch die manuelle Führung konnten die geometrischen Parameter nur in etwa ermittelt werden. Die Linearbewegung sollte einen Hub von 24 bis 27 mm darstellen. Die in den Tests manuell geführten Kreisbewegungen können als Ellipse beschrieben werden, wobei sich die Länge der Achsen zwischen 21 und 35 mm bewegt hat. Die Kreis- sowie die Linearbewegung sollten je 1 bis 3 Sekunden dauern.

Die ermittelten Parameter wurden technisch umgesetzt und eine Mechanik zur Darstellung der Bewegung wurde entwickelt. Dabei wurde eine Lösung angestrebt, die so wenig wie möglich Aktoren hat, um die Anzahl der nötigen Steuergeräte im Fischsortierer niedrig zu halten. Ein Schrittmotor wurde als Antrieb gewählt. Um nacheinander Linear- und Kreisbewegung aus der reinen Rotation der Motorwelle erzielen zu können, wird eine Umschaltung der Bewegungsform sowie eine geeignete Mechanik benötigt. Aus einer Auswahl von sieben möglichen mecha-

nischen Konzepten wurde in [15] eine Kombination gewählt, die mit nur einem Schrittmotor als Aktor funktioniert. In Abbildung 3.11 sind die beiden Mechanikkonzepte zur Realisierung der beiden Bewegungen dargestellt. Links oben ist ein Parallelkurbelmechanismus zu sehen. Das mittlere der drei Zahnräder wird angetrieben. Dadurch drehen sich die beiden äußeren Zahnräder, wodurch der quer montierte Stab im Kreis bewegt wird. Da der Stab mit beiden Zahnrädern verbunden ist, bleibt er immer in horizontaler Ausrichtung. Rechts oben ist ein Mechanismus aus zwei Linearschienen gezeigt. Die vertikale Schiene bleibt in Ruhe. Die horizontale Schiene bewegt sich auf einer Kreisbahn. Der Gleitkörper, der beide Schienen miteinander verbindet, macht durch die geometrischen Einschränkungen eine Linearbewegung in vertikaler Richtung. Mit dem beschriebenen Mechanismus kann also eine Kreisbewegung in eine Linearbewegung umgewandelt werden. Unten im Bild ist das Konzept für den in [15] entwickelten Mechanismus zu sehen. Zentrales Element ist hierbei der Gleitkörper. Er stellt den Mittelpunkt der Petrischale dar. Der Parallelkurbelmechanismus rechts bewegt den Stab1 in einer Kreisbewegung. Nach einem vollen Kreis wird der Weg für den Gleitkörper versperrt, sodass er in die Linearführung 2 gezwungen wird. Bei einer weiteren Kreisbewegung des Stab1 bewegt sich der Gleitkörper entlang der Linearführung 2 rein linear. Bei der ersten Umdrehung des Antriebs macht die Petrischale eine Kreisbewegung. Zum Ende der Bewegung wird ein Sperrmechanismus aktiviert, der zwischen Linear- und Kreisbewegung umschaltet. Bei der zweiten Umdrehung des Motors wird die Petrischale linear bewegt.

Der in der Arbeit [15] entwickelte Mechanismus ist in Abbildung 3.12 zu sehen. Ein auf der Motorwelle befestigtes Zahnrad treibt zwei Zahnräder (Z1) und (Z2) an, welche miteinander durch einen Querstab (QS) gekoppelt sind. Zur Realisierung der Exzentrizität wird der Querstab über je einen Abstandshalter zum Zahnrad angelenkt. Die Abstandshalter ähneln den Zeigern einer Uhr und deren Länge bestimmt die Exzentrizität. Jeder Punkt des Querstabes macht damit bei Drehung der Motorwelle eine Kreisbewegung. Die Kreisbewegung lässt sich mechanisch aufteilen in zwei translatorische, orthogonale Achsen. Dieser Fakt wurde ausgenutzt, indem ein mechanischer, linearer Anschlag (L) ergänzt wurde, der eine translatorische Achse vorgibt. Durch den Anschlag wird die Bewegung in einer der beiden translatorischen Achsen gesperrt. Gleichzeitig wird in den Querstab (QS) ein Gleitkörper (P) ergänzt, sodass der Gleitkörper sich entlang des Querstabes (QS) verschieben kann. Am Gleitkörper (P) wird die Petrischale befestigt. Ohne den mechanischen Anschlag wird der Gleitkörper (P) durch die Feder (F) mit samt der Petrischale ans äußere Ende des Querstabes (QS) gedrückt. Die Petrischale macht dadurch bei Drehung der Motorwelle eine Kreisbewegung. Nach der Kreisbewegung stößt eine Verlängerung des Gleitkörpers (P) unten gegen den mechanischen Anschlag, die Klapptür (K), und verschließt sie. Bei einer erneuten Drehung der Motorwelle bewegt sich der Querstab (QS) wie gehabt in einer Kreisbewegung. Der Gleitkörper (P) wird an einer Bewegung in x-Richtung gehindert und bleibt im Gegensatz zum bewegten Querstab (QS) in der x-Koordinate in Ruhe.

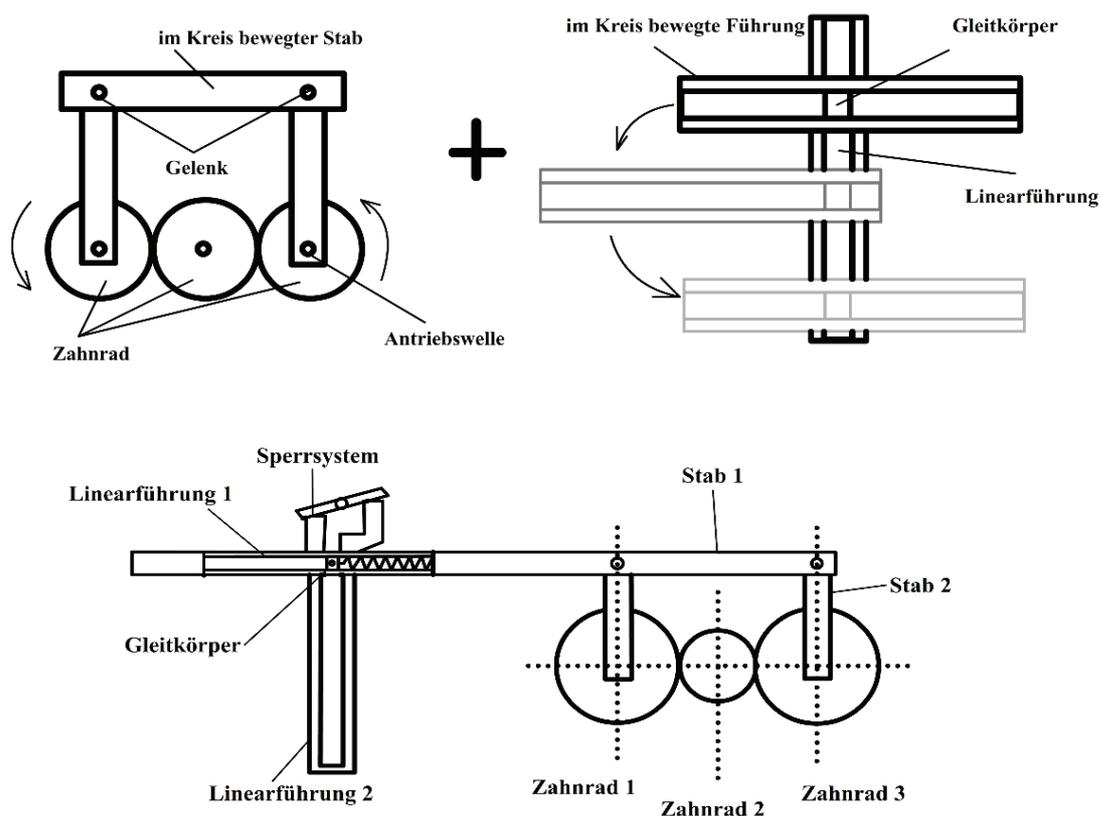


Abb. 3.11.: Mechanismus zur Clustervereinzelung nach [15]; oben: mechanische Grundkonzepte für Kreisbewegung (links) und Linearbewegung aus Kreisbewegung (rechts); unten: Prinzipskizze der kombinierten Mechanik

Durch die Relativbewegung zwischen Querstab (QS) und Gleitkörper (P) wird die Feder (F) eingedrückt. Die y-Komponente der Kreisbewegung wird wie gehabt zugelassen und die Petrischale wird linear entlang der mechanischen Führung (L) bewegt. Nach einem definierten Weg wird die Drehrichtung des Motors umgekehrt und die Petrischale wird wieder in die Ausgangsposition verfahren. Die Details zum Sperrmechanismus zum Umschalten zwischen Linear- und Kreisbewegung werden im Folgenden genauer beschrieben.

Zur Realisierung der Umschaltung zwischen Kreisbewegung und Linearbewegung wurde in [15] ein Selbstsperrmechanismus entwickelt. Der oberste Teil des linearen Anschlags (L), an den der Bolzen des Gleitkörpers nach Beginn der Kreisbewegung als erstes stößt, wird als Klapptür (K) ausgeführt. Durch eine Schenkelfeder (SF) wird die Klapptür im Normalzustand aufgedrückt. Bei Beginn der Kreisbewegung ist damit der Weg frei, da der oberste Teil der Linearführung (L) weggeklappt ist. Nach einer vollen Umdrehung stößt der Bolzen des Gleitkörpers (P) gegen die offene Klapptür (K) und schließt sie automatisch. Bei weiterer Drehung des Motors wird der Bolzen in die lineare Bewegung gezwungen, die Feder (F) im Querstab wird

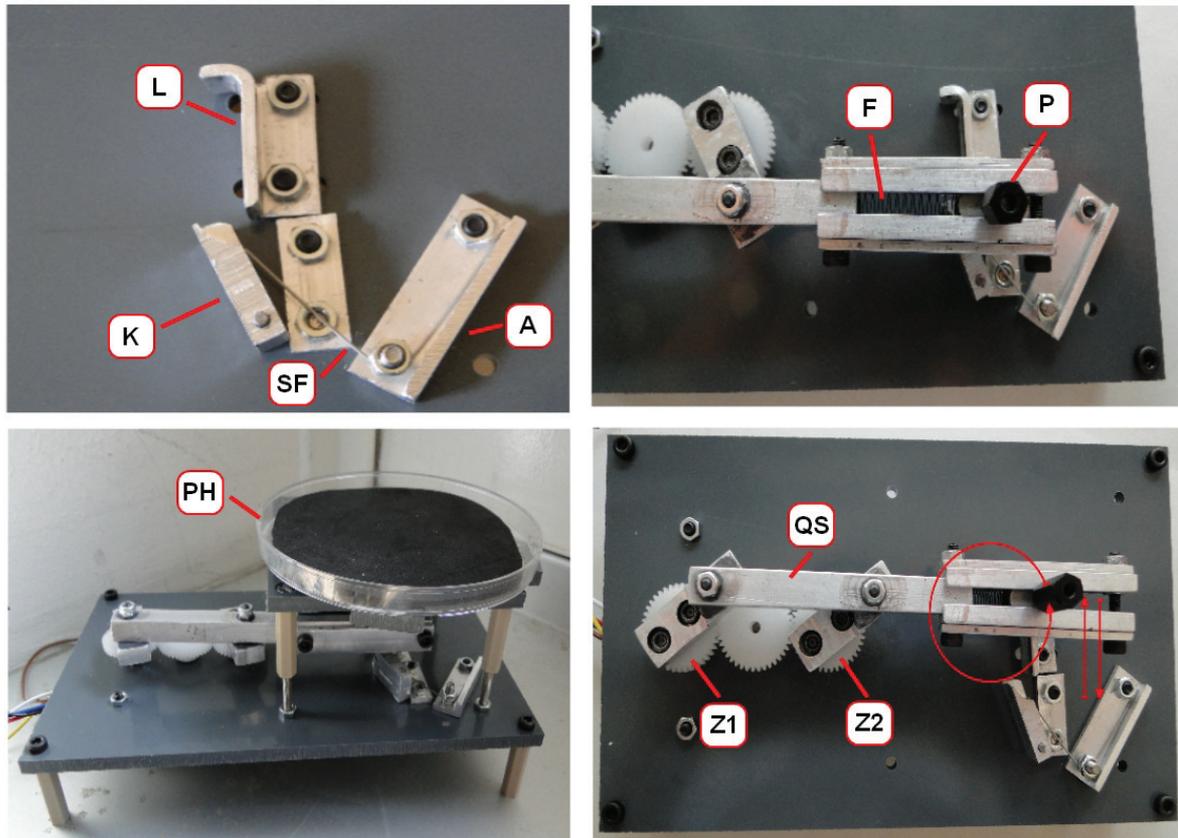


Abb. 3.12.: Hardware zur Clustervereinzelung nach [15]; oben links: Sperrmechanismus, oben rechts: Petrischalen Halter mit Gleitkörper und Feder, unten links: kompletter Mechanismus, unten rechts: Verdeutlichung der Bewegungsbahnen

gestaucht und die Petrischale bewegt sich in y-Richtung. Sobald der Bolzen keinen Druck mehr auf die Klapptür ausübt und entlang des unteren Teils der Führung (L) bewegt wird, öffnet die Schenkelfeder (SF) die Klapptür (K) erneut. Nach der Bewegungsumkehr und nach Erreichen der obersten Position ist damit wieder der Weg für die nächste Kreisbewegung frei. Somit wird der Wechsel zwischen Kreis- und Linearbewegung durch die Kreisbewegung selbst eingeleitet. Die Klapptür sperrt automatisch den Weg und leitet eine Linearbewegung ein. Kreisbewegung und Linearbewegung finden immer abwechselnd statt.

Für den entwickelten Mechanismus wurde in [15] das nötige Motormoment berechnet und ein geeigneter Schrittmotor gewählt. Zur Berechnung wurden die verschiedenen Teile der Bewegung einzeln betrachtet. Die Kreisbewegung kann in drei Teilen betrachtet werden. Zu Beginn liegt eine beschleunigte Kreisbewegung vor. Nach Erreichen der Drehgeschwindigkeit liegt eine Kreisbewegung mit konstanter Geschwindigkeit vor. Zum Ende wirkt eine negative Beschleunigung zur Reduktion der Drehgeschwindigkeit bis zum Stillstand. Bei der konstanten Fahrt treten keine Trägheitskräfte auf und nur die Reibungswiderstände wirken. Am Ende der Bewegung drückt der Bolzen des Gleitkörpers unter der Petrischale den Sperrmechanismus zu.

Die wirkende Federkraft erhöht das nötige Motormoment.

Die lineare Bewegung der Petrischale ist eine Kreisbewegung für den Querstab wie schon vorher. Der Anschlag unterbindet gleichzeitig die Bewegung in x-Richtung, wodurch die Translation erzeugt wird. Gleichzeitig wird die Feder zusammengedrückt. Die Federkraft steigt dem Motordrehmoment entgegen bis zum Winkel π an. Danach leistet die Feder einen Kraftbeitrag in Richtung des Motordrehmoments.

Als Erfahrungswert aus Dauertests hat sich gezeigt, dass das Vereinzeln je nach vorgelegter Anzahl an Fischen in der Petrischale beim Befüllen einer 96er Platte Null bis dreimal vorkommt. Beim Befüllen einer 384er Platte tritt es wesentlich häufiger auf, da mehr Fische zu Beginn vorgehalten werden müssen. Mit dem vorgestellten Mechanismus kann der Vereinzlungsprozess parallel zum Sortierprozess laufen. Ein Vereinzlungsdurchlauf dauert ca. 10 sek. Der Vorgang kann gestartet werden, wenn die aufgenommenen Fische gerade in die well plate pipettiert werden. Dadurch entsteht keine Zeitverzögerung und beim nächsten Foto zur Fischdetektion sind trotzdem wieder viele einzelne Fische zu erkennen. Der entwickelte Umrührmechanismus reduziert daher die für den Sortiervorgang nötige Zeit gegenüber der Verwendung der Technik des Tropfenfallenlassens.

3.6. Software des Fischsortierers

Um den bisher von Biologen manuell durchgeführten Fischsortierprozess automatisch durchzuführen, ist neben entsprechender Hardware auch Software nötig. Zum Einen wird ein Algorithmus zur Ansteuerung der Hardware benötigt. Der Algorithmus steuert den Dreiachsmechanismus so, dass die Pipettierspitze und die Kamera präzise positioniert werden und steuert auch die Pumpe. Zum Anderen ist die Bildverarbeitung ein weiteres zentrales Element. Die Bildverarbeitung zur Erkennung der Fische in der Petrischale ist für den Prozess essenziell, weil sie die Informationsgewinnung aus dem Bildmaterial gewährleistet. Weiter muss die Kommunikation mit dem Pipettiersensor und die Auswertung des Signals umgesetzt werden. Hierfür wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Steuerungsalgorithmus konzipiert und implementiert, der die genannten Einzelkomponenten abbildet. Der realisierte Algorithmus ist in der Lage, auf verschiedene Ereignisse während des Sortierprozesses zu reagieren. Der Grundablauf des Fischeaufnehmens ist analog zu Bild 3.1 wie folgt:

1. Kamera über der Petrischale positionieren und Bild aufnehmen
2. Bildauswertung und Berechnung der Fischkoordinaten
3. Positionieren der Pipettierspitze über der ermittelten Position
4. Aufsaugen von Flüssigkeit durch Aktivieren der Pumpe

5. Prüfung des aufgesaugten Inhalts durch den Schlauchsensor
6. Fisch in die Mikrotiterplatte bringen; falschen Inhalt zurückpipettieren.

Abweichend von dem einzelnen Aufsaugen der Fische wurde die Steuerung des Fischsortierers so flexibel umgesetzt, dass wahlweise auch das Aufsaugen von mehreren Fischen in den Schlauch möglich ist. Die Fische im Schlauch werden dann zu einem Zeitpunkt zur Mikrotiterplatte gebracht und wieder nacheinander ausgegeben. Das Einsaugen von mehreren Fischeiern nacheinander spart Zeit, da die nötigen Verfahrenswege reduziert werden. Eine weitere Möglichkeit zur Reduktion der Sortierdauer durch die Software ist das Aufnehmen mehrerer Fische anhand eines Fotos. Tests im Rahmen der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass Fischeier und betäubte Fischlarven ihre Position durch das Aufnehmen weniger Fische nacheinander kaum ändern. Es ist also möglich, nach der Aufnahme eines Fotos bis zu acht Fische nacheinander aufzunehmen. Bei mehr als acht Fischen wird die Wahrscheinlichkeit zu hoch, dass sich die Koordinaten verändert haben. Die Möglichkeit wird als Option für den Nutzer in das Benutzerinterface übernommen. Für jeden Sortierprozess kann somit gewählt werden, wie viele Fische anhand eines Bildes aufgenommen werden sollen. Zur Beschreibung des Sortieralgorithmus wird zur Vereinfachung im Weiteren vom einzelnen Bildaufnahmen und Aufsaugen der Fische ausgegangen.

Zur Steuerung des Fischsortierers wurde ein Regelungsalgorithmus entworfen und in Lab-View implementiert. Der Algorithmus stellt eine automatische, ereignisbasierte Ablaufsteuerung dar, d.h. dass mittels Bildverarbeitung und Sensorabfragen bestimmte Situationen erkannt werden können und als Reaktion nachfolgend verschiedene Aktionen ausgeführt werden. Die Einzelbausteine des Algorithmus generieren Informationen oder nehmen Fallunterscheidungen vor, um den weiteren Ablauf des Sortierprozesses zu steuern. Außerdem werden die Ausführungsbefehle für mechanische Bewegungen gegeben, die sich aus den Steuerungsgrundbausteinen zusammensetzen, die in Abschnitt 2.3.4 beschrieben wurden. Die für den Fischsortierprozess benötigten Softwareteile sind:

- Bildverarbeitung zur Fischerkennung
- Fallerkennung nach Auswertung der Bildverarbeitung
- Koordinatenberechnung und Fischauswahl
- Fallerkennung nach Auswertung des Pipettiersensors.

Der neue Steuerungsalgorithmus für den Fischsortierer ist in Abbildung 3.13 in Form eines Programmablaufplans dargestellt. Die Details der Einzelfunktionen werden in den folgenden Abschnitten beschrieben. Ein weiteres Softwareelement ist die Dokumentation der Sortierabläufe zu Analysezwecken. Hierfür wurde eine automatische Protokolldatei entwickelt, mit der

die charakteristischen Parameter eines Fischsortierprozesses während des Laufes erfasst und dokumentiert werden. Die Daten können dazu dienen, die Systemperformance zu verbessern, indem Optimierungspotenzial leichter erkannt werden kann. Sie wird nachfolgend ebenfalls kurz beschrieben.

3.6.1. Bildverarbeitung zur Fischerkennung

Die Leistung, die Fische im Bild zu erkennen, indem sie vom Hintergrund unterschieden werden, wird im manuellen Prozess automatisch vom menschlichen Gehirn vollbracht. Dabei wird eine Vielzahl an Informationen aus der optischen Wahrnehmung extrahiert, was den Menschen befähigt, die Pipette gezielt an einen Fisch anzunähern und ihn aufzusaugen. Zur Entwicklung einer Bildverarbeitung, die ebenfalls die Positionen der Fische erkennen kann, müssen Parameter bestimmt werden, die dazu geeignet sind. Zur Detektion der Fischeier und Fischlarven im Bild wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Biosignalanalyse des Instituts für Angewandte Informatik (KIT) ein Bildauswertungsalgorithmus entwickelt. Aufbauend auf Erfahrungen in der Bildverarbeitung für Zebrafischuntersuchungen [3, 29] werden in der Arbeitsgruppe Biosignalanalyse einfache Methoden zur Fischdetektion entworfen. Da sich Fischeier und Fischlarven stark in den Merkmalen unterscheiden, die im Bild erkennbar sind, werden zwei unterschiedliche Fischdetektionsalgorithmen entwickelt. Die entwickelten Algorithmen wurden vom Autor auf die Hardwaredetails des Fischsortierers angepasst und modifiziert. Hierfür wurden Schwellwerte zur Erkennung der Fischkonturen experimentell angenähert, verschiedene Alternativen für Einzeloperationen der Bildverarbeitungskette wurden bewertet, ausgewählt und die charakteristischen Werte für die Unterscheidung zwischen Artefakten und Fischclustern wurden ermittelt. Die technischen Details der digitalen Abbildung der Fische sowie der Bildverarbeitungsmethoden werden im Folgenden beschrieben.

Die Kamera des Fischsortierers liefert 8 Bit Graustufen Bilder mit einer Auflösung von 2560 x 1920 Pixel. Auf den Graustufenbildern ist die Petrischale mit den darin befindlichen Fischen zu sehen. In den Randbereichen des Bildes sind durch Brechungseffekte am Kunststoffrand der Petrischale die Lichtverhältnisse häufig inhomogen. Der Bildausschnitt bei Aufnahme des Bildes wird so gewählt, dass möglichst kein Stück der Petrischale zu erkennen ist. Die Petrischale steht auf einer schwarzen Unterlage, um den Kontrast zwischen den hell angeleuchteten Fischen und dem Hintergrund möglichst groß zu machen.

Zur Trennung der interessierenden Information im Vordergrund und dem Bildhintergrund wird ein Schwellwert (engl. threshold) verwendet. Hierbei wird das Grauwertbild in ein Binärbild umgewandelt. Alle Pixel des Bildes werden anhand des Schwellwertes zu 1 oder 0 gesetzt. Das Schwellwertkriterium ist die Lichtintensität, da die Fische im Bild hell leuchtend zu erkennen sind. Der Hintergrund dagegen ist dunkel. Nach der Umwandlung in das Binärbild ist der Kontrast wesentlich erhöht, da es nur noch weiße und schwarze Pixel gibt.

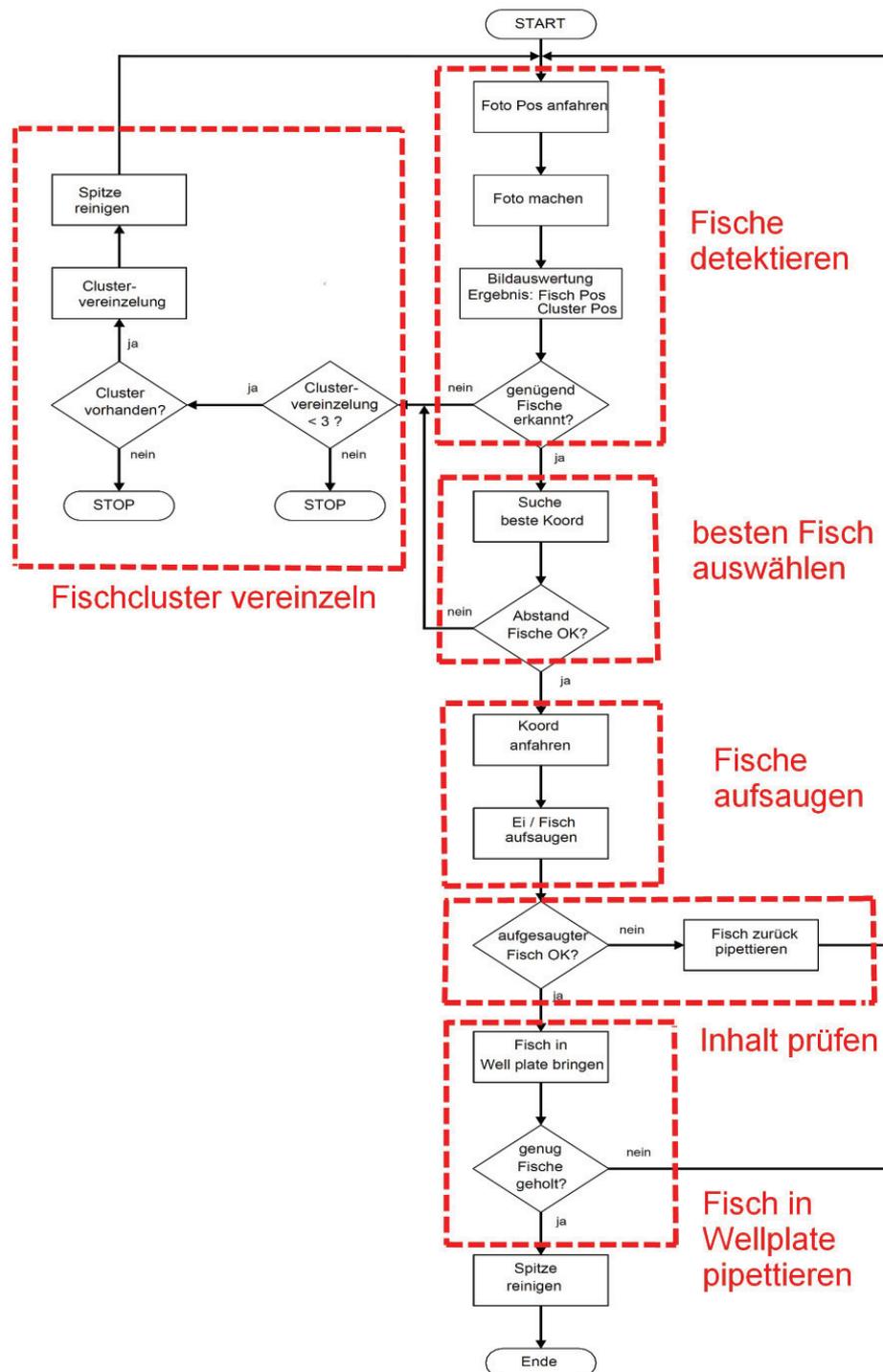


Abb. 3.13.: Entwickelter Programmablaufplan für die Software des Fischsortierers (einzelne Teilfunktionen rot umrandet)

Bei der Schwellwertanwendung werden auch ungewünschte Objekte, die keine Fische sind, noch erkannt, soweit sie ähnliche Helligkeitswerte haben. Mit Hilfe von morphologischen Ope-

ratoren (s. Abs. 2.3.3) werden ungewünschte Objekte entfernt, es findet eine Bereinigung von großen und kleinen Objekten statt. Zum Entfernen gibt es zwei verschiedene Vorgehensweisen. Zum Einen können alle Objekte, die die Kriterien für Fische erfüllen, im Bild verbleiben und alle anderen werden gelöscht. Zum Anderen können alle Objekte, die definitiv keine Fische sind, aus dem Bild entfernt werden. Da nicht alle Kriterien für Fischeier scharf genug gegenüber Artefakten abgegrenzt werden können, werden beide Strategien verfolgt.

Nach der Schwellwertoperation werden alle zu großen und zu kleinen Pixelobjekte, d.h. mit einem Flächeninhalt von 0 bis 600 Pixel und größer als 10000, entfernt. Sie sind wesentlich zu klein oder zu groß und können keine Fische sein. Hierbei muss die Grenze so gewählt werden, dass große Cluster trotzdem noch im Bild verbleiben, da sie eine wichtige Information darstellen. Die Position von Clustern muss bekannt sein, um den Abstand zu ihnen wahren zu können. Das Entfernen kleiner Objekte wird durch die Anwendung morphologischer Operatoren realisiert. Mittels Erosion (s. Abs. 2.3.3) werden Pixelobjekte an ihren Außenkanten verkleinert. Durch mehrere Erosionsvorgänge hintereinander kommt es dazu, dass kleine Objekte komplett ausgelöscht werden. Die Ursprungsgröße der zu erkennenden Fische ist nun aber ebenso geschrumpft. Um die Größe wieder herzustellen, werden in gleicher Anzahl wie Erosionen Dilatationen (s. Abs. 2.3.3) durchgeführt. Dabei werden die Außenkonturen von Pixelobjekten aufgedickt. Dort jedoch, wo ein Objekt vollständig ausgelöscht wurde, entsteht kein neues Objekt. Nur bestehende Objekte werden in ihrem Flächeninhalt vergrößert. So erlangen die Fische ihre Ursprungsgröße zurück. Gleichzeitig wurden damit die Umrisse geglättet.

Die Schwellwertoperation sowie das Entfernen kleiner und großer Objekte ist bei der Erkennung von Fischen und Fischeiern gleich. Der weitere Ablauf variiert dagegen und wird im Folgenden getrennt betrachtet.

Fischeier haben im Bild immer einen Durchmesser von 40 Pixel und eine Fläche von 1000 bis 1300 Pixel. Die wichtigen Erkennungsmerkmale sind daher Rundheit und Flächeninhalt. Fischlarven dagegen haben eine Länge von 120 Pixeln. Sie können mit einer Ellipse approximiert werden. Der charakteristische Flächeninhalt von 1200 bis 1800 sowie das Verhältnis von langer zu kurzer Ellipsenachse beschreiben die Fischlarven im Bild.

Bei der Larvendetektion werden als nächstes solche Objekte behalten, die einen Ausdehnungsfaktor (Faktor der beiden Halbachsen) von mehr als 2,5 haben. Das trifft auf die Larven zu, Eier werden mit dem Kriterium aussortiert. Weiter wird ein Faktor angewendet, der die Geschlossenheit der Fläche beurteilt. Artefakte haben häufig zerklüftete Umrandungen und weisen Löcher in der Fläche auf. Im nächsten Schritt werden die Cluster gegenüber den Fischen aufgrund ihrer Fläche abgegrenzt. Mit *labeling* (s. Abs. 2.3.3) werden alle Pixelobjekte im Bild benannt und im Anschluss wird deren Flächenmittelpunkt berechnet. Die Koordinaten der Flächenmittelpunkte werden in einer Liste als Positionen der Cluster abgespeichert. Die gefundenen Objekte werden dann aus dem Bild entfernt und die übrigen Objekte werden wiederum

mit *labeling* beschriftet. Von den länglichen Larven werden sowohl der Flächenschwerpunkt als auch weitere Merkmale errechnet. Tests mit dem Fischsortierer haben gezeigt, dass die Fische aufgrund des länglichen, spitz zulaufenden Körpers am besten vom Kopf her angesaugt werden können. Dort bieten sie für die Saugströmung den größten Strömungswiderstand und es kann die größte Kraft aufgebracht werden. Zur Berechnung der Position des Kopfes wurde daher folgendes Verfahren erarbeitet. Als erstes wird die längste Gerade ermittelt, die zwei Pixel des Objekts miteinander verbindet. In einer Ellipse entspricht es immer der langen Halbachse und im Fisch dementsprechend der Strecke von Kopf bis Schwanzende. Es wird der Anfangs- und Endpunkt der Linie als Koordinate ausgegeben. Aufgrund der Keilform der Larvenabbildung kann ermittelt werden, welcher der beiden Punkte dem Kopf entspricht. Derjenige der beiden Punkte, der geringeren Abstand zum Flächenschwerpunkt hat, bezeichnet den Kopf, da der Flächenschwerpunkt zum Kopf hin verschoben ist. Die so ermittelte Koordinate des Kopfes wird in einer Liste gespeichert. Die Liste beinhaltet alle erkannten Fische. Der Ablauf der unterschiedlichen Bildverarbeitungsschritte beim Erkennen der Larven im Bild ist in Abbildung 3.14 zu sehen. Mittels Segmentierung über einen Schwellwert werden im Originalbild der dunkle Hintergrund und die hellen Fische von einander getrennt. Aus dem segmentierten Bild werden die kleinen und die großen Objekte entfernt. Sie sind in der Abbildung in der Mitte oben durch Kreise hervorgehoben. In der Abbildung oben rechts wurden die Partikel entfernt. Übrig sind nun die Einzelfische und die Cluster. Mit Dilatationen werden die Fischkonturen vergrößert, sodass nahe Nachbarn zusammen wachsen. Die so zu identifizierenden Cluster sind in der Abbildung unten links in weiß und durch Kreise hervorgehoben. In der Abbildung Mitte unten wurden die Cluster entfernt. Übrig sind nur noch die Einzelfische. In der Abbildung rechts unten sind die erkannten Fische in rot auf dem Originalbild hervorgehoben.

Bei der Eierkennung werden nach der Entfernung großer und kleiner Objekte alle Objekte entfernt, deren äquivalente Ellipse einen vorgegebenen Wert unterschreitet. Im Versuch hat sich ergeben, dass sich anhand dieses Kriteriums die Fischeier am Besten von den anderen Objekten unterscheiden lassen. Auch möglich ist das Kriterium Rundheit. Danach werden die Cluster erkannt, indem alle kleineren Objekte vorübergehend entfernt werden und die übrig gebliebenen Objekte mit *labeling* erkannt werden. Dabei werden wieder die Flächenschwerpunkte der Cluster erfasst und gespeichert. Im Anschluss werden die kleinen Objekte zurück geholt und die Cluster entfernt. Anhand eines zuvor festgelegten Templates, das das typische Aussehen eines Fischeis hat, wird das Bild nach Eiern durchsucht. Mit dem sogenannten *pattern matching* werden dabei die Objekte als Eier identifiziert, deren Merkmale mindestens mit dem vom Bediener festgesetzten Score mit denen des Templates übereinstimmen. Mit dem Score wird hierbei der Grad der Ähnlichkeit beschrieben. Ist die Ähnlichkeit hoch, hat der Score einen hohen Wert. Ist sie niedrig, ist auch der Score niedrig. Bei den Fischeiern ist es ausreichend, den Flächenschwerpunkt zu kennen, da Fischeier wesentlich leichter durch Aufsaugen aufge-

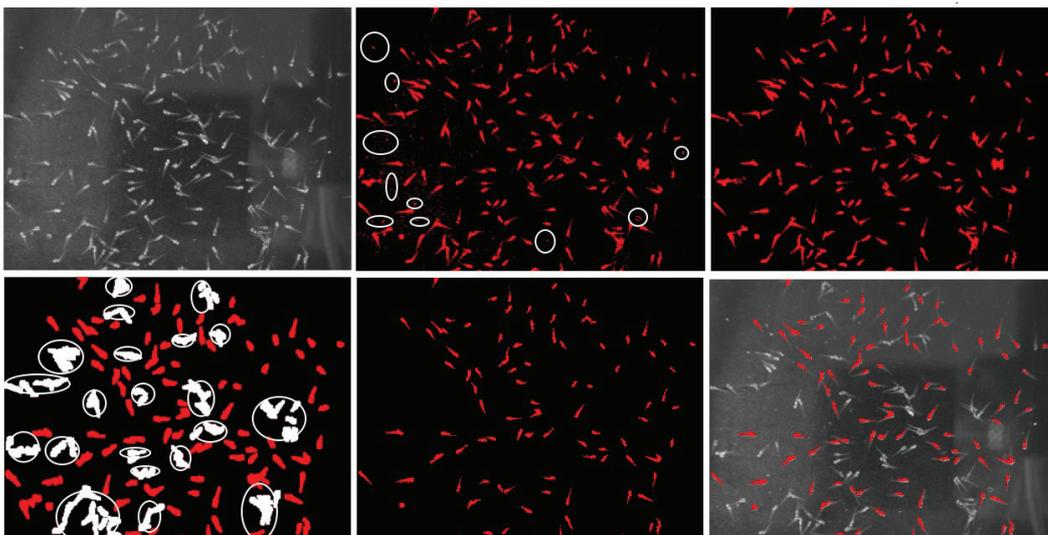


Abb. 3.14.: Ablauf der Bilverarbeitung zur Fischerkennung; oben: links: Originalbild Fischlarven in Petrischale, Mitte: Trennung von Fischen und Hintergrund mittels Schwellwert, rechts: Entfernen kleiner und großer Objekte nach Flächeninhalt (Kreise); unten: links: Dilatation zum Zusammenwachsen naher Nachbarn und Identifikation von Clustern (Kreise), Mitte: Entfernung der Cluster, rechts: Erkannte Einzelfische (rot) hervorgehoben im Originalbild

nommen werden können. Auch die Koordinaten der erkannten Fischeier werden als Ergebnis in einer Liste gespeichert.

3.6.2. Fallerkennung nach Auswertung der Bildverarbeitung

Im Laufe des Sortiervorgangs verändert sich die Situation in der Petrischale mit jedem Aufsaugprozess. Die Anzahl der Fische nimmt ab, da Fische in die Mikrotiterplatte sortiert werden. Außerdem nimmt die Anzahl der Fischcluster zu, weil sich Fische durch Wellen in Gruppen sammeln. Als Fischcluster wird eine Gruppe von mindestens zwei Fischen bezeichnet, die so nah beieinander liegen, dass auf dem Kamerabild die Umrisse der Fische nicht mehr getrennt erkannt werden können. Um auf die Ereignisse reagieren zu können, müssen weitere Fallunterscheidungen im Algorithmus berücksichtigt werden. Die Fischdetektion liefert als Ergebnis zwei Listen mit den Koordinaten der Fische und der Fischcluster. Anhand der Anzahl der erkannten Objekte in beiden Klassen werden folgende drei Fälle definiert:

- mehr als zehn einzeln liegende Fische erkannt
- weniger als 10 Fische aber mehr als 10 Cluster erkannt
- weniger als 10 Fische und weniger als 10 Cluster erkannt.

Der erste Fall stellt den Normalfall dar und einer der Fische wird zur Aufnahme ausgewählt und der Prozess läuft wie bereits beschrieben ab. Werden jedoch weniger als zehn einzelne Fische erkannt, wird weiter geprüft, ob mehr als zehn Cluster vorliegen. Im zweiten Fall sind noch

genügend Fische in der Petrischale, jedoch sind zu viele davon in Clustern zusammen. Daher wird die Clustervereinzelung durchgeführt. Daraufhin wird erneut ein Foto gemacht und erneut ausgewertet. Um eine Endlosschleife zu vermeiden, wurde hier als Abbruchkriterium eine maximale Anzahl an Clustervereinzelungsvorgängen definiert. Verändert sich die Situation dreimal hintereinander nicht, so muss ein Problem vorliegen. Daher wird nach dem dritten Versuch die Cluster zu vereinzeln der Sortierprozess mit einer entsprechenden Meldung abgebrochen.

Im dritten Fall ergibt die Bildauswertung eine Anzahl einzelner Fische unter zehn und eine Clusteranzahl unter zehn. Demnach sind nicht mehr genügend Fische in der Petrischale. In dem Fall kann eine weitere Petrischale angefahren werden und der Sortierprozess wird dort weitergeführt. Die Hardware des Fischsortierers ist hierfür mit zwei Petrischalen ausgerüstet. Um die Fische in verschiedenen Petrischalen erkennen zu können, sind verschiedene Fotopositionen vorgesehen. Werden an einer Fotoposition zu wenige Fische und wenig Cluster erkannt, wird zur nächsten Fotoposition gewechselt. Werden auch dort nicht mehr Fische erkannt, so wird erneut die Fotoposition gewechselt. Sind gar keine Fische mehr vorhanden, muss auch hier ein Abbruchkriterium den Sortieralgorithmus beenden. Werden alle definierten Fotopositionen mehr als zweimal angefahren, so bricht der Sortieralgorithmus ab.

3.6.3. Fallerkennung nach Auswertung des Pipettiersensors

Die Einzelschritte zum Aufsaugen eines Fisches sind bis zur Prüfung des aufgesaugten Inhalts bei jedem Aufnahmeprozess gleich. Beim Aufnehmen wird der Inhalt durch den Sensor an der Pipettierspitze geprüft. Anhand des Ergebnisses der Sensorauswertung werden dann verschiedene Fälle berücksichtigt. Nach der Prüfung des aufgesaugten Inhalts können folgende Fälle eintreten:

- Inhalt ist genau ein Fisch
- mehrere Fische aufgesaugt
- kein Fisch im Schlauch
- Speziell beim Sortieren von Fischeiern: Ei ist koaguliert.

Je nach erkanntem Fall wird der Sortierprozess auf entsprechende Weise fortgesetzt. Ist der Inhalt genau ein Fisch, so wird der Fisch in eine zu befüllende Kammer der Mikrotiterplatte gebracht. Wurden mehrere Fische erkannt, so wird der Inhalt an der Saugstelle zurück in die Petrischale pipettiert. Wurde kein Fisch im Schlauch erkannt, so wird auch hier der Inhalt zurück gepumpt und ein neuer Aufnahmeprozess wird ausgelöst. Speziell beim Sortieren von Fischeiern wird auch überprüft, ob ein Ei lebendig oder koaguliert ist. Wurde ein Ei als koaguliert erkannt, so wird es in ein gesondertes Gefäß gebracht.

3.6.4. Koordinatenberechnung und Fischauswahl

Neben der Logik des Programmablaufs des Fischsortierers ist für die präzise Handhabung der biologischen Objekte die Koordinatenberechnung und die Zielauswahl entscheidend. Mit einer Bilderkennungssoftware werden aus dem Bild der Petrischale die Koordinaten aller Fische berechnet. Aus den möglichen Koordinaten wird dann eine gewählt, bei der die Wahrscheinlichkeit, den Fisch erfolgreich aufzunehmen, am größten ist. Wie die beiden Softwareelemente umgesetzt werden, wird im Folgenden beschrieben.

Die Bilderkennungssoftware arbeitet pixelweise von links nach rechts und zeilenweise von oben nach unten, beginnend in der linken, oberen Bildecke. Das Roboterkoordinatensystem besteht aus den beiden Achsen x und y . Die Koordinaten werden in mm beschrieben. Die Kamera ist so auf dem Wagen der Y -Achse montiert, dass eine Bewegung in y -Richtung des Roboters einer Bewegung im Bild nach rechts entspricht und eine Bewegung in x -Richtung im Bild einer Bewegung nach oben entspricht. Für die Bildkoordinaten werden die Namen η und ξ gewählt und sie werden in Pixel beschrieben. Die horizontale Koordinate η beschreibt die Breite des Bildes und ist aufsteigend in positiver y -Koordinate. Die Positionswerte in ξ im Bild steigen in Richtung unterer Bildrand an. Das entspricht einer Bewegung in negativer x -Richtung. Der Fischsortierer muss einen Fisch mit der Pipettierspitze aufnehmen, nachdem dessen Koordinaten mittels Bildverarbeitung erkannt wurden. Hierzu müssen die Fischkoordinaten in Pixel umgerechnet werden in Koordinaten in mm. Die Umrechnung setzt sich erstens zusammen aus einer maßstäblichen Umrechnung zwischen Entfernungen in Pixel und in mm und zweitens aus einer Vektoraddition verschiedener Ortsvektoren. Der Umrechnungsfaktor von Pixel in mm ergibt sich aus dem gewählten Objektiv, dem realisierten Arbeitsabstand und der Auflösung der Kamera. Zur Ermittlung des Umrechnungsfaktors wird ein Maßstab im Arbeitsabstand positioniert und ein Foto wird aufgenommen. Im Foto kann die abgebildete Strecke in mm in Pixel gemessen werden. Beim Fischsortierer ergibt sich ein Umrechnungsfaktor von 40 Pixel/mm. Die Herleitung der Umrechnungsformel durch Darstellung als Vektoraddition wird im Folgenden beschrieben.

Die geometrischen Verhältnisse der Koordinatenumrechnung sind in Abbildung 3.15 zu erkennen. Nach der Tool Center Point (TCP) Beschreibung der Roboterkoordinaten ist der Mittelpunkt der Pipettierspitze (PS) die maßgebende Koordinate. Die Position der Pipettierspitze ist demnach zu jeden Zeitpunkt bekannt und gesucht wird die Koordinate des Fischeis (FE). Die Position des Fischeis wird von der Bildverarbeitung in η -, ξ - Koordinaten in der Einheit Pixel ausgegeben. Da die Kamera und die Pipettierspitze mechanisch miteinander auf dem Wagen der y -Achse verbunden sind, gibt es eine feste Koordinatenverschiebung zwischen dem Ursprung des Bildkoordinatensystems und dem Mittelpunkt der Pipettierspitze. Der Ursprung des Bildkoordinatensystem im linken oberen Bildrand ist nur auf dem Bild zu erkennen und hat keine leicht zuzuordnende Entsprechung im Roboterkoordinatensystem. Außerdem kommt es durch

die Linse des Objektivs an den Rändern zu einer Verzeichnung und ein genaues Ausrichten auf eine sichtbare Position wird erschwert. Der Kameramittelpunkt ist jedoch eindeutig identifizierbar, sowohl im Kamerakoordinatensystem als auch im Roboterkoordinatensystem. Die Koordinaten des Fischeis werden im Bildkoordinatensystem daher auf den Kameramittelpunkt bezogen. Hierfür wird ein Verschiebungsvektor in Pixelkoordinaten eingeführt. Dieser Vektor hat in beiden Koordinaten den Wert der halben Auflösung, um den Referenzpunkt aus dem Ursprung in die Mitte des Bildes zu verschieben. Der Abstand zwischen dem Kameramittelpunkt (KM) und der Pipettierspitze (PS) ist durch die Geometrie der Halterung festgelegt und hat einen festen Wert. Diese Verschiebung in x- und y-Richtung wird als Offset bezeichnet.

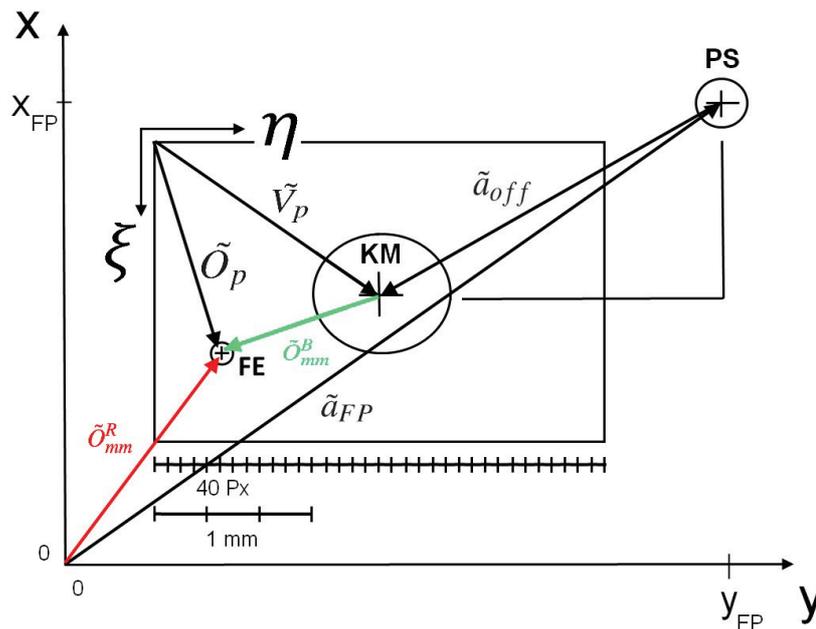


Abb. 3.15.: Darstellung der entwickelten Umrechnung der Koordinaten von Pixel in mm

In Abbildung 3.15 ist die Vektoraddition zur Beschreibung der Koordinaten des Fischeis (FE) im Roboterkoordinatensystem zu sehen. \tilde{O}_p ist der Ortsvektor des Fischeis im Bild vom Nullpunkt des Bildes aus in Pixel. \tilde{v}_p ist der Verschiebungsvektor zum Bildmittelpunkt hin. Die Differenz der beiden Vektoren gibt den Abstand des Fischeis vom bekannten Mittelpunkt in Pixellängen an. Die beiden Vektoren werden durch den Umrechnungsfaktor \tilde{f} von Pixel in mm umgerechnet. Hierbei muss die ξ -Koordinate mit negativem Vorzeichen versehen werden, da die x- und ξ -Achse entgegengesetzt gerichtet sind. \tilde{O}_{mm}^B ist der Ortsvektor des Objekts im Bild vom Bildmittelpunkt aus in mm. \tilde{a}_{FP} ist der Ortsvektor der Pipettierspitze vom Nullpunkt des Roboterkoordinatensystems in mm. \tilde{a}_{off} ist der Offset zwischen der Position der Pipettierspitze (PS) und dem Kameramittelpunkt (KM). \tilde{O}_{mm}^R ist der Ortsvektor des erkannten Objekts vom Nullpunkt des Roboterkoordinatensystems in mm. Mit \tilde{O}_{mm}^R werden die Koordinaten der erkannten Objekte aus der Bildverarbeitung ins Roboterkoordinatensystem überführt und können

so von der Pipettierspitze angefahren werden.

Die Berechnung der Koordinaten der Fische in Roboterkoordinaten anhand der bekannten Fotoposition und des Umrechnungsfaktors sowie der Transformation des Kamerakoordinatensystems in das Roboterkoordinatensystem wird durch die Gleichungen 3.2 und 3.3 beschrieben.

$$\tilde{O}_{mm}^B = \tilde{f} \cdot [\tilde{O}_p - \tilde{v}_p] = \begin{pmatrix} -f_\xi & 0 \\ 0 & f_\eta \end{pmatrix} \left[\begin{pmatrix} \xi_p \\ \eta_p \end{pmatrix} - \begin{pmatrix} v_{\xi p} \\ v_{\eta p} \end{pmatrix} \right] \quad [3.2]$$

$$\tilde{O}_{mm}^R = \tilde{a}_{FP} + \tilde{a}_{off} + \tilde{O}_{mm}^B = \begin{pmatrix} x_{FP} \\ y_{FP} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} -x_{off} \\ -y_{off} \end{pmatrix} + \tilde{f} \cdot [\tilde{O}_p - \tilde{v}_p] \quad [3.3]$$

Die Strategie zur Auswahl des am besten zur Aufnahme geeigneten Fisches kann unter verschiedenen Kriterien vorgenommen werden. Eine möglichst niedrige Gesamtsortierdauer sowie eine möglichst hohe Erfolgsquote können als Ziele angenommen werden. Eine niedrige Sortierdauer wird erreicht, wenn die Fahrwege zwischen der Aufnahme des ersten und des nächsten Fisches minimal gewählt werden. Weiter förderlich für eine niedrige Sortierdauer ist das Vermeiden des Zurückpipettierens. Das Zurückpipettieren dauert ca. 2 sek. Danach muss der Aufnahmevorgang wiederholt werden. Dadurch geht wesentlich mehr Zeit verloren als beim Verfahren von langen Wegen. Das Verfahren des maximalen Weges innerhalb einer Petrischale von 80 mm dauert bei einer Schrittfrequenz von 1000 Hz (0,15 m/s) ca. 2 sek. Es ist also von höherer Wichtigkeit, das Zurückpipettieren zu verhindern. Zurückpipettieren tritt immer dann auf, wenn der Aufnahmeprozess versagt hat. Der Aufnahmeprozess kann fehlschlagen, wenn die Pipettierspitze zu weit weg vom Fisch ist, da dann kein Fisch aufgenommen wird. Das kann aber durch die Wahl des Ziels nicht beeinflusst werden, sondern nur durch richtige Hardwerekalibrierung. Weiter kann der Aufnahmeprozess fehlschlagen, wenn neben dem eigentlichen Ziel ein zu nah liegender Nachbar mit aufgesaugt wird. Der beschriebene Fehler kann minimiert werden, wenn der Fisch ausgewählt wird, der den größten Abstand zu seinen Nachbarn hat. Zur Auswahl eines Fisches aus der Menge der erkannten Fische wird der Abstand zu den umliegenden Nachbarobjekten verwendet. Für jeden erkannten Fisch wird der euklidische Abstand zu allen anderen Fischen sowie Clustern berechnet:

$$d_i = \sqrt{(x - x_i)^2 + (y - y_i)^2} \quad [3.4]$$

x, y : Koordinaten des aktuellen Fisches; x_i, y_i : Koordinaten der anderen Fische.

Wird der Fisch mit dem größten Abstand zu seinen Nachbarn als Ziel gewählt, so ist die Wahrscheinlichkeit des erfolgreichen Aufsaugens am größten.

Ein weiterer Aspekt der Zielauswahl sind mögliche Fehler in der Bilderkennung. Es wurde beobachtet, dass bei der Bilderkennung vereinzelt Lichtreflexionen in der Petrischale, verursacht durch Kratzer in der Petrischale und Verunreinigungen in der Flüssigkeit, zu Pixelob-

jekten führen, die ähnliche Merkmale wie Fische haben und daher als solche erkannt werden. Eine solche Fehlerkennung wird dann zum Problem, wenn sie die weiteste Entfernung zu ihren Nachbarn hat. Beim Aufsaugprozess an der erkannten Stelle wird nur Wasser aufgesaugt und die Lage der Fische in der Petrischale wird nicht verändert. Bei der nächsten Auswertung zur Bestimmung des Ziels wird die Fehlstelle erneut ausgewählt. Dadurch bleibt der Sortiervorgang in der Schleife hängen. Um das zu verhindern, wurde eine Liste mit verbotenen Koordinaten eingeführt. In die Liste wird bei jedem Aufnahmeprozess die ausgewählte Koordinate geschrieben, sodass an jeder Stelle nur einmal gesaugt werden kann. Tritt ein Ereignis auf, das die Positionen der Fische definitiv verändert, wie z.B. das Clustervereinzeln, wird die Liste wieder gelöscht. Außerdem wird die Liste gelöscht, wenn das Verhältnis von erkannten Fischen zu verbotenen Koordinaten zu hoch wird. Die Anzahl detektierter Fische (F) abzüglich der verbotenen Koordinaten (v) entspricht den erlaubten Fischen (E). Wenn die Anzahl der erlaubten Fische geringer ist, als die Hälfte der erkannten Fische, wird die Liste der verbotenen Koordinaten gelöscht. Die beschriebene Bedingung ist in Gleichung 3.6 dargestellt. Ist Gl. 3.6 erfüllt, wird die Liste verbotener Koordinaten gelöscht. Das Erreichen dieser Bedingung wird bei jeder Berechnung der Koordinaten der erkannten Fische erneut geprüft.

$$E = F - v \quad [3.5]$$

$$E \leq \frac{F}{2} \quad [3.6]$$

3.6.5. Automatische Protokolldatei

Zur Evaluierung des Arbeitsprozesses des Fischsortierers müssen mehrere Parameter betrachtet werden. Zum Einen ist die Sortierdauer zum Befüllen einer kompletten Mikrotiterplatte wichtig. Zum Anderen muss gleichzeitig die Erfolgsquote so hoch wie möglich sein. Während der Entwicklung hat sich in den ersten Hardwareversionen gezeigt, dass sehr viele Faktoren die korrekte Funktion des Fischsortierers indirekt beeinflussen. Die Erfolgsquote wie auch die Sortierdauer werden indirekt durch folgende Faktoren und Kombinationen der Faktoren bestimmt:

- Mechanik
 - mechanische Ausrichtung der x-y-Ebene des Roboters und des Petrischalenbodens
 - präzise Kalibrierung der Aufsaughöhe über den Fischen
 - richtig kalibrierte Hardwareposition der Pipettierspitze und Umrechnung Pixel mm.
- Bildverarbeitung
 - homogene Lichtverhältnisse im Bild

- richtig gewählte Belichtungszeit der Kamera
- gutes Bild der Petrischale nach abgewarteter Ausschwingzeit
- richtig gewählter Schwellwert der Bildverarbeitung.
- Pipettiersensor
 - richtig gewählter Schwellwert im Pipettiersensor
 - richtig gewählte Peakbreite.
- Fluidtechnik
 - blasenfreier Schlauch
 - ablagerungsfreier Schlauch
 - trockene Pipettierspitze für definierten Tropfenabriss.
- Petrischalen Vorbereitung
 - Anzahl Fische und Cluster bei Sortierbeginn und während dem Prozess.

Um die kritischen Elemente des Sortierprozesses zu identifizieren, wurde ein Protokoll entwickelt, mit dem jeder Saugversuch bewertet wurde. Jeder Saugversuch wurde in Form einer Strichliste dokumentiert. Hierbei wurden folgende Fälle unterschieden:

- Fisch beim 1. Mal aufgesaugt
- neben dem Fisch gesaugt
- Sensorsignal fehlerhaft
- falsche Position erkannt
- mehrere Fische aufgesaugt.

Die Auswertung der Sortierprozesse mit Hilfe des Protokolls wurde zunächst händisch durchgeführt. Zur Reduktion des Arbeitsaufwandes und um ein leistungsfähiges Diagnoseinstrument zu erhalten, wurde dann in die Software des Fischsortierers die Erstellung einer automatischen Protokolldatei implementiert. In der Protokolldatei wird in Tabellenform jeder Aufsaugversuch dokumentiert, indem die als charakteristisch identifizierten Parameter erfasst werden. Es werden Grundeinstellungen, wie die gewählte Aufsaughöhe sowie Kameraparameter wie die Belichtungsdauer aufgezeichnet. Nach jedem Saugversuch werden dann weitere Parameter dokumentiert, die eine Charakterisierung des Versuchs im Nachhinein zulassen. Die Anzahl der erkannten Fische und Cluster wird festgehalten. Von Sensorseite wird protokolliert, wie breit der gemessene Peak war, wie viele Fische im Schlauch waren und ob der aufgesaugte Inhalt

korrekt war. Zusätzlich wird die Sortierzeit als Durchlaufzeit erfasst. Es ist also für jeden Aufsaugversuch auch im Nachhinein noch möglich zu erkennen, ob ein Fehler aufgetreten ist. Durch die umfassende Parametererfassung können Sortiervorgänge mit variierten Parametern gefahren werden. Auf Grundlage der erfassten Daten ist dann eine Auswertung des Prozesses möglich. Dabei kann im Detail analysiert werden, wann und warum es zu Problemen kam und wie genau die Parameter die Erfolgsquote oder die Sortierdauer beeinflussen.

3.7. Evaluierung des Fischsortierers

In über 40 Dauertests wurden die Schwachstellen des Systems, die den größten Einfluss auf das Sortierergebnis haben, ermittelt und systematisch verbessert. In einer Analyse der Dauer der Einzelelemente des Sortierprozesses wurde deren Einfluss auf die Sortierdauer betrachtet. In Abbildung 3.16 ist das Ergebnis der Analyse grafisch dargestellt. Ausgehend von einer Sortierdauer von ca. 40 min, bringt eine mechanische Verbesserung eine Zeitersparnis von 5 min. Im ersten Aufbau des Fischsortierers war die y-Achse als Kragträger nur an einer Seite gelagert (siehe [86]). Bei Bewegung des Wagens wurde die Achse in Schwingungen versetzt. Nach dem Stopp zum Aufnehmen des Bildes der Petrischale musste ca. 1 s gewartet werden, bis die Kamera so ruhig war, dass ein wackelfreies Bild aufgenommen werden konnte. Das Ergänzen einer passiven zweiten Schiene parallel zur x-Achse konnte die Schwingungen und damit die Wartezeit reduzieren. Ein schnellerer z-Aktor konnte beim Füllen von 96 Einzelkammern 7 min einsparen. Das Vereinzeln von Clustern kommt nur selten vor, dauert aber recht lange. Wird die Anzahl der Clustervereinzelungsprozesse um einen verringert, werden ca. zwei Minuten eingespart. Das Zurückpumpen passiert dann, wenn ein Fisch nicht aufgesaugt wurde oder wenn in einem schlechten Sensorsignal ein richtig aufgesaugter Fisch nicht erkannt werden kann. Durch die Reduktion des Zurückpumpens können bis zu 15 min eingespart werden. Anhand der Einschätzung der genannten Einflüsse wurden iterativ Verbesserungen am Fischsortierer vorgenommen. Die Sortierdauer mit allen Verbesserungen setzt sich nicht nur additiv aus den Einzelverbesserungen zusammen, sodass zur Ermittlung der Sortierdauer nicht alle Einzelzeitersparnisse addiert werden können. Die Häufigkeit des Auftretens von Zurückpumpen und Clustervereinzelung gewichtet den Einfluss der anderen Maßnahmen. Treten die beiden Ereignisse sehr selten auf, so ist auch das Sparpotenzial der anderen Maßnahmen geringer.

Den tatsächlichen Verlauf der Sortierdauer und der Erfolgsquote über die Anzahl der Versuche betrachtet ist in Abbildung 3.16 links zu sehen. Erkennbar ist, dass zu Beginn der Dauertests die Sortierdauer konstant war. Das ist auf den rein gesteuerten Betrieb ohne Sensor zurückzuführen. An der erkannten Position wird Flüssigkeit aufgesaugt und in die Mikrotiterplatte gebracht, ohne dass geprüft wird, ob ein Fisch aufgesaugt wurde oder nicht. Da nicht jeder Saugversuch funktioniert hat, hat die Erfolgsquote stark geschwankt und der Maximalwert lag bei knapp über 80%. Ab Versuch Nr.15 wurde der entwickelte Pipettiersensor verwendet. Als

Folge wurde die Erfolgsquote auf annähernd 100% erhöht. Jedoch muss bei fehlgeschlagenem Saugvorgang der Inhalt zurückpipettiert werden und erneut ein Fisch aufgenommen werden. Dadurch erhöht sich die Sortierdauer. Demnach ist zu erkennen, dass ab Versuch 15 die Sortierdauer erhöht ist und stark schwankt. Die Schwankungen sind beispielsweise auch durch mangelnde Vielfalt der vom Algorithmus erkennbaren Systemzustände zu erklären. Die verschiedenen Fallbetrachtungen zur Clustervereinzelung, Wechsel der Fotoposition und Verbot bereits angefahrener Positionen wurden in der Phase noch nicht berücksichtigt. Somit konnte es passieren, dass der Sortieralgorithmus in einer der bereits beschriebenen Endlosschleifen über mehrere Aufnahmeversuche hinweg hängen bleibt und nur durch Zufall später weiter läuft. Ab Versuch 33 wurden Hardwarekomponenten ersetzt. So konnte durch einen schnelleren z-Aktor die Verfahrszeit reduziert werden. Eine Überarbeitung des Pipettiersensors und eine Verfeinerung der Signalauswertung führten zu einer Reduktion der Sortierdauer. Die Sortierdauer wurde wiederholbar und mit nur geringen zeitlichen Abweichungen erreicht. Gleichzeitig konnte die Erfolgsquote im Durchschnitt auf einem hohen Niveau von ca. 95% richtig befüllten Kammern gehalten werden.

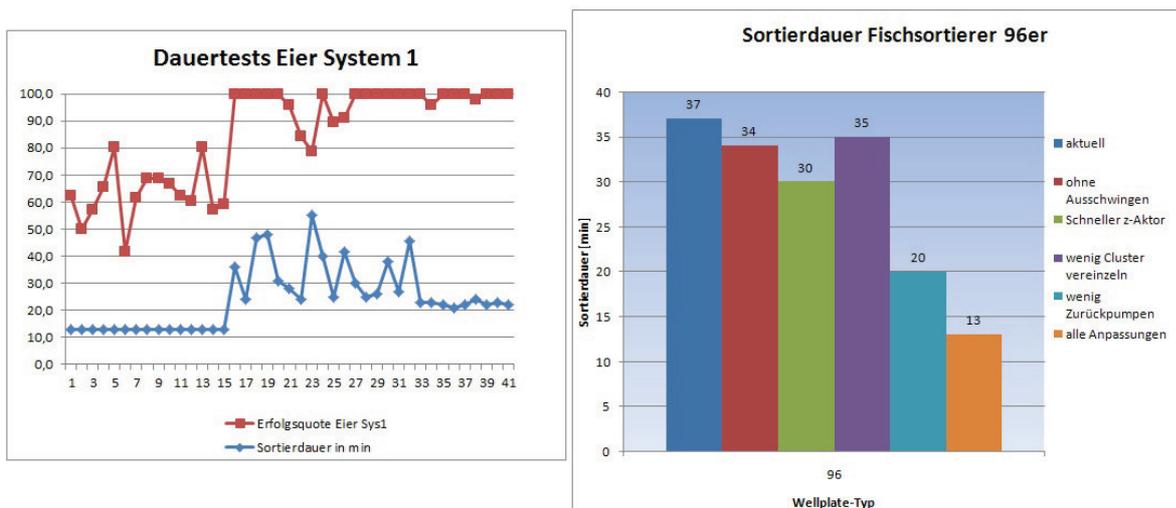


Abb. 3.16.: links: Erfolgsquote und Sortierdauer über Versuchsanzahl. Nach Einbau Sensor (Versuch15) Erfolgsquote 100%. Nach Verbesserung der Hardware (Versuch 33) Sortierdauer reduziert. rechts: theoretische Einflussfaktoren auf die Dauer des Sortierprozesses für 96er Well Plates

Aufbauend auf den Ergebnissen mit dem ersten System wurde ein zweites System aufgebaut. Die Beleuchtung wurde verändert, indem weitere LEDs ergänzt wurden, um das Licht homogener zu gestalten. Weiter wurde ein schnellerer z-Aktor eingebaut und eine Weiterentwicklung des Pipettiersensors (Version wie gezeigt in Abs. 3.4 zu sehen) verwendet. Auch die Software wurde seitens der Bildverarbeitung und in der Erweiterung des Regelungsalgorithmus beispielsweise durch Ergänzen weiterer Fotopositionen weiterentwickelt. Der zu Anfang dieses Kapitels vorgestellte Fischsortierer ist die genannte zweite Version (s. Abb. 3.2). Mit der

Tab. 3.2.: Leistungsdaten des Fischsortierers

Fischtyp	Plattentyp	Sortierdauer	Erfolgsquote
Fischei	96	19 min	98%
	384	80 min	
Fischlarve	96	25 min	95%
	384	105 min	

zweiten Version wurden Dauertests gefahren, dergestalt, dass 96er Platten mit Fischeiern und mit geschlüpften Larven befüllt wurden. Dabei wurde die Sortierdauer durch die automatische Protokolldatei mitgeschrieben und die Erfolgsquote, wieviele Kammern richtig befüllt waren, wurde im Nachhinein manuell ermittelt. Die Ergebnisse der Dauertests, also die Leistungsdaten des Fischsortierers finden sich in Tabelle 3.2. Die durchschnittliche Sortierdauer, die mit der verbesserten Hardware des Fischsortierers erzielt werden konnten, sind 19 min zum Befüllen einer 96er Mikrotiterplatte mit Fischeiern und 25 min zum Befüllen einer 96er Platte mit Fischlarven. Die Dauer zum Befüllen von 384er Platten entspricht gemäß der vierfachen Probenzahl der vierfachen Dauer.

Zum Nachweis, dass der Prozess des Aufsaugens der Fische durch den Fischsortierer für die Entwicklung nicht schädlich ist, wurde ein Versuch mit vier 96er Mikrotiterplatten durchgeführt. Zwei 96er Platten wurden mit einer manuellen Pipette mit Fischeiern befüllt. Zwei weitere 96er Platten wurden durch den Fischsortierer mit Fischeiern befüllt. Die Platten wurden danach für 24 Stunden bei 28°C inkubiert. Nach 24h wurden die Platten begutachtet und es wurde die Anzahl der koagulierten Eier ermittelt. Sowohl für die manuellen Platten als auch für die automatisch befüllten Platten hat sich ein Anteil koagulierter Eier zwischen 9 und 13 Prozent ergeben. Die vollständigen Daten sind im Anhang A.1 zu finden. Daher lässt sich sagen, dass das automatische Befüllen der well plates mit dem Fischsortierer keinen vom manuellen Befüllen abweichenden, negativen Einfluss hat.

In Kapitel 3 wurde der neu entwickelte Fischsortierroboter vorgestellt. Der Fischsortierer führt das bisher manuell von Biologen durchgeführte Befüllen von Mikrotiterplatten mit Fischeiern oder -larven automatisch durch. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Hardware basiert auf einem Zweiachs-Grundroboter. Der Grundroboter wird ergänzt durch einen Schrittmotor mit Spindeltrieb, der eine Pipettierspitze in z-Richtung bewegt. Zum Aufsaugen der Fische über die Pipettierspitze wurde eine neue lineare Schlauchpumpe entwickelt. Um den aufgesaugten Inhalt im Schlauch prüfen zu können, wurde im Rahmen der Arbeit ein Sensor auf Mikrokontrollerbasis entwickelt, der nach dem Prinzip einer Lichtschranke aufgesaugte Fische im Schlauch erkennen kann. Ein weiteres Hauptelement des Fischsortierers ist die Digitalkamera und die dazu eingesetzte Bildverarbeitung. Zur Erkennung von Fischeiern und -larven, die wahllos in Petrischalen verteilt sind, kommen Bildverarbeitungsalgorithmen zum Einsatz. Hierfür wurden Grundelemente der Bildverarbeitung wie Segmentierung, mor-

phologische Operatoren und weitere Bilderkennungsfunktionen angewendet. Weiter wurde ein Bildverarbeitungsalgorithmus modifiziert und auf die Parameter des Fischsortierers angepasst. Der entwickelte Regelungsalgorithmus zur Steuerung des Fischsortierers erkennt verschiedene Ereignisse und Zustände während des Sortierprozesses und kann so einen robusten und effizienten Ablauf gewährleisten. Außerdem wurde ein Konzept, bestehend aus mehreren Ansätzen zur Auswahl der für die Aufnahme geeignetsten Fische, erarbeitet. Um Ansammlungen von Fischen in Clustern vereinzeln zu können, wurde im Rahmen der Arbeit ein Umrührmechanismus entwickelt, der Petrischalen in überlagerten kreisförmigen und linearen Bewegungen schwenkt. Der Fischsortierer wurde ausgiebig getestet und konnte seine Eignung sowie seine Unschädlichkeit für die lebenden Proben unter Beweis stellen.

4. Entwicklung der Mikroskope

Neben der Probenvorbereitung durch den in Kapitel 3 beschriebenen Fischsortierer ist ein wichtiger Teil des neuen Konzepts für eine automatische Prozesskette für eine Zebrafischuntersuchung die mikroskopische Untersuchung der Proben. Hierzu werden im Kapitel 4 drei im Rahmen der Arbeit entwickelte Mikroskoproboter vorgestellt.

In Abschnitt 4.1 wird das Parallelmikroskop beschrieben. Es nimmt mit vier parallelen Kameras vier Kammern einer Mikrotiterplatte gleichzeitig auf. Somit wird die Gesamtaufnahmezeit um ein Vielfaches reduziert. Durch eine Auswertung des Bildmaterials können die Proben identifiziert werden, die weitergehend mit höherer Auflösung untersucht werden sollen.

In Abschnitt 4.2 wird dann das Herzschlagmikroskop beschrieben. Es nimmt automatisch Videos der Herzregion von Zebrafischen in einer Mikrotiterplatte auf. Hierzu trägt das Mikroskop eine Übersichtskamera und eine Detailkamera. Aus dem Bild der Übersichtskamera wird in jeder Kammer die Position des Herzens des Fisches mit Hilfe von Bildverarbeitung erkannt. Nach dem Positionieren der Detailkamera an der erkannten Position wird ein Video des schlagenden Herzens aufgenommen. So können automatisch in kurzer Zeit Videos aufgenommen werden, mit denen der Herzschlag von Zebrafischen analysiert werden kann.

In Abschnitt 4.3 wird das Fluoreszenzmikroskop beschrieben. Es detektiert automatisch die beiden Fluoreszenzproteine GFP und RFP in Fischen in einer Mikrotiterplatte. Die erkannten Fluoreszenzbereiche werden zur besseren Beurteilbarkeit durch die Software mit einer Hellfeldaufnahme des Fisches zu einem Falschfarbenbild überlagert.

Die für alle drei Mikroskope erhaltenen Ergebnisse werden in den jeweiligen Abschnitten bezüglich ihrer Leistungsfähigkeit evaluiert.

4.1. Entwicklung des Parallelmikroskops

In diesem Kapitel wird das Parallelmikroskop vorgestellt. Hierfür wird zuerst das Konzept beschrieben. Danach werden die eingesetzten Hardwarekomponenten Roboter, Optik und Steuerungsrechner dargestellt. Im Weiteren wird dann die entwickelte Steuerungssoftware vorgestellt. Danach wird die Evaluierung des Parallelmikroskops mittels Testreihen erläutert.

4.1.1. Konzept Parallelmikroskop

Eine große Menge an Proben in kurzer Zeit zu Scannen ist eine echte Herausforderung in Zebrafischuntersuchungen. Hochauflösende Mikroskope liefern zur späteren Auswertung geeignetes

Bildmaterial, sind jedoch meist langsam. Z.B benötigt das ScanR von Olympus 2 min 18 sek zum Aufnehmen je eines Einzelbildes für eine komplette 96er Mikrotiterplatte. Die Bilder des ScanR haben eine digitale Auflösung von 1344 x 1024 Pixel (1,38 MP) und eine Dateigröße von 2,7 MB. Die optische Auflösung und damit die Abbildungsleistung des Mikroskops ist je nach verwendetem Objektiv unterschiedlich. Beim ScanR ist die Bildfrequenz bei schnellen Bildfolgen nicht einstellbar, sondern hängt von der Schnelligkeit des Shutters ab. Eine weitere Problematik liegt im Wesen der biologischen Untersuchungen an sich. Häufig wird nach einer Veränderung in den Fischen gesucht und dabei werden verschiedene Einflussfaktoren variiert. So werden beispielsweise Substanzen in ihrer Wirkung in Verdünnungsreihen untersucht. Nur bei wenigen Fischen wird sich eine Veränderung gegenüber dem Normalzustand zeigen. Auch bei genetischen Untersuchungen tragen meist nur wenige Fische die gesuchten Merkmale. Trotzdem wird viel Zeit investiert, weil von allen Fischen die selben Bilder aufgenommen werden.

In der Fluidgruppe am Institut für Angewandte Informatik des KIT wird ein neuer Ansatz zur Steigerung der Effizienz in automatischen Mikroskopierprozessen verfolgt. Der Ansatz ist es, eine Voruntersuchung mit geringerer Auflösung und gleichzeitig wesentlich reduziertem Zeitbedarf zu machen. Alle Fälle, die dem Normalfall entsprechen, brauchen nicht weiter betrachtet zu werden. Nur die interessierenden Fische können dann weiter auf dem hochauflösenden, langsameren Gerät genauer untersucht werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher ein Parallelmikroskop entwickelt, mit dem ein Vorscreen schnell und mit einfachen, günstigen Komponenten realisiert werden kann. Zum Erreichen einer hohen Arbeitsgeschwindigkeit und damit eines geringen Zeitbedarfs für einen Screen kommen mehrere, parallele Detektoren für das Abscannen einer Mikrotiterplatte zum Einsatz.

Die Anwendung, für die das Mikroskop gedacht ist, ist die Untersuchung von transparenten Fischlarven. Hierfür eignet sich das Prinzip der Durchlichthellfeldmikroskopie. Für nicht transparente Körper ist eine Auflichtbeleuchtung vorteilhafter. Einfache Untersuchungsergebnisse wie Unterscheidung zwischen koaguliert und nicht koaguliert (tot/lebendig), Beurteilung der Herzaktivität und des -rhythmus sowie Erkennung von Spontanbewegungen sollen dabei möglich sein. Die genannten Merkmale sind nach DIN definierte, toxikologische Endpunkte, welche wichtige Kriterien in der Beurteilung der Toxizität eines Stoffes sind [20]. Da kein Standardmikroskop ersetzt werden soll, sondern eine hinreichende Voruntersuchung realisiert werden soll, ist ein Konzept mit einfachen Komponenten ausreichend. Für die Bildgebung wird eine Industriedigitalkamera mit passendem Objektiv verwendet. Zur Erfüllung der Aufgabe müssen die optischen Komponenten so ausgelegt werden, dass die für die Vorsortierung nötigen Informationen aus dem Bild extrahiert werden können. Mit dem Verzicht auf koaxiale Beleuchtung, Kondensator und großes Linsensystem ergibt sich die Möglichkeit, mehrere Detektoren auf kleinem Raum zu integrieren. So kann die Aufnahmegeschwindigkeit durch paralleles Aufnehmen

gesteigert werden.

In [111] und [122] wurde in Zusammenarbeit mit dem Autor zu diesem Zweck ein Parallelmikroskop entwickelt, das vier Digitalkameras trägt [86, 89]. Gegenüber nur einem Detektor verringert sich allein durch den Einsatz von vier Kameras die nötige Aufnahmezeit auf ein Viertel. Die vier Kameras sind mechanisch so fixiert, dass ihr Abstand einer halben Mikrotiterplatte in der langen sowie der kurzen Seite entspricht. Die Mittelpunkte der Kameras sind dementsprechend in der einen Richtung um 6 Kammern der Mikrotiterplatte und in der anderen Richtung um 4 Kammern versetzt. Damit kann mit nur 24 Bewegungsvorgängen eine komplette 96er Platte aufgenommen werden, da je vier Kammern gleichzeitig aufgenommen werden. Jede der Kameras nimmt damit ein Viertel der Mikrotiterplatte auf.

Zum Abscannen einer Mikrotiterplatte wird sie im Plattenhalter abgelegt. Mit dem Roboter werden die Kameras unter die als erstes zu fotografierenden Kammern bewegt. Die Platte wird mäandrierend abgefahren (siehe Abbildung 4.1). So wird gewährleistet, dass möglichst wenig Fahrweg gemacht wird. Damit wird die Fahrzeit auf ein Minimum reduziert. Zur Vermeidung von ungewollten Bewegungen der Fische innerhalb der Kammern werden die Kameras unterhalb des feststehenden Mikrotiterplattenhalters bewegt. Zwei Mikrotiterplatten werden in einem Halter fixiert. Um für die Zebrafische eine geeignete Temperatur von 28° zu erzielen, ist ein Beheizen des Halters über ein Heizglas möglich. Der Halter wird zur Integration des Transportkonzepts ausgetauscht gegen die aktive Halterung, die ebenfalls entwickelt wurde und in Abschnitt 5.2 beschrieben wird. Die Zebrafische in den Mikrotiterplatten müssen scharf abgebildet werden. Hierzu werden die Kameras durch den z-Aktor in vertikaler Richtung bewegt, bis die Scharfstellung ausreicht. Nach der Wahl eines Aufnahmemodus beginnt der Scanvorgang und die Kammern werden nacheinander angefahren und gescannt. Dabei werden je vier Kammern zeitgleich aufgenommen. Die Anordnung der Kameras und der Fahrweg während der Aufnahme sind in Abbildung 4.1 zu sehen.

4.1.2. Hardwarekomponenten

Die nötigen Hardwarekomponenten des Parallelmikroskops sind der Roboter, der optische Aufbau und die PCs. Die Details der Komponenten werden im folgenden Abschnitt beschrieben.

Roboter

Als Grundroboter zur Bewegung der Kameras wird der kartesische Grundroboter mit x- und y-Achse verwendet. Zusätzlich wird ein Mikroverstelltisch zur Fokussierung der Kameras als dritte Achse in vertikaler Richtung ergänzt. Die mechanische Auflösung des Mikroverstelltischs beträgt 5 mm pro Umdrehung. Der Mikroverstelltisch wird motorisiert mit Hilfe eines Schrittmotors und einem Zahnriementrieb. Mit der eingestellten Betriebsschrittzahl von 400 Schritte/U sowie der mechanischen Übersetzung der Riemenräder von 1:2 ergibt sich eine erreichbare Auf-

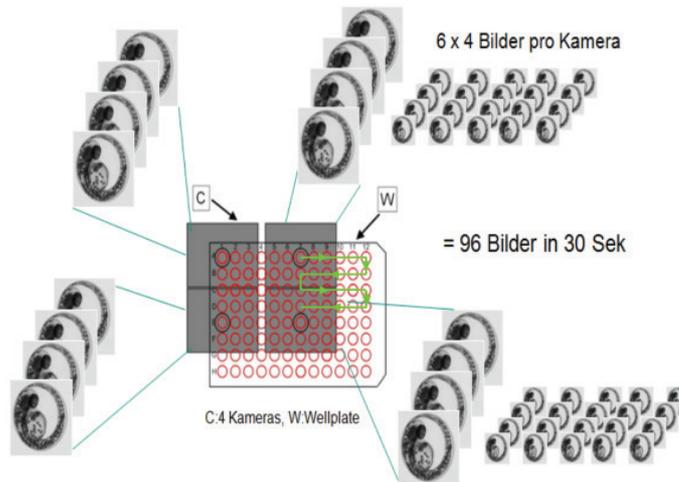


Abb. 4.1.: Anordnung der Kameras des Parallelmikroskops (Verfahrweg in grün) (modifiziert nach [122])

lösung in z -Richtung von $2,5 \mu\text{m}$ pro Schritt. Somit können verschiedene, scharfe Ebenen im Fisch aufgenommen werden. Zum Einsatz kommt die Kamera IDS uEYE UI-6240SE-C-HQ (Datenblatt siehe Anhang A.2). Jede der vier Kameras kann Bilder mit einer Geschwindigkeit von bis zu 15 FPS aufnehmen. Die Übertragung der Daten zum PC geschieht über einen GigE Anschluss. Das verwendete Objektiv TC 20- 40 von Lensation hat eine Schärfentiefe von $0,3 \text{ mm}$ (Datenblatt siehe Anhang A.2). Eine Fischlarve hat eine durchschnittliche Dicke am Dotter von $0,56 \text{ mm}$ und ein Fischei hat einen Durchmesser von $1,1 \text{ mm}$ (siehe Vermessungsprotokoll im Anhang A.1). Zur scharfen Abbildung aller Bereiche müssen daher mehrere Fokusebenen aufgenommen werden. Für eine Larve reichen theoretisch zwei Ebenen und für ein Ei werden auf Grund der doppelten Höhe vier benötigt. Um die Mindestanforderung von vier Fokusebenen sicher zu erfüllen und Spielraum für Änderungen der Anforderungen zu haben, wird die Festlegung getroffen, dass der Verfahrweg von $1,1 \text{ mm}$ durch 10 Fokusebenen aufgelöst werden soll. Der kleinste Schritt, den der z -Aktor also erreichen können muss, beträgt $11 \mu\text{m}$. Die berechnete Auflösung der gewählten Hardware übertrifft mit einem Wert von $2,5 \mu\text{m}$ die Anforderung.

Die Hardwarekomponenten des Parallelmikroskops sind in Abbildung 4.2 zu sehen. Oben links ist das Parallelmikroskop von vorne zu sehen. Im unteren Bereich befindet sich der Dreiachs-Roboter, der die vier Kameras bewegt. Über dem Roboter befindet sich der Halter für zwei Mikrotiterplatten. Im oberen Teil des Mikroskops ist die flächige Beleuchtung zu erkennen. Im Bild rechts ist die Steuerung des Parallelmikroskops zu sehen. Es wird ein PC für die Steuerung des Roboters benötigt und jeweils ein PC, um die Datenströme der vier Kameras aufzunehmen. Unten links ist das Durchlichtprinzip des Aufbaus zu erkennen. Die Beleuchtung im oberen Teil leuchtet durch die Proben in der mittleren Ebene und die Kameras befinden sich im unteren Teil des Aufbaus. Unten rechts ist der Roboter von der Seite zu sehen. Zu erkennen ist hier

im Hintergrund der Zahnriemenantrieb des Mikroverstelltisches zum Bewegen der Kameras in z-Richtung.

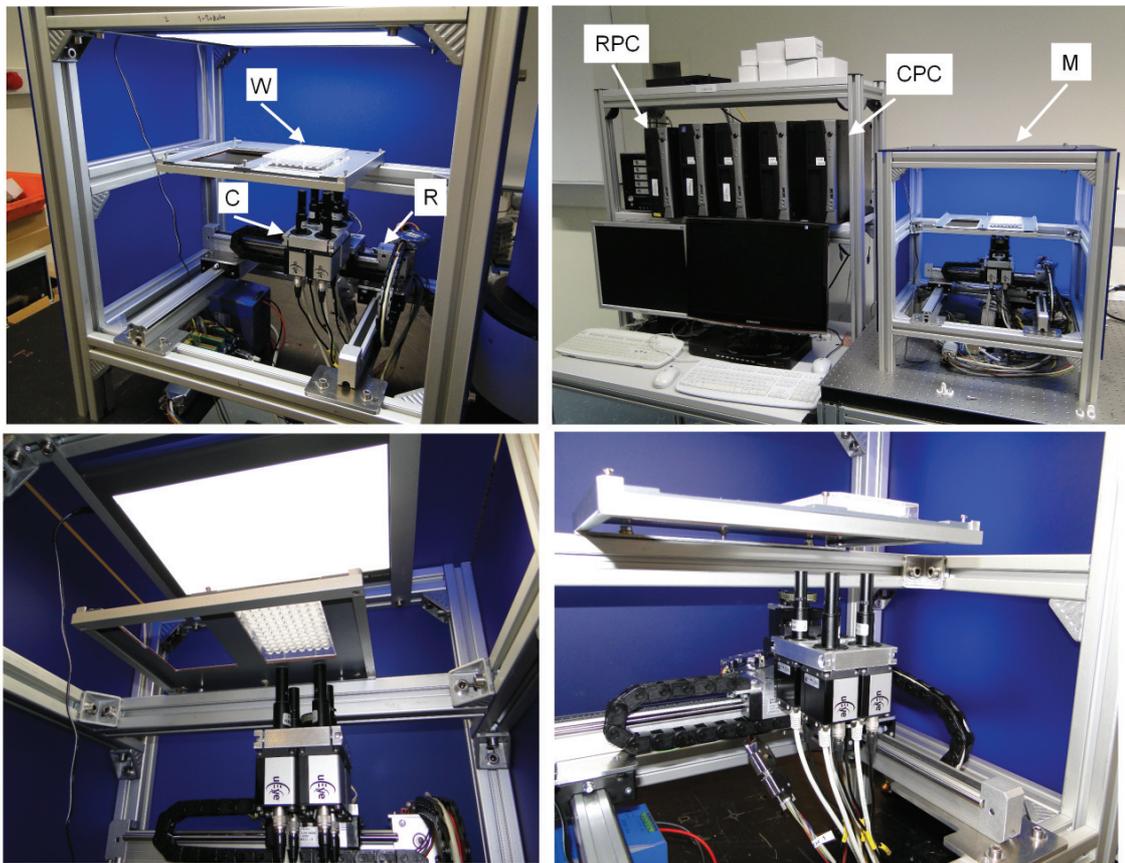


Abb. 4.2.: Hardware des neuen Parallelmikroskops, C = Kamera, R = Roboter, W = well plate, RPC = Roboter-Steuers-PC, CPC = Camera-Steuers-PC, M = Parallelmikroskop (modifiziert nach [86])

Optik

Der realisierte optische Aufbau entspricht dem Hellfelddurchlichtprinzip. Es wurde gewählt, weil es sich zur Begutachtung von durchsichtigen Objekten eignet. Kamera und zu begutachtendes Objekt sind dabei in einer Achse angeordnet. Die Beleuchtung sollte so diffus wie möglich sein, sodass die Kammern gleichmäßig ausgeleuchtet werden.

Die Auswahl der optischen Komponenten muss so vorgenommen werden, dass die Abbildungsleistung zur gewünschten Anwendung passt. Im vorliegenden Fall sollen Fischeier mit einem Durchmesser von 1 mm und Fischlarven mit einer Länge von 3 mm aufgenommen werden. Dabei sollen im Fisch Details erkannt werden. Für das Parallelmikroskop soll angestrebt werden, das Vorhandensein aller Organe zu erkennen. Die kleinste Struktur, die detailliert abgebildet werden soll, ist das Herz. Die Abbildung des Herzens ist zur Ermittlung der Herzfrequenz

und zur Bestimmung toxikologischer Endpunkte nötig. Das Herz hat zirka eine Länge von 0,15 mm und eine Breite von 0,05 mm (Werte aus eigener Messung anhand von Bildern von 72 hpf alten Fischen). Um eine detaillierte Abbildung des Herzens zu erhalten, sollte die kleinste der Abmessungen mit mehr als 20 Pixeln abgebildet werden.

Die Kamera Ueye 6240SE von IDS (Datenblatt siehe Anhang A.2) hat einen 1/2“ Sensor und eine Auflösung von 1280x1024 (1,3 MP). Sie hat einen globalen Shutter, d.h. die Belichtungszeit kann für alle Pixel gleich gesetzt werden. Der globale Shutter eignet sich bei bewegten Motiven besser als das Alternativkonzept des rolling Shutter, bei dem die Intensitätswerte der Pixel nacheinander ausgelesen werden. Ein Pixel hat eine Größe (pixelpitch) von 4,65 μm . Damit ergibt sich eine optische Fläche von 5,95 x 4,76 mm. Die Breite des Herzens ist 50 μm und das entspricht ca. 10 Pixeln. Um eine weitere Auflösung des Herzens zu erzielen, wird ein Objektiv mit einer zweifachen Vergrößerung verwendet. Das gewählte telezentrische Objektiv TC 20-40 von Lensation (Datenblatt siehe Anhang A.2) hat eine numerische Apertur von $\text{NA}=0,05$, zweifache Vergrößerung und einen Arbeitsabstand von 40 mm.

Für eine gute Bildqualität ist die Beleuchtung von großer Wichtigkeit. Um die Kammern alle gleichmäßig auszuleuchten, wird eine LED Beleuchtung gewählt, bei der auf einer Fläche von 300 x 300 mm diverse LEDs so angebracht sind, dass die Fläche homogen leuchtet. Die LED Leuchfläche wird über der Mikrotiterplatte befestigt, sodass die Kammern bestmöglich ausgeleuchtet werden.

Computer

Der Datenstrom, der von jeder Kamera über GigE zum Computer geschickt wird, ist bei 15 FPS¹ so hoch, dass ein Standard Desktop-Rechner im Jahr 2010 (AMD Atlon 64 3800, 1 Prozessorkern, 2,4 Ghz, 2 GB Arbeitsspeicher) damit ausgelastet war. Zum Zeitpunkt des Aufbaus der ersten Version des Parallelmikroskops waren Rechner, die die Datenströme von vier GigE-Ports gleichzeitig verarbeiten und die Daten auf der Festplatte speichern, sehr teuer. Daher wurde für jede Kamera ein PC vorgesehen, in dem die Bilder auf der Festplatte gespeichert werden. Alle vier Rechner müssen zur gleichen Zeit die Aufnahmen machen. Deshalb wird ein Masterrechner ergänzt, der die Bildaufnahme koordiniert. Der PC steuert die Bewegungen des Roboters und initiiert dann die Bildaufnahme. Das in [122] entwickelte Kommunikationskonzept wurde über das TC-Protokoll realisiert. Die Kamerarechner melden sich hierbei als Clients am Masterrechner an. Nach der Aufnahme können die auf den vier Rechnern verteilten Bilder automatisch auf einen Server kopiert werden, sodass dort der vollständige Datensatz zu finden ist. Der Aufbau der Netzwerksteuerung ist in Abbildung 4.3 zu sehen. Der Roboter links oben im Bild trägt die vier Kameras. Die Kameras sind über GigE (Ethernet) an je einen Kamerarechner angeschlossen (Mitte unten). Über einen Switch sind die vier Kamerarechner mit dem Masterrechner zur

¹frames per second = Bilder pro Sekunde

Steuerung des Mikroskopierablaufes verbunden (Mitte oben). Gleichzeitig ist am Switch ein Netzwerkspeicher (Raid) angeschlossen, auf den die aufgenommenen Daten zur Langzeitspeicherung und Datenanalyse verschoben werden können. Der Masterrechner (Mitte oben) steuert über die RS485 bzw. RS232 Schnittstelle die Bewegungen des Roboters und steuert über TCP (Ethernet) die Aufnahmezeitpunkte der vier über den Switch verbundenen Kamerarechner.

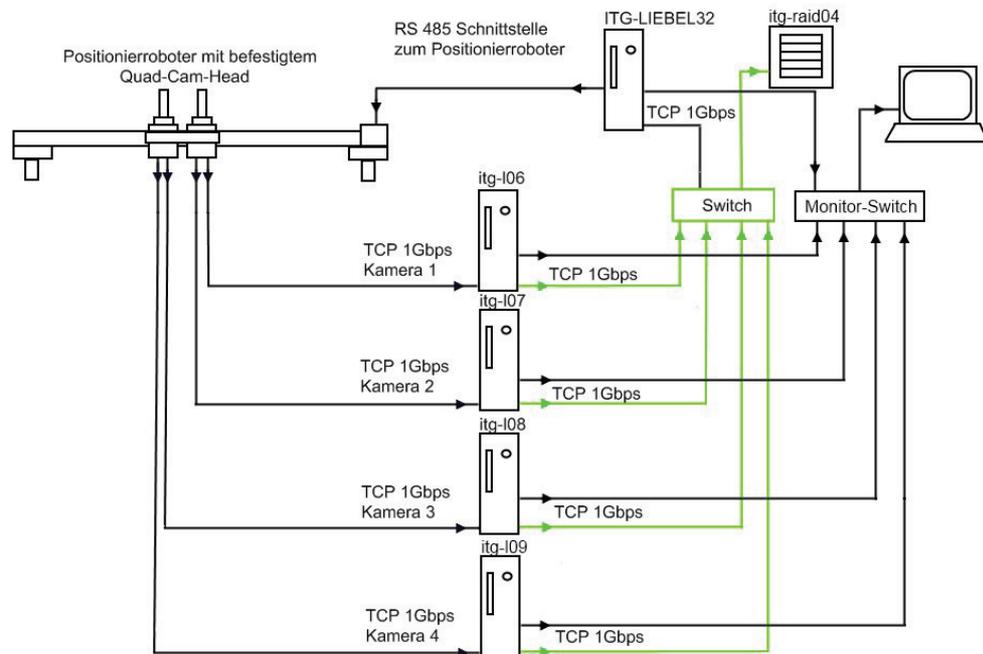


Abb. 4.3.: Darstellung des Datenflusses der Netzwerksteuerung des Parallelmikroskops (aus [122])

4.1.3. Software

In [122] wurde eine Software entwickelt, die das Aufnehmen der Kammern einer Mikrotiterplatte in verschiedenen Modi zulässt. Im ersten Modus werden Einzelbilder von jeder Kammer aufgenommen. Im zweiten Modus werden von jeder Kammer Serienbilder mit einer definierbaren Anzahl von Bildern und einer wählbaren Bildfrequenz (bis zu 15 FPS) aufgenommen. Im dritten Modus werden z-stacks von jeder Kammer gemacht, d.h. von jeder Kammer werden mehrere Bilder mit unterschiedlichen Fokuseinstellungen gemacht. Der Fisch wird damit in eine wählbare Anzahl an Schärfeebenen unterteilt.

Die drei Modi werden ergänzt durch die Möglichkeit die selbe Platte im selben Modus mehrfach hintereinander aufzunehmen. Die Wiederholungsdurchläufe werden als Zyklen bezeichnet. Mit der Zyklusoption können Langzeitbeobachtungen realisiert werden. Die Anzahl der Durchläufe sowie die Wartezeit zwischen zwei Zyklen werden vom Bediener vorgegeben. So können verschiedene Merkmale im Experiment ermittelt werden. Eine Beispielanwendung ist die Auf-

nahmen von Serienbildern mit einer Frequenz von ca. 2Hz und je 10 Bilder pro Fisch. Anhand solcher Serienreihen ist es möglich eine Beurteilung des Herzschlages vorzunehmen. Nach der Aufnahme von 96 solcher Zeitreihen kann in der Zyklusaufnahmeeinstellung die Platte erneut gescannt werden. Anhand einer möglichen Abweichung der Position des Embryos zwischen der ersten Zeitreihe und der zweiten, kann auf spontane Bewegungen des Embryos zurück geschlossen werden. Am Institut für Angewandte Informatik wurden in der Arbeitsgruppe Biosignalanalyse zur Extraktion des Herzschlages und der Spontanbewegung aus solchen Zeitreihen automatische Bildverarbeitungsalgorithmen entwickelt [4].

Für jede Untersuchung wird eine große Menge an Bildern pro Mikrotiterplatte aufgenommen. Die aufgenommenen Bilder sehen alle sehr ähnlich aus und es fehlen charakteristische Merkmale, die eine eindeutige Zuordnung des Bildes zu einer Kammer ermöglichen. Daher ist eine eindeutige Benennung der digitalen Daten nötig. Hierfür wird in [122] eine Nomenklatur festgelegt. Beim Start des Mikroskopiervorgangs muss der Bediener einen Ordnernamen für den Screen festlegen. In dem Ordner wird für jede Kammer ein Unterordner angelegt, der die Bilder jeder Kammer aufnimmt. Die Kammern einer 96er Mikrotiterplatte werden durch eine Beschriftung bestehend aus einer Kombination der Spaltenbezeichnung von A bis H und der Zeilenbezeichnung 1 bis 12 bezeichnet. Für das Parallelmikroskop werden die Unterordner die Kammerbeschriftungen aus Zeilenbeschriftung von 01 bis 12 und Spaltenbeschriftung von 01 bis 08 gekennzeichnet (also von 01.01 bis 12.08) bezeichnet. Für verschiedene Zyklen der selben Platte wird jeweils ein Ordner mit dem Namen Sequenz erstellt, in dem die von der Kammer aufgenommenen Bilder des Zyklusses gespeichert werden. Die Bilder selbst werden mit der Kammerbezeichnung 01...12 und A...H versehen. Weiter werden die Stacknummer, die Sequenznummer, die laufende Nummer des Bildes in der Sequenz und der Kammer im Dateinamen ergänzt. Außerdem wird ein Zeitstempel im Namen integriert, der das Format JJ.MM.TT.HH.MM.SS.MSMS hat. Durch die beschriebene Nomenklatur trägt jedes Bild eine Kennzeichnung, die eine Zuordnung innerhalb eines Screens eindeutig ermöglicht. Das ist essentiell zur Sicherung der Richtlinien zum guten, wissenschaftlichen Arbeiten, sodass es zu keinen Fehldeutungen durch Verwechslung von Bildern kommen kann. Ein Beispiel für eine korrekte Benennung ist in Abbildung 4.4

4.1.4. Evaluierung des Parallelmikroskops

Zum Nachweis der Funktionsfähigkeit des Parallelmikroskops wurden verschiedene Testreihen durchgeführt. Dazu wurden die verschiedenen Modi getestet und das aufgenommene Bildmaterial beurteilt. Die maximale Geschwindigkeit des Parallelmikroskops wurde durch das Abscannen zweier 96er Mikrotiterplatten im Einzelbildmodus ermittelt. Das Aufnehmen der beiden Platten mit je einem Bild pro Kammer dauert 40 Sek. Dabei werden 192 Bilder mit je 1,25 MB Größe gespeichert, wodurch sich eine Datensatzgröße von ca. 240 MB ergibt. Weiter wurde



Abb. 4.4.: Beispiel der Dateibenennung der Bilder des Parallelmikroskops (nach [122])

die Schnelligkeit beim Aufnehmen von Bildfolgen von jeder Kammer getestet. Dazu wurden zwei 96er Mikrotiterplatten gefüllt mit Zebrafischeiern mit je 10 Bildern pro Kammer und einer Bildfrequenz von 5 Hz (5 FPS) aufgenommen. Die gewählten Einstellungen sind geeignet, um den Herzschlag der Zebrafische zu untersuchen. Das Abscannen der beiden Platten mit diesen Einstellungen dauert 2 min 20 Sek. Die Einstellungen wurden auch im Zyklusmodus für Langzeitbeobachtungen getestet. Das vollständige Aufnehmen der Platten wurde dabei 25 Mal nacheinander durchgeführt. Zur Vergleichbarkeit mit dem Mikroskop Olympus ScanR wurde nach jeder Platte eine Wartezeit von 70 Sekunden definiert, sodass die gesamte Aufnahmedauer ca. 2 h entspricht, da das ScanR für die selbe Aufgabestellung ebenfalls 2 h benötigt. Es wurden zuverlässig 25 Zeitreihen à 10 Bilder von jeder Kammer aufgezeichnet. Auch die Beschriftung der Daten erfolgte fehlerfrei. Zur Überprüfung, ob die erzielte Bildqualität ausreichend für die angestrebten Untersuchungen ist, wurden die Bilder in der Arbeitsgruppe Mikut am KIT mit der automatischen Bildanalysesoftware Gait-CAD [66] ausgewertet. Eine Klassifizierung der Fische nach Häufigkeit der Spontanbewegung konnte automatisch erzielt werden. Die selbe Aufgabestellung wurde parallel mit einem Olympus ScanR durchgeführt. Die beiden zuvor erwähnten 96er Platten wurden auch auf dem ScanR aufgenommen. Die Aufnahme einer 96er Mikrotiterplatte als Zeitreihe mit 10 Bildern pro Kammer dauert ca. 5 Min. Die Bildfrequenz ist hierbei nicht einstellbar, sondern hängt von der Schnelligkeit des Shutters ab. Das Aufnehmen der geforderten 25 Zeitreihen dauert ohne Pause 2 h. Für die zweite Platte ist der Ablauf erneut für 2 h durchzuführen. Auch mit dem auf dem ScanR erzielten Material wurde eine automatische Klassifizierung der Fische nach Spontanbewegung durchgeführt. Das Ergebnis deckt sich mit dem Ergebnis des Parallelmikroskops.

Damit konnte gezeigt werden, dass das Parallelmikroskop für bestimmte Aufgabenstellungen die selben automatischen Untersuchungsergebnisse ermöglicht wie das etablierte ScanR. Gleichzeitig ist die Geschwindigkeit des Parallelmikroskops vier Mal so hoch wie die des ScanR. Das ScanR braucht für eine Zeitreihe mit 10 Bildern pro Platte 5 min. Das Parallelmikroskop kann Zeitreihen mit 10 Bildern von zwei Platten in 2 min 20 sek erstellen und ist damit

schneller.

In diesem Abschnitt wurde das entwickelte Parallelmikroskop vorgestellt. Aufbauend auf dem für das Automatisierungskonzept entwickelten Grundroboter wurde ein Funktionsmodul mit vier Kameras ergänzt, das zur Fokuseinstellung durch einen Mikroverstelltisch bewegt wird. Zur Steuerung des Mikroskops wurde ein Konzept nach dem Master-Slave-Prinzip entwickelt mit dem die großen Datenströme der Kameras von zugeordneten Einzelrechnern gespeichert werden. Als Anwendungsmodi wurden drei durch wählbare Parameter anpassbare Modi realisiert. Das Parallelmikroskop nimmt die Fische in Mikrotiterplatten mit hoher Geschwindigkeit auf. In einem Vergleich mit einem kommerziell verfügbaren Mikroskop konnte eine vierfach höhere Aufnahmegeschwindigkeit gezeigt werden. Gleichzeitig konnten aus dem aufgenommenen Datensatz die selben interessierenden Merkmale extrahiert werden wie beim kommerziellen Mikroskop.

4.2. Entwicklung des Herzschlagmikroskops

In diesem Abschnitt wird das entwickelte Herzschlagmikroskop vorgestellt. Das Herzschlagmikroskop ist ein bildverarbeitungsgestütztes Zoommikroskop, das das automatische Aufnehmen von interessierenden Bereichen in Proben ermöglicht. Im Folgenden wird zuerst das gewählte Konzept mit einer Übersichts- und einer Detailkamera erläutert. Danach werden die Hardwarekomponenten Grundroboter, Kameras und Objektive beschrieben. Daran schließt sich die Beschreibung der Software an. Die Software gliedert sich in die Hauptelemente Autofokus, Herzerkennung und Präzisierung der Herzposition. Für die Implementierung der Softwareelemente kommen verschiedene Bildverarbeitungstechniken zum Einsatz. Abschließend wird die Evaluierung des Herzschlagmikroskops anhand von Testaufnahmen beschrieben. Zusätzlich wird ein Anwendungsbeispiel vorgestellt, bei dem die vom Herzschlagmikroskop erstellten Daten durch eine automatische Bildanalyse ausgewertet wurden.

4.2.1. Konzept Herzschlagmikroskop

Für verschiedene Aufgabestellungen muss beim Mikroskopieren eine manuelle Auswahl interessierender Bereiche getroffen werden. Ein automatisches Mikroskopieren mit konstanten Einstellungen wie beim Parallelmikroskop ist für eine solche Fragestellung nicht möglich. Ein Beispiel dafür ist die Aufnahme von bestimmten Regionen innerhalb eines Zebrafisches. Werden Zebrafische in Mikrotiterplatten vorbereitet, so ist deren Position und Ausrichtung in der Kammer willkürlich. Mit einer Optik, die einen kleinen Teil des Fisches detailreich abbilden soll und daher nur ein Sichtfeld von 1x1 mm haben sollte, kann nicht in jeder Kammer (Durchmesser 9 mm) an der selben Stelle die Aufnahme gemacht werden. Die interessierende Region wird in jeder Kammer an anderen Koordinaten zu finden sein. Um die gewünschten Aufnahmen

machen zu können, wurde daher bisher manuell von einem Bediener die Probe so unter dem Mikroskop verschoben, dass der interessierende Bereich im Fokus liegt. Für eine Hochdurchsatzanwendung mit großen Probenumfängen ist das kein geeigneter Ansatz und es muss daher eine automatisierte Erkennung und Zentrierung von interessierenden Bereichen umgesetzt werden.

Ein Ansatz zur automatischen Mikroskopie solcher interessierenden Bereiche wurde am Institut für Toxikologie und Genetik (KIT) entwickelt und in [81] beschrieben. Zum leichteren Auffinden der interessierenden Region werden die Zebrafische in speziell angefertigten länglichen Vertiefungen positioniert. Damit wird eine Ausrichtung des Fisches erreicht, es erfordert jedoch im Vorfeld ein genaues Positionieren der Fische in den Vertiefungen. Hierbei ist wieder manueller Aufwand nötig. Das beschriebene Projekt zielt auf die Analyse der Hirnregion der Zebrafischlarven zur Untersuchung von Neuronen, die auf den Neurotransmitter Dopamin reagieren. Dabei wird der Kopf der Fische mittels Bildverarbeitung erkannt und das Mikroskop wird auf die identifizierte Region fokussiert. Hierfür ist es wichtig, dass die Fische in dorsaler Lage² zu sehen sind. Die Bildverarbeitung arbeitet mit einer Merkmalsextraktion [65], die anhand eines Beispielfisches kalibriert wird und dann die entsprechende Region in den folgenden Fischen der Untersuchung ebenso wiederfinden kann.

Die Analyse der Herzfunktion von Zebrafischen wird unter anderem dazu genutzt, um nach Medikamenten gegen Herzerkrankungen zu forschen. Da Herzerkrankungen beim Menschen die häufigste Todesursache in Deutschland sind [104], ist die Relevanz von Herzuntersuchungen mit Hilfe von Zebrafischen deutlich.

Zur Herzanalyse gibt es bereits einige Ansätze. In [24, 74] wird ein System zur automatischen Analyse von aufgenommenem Bildmaterial beschrieben. Das Bildmaterial von den Herzen muss jedoch per Hand aufgenommen werden. Auch in [113] wird ein Verfahren zur Frequenzanalyse der Herzen von Zebrafischen beschrieben. Es basiert jedoch auf Fluoreszenzdetektion und ist daher nur mit mutanten Fischen möglich. Auch kommerziell ist eine Software verfügbar, die anhand von Videomaterial den Herzschlag analysieren kann. Das Tool der Firma Viewpoint ermittelt die Herzfrequenz aus Zeitreihen. Das Material muss aber manuell aufgenommen werden.

In Zusammenarbeit mit der Uniklinik Heidelberg sowie der Uniklinik Ulm, wurde in der Fluidgruppe am KIT die Aufgabestellung für ein Mikroskop erarbeitet, das einen automatischen, mehrstufigen Prozess abarbeiten kann. Dabei sollen automatisch Herzen von Zebrafischlarven erkannt und in Form einer Videosequenz aufgenommen werden.

In [44] und [100] wurde zur Lösung der Aufgabestellung ein automatisches Robotermikroskop entwickelt, mit dem die Herzregion als interessierender Bereich automatisch erkannt und aufgenommen werden kann. Zur Hochdurchsatzzeichnung werden die Fische in Standardmikro-

²dorsal = rückseits, vom Rücken betrachtet

titerplatten vorbereitet. Das Befüllen der Platten kann mit Hilfe des Fischsortierers automatisch stattfinden. Da die Lage der einzelnen Fische in den Kammern wahllos ist, wird in einem ersten Schritt der Fisch in der Kammer lokalisiert und in einem zweiten Schritt wird die Herzposition ermittelt. Vom Herzen werden dann die gewünschten Aufnahmen gemacht. Damit kann im Format von 96er Mikrotiterplatten ein automatisches Aufnehmen der Herzregion der Fische dargestellt werden [101].

Zur Umsetzung des mehrstufigen Prozesses mit Lokalisierung des Fisches, Erkennung der Herzregion und Nahaufnahme eines Teilbereiches, ist eine Optik nötig, die verschiedene Vergrößerungsstufen zulässt. Hierfür gibt es motorisierte Zoomobjektive, die eine computergesteuerte Veränderung der Vergrößerung zulassen, aber sowohl sehr teuer wie auch sehr groß sind. Die Tubuslängen bewegen sich meist in Bereichen von weit über 100 mm. Die Baugröße erschwert den Einsatz im entwickelten Robotersystem, da der optische Aufbau aus Roboter, Kamera mit Objektiv, Objekt und Beleuchtung sehr hoch wird.

Das neue Konzept besteht darin, zwei Kameras mit je einem Objektiv mit fester Vergrößerung zu verwenden. Die beiden Kameras können dann durch den Roboter bewegt werden und so abwechselnd auf das selbe Objekt fokussiert werden.

Das Herzschlagmikroskop trägt zwei Kameras, eine Kamera mit 1,5 facher Vergrößerung zur Abbildung einer vollständigen Kammer. Eine zweite Kamera mit einem Objektiv mit vierfacher Vergrößerung ermöglicht die Abbildung eines Bildbereiches von 2,5x3 mm. Ein Algorithmus zur Erkennung der Herzregion anhand des Übersichtsbildes wurde in [44] entwickelt und in [100] modifiziert und erweitert. Die softwaregestützte, automatische Erkennung der Herzposition ermöglicht die genaue Positionierung der Detailkamera unter der Herzposition. Da beide Kameras mit dem selben Drei-Achs-Mechanismus bewegt werden, muss nach jedem Wechsel zwischen Übersichts- und Detailkamera eine Neufokussierung des Objekts stattfinden. Realisiert wird das über einen Autofokusalgorithmus [100]. Das Zwei-Kamera-Konzept ist in Abbildung 4.5 zu sehen. Die beiden Kameras befinden sich in einem gemeinsamen Halter und werden durch den Roboter unterhalb der Mikrotiterplatte (oberer Bildrand) bewegt. Rechts im Bild ist die Übersichtskamera und ein Beispiel für einen aufgenommenen Bildausschnitt zu sehen. Links im Bild ist die Detailkamera zu sehen und der Detailausschnitt, der durch sie aufgenommen wird.

Der automatische Scanprozess des Herzschlagmikroskops beginnt mit einem Übersichtsbild der Kammer. Hierfür wird die Übersichtskamera mittig unter der entsprechenden Kammer positioniert und mittels der Autofokusprozedur ein scharfes Bild eingestellt. Die Positionen für die Übersichtsbilder sind fest vorgegeben und sind immer in der Mitte der Kammer. Anhand des aufgenommenen Übersichtsbildes wird mittels Bildverarbeitung die Position des Fisches erkannt. Innerhalb des Fisches wird anhand charakteristischer Merkmale die Position des Herzens ermittelt. Die gefundenen Koordinaten des Herzens werden vom Roboter so angefahren,

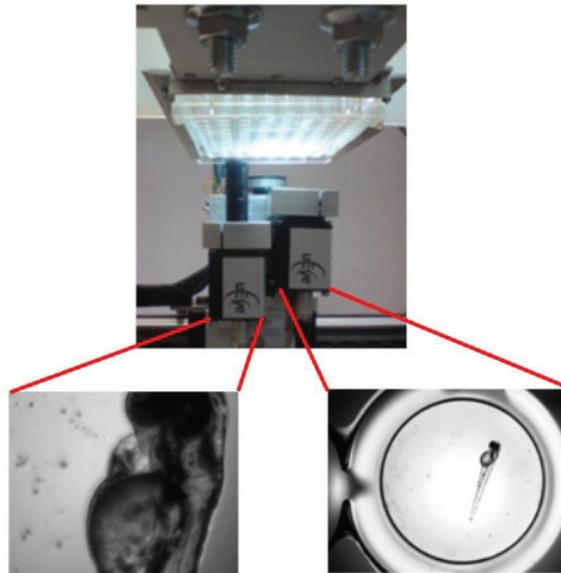


Abb. 4.5.: Übersicht Zwei-Kamera-Konzept im Herzschlagmikroskop. links: Detailkamera, rechts: Übersichtskamera

dass die Detailkamera das Herz mittig abbildet. Nach erneuter Scharfstellung des Autofokusalgorithmus wird die Auflösung des Detailbildes reduziert und es wird nur ein Ausschnitt aufgenommen, um eine hohe Bildrate erreichen zu können. Hierzu werden mit voller Auflösung zwei Bilder schnell hintereinander aufgenommen. Anhand der Bilder wird die präzisierte Herzposition im Bild mit voller Auflösung ermittelt. Softwareseitig gesteuert wird dann durch die Kamera nur der Ausschnitt aufgenommen, in dem das Herz erkannt wurde. Von dem Ausschnitt wird dann eine Bildfolge mit einstellbarer Bildrate bis zu 30 FPS und wählbarer Bildanzahl aufgenommen. Danach wird mit den weiteren Kammern der Platte gleichermaßen verfahren.

Die für die Realisierung der Funktion nötigen Komponenten der Hardware und der Software werden im Folgenden beschrieben.

4.2.2. Hardwarekomponenten

Die nötigen Hardwarekomponenten des Herzschlagmikroskops sind der Roboter, die Kameras und die Objektive. Die Details der Komponenten werden im folgenden Abschnitt dargestellt.

Roboter

Realisiert wird für den Mikroskoproboter wiederum ein Durchlichtaufbau. Die Beleuchtung befindet sich über der Mikrotiterplatte. Der Grundroboter besteht aus Zahnriemen-Linearachsen, angetrieben von Schrittmotoren, und ermöglicht die Bewegung in x-y Richtung. Die Mikrotiterplatte wird in einem Halter fest fixiert. Der Roboter bewegt die Kameras unter der Mikro-

titerplatte. Zur Fokussierung kommt ein Mikroverstellisch Typ Owis VT45 (Datenblatt siehe Anhang A.2) zum Einsatz. Der Mikroverstellisch wurde wie im Parallelmikroskop durch einen Schrittmotor und Ansteuerung über einen Zahnriementrieb motorisiert. Damit ergibt sich ein kleinster Stellschritt von $2,5 \mu\text{m}$.

Der Kamerahalter muss so gestaltet sein, dass die Kameras möglichst die selbe Fokusebene haben. Die für die Aufnahmen passenden Kameras haben unterschiedliche Arbeitsabstände. Um die selbe Fokusebene zu haben, müssen sie daher in unterschiedlichen Höhen montiert werden. Hierfür wurde in [44] ein Adapter konstruiert, der die beiden Kameras im richtigen Abstand zueinander fixiert. Der Adapter mit den beiden Kameras wird mit dem Mikroverstellisch verbunden. Die genauen Größen der nötigen geometrischen Abstände wurden bei der Auslegung der Kameras und der Objektive festgelegt.

Das entwickelte Herzschlagmikroskop ist in Abbildung 4.6 zu sehen. Es setzt sich zusammen aus dem Grundroboter und dem in [44] entwickelten Zwei-Kamera-Modul. Unten links ist der Roboter aufgebaut aus den Achsen x, y und z gezeigt. Am Wagen der z -Achse ist der Halter für die Detailkamera (DC) und die Übersichtskamera (OC) befestigt. Oberhalb des Roboters ist die Halterung für die well plate (WP) befestigt. Oben Links im Bild ist das Herzschlagmikroskop seitlich von unten zu sehen. Erkennbar ist, dass die Übersichtskamera und die Detailkamera nebeneinander unterhalb der Mikrotiterplatte angebracht sind. Unterhalb der x -Achse (rechts) befinden sich die Steuerung sowie die Spannungsversorgung des Roboters. Rechts oben im Bild ist eine Detailaufnahme des Zwei-Kamera-Moduls zu sehen. Unten rechts ist ein Beispiel für eine Übersichtsaufnahme und die zugehörige Detailaufnahme des Herzbereichs dargestellt.

Kameras

Zum Einsatz können Farbkameras oder Graustufenkameras kommen. Die Farbkamera eröffnet mehr Möglichkeiten als die Graustufenkamera, weil das rote Blut im Herzen möglicherweise auf Grund der Farbinformation detektiert werden kann. Zur Darstellung der Farbinformation können verschiedene Farbräume verwendet werden. Additive Farbmischung in RGB (Rot, Grün, Blau) und HSB (Farbton(Hue), Sättigung(Saturation), Helligkeit (Brightness)) sind zwei Optionen. Jeder Farbton wird hierbei durch eine Kombination der drei jeweiligen Grundeigenschaften eindeutig beschrieben.

Zur Aufnahme der Herzen von Zebrafischen muss eine Mindestframerate erreicht werden. Die nötige Bildrate muss schneller sein als der Herzschlag, sodass die Bewegung des Herzens in Einzelbildern aufgelöst werden kann. Die Mindestframerate muss von der Kamera und dem zur Übertragung verwendeten Kameraprotokoll erreicht werden, weiter muss auch die Schreibgeschwindigkeit auf der Festplatte ausreichend sein. Nach dem Abtasttheorem nach Nyquist muss zur Analyse eines Signals mindestens mit doppelter Frequenz abgetastet werden. Ein gesunder Zebrafisch hat einen Herzschlagrhythmus von ca. 2 Hz. Es muss also mit mindestens

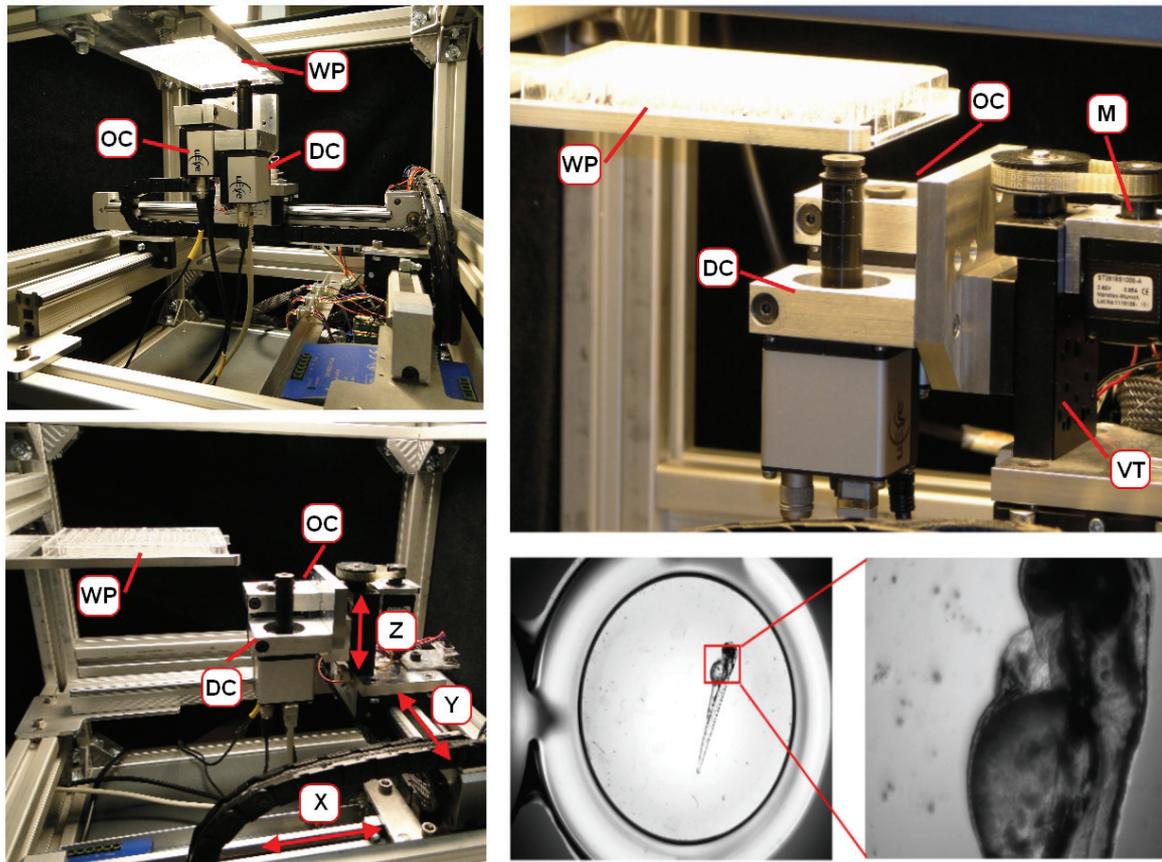


Abb. 4.6.: Übersicht über das neue Herzschlagmikroskop: WP= Mikrotiterplatte, OC= Übersichtskamera, DC= Detailkamera, VT= Verstelltisch, M=Schrittmotor, x-,y-,z-Achse; rechts unten: Beispielbild Übersicht (links) und Detail (rechts)

4 Hz, also 4 frames per second (FPS), aufgezeichnet werden, um zuverlässig jeden Schlag detektieren zu können. Auf Grund der Nichteignung von Zoomobjektiven wegen des zu hohen Platzbedarfs werden die Digitalkameras von IDS verwendet, die bereits mehrfach im Projekt Verwendung fanden: IDS Typ uEye UI-5480SE-C (Datenblatt siehe Anhang A.2). Mit den Kameras kann eine Bildfrequenz von 30 FPS erreicht werden. Somit wird jeder Herzschlag mit 15 Bildern aufgelöst. Die Bildrate übertrifft damit die geforderte Grenzfrequenz von 4 FPS um ein Vielfaches.

Objektive

Zur Realisierung der Aufgabe müssen adäquate Objektive ausgewählt werden. Die Kameras werden zusammen an dem z-Verstelltisch montiert und daher müssen die Objektive in ihrem Arbeitsabstand auf einander abgestimmt werden. Mit beiden Kameras soll das selbe Objekt nacheinander fokussiert werden. Mit der Linsengleichung (Gl. 2.4) können für Arbeitsabstand und Bildweite entsprechende Werte berechnet und eine passende Brennweite der Linsen ausge-

wählt werden.

Mit der Übersichtskamera soll eine Kammer mit einem Durchmesser von 9 mm vollständig abgebildet werden. Die Kamera hat einen Sensor mit einer Größe von 1/1,8“. Der Pixelabstand beträgt $5,3 \mu\text{m}$ und die Sensorfläche mit 1280×1024 Pixeln hat damit Abmessungen von 6,8 mm x 5,4 mm. Da die Kammer komplett abgebildet werden soll, muss die kurze Seite mindestens so groß wie der abgebildete Durchmesser der Kammer sein. Gemäß Gl. [2.4] gilt für die nötige Vergrößerung der Übersichtskamera A_{OC} :

$$A_{OC} = \frac{6,784\text{mm}}{9\text{mm}} = 0,75 \quad [4.1]$$

Bei der Detailkamera soll der Bereich des Herzens abgebildet werden. Anhand von exemplarischen Testaufnahmen wurde zur Darstellung des Herzens (Breite ca. $50 \mu\text{m}$) ein geeigneter Bildausschnitt mit den Abmessungen von $1,7 \times 1,7$ mm ermittelt. Der Ausschnitt ist groß genug, um auch bei geringer Abweichung der erkannten Position eine Abbildung des Herzens zu gewährleisten. Damit ergibt sich eine nötige Vergrößerung der Detailkamera A_{DC} von:

$$A_{DC} = \frac{6,784\text{mm}}{1,7\text{mm}} = 4 \quad [4.2]$$

Eine weitere Einschränkung bei der Wahl der Objektive birgt der Bauraum. Die Gegenstandsweite, also der Arbeitsabstand, muss so groß sein, dass ein Fisch in der Mikrotiterplatte scharf abgebildet werden kann, ohne dass das Objektiv an die Unterkante der Halterung oder der Mikrotiterplatte stoßen kann. Als Extremfall wird angenommen, ein Fisch befindet sich ganz oben in einer vollständig gefüllten Kammer. Die Höhe der Mikrotiterplatte beträgt ca. 14 mm und die Dicke der Halterung beträgt 1 mm. Der minimale Arbeitsabstand wird daher mit 15 mm festgelegt.

Variabel bei der Auswahl der Objektive nach der Linsengleichung sind nun nur noch die Brennweite f und die Bildweite b , anhand derer geeignete Objektive ausgewählt werden müssen. Die Bildweite b , respektive die Tubuslänge zwischen Sensor und Linse, kann durch Zwischenringe leicht angepasst werden. Linsen gibt es nur in bestimmten handelsüblichen Brennweiten. Daher wird eine Objektivauswahl anhand der Brennweite getroffen. Die sich ergebende Bildweite wird dann mit Distanzringen eingestellt. Für die Übersichtskamera muss eine Mindestbrennweite von $f_{OC} = 6,6$ erreicht werden, für die Detailaufnahme eine Mindestbrennweite von $f_{DC} = 12$.

4.2.3. Software

Zur Erfüllung der Aufgabe müssen verschiedene Softwarekomponenten verwendet werden. Nötig sind eine Steuerungskomponente für die Bewegung des Roboters, eine Fokuskomponen-

te für scharfe Abbildungen sowie eine Bildauswertung zur Ermittlung der Herzposition. Die Steuerungssoftware muss die beiden Kameras so verfahren, dass sie abwechselnd auf das selbe Objekt fokussiert werden. Die Fische befinden sich in den Kammern manchmal in unterschiedlichen Höhen. Um trotzdem zuverlässig alle Fische scharf abzubilden, muss der Arbeitsabstand der Kamera zum Fisch angepasst werden. Zur Erkennung des richtigen Abstandes, also wann das Bild scharf ist, wird ein Autofokusalgorithmus [44, 100] implementiert. Im scharfen Übersichtsbild muss der Fisch erkannt und vom Hintergrund getrennt werden. Dazu werden Bildverarbeitungswerkzeuge wie morphologische Operatoren [17, 112] und Segmentierung [22, 112] eingesetzt. Innerhalb des isolierten Fisches kann dann die Ermittlung der Herzposition durchgeführt werden. Hierbei werden charakteristische Merkmale des Bildes ausgewertet. Zur Präzisierung der Herzposition, um die AOI (area of interest) mit begrenzter Auflösung richtig zu positionieren, wird eine Differenzbildanalyse [10, 22] eingesetzt.

Die im Rahmen der Arbeiten [44, 100] entwickelten Softwarekomponenten für Autofokus, Herzerkennung und Präzisierung der Herzposition werden im Folgenden beschrieben.

Autofokus

Zur automatischen Scharfstellung einer Einstellung muss ein Schärfemerkmale im Bild definiert werden. Ein Bild ist dann scharf, wenn Konturen im Bild sehr gut gegenüber ihrer Umgebung abgegrenzt werden können. Bei einem unscharfen Bild verschwimmt die Kontur mit der Umgebung. In einem digitalen Bild äußert sich das in der Form, dass bei scharf abgebildeter Kontur die umliegenden Pixel stark abweichende Helligkeitswerte haben. Bei einem unscharfen Bild gibt es einen eher kontinuierlichen Verlauf von Kontur zur Umgebung. Mathematisch kann dieser Fakt mittels der Richtungsableitung von einem Pixel zum nächsten beschrieben werden. Wird eine Funktion definiert, die die Helligkeitswerte der Pixel einer Zeile und eine zweite mit den Helligkeitswerten der Spalten umfasst, so findet sich an jeder Kontur eine Änderung der Helligkeit. Wie stark die Änderung ist, wird durch die Steigung der Ableitung beschrieben. Ist die Steigung groß, ist die Änderung der Helligkeit groß und damit lässt sich auf eine Kontur schließen (siehe Abbildung 4.7). Durch einen Autofokusalgorithmus wird daher in Spalten- sowie in Zeilenrichtung zu jedem Pixel die Ableitung der Helligkeitswerte betrachtet. Die berechneten Steigungswerte werden aufsummiert. Ein Beispiel für einen solchen ableitungsbasierten Kennwert ist der sogenannte Sobelindex [10, 105]. Zwei Bilder, die das selbe Objekt zeigen, aber unterschiedlich scharf das Objekt darstellen, können mit dem Sobelindex unterschieden werden. Das unscharfe Bild wird einen niedrigen Sobelindex aufweisen, das scharfe dagegen einen hohen Wert. Anhand des Sobelindex kann entschieden werden, ob ein Bild scharf ist oder nicht. Der Sobeloperator ist ein Hochpassfilter und zählt damit zu den linearen Filtern. Am Beispiel des Sobelindex lässt sich sehen, dass Kantenmerkmale durch lineare Filter gefunden werden können [112].

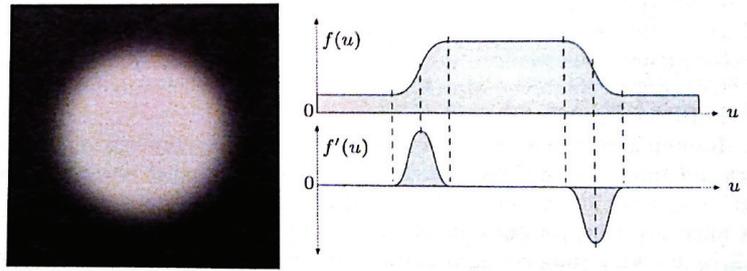


Abb. 4.7.: Kantenerkennung mittels Ableitung der Intensitätsfunktion, links: zu erkennender Rand des Kreises, rechts oben: Intensitätsverlauf im Bild von links nach rechts, rechts unten: Ableitung des Intensitätsverlaufs (aus [10])

Mit dem Sobeloperator wird in einer linearen Faltungsoperation ein Kantenbild erstellt. Mathematisch dient der Sobeloperator hierbei als richtungsabhängiger Faltungskern. Er hat nach [10] folgende Teile:

$$H_x^S = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -2 & 0 & 2 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad \text{und} \quad H_y^S = \begin{bmatrix} -1 & -2 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 2 & 1 \end{bmatrix} \quad [4.3]$$

Als Ergebnis der beiden Faltungen des Bildes I mit den Faltungskernen H_x und H_y ergeben sich die beiden Kantenbilder D_x und D_y zu:

$$D_x = H_x * I \quad \text{und} \quad D_y = H_y * I \quad [4.4]$$

Die Kantenstärke ergibt sich damit als Betrag des Kantenbildes:

$$D = \sqrt{D_x^2 + D_y^2} \quad [4.5]$$

Neben der beschriebenen Schärfekennung mit Hilfe des Sobeloperators gibt es noch weitere Verfahren. In [25] wird ein Überblick über Autofokusmethoden gegeben. Autofokusmethoden werden eingeteilt anhand der Grundkonzepte basierend auf Kantendetektion, basierend auf Histogramm oder basierend auf Varianz und Entropie. In [37] werden die Methoden Kantendetektion und Varianz als beste für Autofokusalgorithmen ermittelt. Wichtig hierbei ist der Verlauf der Schärfefunktion. Die Schärfefunktion ist geeignet zur automatischen Erkennung eines scharfen Bildes, wenn es ein definiertes Maximum gibt. Gleichzeitig ermöglicht ein gleichmäßiger Verlauf konstanter Steigung vor und nach dem Maximum eine Abschätzung der weiteren Suchrichtung bei der Suche nach dem Maximum. Ein Vergleich von Kantendetektionen wurde durchgeführt in [60]. Dabei werden die kantenbasierten Schärfemaße nach den Methoden mit Roberts-Operator [10], Gradienten-Vektor [112], Gradienten-Quadrat [60], Tenengrad [71]

und Sobeloperator [10] verglichen. Alle Algorithmen liefern ähnliche Ergebnisse, sind ähnlich schnell, bis auf den Tenengrad-Algorithmus, der doppelt so lange dauert.

Um ein scharfes Bild erkennen zu können, werden mehrere Bilder vom selben Bildausschnitt nacheinander aufgenommen. Nach jedem Bild wird die Fokuseinstellung um einen festen Wert verstellt, indem der Arbeitsabstand der Kamera verändert wird. Das Objekt wird somit in verschiedenen Schärfeebenen aufgenommen. Die aufgenommenen Bilder werden dann mit dem Kantenerkennungsalgorithmus mit Sobeloperator ausgewertet. Das Bild mit dem höchsten Wert stellt die schärfste Abbildung da. Nach dem beschriebenen Vorgehen wurde in [44] eine Testreihe durchgeführt. Deren Ergebnisse sind in Abbildung 4.8 gezeigt. Zu sehen sind 5 Abbildungen des selben Motivs. Von links bis zur Mitte nimmt die Schärfe zu, von der Mitte nach rechts nimmt sie wieder ab. Die Bildfolge wurde erstellt, indem nach jedem Bild die Kamera weiter an das Objekt angenähert wurde (im Bild links unten). Rechts unten im Bild sind die zu den Bildern gehörenden Werte des Sobelindex dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, dass das mittlere Bild den mit Abstand größten Sobelindex hat und es damit die schärfste Abbildung darstellt.

Beim Abfahren der verschiedenen Arbeitsabstände und Ermitteln der Schärfewerte kann eine lokale oder globale Suchstrategie verfolgt werden. Bei globalen Suchstrategien wird nach dem Aufnehmen aller Bilder entschieden, welcher aufgenommene Schärfewert während der Annäherung der Kamera an das Objekt der größte war. Bei lokaler Strategie wird an einer Kameraposition begonnen Bewegungen in einer Richtung zu machen und solange fortzufahren, bis ein Abbruchkriterium erreicht ist. Danach wird die andere Seite abgesucht.

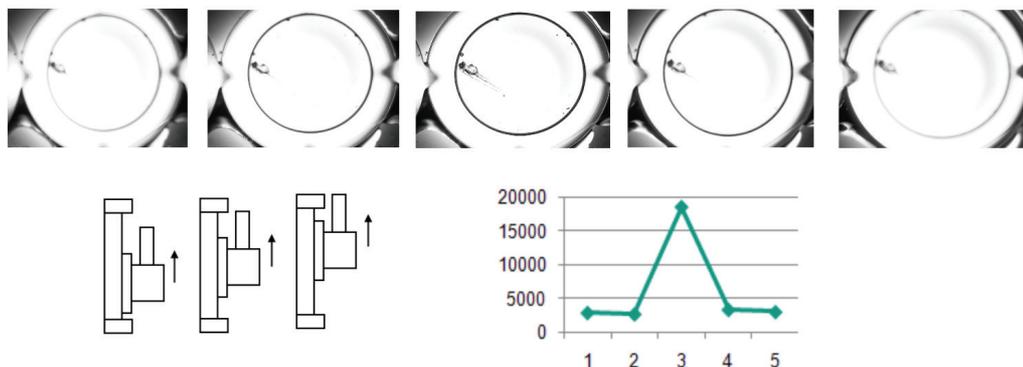


Abb. 4.8.: Bildserie bei Autofokus; oben: Bildserie bei Annäherung an Objekt; unten links: Annäherung der Kamera an Objekt; unten rechts: Sobelindex der fünf Bilder. Das Bild in der Mitte hat den höchsten Sobelindex und ist demnach das schärfste. (modifiziert nach [44])

Zur Auswahl eines geeigneten Schärfekriteriums werden in [101] Varianzmethode und Sobeloperator untersucht. Der jeweilige Kennwert wird für eine Beispielbildreihe einer Fokusfahrt errechnet. Zwischen den Bildern wird die Kamera jeweils um eine feste Strecke in z-Richtung dem Objekt angenähert. Der damit zu erwartende Schärfeverlauf beginnt mit einer unscharfen

Abbildung auf Grund des zu großen Abstands. Einige wenige Bilder im richtigen Fokusabstand zeigen ein scharfes Bild. Mit fortschreitender Annäherung wird die Schärfe wieder abnehmen, auf Grund von zu geringer Distanz zum Objekt. Da die Objektive der beiden Kameras unterschiedliche Schärfentiefen realisieren, werden die Schärfekennwerte für die Übersichtskamera und die Detailkamera getrennt betrachtet. Das Bild wird im ersten Schritt mit dem Sobeloperator gefiltert. Danach werden die Pixelwerte des nach Gl. [4.5] entstehenden Kantenbildes D aufsummiert und durch die Bildbreite m und -höhe n normiert. Für den so zu berechnenden Sobelindex gilt [101]:

$$S_{Sobel} = \frac{1}{m \cdot n} \sum_{x=1}^n \sum_{y=1}^m D(x,y) \quad [4.6]$$

Der Varianzkennwert berechnet sich nach folgender Formel:

$$S_{Varianz} = \frac{1}{m \cdot n} \sum_{x=1}^n \sum_{y=1}^m (B(x,y) - \mu)^2 \quad [4.7]$$

wobei μ den Mittelwert der einzelnen Pixelwerte $\mathbf{B}(x,y)$ des Bildes \mathbf{B} darstellt:

$$\mu = \frac{1}{m \cdot n} \sum_{x=1}^n \sum_{y=1}^m B(x,y) \quad [4.8]$$

Wie in Abbildung 4.9 zu sehen ist, zeigt der Sobelkennwert ein definiertes Maximum für beide Kameras. Die Varianzmethode prägt ebenfalls ein deutliches Maximum in der Übersichtsaufnahme aus, jedoch ist für die Detailaufnahme eine präzise Erkennung des schärfsten Bildes auf Grund des Fehlens eines exponierten Maximums nicht möglich. Da der Sobelindex bei beiden Kameras ähnlich gute Ergebnisse zeigt, wird er als Schärfekriterium für den Autofokusalgorithmus gewählt.

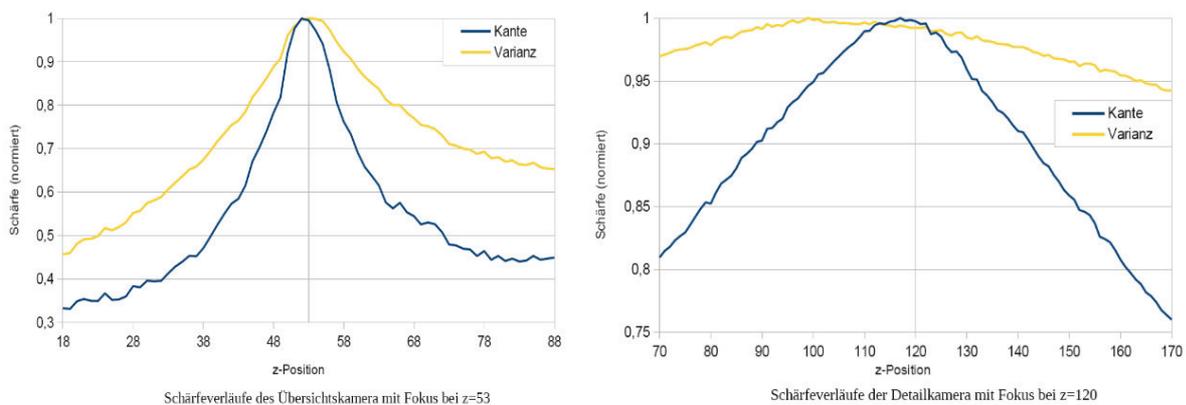


Abb. 4.9.: links: Schärfeverlauf der Übersichtskamera, rechts: Schärfeverlauf der Detailkamera (aus [100])

Herzerkennung

Zur Herzerkennung muss im ersten Schritt der Fisch in der Kammer der Mikrotiterplatte erkannt und damit vom Hintergrund getrennt werden. Innerhalb der Konturen des erkannten Fisches muss dann ein charakteristisches Merkmal gefunden werden, das die Position des Herzens angibt.

Hierzu wurde in [100] eine Fischerkennung mittels Segmentierung erarbeitet. Weiterhin wurde zur Erkennung der Herzposition im Fisch als charakteristisches Merkmal der Intensitätsverlauf entlang der Längsachse identifiziert und es wurde ein Softwaremodul zur Berechnung der Position anhand des Merkmals implementiert.

Zur Trennung des Fisches vom Hintergrund wird das Bild segmentiert. Zur Segmentierung kann ein Schwellwert eingesetzt werden. Die Segmentierung mit Schwellwert funktioniert jedoch nur zuverlässig, wenn die Grauwerte im Hintergrund und im Vordergrund stark unterschiedlich sind. Versuche mit Schwellwerten haben gezeigt, dass der Fisch sich nicht stark genug vom Hintergrund abhebt. Ein weiteres Mittel zur Segmentierung von Strukturen in digitalen Bildern ist die Kantenerkennung. Vor Beginn einer Kantenerkennung sollten im dem Bild Störungen reduziert bzw. eliminiert werden. Hierfür gibt es Pixeloperationen wie Dilatation, Erosion, Opening und Closing [17, 22, 105, 112].

In dem in [100] entwickelten, aus Bildverarbeitungsgrundfunktionen aufgebauten Algorithmus zur Trennung von Fischen vom Hintergrund wird als erstes eine Grauwertspreizung vorgenommen, um den Kontrast im Bild zu erhöhen. Mittels Sobeloperator werden im nächsten Schritt die Kanten im Bild detektiert. Mit Dilatation werden hohle Strukturen gefüllt und unterbrochene Kanten verbunden. Die darauffolgende Erosion löscht kleine Pixelobjekte aus. Zur Herstellung des originalen Flächeninhalts des Fisches wird erneut eine Dilatation durchgeführt. Das größte Objekt im Bild wird ausgewählt und es wird durch eine konvexe Hülle umrandet. Eine konvexe Hülle ist das kleinste Polygon, das die Fläche des Objekts vollständig umrandet [10, 106]. Die Veränderung des Originalbildes bis hin zum segmentierten Fisch ist in Abbildung 4.10 zu sehen. Von A zu B wird die Wirkung der Grauwertspreizung deutlich. In C wurden die Kanten erkannt und sie wurden in ein Binärbild überführt. In D wurden mit Erosionen die kleinen Störstrukturen eliminiert. Von D nach E wurde mit Dilatationen die Ursprungsgröße des Fisches wieder hergestellt. F zeigt die gefundene konvexe Hülle des vom Hintergrund getrennten Fisches. Mit der erhaltenen Maske wird aus dem Originalbild der Fisch ausgeschnitten. Das Ergebnis der Segmentierung ist also das Grauwertbild des Fisches getrennt vom Hintergrund.

Im herausgearbeiteten Grauwertbild des Fisches wird als nächster Schritt des Algorithmus die Herzposition anhand eines charakteristischen Merkmals ermittelt. Hierfür wurden verschiedene mögliche Merkmale betrachtet. Durch die Wahl der Auflösung der optischen Komponenten ergibt sich, dass das Herz als Pixelfläche mit einem Flächeninhalt von 250 Pixel repräsentiert wird. Weder über die äußere Kontur, noch über den Flächeninhalt, noch über die Grauwert-

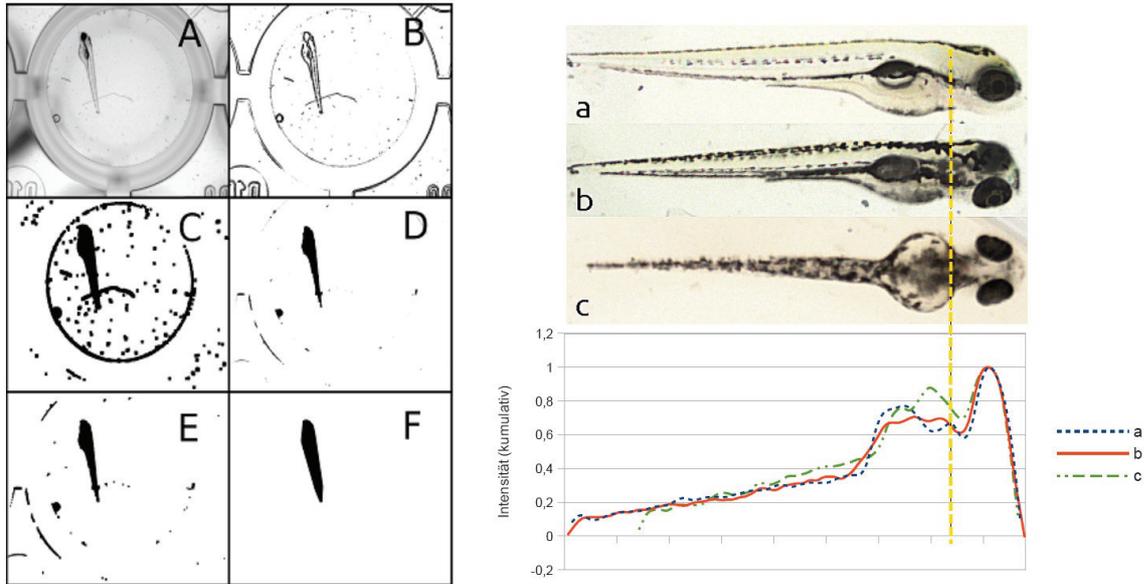


Abb. 4.10.: links: Segmentierung zum Finden der Fischkontur, rechts: Herzerkennung mittels Intensitätsgraph anhand der drei Ausrichtungen a,b und c einer Larve (tatsächliche Herzposition markiert durch gelbe, vertikale Linie) (aus [100])

verteilung kann das Herz innerhalb des Fischbildes erkannt werden. Die Position des Herzens kann aber indirekt bestimmt werden, da das Herz im Fisch immer zwischen dem Kopf und dem Dottersack ist. In einer Darstellung der Intensitätswerte entlang der Längsachse des Fisches lassen sich der Kopf sowie der Dottersack zweifelsfrei identifizieren. Die Anhäufung dunkler Pixel im Augenbereich sowie die dunklen Pixel im dicken Dottersack sind klar als Peaks im Intensitätsgraph zu erkennen. In Abbildung 4.10 sind die Intensitätsgraphen eines Fisches in drei verschiedenen Lagen a,b und c gezeigt. Ein Polynom dritten Grades (geglättete kubische Splinekurve) wird so angenähert, dass es in guter Näherung dem tatsächlichen Intensitätsgraph entspricht [100]. Die drei Polynome für die Lagen a,b und c sind anhand der Lagebilder des Fisches a,b,c ermittelt worden. Die dunklen Flächen der Augen und des Dottersacks sind gut als lokale Maxima zu erkennen. Anhand der kontinuierlichen Funktion der Intensität können die beiden Maxima und das dazwischenliegende lokale Minimum analytisch bestimmt werden. Im Bild zu erkennen ist, dass die tatsächliche Herzposition (markiert durch gelbe, vertikale Linie) auf der Längsachse in hinreichendem Maß mit der Position des lokalen Intensitätsminimums übereinstimmt. Auch in lateraler Richtung wird eine Intensitätsverteilung errechnet. In guter Näherung befindet sich das Herz immer auf der Mittelachse des Fisches.

Die gefundene Herzposition in Form von Pixellängen bezogen auf das Ende des Fisches werden im Bild als Pixellängen bezogen auf die Bildränder umgerechnet. Mit der optischen Auflösung des Aufbaus kann somit die Position des Fischherzens innerhalb des Bildes in mm beschrieben werden. Durch die TCP Konvention (siehe Abs. 2.3.1) ist der Mittelpunkt der Über-

sichtskamera der Werkzeugmittelpunkt. Die Detailkamera ist durch einen in x- und y-Richtung starren Halter mit der Übersichtskamera verbunden. Die Berechnung der nötigen Position der Übersichtskamera, sodass die Detailkamera direkt unter der erkannten Position ist, geschieht analog zur Berechnung der Koordinaten im Fischsortierer (siehe Gl. [3.3]) als vektorielle Addition aus dem Abstand der Herzposition vom Mittelpunkt des Übersichtsbildes und dem Offset beider Kameramittelpunkte.

Präzisierung der Herzposition

Eine konstante Speicherrate ist für die Auswertung der Herzfrequenz wichtig. Die volle Auflösung der Kamera von 1280x1024 ist für die angestrebte Bildrate von 30 FPS nicht möglich, da die Bilder nicht schnell genug gespeichert werden können. Tests im Rahmen der Arbeit haben gezeigt, dass für eine Framerate von 30 FPS nur eine Auflösung von 800x640 möglich ist. Durch das Setzen einer Area of Interest (AOI) im Bild, können die Kameras auf einen Bildausschnitt mit gewählter Auflösung beschränkt werden. Durch die Kombination aus mechanischer Ungenauigkeit beim Positionieren der Detailkamera sowie Ungenauigkeiten beim Erkennen und Berechnen der Herzposition ist das Herz nicht immer im Zentrum des Detailbildes. Wird der Zuschnitt der AOI fest mittig gewählt, kann es vorkommen, dass das Herz auf manchen Bildern nicht zu sehen ist, obwohl es auf der Aufnahme mit voller Auflösung sichtbar war. Um das zu verhindern, wird hierzu in [100] eine zusätzliche Herzerkennung entwickelt. Mittels Bildverarbeitung wird aus den Bildern mit voller Auflösung die genaue Position des Herzens im Bild ermittelt. Hierzu werden im Abstand von 200 ms zwei Bilder in voller Auflösung mit der Detailkamera an der detektierten Position gemacht. Unter der Annahme, dass auch auf diesen beiden Aufnahmen das Herz zu sehen ist und unter der weiteren Annahme, dass es schlägt, kann zur Detektion eine Differenzbildanalyse durchgeführt werden. Die beiden Bilder werden von einander subtrahiert. Übrig bleiben nach der Operation nur die Pixel, die in beiden Bildern unterschiedlich waren. Durch die Bewegung des Herzens während der Fisch in Ruhe verweilt, sind die einzigen Pixel, die übrig sind, mit hoher Wahrscheinlichkeit dem Herzen zuzuordnen. Der Flächenschwerpunkt der identifizierten Pixelfläche wird als Mittelpunkt des Herzens angenommen. Die AOI wird daher so gesetzt, dass deren Mitte mit der neuen erkannten Position zusammenfällt. Ist es eine Randposition, so wird die AOI immer so gesetzt, dass ihre Kante innerhalb der Kanten des Originalbildes bleibt.

In wenigen Fällen liefert das Differenzbild keine verwertbaren Ergebnisse in Form von sich verändernden Pixeln. Die Wahl der AOI ist daher nicht möglich. Um solche Fälle erkennen zu können, wurden Kriterien entwickelt, die die entsprechenden Fehler aufzeigen. Mit Hilfe der Varianz der Intensitätswerte im Bild und mit der maximalen Intensität kann eine Abschätzung getroffen werden. Die Varianz muss sich zwischen 0,6 und 2,5 bewegen und die maximale Intensität zwischen 8 und 20. Auswertungen der beiden Parameter sind geeignet, um über die

Zuverlässigkeit der Differenzbildoperation zu entscheiden. Wird ein falscher Fall erkannt, so wird die AOI zentrisch im Bild gewählt, da eine Präzisierung der Herzposition nicht möglich ist.

4.2.4. Evaluierung des Herzschlagmikroskops

Zur Ermittlung der Zuverlässigkeit wurde eine 96er Flatbottom³ Mikrotiterplatte automatisch gescannt. Die Fische waren 72 hpf alt und anästhesiert mit Tricain (MS222). Für die Kammern der Platte wurde die Quote ermittelt, wie häufig ein Video aufgenommen wurde, das tatsächlich das Herz so zeigt, dass Herzparameter extrahiert werden können. Als Beispiel einer mittleren Auslastung des Mikroskops wurden für die Evaluierungsaufnahmen je 6 Bilder pro Kammer bei einer Framerate von 10 FPS aufgenommen. Das Scannen von 96 Kammern dauerte mit den beschriebenen Einstellungen 18 min.

Es wurden 96 Bildreihen aufgenommen. Auf 69,8% (67 von 96) der Videos waren Zebrafischherzen zu sehen. Von den 67 Videos konnte aber bei 15 Videos selbst manuell kein Herzschlag erkannt werden, da die Fische in Bauchlage lagen. Durch das einfache Befüllen ohne nachträgliches Ausrichten der Larven waren 15,6% (15 von 96) der Fische in Bauchlage, sodass zwar die Herzregion auf den Bildern zu sehen ist, aber die Pigmentierung des umliegenden Gewebes das Herz verdeckt. Daher waren nur 54,2% (52 von 96) Videos tatsächlich für die Auswertung geeignet.

Die 30,2% Videos, in denen die Herzregion nicht richtig ermittelt wurde, sind auf verschiedene Fehler zurückzuführen. In 2% der Kammern (2 von 96) war kein Fisch auf dem Übersichtsbild zu sehen. Das kann vorkommen, wenn Fische an der Wasseroberfläche und gleichzeitig am Rand liegen. Da für den Autofokus die Suche nach dem Fisch im unteren Teil der Kammer durchgeführt wird, ist der Fisch somit soweit außerhalb des scharfen Bereichs, dass er nicht zu erkennen ist. Bei 28,1% kam es zu verschiedenen Fehlern der Bilderkennung, die im Folgenden dargestellt werden.

Eine Fehlerquelle bei der Fischerkennung ist die Segmentierung des Fisches. Wird mit der Kantenerkennung ein Teil der Mikrotiterplatte erkannt und als Maske verwendet, indem sich der Fisch nicht befindet, so kann auch die nachfolgende Herzdetektion nicht erfolgreich sein. Das ist in 17 Kammern (17,7% Prozent) passiert. Hat die Fischdetektion funktioniert, kann in der Herzerkennung mittels Intensitätsgraph ein Fehler auftreten. Aufgrund von starker Pigmentierung oder ungünstiger Bauchlage kann es vorkommen, dass nicht genau die Mitte des Herzens erkannt wird. In Verbindung mit möglichen Positionsungenauigkeiten des Roboters kann es auch vorkommen, dass das Herz auf dem Detailfoto nicht zusehen ist, da es sich etwas neben dem sichtbaren Bildausschnitt befindet.

Durch Setzen der Area of Interest (AOI) wird das Bild so zugeschnitten, dass das erkannte

³Die Kammern haben flache Böden im Gegensatz zu Roundbottom Platten, bei denen die Böden rund sind

Herz möglichst in der Mitte des Ausschnittes von 800 x 640 zu sehen ist. Tritt bei der Differenzbildanalyse ein Fehler auf und wird die AOI dadurch falsch gewählt, so kann es sein, dass das Herz zwar auf der Aufnahme mit voller Auflösung zu sehen war, auf dem Detailbild mit 800 x 640 aber dann nicht mehr zusehen ist. Der genannte Fall ist in 7,3% (7 von 96) aufgetreten. In 3,1% (3 von 96) zeigte die AOI einen Ausschnitt, der nicht Teil des Bildes mit voller Auflösung war. Gründe für den Fehler konnten nicht ermittelt werden.

Es kam also zu falschen Bildaufnahmen auf Grund falscher Segmentierung (17,7%) und falschem Setzen der AOI (7% + 3%). Auf 69,8% der Videos wurden korrekt Herzen abgebildet. Davon war in 15,6% zwar die Herzregion zu sehen, aber durch die Bauchlage, ist auch manuell keine Herzbewegung zu erkennen. Damit entsprechen 54,2% der Videos dem gewünschten Ergebnis, da sie bezüglich des Herzschlages ausgewertet werden können. Die Herzerkennung mit Intensitätsgraph und zentral gesetzter AOI ist gut, aber nicht sehr gut, da der nötige kleine Bildausschnitt von 800 x 640 nur wenig Abweichung zulässt. Durch die Präzisierung mit den Bildern mit voller Auflösung können daher manche falsche Fälle ohne Herz abgefangen werden. Jedoch ist auch die hierfür implementierte Erkennung noch nicht perfekt und es werden auch richtige Fälle zum Falschen verbessert. Das größte Optimierungspotenzial hat daher die Differenzbildmethode. Insgesamt ist die Erkennungsquote mit zusätzlicher Differenzbildmethode jedoch höher als die mit zentral gesetzter AOI.

In [101] wurden weitere Tests zur Evaluierung des Systems durchgeführt. Es wurden sechs Mikrotiterplatten mit 96 Zebrabärblinglarven im Alter von 60 hpf und 72 hpf mit dem Herzschlagmikroskop automatisch gescannt. Hierbei wurde eine durchschnittliche Erkennung der Herzregion von 75% erreicht.

4.2.5. Berechnung der Herzfrequenz anhand der erzeugten Videos

In [93] wurde eine Auswertungssoftware entwickelt, die aus den mit dem Herzschlagmikroskop erstellten Videos die Herzschlagfrequenz automatisch ermittelt.

In den mit dem Herzschlagmikroskop aufgenommenen Datensätzen werden mit der neuen Auswertungssoftware die Herzregionen erkannt. Mit verschiedenen berechneten Unterscheidungsmerkmalen werden die sich ändernden Pixel in den erkannten Regionen analysiert. Die Änderungen, über die Zeitreihe hinweg betrachtet, ergeben diskrete Werte einer Herzschlagfunktion. Mit Hilfe der am Institut für Angewandte Informatik (KIT) entwickelten MatlabToolbox *Gait CAD* [66] wird die Herzschlagfunktion ausgewertet. In der *Gait CAD* Umgebung wird der vom Herzschlagmikroskop aufgenommene Datensatz geöffnet und es wird für jede Kammer eine Frequenzanalyse gemacht. Als Ergebnis wird die Schlagfrequenz des Herzens ausgegeben (siehe Abb. 4.11).

Die Vorgehensweise und die Methodik der Bildverarbeitung zur Analyse der Herzfrequenz wird im Folgenden beschrieben.

Bildauswertung

Zur Erkennung des Herzbereichs wird eine Segmentierung vorgenommen. Das Herz ist die sich am stärksten bewegende Struktur in den Bildern. Weiter ist das Herz gekennzeichnet durch die rote Farbe des Blutes. Das Pumpen des Herzens wird daher als sich rhythmisch ausdehnende und zusammenziehende Fläche erkennbar sein. Die beiden Eigenschaften können durch zwei verschiedene Segmentierungstypen erkannt werden. Durch Differenzbildanalyse können die sich ändernden Pixel zwischen zwei Bildern ermittelt werden [22]. Die bewegten Pixel sind dann meist Teil des Herzens. Ab und zu bewegt der Fisch jedoch auch die Flossen. Es kann damit nicht eindeutig nur anhand des einen Merkmals das Herz detektiert werden. Die rhythmisch wiederkehrende, rote Fläche kann durch Farbsegmentierung erkannt werden. Neben dem Herz fließt jedoch auch Blut in den Blutgefäßen in anderen Teilen des Körpers. Auch mit Farbsegmentierung kann also keine eindeutige, zuverlässige Detektion des Herzens erreicht werden. Eine Kombination der beiden Segmentierungsverfahren ermöglicht den Ausschluss der Regionen, die nicht dem Herzen entsprechen. Das Herz muss in beiden Segmentierungsverfahren erkannt werden, die Bewegung der Flossen nur im Differenzbild und die roten Blutflüsse vornehmlich in der Farbsegmentierung. Die einzige Struktur, die also in beiden Segmentierungsverfahren erkannt wird, ist demnach das Herz.

Aus den segmentierten Herzbereichen wird dann die Herzfrequenz berechnet. Hierfür wird die Pixeländerung von Bild zu Bild jeweils quantifiziert. Der errechnete Zahlenwert stellt einen Wert der Herzschlagfunktion dar. Es gibt diverse Methoden zur Berechnung eines quantifizierten Merkmals. Die folgenden sieben Methoden werden in [93] testweise in Matlab implementiert: Mittelwert der Pixelanzahl im segmentierten Bild, Standardabweichung im Bild, Summe der relevanten Pixeländerungen im Differenzbild, Summe der roten Pixel, Anzahl der relevanten Pixeländerungen im Differenzbild, Summe der Kanten und maximale Pixeländerung. Bei idealen Ergebnissen sollten alle Methoden dieselbe Herzfrequenz berechnen. Tatsächlich haben die einzelnen Merkmale unterschiedlich starke Schwankungen in den ermittelten Frequenzen.

Die Segmentierung und die Ermittlung der sieben Frequenzmerkmale wurden in Matlab umgesetzt. Mit Hilfe der MatlabToolbox GaitCAD wurden die Zeitreihen dann analysiert und es wurde die Frequenz herausgelesen. In Abbildung 4.11 ist links das Ergebnis einer automatischen Segmentierung des Herzbereiches sowie rechts das Ergebnis einer Herzschlaganalyse zu sehen. Die einzelnen Peaks der Herzschlaganalyse stellen je einen Schlag des Herzens dar. Die erwartete Schlagfrequenz von 2 bis 3 Hz ist gut zu erkennen.

Die automatische Berechnung der Herzfrequenz hat sich als zuverlässig erwiesen für den Fall, dass die Bildqualität den geforderten Merkmalen entspricht. Bei Abweichungen in der Bildqualität durch Helligkeitsveränderungen oder Farbveränderungen muss die Bildauswertung neu parametrisiert werden. Die Herzfrequenz wurde in mehreren Testdurchläufen mit Videos des Herzschlagmikroskops mit der automatischen Auswertung richtig ermittelt. In einer Testreihe

mit verschiedenen Konzentrationen an Lidocain konnte ebenfalls die Funktion der Software nachgewiesen werden. Die zu erwartende durch steigende Konzentration an Lidocain abnehmende Herzfrequenz konnte durch die Software richtig ermittelt werden.

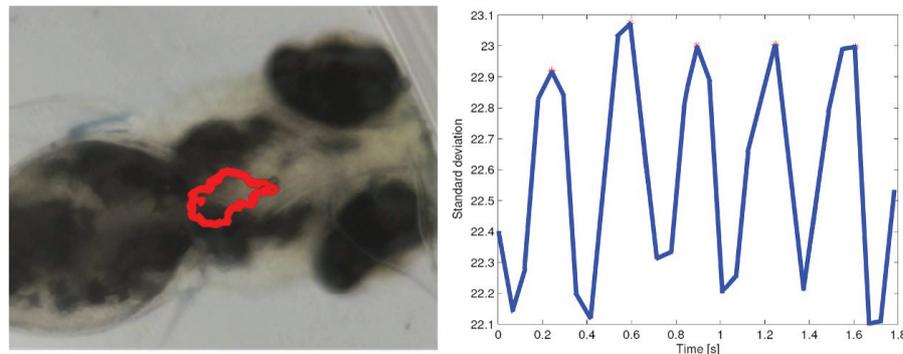


Abb. 4.11.: links: Automatisch segmentierte Herzregion (rot), rechts: Ergebnis der Herzschlaganalyse (aus [93])

Für die Evaluierung der automatischen Herzschlaganalyse wurden verschiedene Lagen der Fische betrachtet sowie verschiedene Merkmale, die die Bildqualität beeinflussen. So wurde zur Aufnahme der Bilder mit dem Herzschlagmikroskop eine Beleuchtungsblende ergänzt, um die Schärfe im Bild zu erhöhen. Außerdem wurden schwarze Mikrotiterplatten zur Aufnahme der Bilder getestet, da das schwarze Material weniger Streulicht durch die Seitenwände der Wells zulässt. Weiter wurde getestet, ob die Frequenzanalyse sowohl bei anästhesierten und bei nicht anästhesierten Fischen funktioniert. Liegen die Fische lateral, ist die Erkennung einfacher als bei einer dorsal-ventralen Lage. Insgesamt hat sich in den Evaluierungstests in [93] die automatische Herzschlaganalyse als robust herausgestellt. Trotz teilweise starker Abweichungen der Bildqualität zu den Standardbildern des Herzschlagmikroskops konnten gute Analyseergebnisse mit einer erfolgreichen Erkennung der Frequenz in 72% der Fälle erreicht werden. Die besten Analyseergebnisse sind bei Bildern zu erwarten, deren Helligkeitswerte, Bildkontrast und Farbgebung der Abbildung 4.11 ähnlich sind.

Das im Rahmen der Arbeit entwickelte Herzschlagmikroskop nimmt automatisch Videos der Herzen von Zebrafischen in Mikrotiterplatten auf. Bisher musste jede einzelne Probe händisch in einem Mikroskop ausgerichtet werden und dann der interessierende Bereich durch den Bediener identifiziert und in das Zentrum des Aufnahmebereichs gebracht werden. Zur automatischen Aufnahme der Videos trägt das Mikroskop zwei Kameras für eine Übersichtsaufnahme und eine Detailaufnahme, die abwechselnd Bilder vom selben Objekt machen können. Durch die Automatisierung des Erkennens des interessierenden Bereichs, wird die manuelle Arbeit wesentlich reduziert. Hierfür wurden Bildverarbeitungsalgorithmen entwickelt, die durch Segmentierung der Übersichtsaufnahme den Fisch in der Kammer erkennen können. Es konnte gezeigt werden, dass anhand der Intensitätsverteilung entlang der Längsachse des Fisches die Herzposition

zuverlässig bestimmt werden kann. Zur Präzisierung der gefundenen Herzposition wurde eine Differenzbildanalyse eingesetzt. Das Herzschlagmikroskop hat in Tests seine Funktion unter Beweis gestellt, jedoch kann die Zuverlässigkeit noch weiter gesteigert werden. Weiterführend wurde eine Auswertungssoftware entwickelt, die aus den aufgenommenen Datensätzen automatisch den Herzschlag ermittelt.

4.3. Entwicklung des Fluoreszenzmikroskops

In diesem Abschnitt wird das entwickelte Fluoreszenzmikroskop vorgestellt. Das Fluoreszenzmikroskop ermöglicht den automatischen Nachweis der Fluoreszenzproteine GFP (*green fluorescence protein*) und RFP (*red fluorescence protein*). Somit ist eine schnelle Vorsortierung und Identifizierung der erfolgversprechenden Proben, die eine Information enthalten, automatisch möglich.

Im Folgenden werden zuerst die Grundlagen von Fluoreszenz sowie Beispiele für aktuell kommerziell verfügbare Geräte beschrieben. Die Einführung eines aktuellen Beispiels aus der Biologie zeigt die Relevanz der Fragestellung auf. Danach wird das Konzept des Fluoreszenzmikroskops vorgestellt. Im Weiteren werden dann die Hardware sowie die Software des Fluoreszenzmikroskops beschrieben.

Grundlagen Fluoreszenz

Eine wichtige Untersuchungsmethode in Biolabors ist der Einsatz von Fluoreszenz [9, 40]. Mit Hilfe von fluoreszenten Farbstoffen können bestimmte Merkmale in einer Probe hervorgehoben werden, sodass ein Kontrast zur Umgebung entsteht. Das Hervorheben von Einzelmerkmalen ist immens wichtig zur Analyse von diversen Prozessen und Zusammenhängen, die ohne Fluoreszenz nicht beobachtbar sind. Es ermöglicht auch die *in vivo* Beobachtung von Prozessen, die ohne Marker nicht sichtbar sind.

Fluoreszenz beschreibt das Phänomen der stimulierten Emission von Licht. Man unterscheidet die Emission von Licht in den drei Kategorien Lumineszenz, Phosphoreszenz und Fluoreszenz [30]. Bei Biolumineszenz erzeugt ein biologischer Organismus selbstständig Licht. Durch eine chemische Reaktion wird Energie in Form von Licht frei. Fluoreszenz und Phosphoreszenz dagegen sind fremderregtes Leuchten. Die leuchtenden Moleküle werden nicht verbraucht. Aber durch Photobleaching können fluoreszente Moleküle, auch Fluorophore oder Fluoreszenzfarbstoffe genannt, zerstört werden, wenn der Energieeintrag zu hoch ist. Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterscheiden sich darin, dass es bei Fluoreszenz so gut wie kein Nachleuchten gibt. Wird die Anregungsquelle abgeschaltet, so endet zeitgleich die fluoreszente Emission. Bei Phosphoreszenz gibt es ein Nachleuchten auch bis zu Stunden nach der Anregung.

Beim Vorgang der Fluoreszenz wird über eine Anregungsquelle Licht in fluoreszente Mole-

küle eingekoppelt. Bei der richtigen Wellenlänge werden durch die eingebrachte Energie der ankommenden Photonen Elektronen des Moleküls auf ein höheres Energieniveau gehoben und befinden sich damit im angeregten Zustand. Der Zustand ist nur von kurzer Dauer und das Elektron kehrt nach wenigen Millisekunden in seinen Ursprungszustand zurück. Wird die dabei frei werdende Energie in Form von Licht abgegeben, so spricht man von Fluoreszenz [90]. Das Emissionslicht hat immer eine längere Wellenlänge als das Anregungslicht hat. Das Phänomen wird als Stokes Shift bezeichnet [31]. Die Frequenzbänder der Anregung und der Emission liegen recht nah beieinander. Zur Beschreibung von Fluoreszenz werden die charakteristischen Merkmale Absorptionsspektrum, Anregungsspektrum und Emissionsspektrum verwendet [90].

Zum ersten Mal festgestellt und erforscht wurde Fluoreszenz an der Qualle *Aequorea victoria*. Das für die Fluoreszenz verantwortliche Gen sowie das leuchtende Protein, das sogenannte Green Fluoreszenz Protein (GFP), wurden isoliert und der Umgang wurde erforscht. Später wurden weitere Farbstoffe durch Modifikation entwickelt. Jeder Fluorophor benötigt eine andere Wellenlänge als Anregung. Zur biologischen Nutzung des Phänomens wurden Techniken entwickelt, die fluoreszenten Moleküle an definierte Strukturen in biologischen Organismen zu hängen. So können interessierende Strukturen markiert werden und sind in der späteren Auswertung gut erkennbar.

Geräte

Fluoreszenzmikroskope und -detektoren gibt es kommerziell verfügbar von verschiedenen Herstellern. Dazu gehören:

- das ScanR von Olympus, ein Durchlichtmikroskop mit Fluoreszenzoption.
- der Fluoreszenzscanner FLX 800 von BioTec
Der Scanner ist nicht bildgebend und eignet sich zum Scannen von Mikrotiterplatten. Es wird eine quantitative Fluoreszenzmessung durchgeführt.
- das Fluoreszenzmikroskop FluorChem von Western Blot Imaging
Das Mikroskop ist ausgerüstet mit einem Filterwechsler und verschiedenen Anregungsquellen, um mehrere Fluorophore zu detektieren. Es hat eine sehr große Dunkelkammer, sodass auch ganze Pflanzen im Topf untersucht werden können.
- der Scanner Aequorea MDS von Hamatsu
Das Aequorea ist ein makroskopisches Imaging System. Es funktioniert mit LED Beleuchtung und hat eine Dunkelkammer in der ganze Pflanzen gescannt werden können.
- das System FluorCam von Qubit Systems
Es besitzt eine Fluoreszenzkamera zur bildgebenden Untersuchung von Proben. Das Ge-

rät ist speziell für die Analyse von Pflanzen entwickelt worden. Die Fluoreszenzanregung wird über eine LED Beleuchtung realisiert.

Von den Scannern ist nur das ScanR auf die bildgebende Untersuchung von Proben in Mikrotiterplatten ausgelegt. Die nicht bildgebenden Systeme für Mikrotiterplatten haben den Nachteil, dass nicht untersucht werden kann, wo in der Probe Fluoreszenz auftritt, sondern nur, ob Fluoreszenz auftritt. Die auf Pflanzen ausgelegten Scanner eignen sich nicht zur Untersuchung von Zebrafischen in Mikrotiterplatten. Schwierig ist bei den Geräten auch das Erzielen von hohen Durchsätzen, da Konzepte für einen automatischen Probenwechsel meist fehlen.

Aktuelles Anwendungsbeispiel für Fluoreszenz in der Biologie

In einer aktuellen Fragestellung werden am Institut für Toxikologie und Genetik (KIT) Leukozyten (weiße Blutkörperchen) und Neuromasten (Nervenzellen) unterschiedlich mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, um eine Wundreaktion zu untersuchen [14]. Hierzu kommen die beiden Fluorophore Green-Fluorescence-Protein (GFP) und Red-Fluorescence-Protein (RFP) zum Einsatz. Um Fischlarven mit beiden genetischen Merkmalen zu erzeugen, müssen als erstes Fische erstellt werden, die das GFP-Merkmal an den Nervenzellen und andere Fische, die das RFP-Merkmal an den Leukozyten ausbilden. Bei der Bezeichnung der Gene werden mutante Gene, dazu gehören die fluoreszenten, und Wildtyp Gene unterschieden. Als Wildtyp wird der genetisch in der Natur so vorkommende Typ bezeichnet. Auf Grund der Tatsache, dass Zebrafische wie Menschen auch einen diploiden Gensatz⁴ haben, ist jedes Gen doppelt vorhanden. Wenn nur eines der beiden Gene das fluoreszente Merkmal trägt und das andere der Wildtypversion entspricht, entstehen bei der Kreuzung der GFP und RFP Fische miteinander nach den Mendelschen Vererbungsregeln vier verschiedene Typen von Nachkommen. Solche, die nur die Wildtypmerkmale tragen, solche die GFP und Wildtyp tragen, solche, die RFP und Wildtyp tragen und solche, die GFP und RFP Merkmale tragen.

Für die gewünschte Untersuchung der Wundreaktion ist es nötig, nur Fische zu untersuchen, die beide Fluoreszenzmerkmale ausbilden. Es müssen also im Vorfeld die Fische identifiziert werden, die beide Merkmale tragen. Das geschieht bisher per Hand mittels manuellen Fluoreszenz-Stereomikroskopen. Eine automatisch ablaufende Untersuchung der Fluoreszenzmerkmale kann den Vorbereitungsaufwand verringern und Zeit sparen.

4.3.1. Konzept Fluoreszenzmikroskop

In [34] und [102] wurde ein Fluoreszenzmikroskop entwickelt, um eine Voruntersuchung zu ermöglichen, bei der Zebrafische identifiziert werden, die sowohl GFP als auch RFP Fluoreszenz

⁴diploide Organismen haben jedes Gen doppelt, eines jeweils von Vater und Mutter

ausbilden. Das Fluoreszenzmikroskop scannt automatisch Fischlarven in einer 96er Mikrotiterplatte und nimmt je eine Hellfeldaufnahme, eine GFP Aufnahme und eine RFP Aufnahme auf. Die drei Bilder werden mittels Software zu einem Falschfarbenbild überlagert. Anhand des erstellten Bildes kann dann entschieden werden, ob beide Fluoreszenzmerkmale vorhanden sind.

Zum Aufbau eines Mikroskops, mit dem Fluoreszenz sichtbar gemacht werden kann, sind bestimmte Hardwarekomponenten nötig. Es muss eine Anregungslichtquelle geben, einen Detektor für das Emissionslicht und optische Elemente, mit denen Reste des Anregungslichts aus dem Emissionslicht ausgeblendet werden.

In einem Fluoreszenzmikroskop kommen standardmäßig Laserlichtquellen zum Einsatz. Das Licht mit definierter Wellenlänge wird über verschiedene optische Komponenten in den Strahlengang des Mikroskops eingekoppelt. Ein solcher Aufbau erfordert viel Bauraum und teure optische Komponenten wie den dichroischen Spiegel und die Laserlichtquelle. Zur Fluoreszenzanregung kommen auch die Lichtquellen LED, Laser-Diode, Wolfram Halogen Glühlampe, Quecksilberdampfampe und Xenon-Gasentladungslampe in Frage [30, 90]. Aufgrund ihres einfachen Aufbaus und des geringen Preises sollen in dem neuen Konzept LEDs verwendet werden.

Die fluoreszenten Bereiche in der Probe, die vom Anregungslicht getroffen werden, beginnen Licht mit ihrer Charakteristik entsprechender Wellenlänge zu emittieren. Das Licht muss vom Detektor aufgenommen werden. Hierbei muss jedoch das Anregungslicht vollständig ausgeblendet werden, um die Fluoreszenz nicht zu überdecken, da das emittierte Licht um sechs Zehnerpotenzen schwächer als das Anregungslicht ist. Anregungslicht und Emissionslicht können auf verschiedene Weise voneinander getrennt werden. In hochwertigen Fluoreszenzmikroskopen geschieht die Trennung meist durch die Verwendung eines dichroischen Spiegels. Solche Spiegel dienen als Strahlteiler. Hierbei bestrahlt die Lichtquelle den dichroischen Spiegel im rechten Winkel zur optischen Achse zwischen Detektor und Probe. Das Anregungslicht wird am 45° geneigten dichroischen Spiegel in Richtung der Probe gebrochen. Das emittierte Licht kann den Spiegel passieren und wird nicht abgelenkt. So erreicht nur das Emissionslicht den Detektor. Solche Aufbauten sind komplex und die Komponenten sind teuer. Dichroische Spiegel kommen meist in Verbindung mit Laserlichtquellen zum Einsatz.

Eine weitere Möglichkeit, das Anregungslicht aus dem Emissionslicht zu filtern, sind sogenannte Bandpassfilter. Sie lassen nur ein bestimmtes Frequenzband passieren und ermöglichen daher die Sichtbarmachung der fluoreszierenden Strukturen. Ein Anregungsfilter beschneidet das Wellenlängenband so, dass möglichst nur die für den Fluorophor nötige Anregungswellenlänge auf die Probe trifft. Im weiteren Strahlengang beschneidet ein Emissionsfilter das von der Probe emittierte Licht so, dass nur die Emissionswellenlänge passieren kann. Am Detektor kommt damit nur Emissionslicht an. Je nach Fluorophor sind Anregungs- und Emissionsfilter

zu wählen. Der Aufbau mit Bandpassfiltern ist wesentlich preisgünstiger als der mit einem dichroischen Spiegel. Außerdem ist das Bandpassfilterkonzept auch für die Anregung mit LEDs geeignet. Es wird daher für den Aufbau des Fluoreszenzmikroskops gewählt.

In den bisher in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Robotern waren die Mikrotiterplatten ortsfest im Bauraum. Steht die Mikrotiterplatte im Fluoreszenzmikroskop im Bauraum fest, muss der komplette optische Aufbau bewegt werden. Der Aufbau benötigt oberhalb und unterhalb der Mikrotiterplatte Komponenten, die synchron bewegt werden müssen, um in einer optischen Achse gehalten zu werden. Die Geometrie der Verbindungselemente der oberen und unteren Teile ist daher aufwendig. Sie müssen eine U-Form bilden, um einen Zwischenraum für die Platte zu lassen. Auf Grund des komplexeren optischen Aufbaus ist es also zweckmäßig, die Mikrotiterplatte zu bewegen und nicht den optischen Aufbau. Daher wurde für das aufgebaute Fluoreszenzmikroskop ein Aufbau gewählt, bei dem die Mikrotiterplatte durch einen Zwei-Achs-Mechanismus bewegt wird und die Kamera fest steht.

Das neue Konzept für das Fluoreszenzmikroskop als linearer optischer Aufbau mit LEDs und Bandpassfiltern ist in Abbildung 4.12 zu sehen. A zeigt den mechanischen Aufbau. Die Kamera ist feststehend montiert und die Mikrotiterplatte wird durch einen Zwei-Achs-Mechanismus bewegt. Im Bild dargestellt ist nur der Wagen der zweiten Achse mit dem Halter für die Mikrotiterplatte. Eine weitere Achse bewegt den Doppelhalter für LEDs und Filter. Die LEDs und die Anregungsfilter werden über der Mikrotiterplatte bewegt, die Emissionsfilter werden unterhalb der Mikrotiterplatte bewegt. B zeigt den Strahlengang des Mikroskops. Der Weg des Lichts beginnt in der Lichtquelle, dann passiert das Licht den Anregungsfilter, trifft auf die Probe, passiert dann den Emissionsfilter und trifft schließlich auf den Detektor. Durch die Filter wird verhindert, dass Licht direkt von der Lichtquelle in die Kamera strahlt.

Neben der Hardware ist für die automatische Erstellung der Falschfarbenbilder Software nötig, mit der die fluoreszenten Bereiche in den Bildern erkannt werden und dann mit den dazugehörigen Hellfeldbildern überlagert werden können. Hierfür wurden in [34] und [102] Softwaremodule mit Bildverarbeitungsfunktionalität implementiert. Die Details der Hardware sowie der Software werden im Folgenden beschrieben.

4.3.2. Hardwarekomponenten

Die Hardware des neu entwickelten Fluoreszenzmikroskops besteht aus dem Grundroboter ergänzt durch ein Kameramodul mit Mikroverstelltisch. Kernelement des Fluoreszenzaufbaus sind die LEDs als Anregungslichtquellen sowie die Bandpassfilter. Die Details der Hardware werden im Folgenden beschrieben.

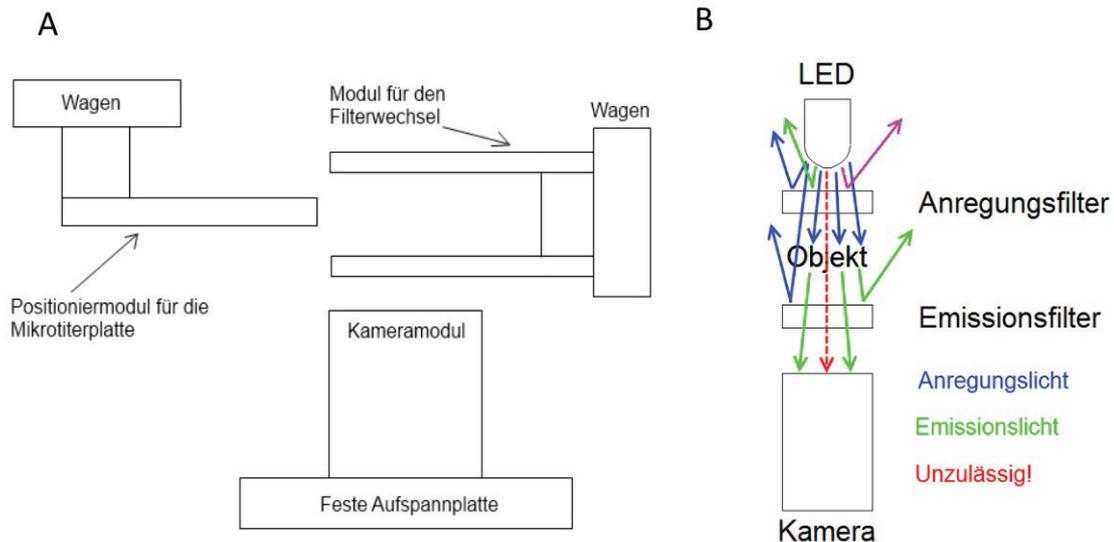


Abb. 4.12.: Neues Konzept für das Fluoreszenzmikroskop, A: Hardwarekomponenten (aus [102]), B: Linearer optischer Aufbau (aus [34])

Roboter

Für das in [34] und [102] entwickelte Fluoreszenzmikroskop kommt erneut als Grundroboter das gewählte kartesische Linearachsenkonzept zum Einsatz. Der ergänzte Fluoreszenzaufbau besteht aus mehreren optischen Teilen, die entlang einer gemeinsamen optischen Achse ausgerichtet sein müssen.

Da die Mikrotiterplatte bewegt wird, wird die Kamera feststehend, vertikal im Bauraum montiert. Mit einem Mikroverstelltisch kann die Fokusslage verschoben werden. Die Mikrotiterplatte wird durch den Zwei-Achs-Mechanismus in der Horizontalen so positioniert, dass die Kammern der Platte nacheinander in der optischen Achse der Kamera sind.

Nachdem die Kamera im Bauraum feststehend ist, müssen die Filterpaare und die Anregungslichtquelle für den jeweiligen Fluoreszenztyp in die optische Achse der Kamera bewegt werden. Hierfür wurde in [102] ein Konzept erarbeitet, mit dem die LEDs und die Filter parallel bewegt werden können. Zur Realisierung wurde eine weitere Linearachse im Bauraum angebracht, an der eine Halterung mit drei nebeneinander angebrachten LEDs mit zugehörigen Anregungsfiltern befestigt ist. Weiter ist in einem Abstand, dass gerade eine Mikrotiterplatte dazwischen passt, eine weitere Halterung an der Linearachse befestigt. Sie trägt nebeneinander drei Emissionsfilter im selben Abstand wie die LEDs auf der ersten Halterung. Damit kann mit der Linearachse die jeweils benötigte Paarung aus Lichtquelle und Filterpaar über die Kamera verfahren werden. Die Linearachse wird als Filterschiene bezeichnet. Die Mikrotiterplatte wird vom Zwei-Achs-Mechanismus über die Kamera bewegt. Unabhängig davon kann ohne Bewegung der Mikrotiterplatte die Positionierung der LEDs und Filter durchgeführt werden.

Die Filterschiene wird so angebracht, dass in Mittelstellung der Schiene die mittlere Filterpaarung, also die für Hellfeld, in der optischen Achse der Kamera ist. Für die Fluoreszenzaufnahmen wird die Filterschiene dann jeweils ein Stück nach rechts bzw. links gefahren, um die entsprechenden LEDs und Filter in Position zu bringen. Zur Steuerung der Beleuchtung wird eine mechanische Kopplung der Schalter mit den Positionen der Filterschiene installiert. Für die Aufnahmen der Hellfeld-, GFP- und RFP- Bilder darf je nur die entsprechende Beleuchtung an sein und die anderen müssen aus sein. Hierzu wird eine Nase an der Filterschiene montiert, die die Schalter der verschiedenen LEDs in den verschiedenen Positionen drückt. Bei gedrücktem Schalter leuchten die entsprechenden LEDs und nur die benötigte Beleuchtung ist aktiviert.

Die Hardware des aufgebauten Fluoreszenzmikroskops ist in Abbildung 4.13 zu sehen. Oben links im Bild ist der Zwei-Achs-Mechanismus zu sehen. Die beiden Achsen x und y sind hängend oben im Bauraum montiert und bewegen die Mikrotiterplatte (WP). Die zwei zusätzlichen Achsen des Aufbaus sind der Verstelltisch als z -Achse sowie die Achse für die LEDs und den Filterträger (FT). Rechts oben im Bild zu sehen ist der lineare Aufbau der optischen Komponenten. Von oben beginnend leuchtet die Lichtquelle (L) durch den Anregungsfilter (AF) und dann durch die Probe, wenn die Mikrotiterplatte dort positioniert ist. Von der Probe trifft das Licht auf den Emissionsfilter (EF) und erreicht dann die Kamera. Zum Fokussieren wird die Kamera (C) mit einem im Bauraum fest montierten Mikroverstelltisch (VT) in z -Richtung bewegt. Der Verstelltisch (VT) wird durch einen Schrittmotor (M) angetrieben. Links unten ist der optische Aufbau im Detail zu sehen. Zu erkennen sind die drei nebeneinander angeordneten Filterpaare sowie die dazugehörigen LEDs. Im Bild rechts unten ist die Steuerung des Roboters im Hintergrund zu sehen. Außerdem ist die vierte Achse zur Bewegung der Filter (AF, EF) und der Anregungslichtquelle (L) erkennbar. Sie verschiebt Anregungs- (AF) und Emissionsfilter (EF) sowie Lichtquelle (L) parallel.

Zum Scannen der Mikrotiterplatte wird eine Kammer der Platte (WP) in die optische Achse der Kamera (C) positioniert. Der Filterwechsler (FT) wird in die Hellfeldposition, also ohne Filter, gebracht und die LED Beleuchtung wird aktiviert. Mit den entsprechenden Einstellungen für die Belichtungszeit wird dann das Hellfeldbild aufgenommen. Dann wird der Filterwechsler nacheinander in die GFP und in die RFP Position gebracht. Durch das Phänomen der chromatischen Aberration werden unterschiedliche Wellenlängen in Linsen unterschiedlich stark gebrochen. Daher haben die Emissionen von verschiedenen Fluorophoren verschiedene Fokuslagen für eine scharfe Abbildung. Beim Wechsel des aufzunehmenden Kanals wird daher mit der z -Achse der richtige Arbeitsabstand eingestellt. Mit auf die jeweils zu erwartenden Lichtintensitäten eingestellten Belichtungszeiten werden die Fluoreszenzbilder aufgenommen. Das beschriebene Vorgehen wird für jede Kammer der Platte wiederholt.

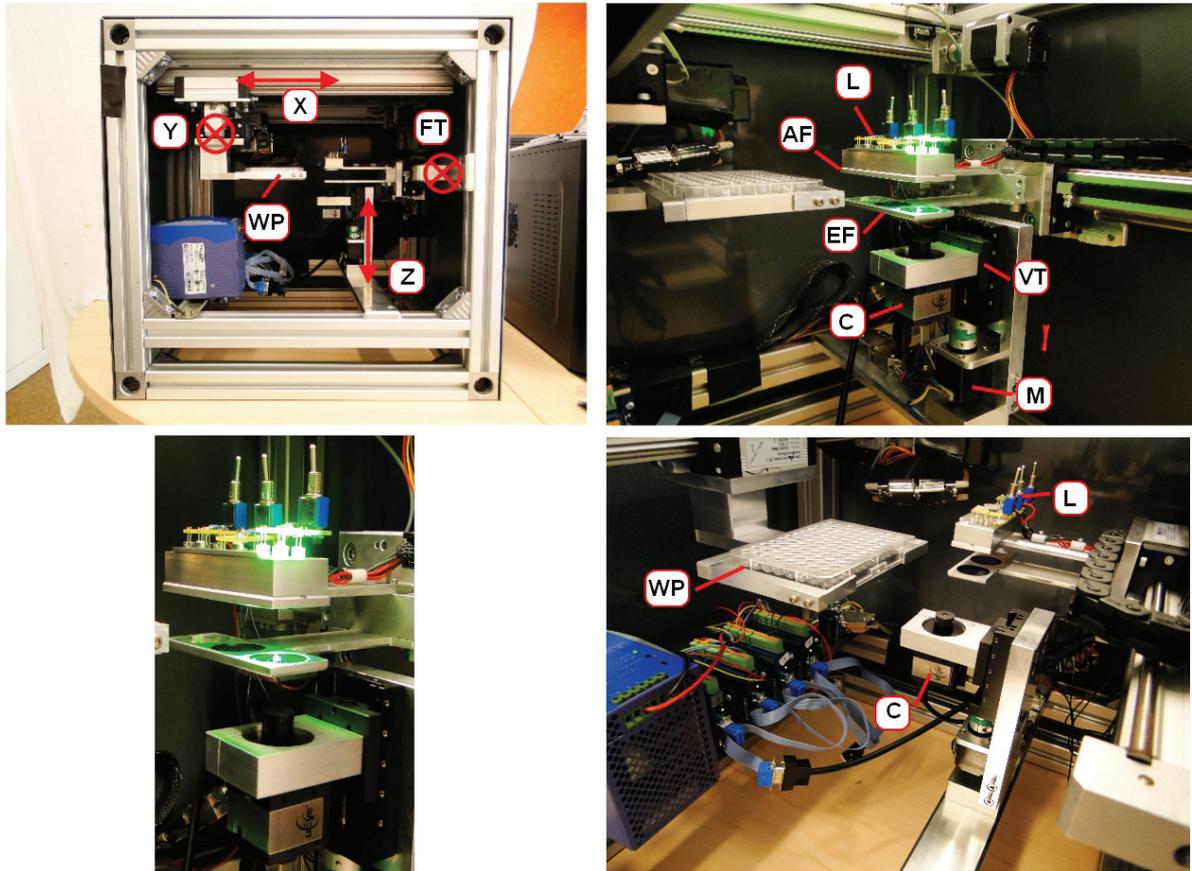


Abb. 4.13.: Übersicht über das neue Fluoreszenzmikroskop: X, Y, Z-Achsen, WP= Mikrotiterplatte, FT= Filterträger, L= Lichtquelle, AF= Anregungsfilter, EF= Emissionsfilter, C= Kamera, M= Motor, VT= Verstellisch.

Optische Komponenten für die Fluoreszenz

Zur Aufnahme der Bilder wird die Graustufenkamera uEye USB UI-1240SE-M (Datenblatt siehe Anhang A.2) ausgewählt. Im Vergleich mit Farbkameras hat sie bei gleicher Sensorgröße eine bessere Auflösung, da bei der Farbkamera je drei bzw. vier Pixel zusammengefasst die Farbinformation eines Bildpunktes erfassen. Die gewählte Kamera bietet eine Auflösung von 1280 x 1024 Pixeln bei einer Farbtiefe von acht Bit. Die maximale Bildrate beträgt bis zu 25 Bilder pro Sekunde. Zur Abbildung einer vollständigen Kammer einer Mikrotiterplatte wird das Linsensystem B5M12028 von Lensagon (Datenblatt siehe Anhang A.2) mit einer Brennweite von 12 mm eingesetzt.

Durch die serielle Anordnung der Komponenten leuchtet bei Fehlen der Filter die Anregungslichtquelle direkt in die Kamera. Die Fluoreszenz wird dabei vollständig überlagert und ist nicht zu detektieren. Außerdem werden nur bestimmte Wellenlängenbereiche zur Anregung des Fluorophors benötigt. Ein Anregungsfilter lässt nur Licht der zur Anregung nötigen Wellenlänge durch. Zur Anregung der Fluorophore GFP und RFP werden jeweils unterschiedliche

Lichtquellen benötigt. Die charakteristischen Wellenlängen für GFP und RFP Anregung finden sich in [79]. Um die ungewollten Frequenzen herauszufiltern, kommen Bandpassfilter für das Anregungslicht und für das Emissionslicht zum Einsatz.

In Abbildung 4.14 sind die Fluoreszenzspektren für GFP und RFP zu sehen. Links zu sehen ist die Kurve des Anregungsspektrums für GFP und die Kurve des Emissionsspektrums in grün. In der Nähe von 500 nm sind die beiden Maxima zu erkennen. Die mit ca. 470 nm strahlende Anregungs-LED wird durch die violette Kurve dargestellt. Der Bandpassfilter für die Anregung ist in rot dargestellt und begrenzt das Anregungslicht. Der Bandpassfilter für die Emission ist in gelb dargestellt und begrenzt das Emissionslicht. Wichtig hierbei ist, dass Anregungsfilter und Emissionsfilter sich nicht überschneiden, sonst strahlt das Anregungslicht auch durch den Emissionsfilter. Die Fläche unter der Kurve beschreibt die eingebrachte Intensität. Die Bandbreite wurde so gewählt, dass eine ausreichende Lichtintensität erreicht wird. Rechts im Bild zu sehen sind die Spektren für RFP analog zu denen von GFP. Das Anregungsspektrum wird hier in rot dargestellt, das Emissionsspektrum in gelb. Die Anregungs-LED strahlt mit ca. 530 nm und wird in violett dargestellt. Der Bandpassfilter für die Anregung ist grün dargestellt, der Emissionsfilter ist blau dargestellt.

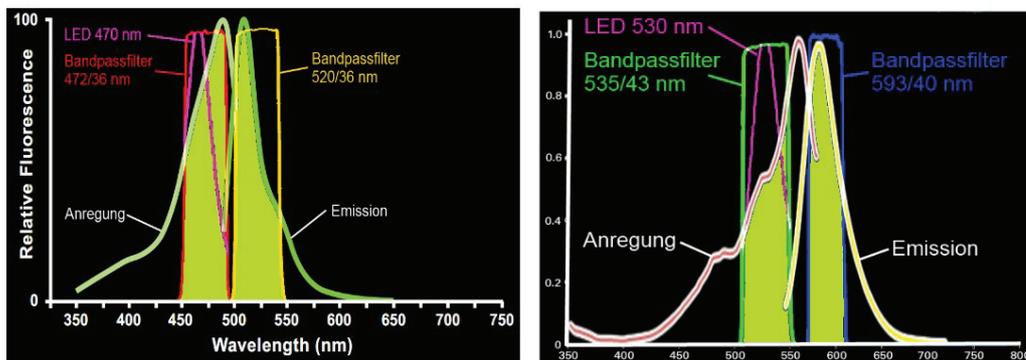


Abb. 4.14.: links: Fluoreszenzspektren GFP, rechts: Fluoreszenzspektren RFP (aus [34])

Die genauen Bezeichnungen der anzuregenden Fluorophore sind EGFP (enhanced GFP) und DsRed2. EGFP muss mit 489 nm angeregt werden und emittiert mit 508 nm. Der verwendete Anregungsfilter NT67-027 hat eine Peakwellenlänge von 472 nm und Breite von 30 nm, lässt also Licht durch von 442 nm bis 502 nm. Die Emission liegt darüber. Für die Emission wird der Bandpassfilter NT67-030 ausgewählt. Der hat eine Peakwellenlänge von 520 nm und eine Bandbreite von 36 nm, lässt also Licht zwischen 484 nm und 556 nm durch. Die Anregungs-LED für EGFP liegt darunter mit 470 nm. DsRed wird mit 558 nm angeregt und emittiert bei 583 nm. Der Anregungsfilter NT67-032 hat eine Peakwellenlänge von 543 nm und eine Bandbreite von 22 nm, lässt also Licht durch von 521 nm bis 565 nm. Die Emission liegt weit darüber. Der gewählte Emissionsfilter NT48-086 hat eine Peakwellenlänge von 593 nm und

eine Bandbreite von 40 nm, lässt also Licht von 553 nm bis 623 nm durch. Das Anregungslicht der gewählten LED für DsRed2 liegt mit 545 nm darunter.

4.3.3. Software

Mit der Software muss die Bewegung des Roboters gesteuert werden. Hierbei muss der Zwei-Achs-Mechanismus die Mikrotiterplatte in die optische Achse der Kamera bewegen. Weiter muss die Kamera mit dem Mikroverstelltisch in den richtigen Arbeitsabstand gebracht werden. Für die Aufnahme der jeweiligen Bilder werden dann die entsprechenden Filter und Lichtquellen mittels der vierten Achse positioniert. In einem automatischen Ablauf werden auf die Art und Weise nacheinander von allen 96 Kammern je drei Bilder Hellfeld, GFP und RFP gemacht.

Zur Auswertung der Bilder hinsichtlich der Fluoreszenz wurde in [102] ein Softwaremodul implementiert, indem verschiedene Bilder zu einem Falschfarbenbild überlagert werden können. Da die Kamera eine Graustufenkamera ist, sind in den GFP- und RFP-Bildern keine Farbinformationen enthalten, sondern nur Intensitätswerte. Zur einfachen, intuitiven Beurteilung, ob Fluoreszenz vorhanden ist, wird die Farbinformation nachträglich ergänzt, wodurch ein Falschfarbenbild entsteht. In der entwickelten Software wird manuell ein Schwellwert für die Fluoreszenzbilder festgelegt. Der Schwellwert muss so gewählt werden, dass die fluoreszierenden Strukturen erkannt werden und Hintergrundstrukturen ausgeblendet werden. Bei dem Vorgang entsteht aus dem Grauwertbild ein Binärbild. Den erkannten Pixeln des Binärbildes wird dann ein RGB Wert zugewiesen. Die Schwellwerte müssen zur Kalibrierung an einem Beispielbild manuell ermittelt werden. Für die restlichen Kammern der Platte werden dann automatisch alle Bildtrios auf die Weise mit den gefundenen Einstellungen verarbeitet. Für das Falschfarbenbild kommt für die GFP Aufnahme auf Grund der Fluoreszenz im grünen Wellenlängenbereich ein grün zum Einsatz, für RFP wegen der roten Fluoreszenz ein rot. Das Hellfeldbild wird dann mit den beiden eingefärbten Binärbildern überlagert. Im entstehenden Bild erscheinen die fluoreszierenden Strukturen in den intuitiv zu erwartenden Farben und mit hoher Intensität. Eine solche Überlagerung ist in Abbildung 4.15 zu sehen. Links zu sehen ist das Hellfeldbild des Fisches. Rechts oben ist das GFP Bild mit der erkannten Fluoreszenz im Kopf zusehen. Rechts unten ist das RFP Bild mit den im Schwanz erkannten Strukturen gezeigt. In der Mitte ist das entstandene Falschfarbenbild zu sehen, für das das Hellfeldbild mit den beiden anderen Aufnahmen überlagert wurde und die Strukturen in der jeweiligen Fluoreszenzfarbe künstlich eingefärbt wurden. Anhand des Falschfarbenbildes kann somit einfach eine Aussage über das Vorhandensein der Fluoreszenztypen getroffen werden.

4.3.4. Evaluierung des Fluoreszenzmikroskops

Zur Evaluierung des Fluoreszenzmoduls wurde ein Blindversuch durchgeführt, bei dem zum Zeitpunkt der Untersuchung dem Untersuchenden nicht bekannt ist, welche Proben er vor sich

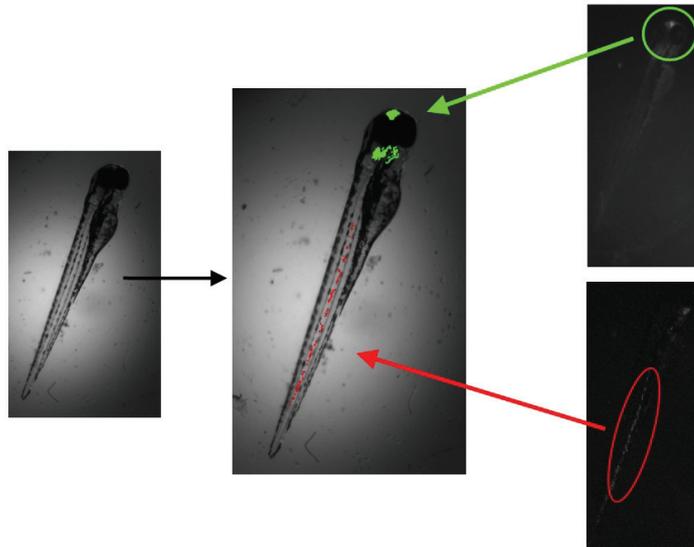


Abb. 4.15.: Überlagerung Fluoreszenzbilder zu Falschfarbenbild

hat. Nach der Erzeugung der Ergebnisse wird der Untersuchende aufgeklärt, welche Proben ihm übergeben wurden. So kann objektiv überprüft werden, ob mit dem Fluoreszenzmodul Zebrafische klassifiziert werden können. Der Blindversuch wurde mit 20 Zebrafischlarven durchgeführt, die entweder nur GFP, nur RFP, GFP und RFP oder gar keine Fluoreszenz zeigen. Die verschiedenen Fischtypen konnten erfolgreich mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops klassifiziert werden. Eine Aussage, ob Fische Fluoreszenz tragen oder nicht, ist mit dem Fluoreszenzmikroskop also möglich. In einer weiteren Testreihe wurde eine Gegenprobe gemacht. Von acht Wildtyp-Larven wurden jeweils die Hellfeld-, GFP- und RFP- Aufnahmen gemacht. Auf den GFP- und RFP-Aufnahmen konnte nichts detektiert werden. Ohne Fluoreszenz wird vom Fluoreszenzmikroskop auch nichts fälschlicherweise erkannt.

Weiterhin wurden acht doppeltransgene Larven, die für die bereits beschriebene aktuelle Aufgabestellung am ITG verwendet werden, getestet. Die Larven prägen das GFP-Merkmal an den Neuromasten und das RFP-Merkmal an den Leukozyten aus. Die acht Larven wurden in einer Reihe einer Mikrotiterplatte automatisch aufgenommen. Vor dem Start des Scans muss die Fokusslage der Kamera so eingestellt werden, dass im Hellfeld eine scharfe Abbildung erreicht wird. Mit den durch Vorversuche gefundenen Anpassungen der Belichtungszeiten sowie der Fokusslagenkorrektur wurden dann automatisch Hellfeld-, GFP- und RFP-Aufnahmen gemacht. Für alle acht Larven konnten beide Fluoreszenzmarker nachgewiesen werden, sodass eine Überlagerung zu einem Falschfarbenbild möglich war. Die automatische Aufnahme der Bilder funktioniert also. Jedoch hat sich beim Versuch der Aufnahme einer vollständigen 96er-Mikrotiterplatte gezeigt, dass die Präzision der Mikrotiterplattenhalterung bezüglich der Ausrichtung zur Kamera nicht ausreicht. Die horizontale Bewegungsebene der Kamera ist nicht parallel zur Halterung der Mikrotiterplatte. Wird die Kamera also unter der Mikrotiterplatte be-

wegt, verändert sich auch der Abstand. Das hat zur Folge, dass ein in der ersten Reihe richtig eingestellter Fokus in der zwölften Reihe eine nicht mehr ganz scharfe Abbildung ergibt. Aufgrund der geringen Schärfentiefe des Objektivs ist hier die Lagetoleranz für die Platte zu gering. Die Halterung der Platte muss also dahingehend überarbeitet werden, dass die Ausrichtung gegenüber der Kamera einstellbar wird. Innerhalb einer Reihe ist mit dem aktuellen Aufbau die Abweichung aber klein genug, sodass eine Reihe automatisch aufgenommen werden kann. Für jede Reihe muss die Fokusslage per Software ca. 0,1 mm angepasst werden, um über 12 Reihen eine Abweichung von ca. 1 mm auszugleichen.

In diesem Abschnitt wurde das Fluoreszenzmikroskop vorgestellt. Es wurde ein neues Konzept für einen günstigen Fluoreszenzaufbau entwickelt. Hierfür wurden LEDs als Lichtquelle ausgewählt und Bandpassfilter zur Trennung von Anregungs- und Emissionslicht eingesetzt. Für die Detektion der Fluoreszenz wurde eine Graustufenkamera eingesetzt. Von jeder Probe in einer Mikrotiterplatte werden mit dem Fluoreszenzmikroskop automatisch drei Bilder aufgenommen. Das Hellfeldbild zeigt den Fisch in schwarz weiß, das GFP-Bild zeigt die mit GFP fluoreszierenden Strukturen und das RFP-Bild zeigt die mit RFP fluoreszierenden Strukturen. Es wurden die verschiedenen Fokusslagen der unterschiedlichen Wellenlängen des Emissionslichts ermittelt, sodass ein automatischer Ablauf ermöglicht wird. Durch ein entwickeltes Softwaremodul werden die drei Bilder jedes Fisches zu einem Falschfarbenbild zusammengesetzt. Anhand des Falschfarbenbildes lässt sich auf einen Blick erkennen, ob ein Fisch ein gesuchtes Fluoreszenzmerkmal trägt oder nicht. In verschiedenen Tests wurde die grundsätzliche Funktion des Fluoreszenzmikroskops nachgewiesen. Jedoch wurde auch Verbesserungspotenzial in der Genauigkeit der Mechanik identifiziert.

5. Entwicklung des Transportsystems

In Kapitel 5 wird das neue Transportsystem vorgestellt. Im Konzept für eine automatische Prozesskette für Hochdurchsatzuntersuchungen stellt das Transportsystem den Austausch der Mikrotiterplatten zwischen den einzelnen Funktionsrobotern sicher. Im Folgenden wird zuerst das Konzept für das neue Transportsystem dargestellt. Im Anschluss werden die Hardwarekomponenten der drei Hauptelemente Schienensystem, Greifmechanismus und Plattenhalterung beschrieben. Danach wird das Konzept für die einfache, elektrische Steuerung dargestellt und die nötigen Elemente beschrieben. Abschließend wird die Evaluierung des aufgebauten Transportsystems erläutert.

Die in den Kapiteln 3 und 4 vorgestellten Robotermodule eignen sich, Teile einer Prozesskette zur Durchführung einer biologischen Untersuchung zu automatisieren. Um eine vollständige Automatisierung einer biologischen Untersuchung realisieren zu können, ist es nötig, Mikrotiterplatten zwischen den Robotern austauschen zu können. Hierfür gibt es bereits kommerzielle Transportsysteme. Dazu gehört das Laufband-System LabLynx von Hudson Robotics. Als Gelenkarmroboter mit Parallelgreifer wurden verschiedene Systeme entwickelt, so z.B. Catalyst Express von Thermo Fisher Scientific. Auch als Scara Roboter mit Parallelgreifer gibt es Lösungen zum Transport von Mikrotiterplatten. Ein Beispiel hierfür stellt der BenchBot von Agilent Technologies dar. Die genannten Systeme erfüllen nicht die Anforderungen, die zur Erfüllung der Aufgabestellung für die Dissertationsschrift erforderlich sind. Deshalb wurde im Rahmen der Arbeit ein neues Transportsystem mit entsprechender Hard- und Software entwickelt.

Die Hardware von Transportsystem und Funktionsroboter müssen auf einander abgestimmt sein. Die Mikrotiterplatte muss exakt an der dafür vorgesehenen Stelle im Roboter abgesetzt werden, da die Aktionen der Roboter immer auf fixen Koordinaten der Kammern basieren. Eine genaue Positionierung mit einer Genauigkeit von $\pm 0,1\text{mm}$ ist erforderlich, da auch das Robotersystem mit der selben Positioniergenauigkeit die Kammern anfährt. Gleichzeitig muss das Transportsystem bei einer Kantenlänge der Würfel von jeweils 500 mm bei der Bedienung mehrerer Roboter auch mehrere Meter Weg zurücklegen. Da die Anzahl der in Reihe arbeitenden Roboter nicht festgelegt ist und vom Anwender je nach Aufgabenstellung festgelegt werden kann, muss das Transportsystem eine solche Flexibilität bieten, dass es in der Länge leicht variiert werden kann.

Neben der Kompatibilität der Hardware muss auch die Steuerung des Transportsystems so sein, dass eine Kommunikation mit den Robotern möglich ist. Der Austausch einer Mikrotiterplatte in einem Roboter erfordert eine Schnittstelle, um vor dem Einbringen der Platte den

Roboter auf das Einbringen vorzubereiten und zweitens, um vom Roboter eine Statusmeldung zu bekommen, wenn der Arbeitsprozess abgeschlossen wurde. Hierfür wurde ein einfaches, flexibles Steuerungskonzept ohne zusätzlichen PC entwickelt und aufgebaut.

Die entwickelten Hardwarekomponenten sowie die Details der Steuerung werden im Folgenden beschrieben.

5.1. Konzept Transportsystem

Mit dem neuen Transportsystem muss eine hohe Präzision ($\pm 0,1\text{mm}$ Wiederholgenauigkeit) in der Endlage der Mikrotiterplatte erreicht werden und gleichzeitig müssen Verfahrswege über mehrere Meter realisiert werden. Um eine günstige und flexible Lösung erzielen zu können, werden in dem Konzept die Funktionen Transport und Endpositionierung voneinander getrennt. Der Transport außerhalb der Würfel kann dadurch mit einem einfachen mechanischen Aufbau realisiert werden. Auch das Einbringen der Mikrotiterplatte in und das Herausholen aus dem Roboter kann durch eine einfache Mechanik umgesetzt werden. Für das Ablegen der Mikrotiterplatte reicht hierbei eine mittlere Präzision ($\pm 1\text{mm}$ Wiederholgenauigkeit) aus. Die geforderte hohe Präzision in der Endlage wird nachdem die Platte durch den Transportgreifer abgelegt wurde erreicht, indem die Mikrotiterplatte durch eine aktive Plattenhalterung in ihre Endlage gebracht wird.

Die drei Teile des neuen Transportkonzepts Schienensystem, Greifarm mit Greifer und aktive Plattenhalterung sind in Abbildung 5.1 zu sehen. Links im Bild sind zwei Robotergehäuse (Würfel) zu sehen, die durch eine Linearschiene mit Antrieb im Vordergrund verbunden sind. In der Mitte ist der Greifarm zu sehen, der auf dem Wagen der Linearschiene befestigt ist. Die beiden Ausleger des Greifarms (blaue Stäbe) werden durch einen Motor angetrieben und bewegen den Greifer (dreieckige Platte) zwischen der Absetzposition im Roboter und der Fahrposition auf dem Wagen der Linearschiene. Der Greifer kann durch einen Elektromagnet gegen eine Federkraft die Greiferbacken öffnen und so eine Mikrotiterplatte aufnehmen oder absetzen. Rechts im Bild ist die aktive Plattenhalterung zu sehen. Die Mikrotiterplatte (grau) wird von der Halterung in die Endposition gebracht. Hierzu wird der grüne Keil im unteren Teil des Bildes durch eine Feder in Richtung des zweiten grünen Keils gezogen. Dadurch wird die Mikrotiterplatte im Bild nach oben und nach rechts geschoben und wird so in eine fixe Endposition gebracht.

Die Steuerung des Transportsystems ist ein wichtiger Aspekt, da das Transportsystem mehrere Roboter miteinander mechanisch verbindet und dafür auch Informationsschnittstellen benötigt. Für den Austausch einer Mikrotiterplatte muss im Roboter, aus dem die Platte geholt werden soll, eine Meldung an das Transportsystem geschickt werden, wenn die Platte zur Aufnahme bereit ist. Dann nimmt der Greifer des Transportsystems die Platte auf und fährt zum nächsten Roboter. Dort muss der Roboter mit einem Signal über die Ankunft der Platte vor dem Roboter informiert werden. Sobald der Roboter zur Aufnahme der Platte bereit ist, schickt er

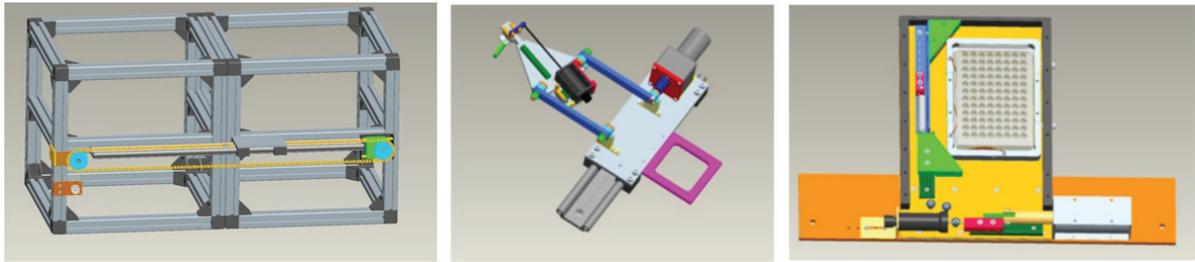


Abb. 5.1.: Dreiteiliges Konzept für das Transportsystem, links: Schienensystem (Antriebskette gelb), Mitte: Greifarm mit Greifer (nach [35]), rechts: Aktive Plattenhalterung (nach [114])

ein Signal an das Transportsystem, das daraufhin die Platte in den Roboter bringt und absetzt.

Die geforderten Signale können auf verschiedene Weisen in einem Steuerungskonzept umgesetzt werden. Ein PC zur Steuerung des Transportsystems kann über ein Master Slave Prinzip die Steuerung des Gesamtablaufs vorgeben. Der Master-PC muss hierfür Kontakt zu den PCs der einzelnen Roboter haben. Nach Erreichen der Position außerhalb des Roboters kann der Master-PC den betreffenden Roboter durch einen Befehl auf die Aufnahme der Platte vorbereiten. Die weiterzugebenden Informationen sind jeweils Boolesche Werte, d.h. sie haben entweder den Wert 1 oder den Wert 0 (Bsp.: Platte ist da= 1, Platte ist nicht da= 0, Roboter ist bereit= 1, Roboter ist nicht bereit= 0). Die Schrittmotorsteuergeräte SMCI33 von Nanotec, die ohne hin in jedem Roboter verwendet werden, verfügen über sechs Boolesche Eingänge und drei Boolesche Ausgänge. Die Kommunikation der Roboter mit dem Transportsystem kann daher auch über die Booleschen Schnittstellen geschehen.

Die Steuerung wurde als einfache elektrische Schaltung, aufbauend auf den Schrittmotorsteuergeräten SMCI33, konzipiert. Kern des Konzepts ist der Verzicht auf eine übergeordnete Steuerung durch einen weiteren PC und einen zu entwickelnden Steuerungsalgorithmus. Außerdem soll die Steuerung leicht erweiterbar sein, sodass weitere Funktionsroboter einfach in die Prozesskette ergänzt werden können.

Als Teil der Umsetzung einer einfachen Steuerung des Transportsystems wird an jedem Roboter ein Endschalter angebracht, an dem der Wagen der Linearschiene zum Halten gebracht wird. Das Schienensystem wird bei Prozessbeginn dauerhaft in den Fahrmodus versetzt. Bei Ankunft an einem der Endschalter wird dann ein Halt erzwungen. Nach dem Halt setzen die jeweiligen Steuergeräte des Roboters, an dem gehalten wurde, das Einbringen und Ausrichten der Mikrotiterplatte über elektrische Signale durch ihre Booleschen Ausgänge um. Um einzelne Roboter in der Reihe auch auslassen zu können, werden die Endschalter mit zusätzlichen Wahlschaltern überbrückbar gemacht. Der Wagen wird dann nur an den Endschaltern zum Stehen gebracht, die aktiv geschaltet wurden. Auf das Signal hin, dass der Wagen angekommen ist, das von dem entsprechenden Funktionsroboter erkannt wird, veranlasst der Roboter durch Schaltung seiner Booleschen Ausgänge selbst, dass die Platte in den Roboter übergeben wird. Nach

der Durchführung der jeweiligen Funktion im Roboter wird der Wagen wieder losgeschickt und er hält erst bei Erreichen eines aktiv geschalteten Endschalters erneut. Das Transportsystem hat damit immer die selbe Schnittstelle mit den Funktionsrobotern, egal welche Funktion in einem Roboter durchgeführt wird. Mit der dezentralen Steuerung des Transportsystems über Endschalter, muss zur Erweiterung des Systems um einen Roboter keine Software verändert werden. Der neue Roboter wird nur mit einem Endschalter ausgestattet, sodass die Ankunft des Wagens detektiert werden kann.

Für die Realisierung ist hierfür im Transportsystem ein Schrittmotorsteuergerät nötig, das den Schrittmotor zum Antrieb des Kettenrades bewegt. Das Transportsystem wird somit ohne weiteren PC nur über an das Schrittmotorsteuergerät angeschlossene, elektrische Schalter gesteuert. Die Fahrparameter werden im Vorhinein im internen Speicher konfiguriert. Start und Stopp der Bewegung wird im Betrieb über den Fahrschalter und die Endschalter gesteuert. Nach Betätigen des Fahrschalters durch den Bediener fährt der Wagen solange, bis er einen Endschalter erreicht und dort stoppt. Nach Ende des Vorgangs in dem Funktionsroboter wird das Endschaltsignal vom Funktionsroboter überbrückt, sodass der Wagen weiter fährt bis zum nächsten Endschalter. Über einen weiteren Schalter kann die Fahrtrichtung des Wagens umgedreht werden, um ihn zurück zum Startpunkt fahren zu lassen.

Ein wichtiger Teil des neuen Konzepts ist, dass das Transportsystem erweiterbar sein muss und somit auf eine unterschiedliche Anzahl an Funktionsrobotern einstellbar sein muss. Hierfür wurde ein lineares Transportsystem entwickelt, das aus einem Kettentrieb, der durch einen Schrittmotor angetrieben wird, besteht. Auf einer Doppelgleitschiene wird ein mit der Kette verbundener Wagen entlang der Roboter bewegt. Auf dem Wagen ist der Handhabungsmechanismus zum Greifen der Mikrotiterplatte befestigt. Als Antrieb wurde ein Kettentrieb gewählt, da der den Vorteil hat, dass die Kette mit sogenannten Verschlussgliedern leicht geöffnet und verlängert werden kann. Auch die Doppelschiene kann stückweise erweitert werden. So ist es möglich, je nach Anzahl zu verwendender Roboter die richtige Länge des Transportsystems einzustellen. Das Transportsystem wurde dabei so aufgebaut, dass es ein Startmodul gibt, das den Schrittmotor mit Antriebskettenrad am ersten Roboter vorsieht. Am letzten Roboter befindet sich ein Kettenrad mit Kettenspanner und ein Stück Schiene verbindet die beiden Roboter. Soll ein weiterer Roboter ergänzt werden, so kann ein Erweiterungsmodul zum Einsatz kommen. Die Spanneinrichtung wird dafür am letzten Roboter der Reihe angebracht. Ein Erweiterungstück der Schiene wird mit dem Grundstück verbunden. Die Kette wird am Verschlussglied geöffnet und es wird ein Erweiterungstück eingesetzt.

In [35] wurde ein Handhabungsmechanismus entwickelt, der eine Mikrotiterplatte von einer Position außerhalb des Roboters mit einem Greifer in den Roboter transportieren und absetzen kann. Der Mechanismus, aufgebaut als Parallelkurbeltrieb, wird durch einen DC Motor bewegt und kann demnach ebenfalls über einfache on/off Kommandos gesteuert werden. Das Greifen,

Halten und Loslassen der Platte wird über einen eigens entwickelten Parallelgreifer dargestellt, der durch einen Hubmagneten aktuiert ist. Die Besonderheit des Greifers ist hierbei, dass die Platte an einer anderen Stelle abgesetzt wird als sie wieder aufgenommen wird. Nach dem Absetzen der Platte wird sie durch die aktive Halterung um bis zu 5 mm in zwei Richtungen verschoben. Um die Mikrotiterplatte an der Position aufnehmen zu können, wurde der Greifer zweistufig aufgebaut.

In [114] wurde eine aktive Mikrotiterplatten-Halterung entwickelt. Mit einem Hubmagnet als Aktor zum Öffnen der Halterung und einer Federrückstellung zum Schließen wird eine Platte nach dem Ablegen auf der Fläche ausgerichtet und gegen feste Anschläge gedrückt. Gleichzeitig wird an drei Positionen detektiert, ob die Mikrotiterplatte anliegt. Durch die Lageinformation kann der Roboter erkennen, wann die Bearbeitung der Platte beginnen kann.

5.2. Hardwarekomponenten

Das Transportsystem besteht aus den Hardwarekomponenten Schienensystem mit Antrieb, Greifarm mit Greifer sowie der aktiven Plattenhalterung. Die Details der Komponenten werden im Folgenden beschrieben.

5.2.1. Schienensystem mit Antrieb

Zum Transport einer Mikrotiterplatte von Roboter zu Roboter wird ein einfaches Linearachsensystem eingesetzt, bei dem Antrieb und Führung getrennt sind. Die Führung der Bewegung wird durch eine Gleitschiene mit Laufwagen realisiert. Der Handhabungsmechanismus zum Greifen der Mikrotiterplatten wird auf einem Laufwagen montiert. Vier Gleitschuhe halten den Laufwagen auf der Bahn und bilden eine Festlagerung. Der Laufwagen wird mittels einer Rollenkette bewegt, die von einem Schrittmotor über ein Kettenrad angetrieben wird. Rollenketten haben gegenüber Zahnriemen und Spindeln den Vorteil, dass ihre Länge sehr einfach verändert werden kann. Mittels Kettenschlüssern kann die Kette einfach geöffnet und verlängert oder gekürzt werden.

Die Anforderungen an Linearmodule unterscheiden sich je nach Anwendungsfeld. Die notwendige Wiederholgenauigkeit bei Werkzeugmaschinen liegt bei $\pm 0,01$ mm, in der Handhabungstechnik dagegen im Bereich von 0,2 bis 0,5 mm [43]. Typische Eigenschaften von Positionierachsen sind in Tabelle 5.1 aufgeführt. Zur Erreichung der für die vorliegende Aufgabe erforderlichen mittleren Präzision (Wiederholgenauigkeit ± 1 mm) reicht der Antrieb mit Rollenkette.

Der Schrittmotor überträgt das Drehmoment über eine Zahnriemenstufe auf das Kettenrad. Mit dem Kettenrad wird die Kette vorwärts bzw. rückwärts bewegt. Um die nötige Kettenspannung zu erzeugen, wird am anderen Ende des Kettentrums ein Spannelement vorgesehen. Ein

Tab. 5.1.: Typische Eigenschaften von Positionierachsen (nach [43])

Positionierachsentyp	Geschwindigkeit	Wiederholgenauigkeit
Zahnriemenantrieb	$6m/s$	$\pm 0,1mm$ bis $0,05mm$
Kugelgewindetrieb	$1,5m/s$	$\pm 0,01mm$ bis $0,005mm$
Gleitgewindetrieb	$0,05m/s$	$\pm 0,5mm$ bis $0,1mm$
Kettentrieb	$3m/s$	$\pm 1mm$ bis $0,5mm$

Kettenrad wird mittels Federn so vom Antriebskettenrad weggedrückt, dass die Kette nicht unzulässig durchhängt.

Das Grundmodul des Schienensystems besteht aus der Gleitschiene, dem Laufwagen, dem Antriebskettenrad mit Schrittmotor, dem zweiten Kettenrad mit Spannelement und der Rollen- kette. Das Grundmodul hat die Breite von zwei Roboterwürfeln, also 1,0 m. Die Schiene ist dabei 750 mm lang. Die Kette besteht aus 205 Gliedern, die Kettenräder haben 20 Zähne und einen Durchmesser von 61 mm.

Bei Bedarf kann das Grundmodul um ein Erweiterungsmodul verlängert werden. Ein Erwei- terungsmodul besteht aus einer Gleitschiene der Länge 500 mm sowie einem Stück Rollen- kette mit 105 Gliedern. Pro ergänztes Erweiterungsmodul wird das Schienensystem um die Breite eines weiteren Roboters verlängert. Hierzu werden die beiden Gleitschienen mittels Passstif- ten ausgerichtet und über ein federndes Verbindungsstück verbunden. Die Rollen- kette wird am Kettenschloss geöffnet und das Zusatzstück wird eingesetzt. Das Antriebskettenrad bleibt am ersten Roboter montiert, das Spannelement wird an den neuen nun letzten Roboter montiert. Für jeden weiteren Roboter, der ergänzt werden soll, wird ein weiteres Erweiterungsmodul ergänzt.

Das entwickelte Schienensystem mit Antrieb ist in Abbildung 5.2 zu sehen. Oben links ist ein Überblick über das neue Transportsystem zu sehen. Die Linearschiene verbindet hierbei zwei Grundroboter. Oben rechts ist eine Nahaufnahme des entwickelten Rollenkettenantriebes zu se- hen. Zu erkennen ist das Antriebskettenrad, das über einen Zahnriemen mit einem Schrittmotor verbunden ist. Weiter ist der Beginn der Doppelgleitschiene zu sehen. Die beiden Schalter set- zen den Fahrmodus aktiv und veranlassen die Richtungsumkehr des Antriebs. Unten links ist der auf dem Wagen befestigte Greifarm mit Greifer zu sehen, der in [35] entwickelt wurde. Der Hubmagnet (schwarz) schiebt die Backen des Greifers gegen die Kraft der diagonalen Feder auf. In der gezeigten Position kann der Greifarm auf der Linearschiene an den Robotern vorbei be- wegt werden. Unten rechts im Bild ist die in [114] entwickelte aktive Plattenhalterung zu sehen. Der Hubmagnet (schwarze Box, rechts) zieht gegen die Kraft der Feder den Keil weg von der Mikrotiterplatte und öffnet die Halterung. Ein Dämpfer (schwarzer Zylinder, links) verhindert bei Abschalten der Kraft des Hubmagneten, dass der Keil schlagartig gegen die Mikrotiterplatte stößt. An der gezeigten Position der Mikrotiterplatte setzt der Greifarm die Mikrotiterplatte in jedem Roboter ab.

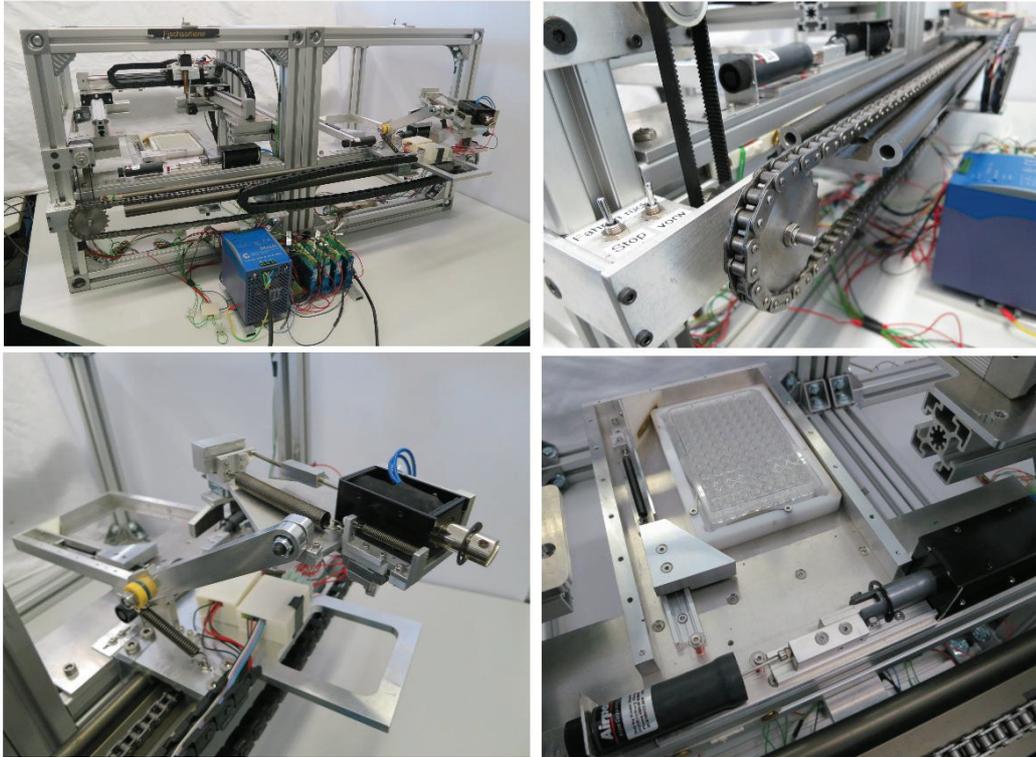


Abb. 5.2.: Hardware des neuen Transportsystem, oben links: Transportsystem mit zwei Roboterwürfeln, oben rechts: Linearschiene mit Rollenkettenantrieb, unten links: Greifarm mit Greifer, unten rechts: aktive Plattenhalterung

5.2.2. Greifarm

In [35] wurde ein Handhabungsmechanismus entwickelt, der eine Mikrotiterplatte greifen kann und sie vom Schienensystem in die Würfel und auch heraus bringen kann. Hierfür ist eine Greifkomponente zum Festhalten und Loslassen einer Mikrotiterplatte nötig und ein Bewegungsmechanismus, der den Greifer so bewegt, dass die Positionen im Roboterwürfel und auf dem Schienensystem erreicht werden können. Die Komponenten werden nachfolgend beschrieben.

Bewegungsmechanismus

Die geometrischen Randbedingungen für den Greifarm sind durch die Geometrie der Würfel vorgegeben. Vorgegeben ist die Größe der Öffnung, durch die die Mikrotiterplatte in den Würfel gebracht werden soll ($H = 160\text{mm}$, $B = 320\text{mm}$). Die Mikrotiterplatte muss von oben in die aktive Halterung im Würfel eingelegt werden und kann nicht in horizontaler Ebene eingeschoben werden. Die Aktorik der aktiven Halterung befindet sich am äußeren Rand des Würfels und ragt an der höchsten Stelle zirka 40 mm über die Ebene, auf der die Platte abgelegt werden soll. Die Position, an der die Platte im Würfel abgelegt werden soll, ist 96 mm von der Außenkante

des Würfels entfernt (siehe Bereich C in Abb. 5.3). Die Platte muss durch den Mechanismus aus der Position innerhalb des Roboters soweit herausbewegt werden, dass die Mikrotiterplatte außen am Würfel entlang bewegt werden kann. Die Mikrotiterplatte hat eine Länge von 120 mm. Die Länge des Mikrotiterplattenrahmens beträgt 145 mm. Der Mindestweg, um den die Platte bewegt werden muss, ist also $96 + 145 = 241$ mm. Das Gesamtgewicht der gefüllten Mikrotiterplatte mit Rahmen beträgt 160 g.

Die Mikrotiterplatte muss an einer anderen Stelle abgelegt werden, als sie aufgenommen wird. Das liegt daran, dass nach dem Ablegen die Platte von der aktiven Halterung um einige Millimeter verschoben werden soll, um die präzise Endposition zu erreichen. Wird die Platte vom Greifer direkt an der Endposition abgesetzt, so kann es durch die Ungenauigkeit des Greifers dazu kommen, dass die Platte gegen die Endanschläge der Plattenhalterung stößt und teilweise auf der Halterung zum Liegen kommt. Ein richtiges Positionieren ist in dem Zustand nicht möglich und der nachfolgende Prozess kann nicht gestartet werden. Die Anzahl der Aktoren soll für den Handhabungsmechanismus so gering wie möglich sein. Außerdem sollen die nötigen Aktoren durch einfache „ein-, aus-Befehle“ steuerbar sein. Gelenkarmroboter, Portalroboter und Scararoboter mit entsprechendem Greifer sind alle für die Aufgabe geeignet, haben aber jeweils mindestens drei Freiheitsgrade und benötigen Aktoren entsprechend der Anzahl der Freiheitsgrade. Eine komplizierte Steuerung ist dafür nötig.

Um eine solche Steuerung zu umgehen, wurden in [35] verschiedene Konzepte mit möglichst wenig Aktoren ausgearbeitet. Mögliche Konzepte zur Reduktion der Anzahl der Aktoren sind die Nutzung der Schwerkraft, eine Kopplung von Aktoren über Riementriebe, der Aufbau mehrstufiger Bewegungen mit Seilantrieb oder der Einsatz einer Parallelkurbel. Die Konzepte werden im Folgenden beschrieben.

Eine Teleskopschiene, die gegenüber der Horizontalen geneigt so angebracht wird, dass sie durch die Schwerkraft bedingt komplett ausgefahren wird, kann verwendet werden. Mittels eines am weitest ausgefahrenen Element angebrachten Zugseils kann die Schiene auf ihr Minimalmaß zusammengeschoben werden.

Eine andere Möglichkeit, die Aufgabe zu lösen, ist ein Riemengetriebe. Zwei Stäbe könnten über einen Zahnriemen miteinander verbunden werden. Stab 1 ist am unteren Drehpunkt auf der Unterlage montiert. An seinem oberen Ende ist drehbar Stab 2 montiert. Die Lage des freien Endes von Stab 2, an dem die Mikrotiterplatte befestigt werden soll, wird damit vollständig durch die beiden Winkel zwischen Stab1 und der Horizontalen und zwischen Stab 1 und Stab 2 bestimmt. Werden die beiden Stäbe nun mit einem gekreuzten Zahnriemen verbunden, so verhalten sich die Winkeländerungen gegenläufig. Wird Stab 1 so gedreht, dass er sich der Horizontalen nähert, so wird sich Stab 2 so entgegengesetzt heben, dass er sich ebenfalls der Horizontalen annähert. Der Mechanismus nähert sich damit seiner maximal erreichbaren Entfernung. Zeigt Stab1 senkrecht nach oben, so liegt Stab 2 parallel und zeigt nach unten.

Ein weiteres Konzept ist eine Seilbrücke mit Linearschiene. Ein am Fuß drehbar gelagerter Stab, an dem am Ende eine Linearschiene im rechten Winkel angebracht ist, bildet den Grundmechanismus. Durch die Schwerkraft fällt die Seilbrücke nach vorn und der Wagen der dadurch gegenüber der Horizontalen geneigten Linearschiene fährt an das äußerste Ende. Über einen Seilzug wird der Wagen gegen die Schwerkraft an den Anfang der Linearschiene gezogen. Bei Erreichen des Anschlages führt das weitere Ziehen am Seil dazu, dass sich der Grundstab dreht. Die maximale Endlage hierfür darf die Senkrechte nicht überschreiten, da sonst schwerkraftbedingt der Mechanismus nach hinten fallen wird, da über das Seil keine Druckkräfte übertragen werden können.

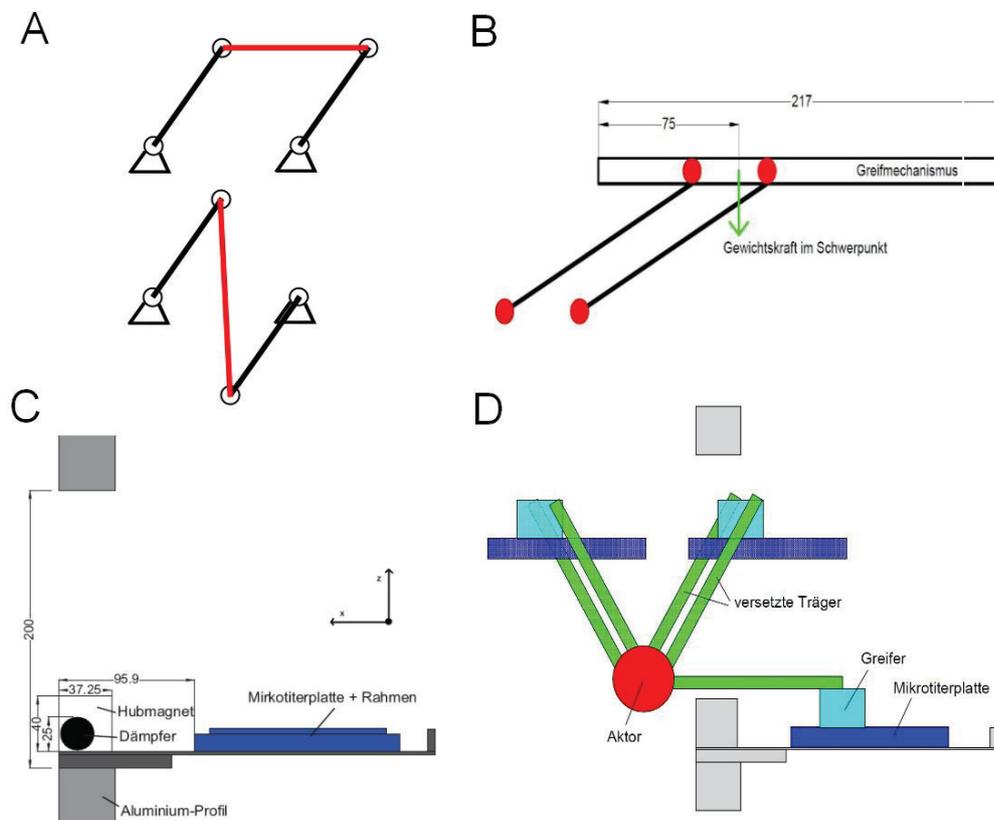


Abb. 5.3.: Übersicht Konzept Greifarm; A: Parallelkurbel (oben), Zwillingskurbel (unten), B: Skizze der ermittelten Geometrie des Greifarms, C: Geometrische Randbedingungen der Endlage der Platte, D: Bewegungsskizze Greifarm (nach [35])

Das gewählte Konzept ist das einer Parallelkurbel. Es ist ähnlich dem Prinzip eines Absetzkippers. Zwei Kurbeln gleicher Länge bewegen eine Last zwischen den Kurbeln (siehe Abbildung 5.3 D). Die Last, hier eine Mikrotiterplatte, soll zu jeder Zeit horizontal liegen, da bei zu großer Neigung möglicherweise Inhalt austritt. Werden beide Kurbeln gleichzeitig angetrieben, ist das der Fall, wenn die Lagerung der Mikrotiterplatte frei drehbar ist und sich im Schwerpunkt der Mikrotiterplatte befindet. Die Platte richtet sich damit immer selbst in die ho-

rizontale Lage aus. Da nur ein Aktor für den Greifarm verwendet werden soll, müsste für den Antrieb beider Kurbeln gleichzeitig eine Getriebemechanik entwickelt werden. Um den mechanischen Aufwand so gering wie möglich zu halten, soll nur eine Kurbel angetrieben werden. Die Öffnung, durch die die Platte in den Roboter eingebracht werden soll, ist nicht sehr hoch. Gleichzeitig muss ein weiter Weg von der Linearschiene bis zur Mikrotiterplattenhalterung im Roboter überwunden werden. Daher muss sich die Mikrotiterplatte weit am Ende der Kurbel befinden. Ein freies Hängen wie an einer Schaukel ist deshalb nicht möglich. Der Schwerpunkt der Last verändert sich, je nachdem, ob der Greifer eine Mikrotiterplatte hält oder nicht. Die beiden Kurbeln werden daher zur Aufnahme der Mikrotiterplatte so seitlich versetzt an der Platte angebracht, dass der Schwerpunkt zu jeder Zeit zwischen den Lagerpunkten liegt (siehe Abbildung 5.3 B). Unter Annahme idealer Drehgelenke reicht hierbei der Antrieb nur einer Kurbel. Die wirkende Kraft überträgt sich über die Platte auf die zweite Kurbel und bewegt sie passiv mit. Real jedoch bewirkt das Lagerspiel in den beiden Drehgelenken, dass die Platte verkippen kann und es zu einem Verklemmen kommt. Für den Fall, dass beide Kurbeln senkrecht stehen und in kleinen Winkeln zu beiden Seiten um die Mittellage herum, funktioniert die Parallelkurbel wie gewünscht. Bei Annäherung an die Endlagen, wenn die Kurbeln horizontal stehen, trägt neben dem Lagerspiel das Eigengewicht der nicht angetriebenen Kurbel zur Verkippenneigung bei. In den jeweiligen Endlagen, wenn die Kurbeln horizontal liegen, kommt es zu einem instabilen Zustand. Der Satz von Grashof besagt, dass in den horizontalen Endlagen ein durchschlagendes Getriebe vorliegt [49]. Aus der Parallelkurbel kann eine Zwillingskurbel werden (siehe Abbildung 5.3 A). Die Mikrotiterplatte wird dabei massiv verkippt und der Mechanismus wird blockiert. Der verkippte Zustand muss verhindert werden. Um der Problematik Rechnung zu tragen, wird an der nicht angetriebenen Kurbel eine Zugfeder installiert, die bei senkrechter Stellung der Kurbeln kraftfrei ist. In beide Richtungen gleichermaßen wirkend, wird bei Veränderung der Winkels aus der Senkrechten heraus eine Federkraft aufgebracht, die die nicht angetriebene Kurbel zurück in Richtung der Senkrechten zieht. Hiermit können das Eigengewicht der Kurbel und das Lagerspiel kompensiert werden. In den Endlagen ist die Federkraft am größten. Ein Durchschlagen der Kurbel zu einer Zwillingskurbel wird damit ebenfalls ausgeschlossen. Somit ist gewährleistet, dass die Parallelkurbel immer zuverlässig funktioniert. Der Bewegungsablauf des aufgebauten Greifarms mit Parallelkurbel ist in Abbildung 5.4 zu sehen. Links ist der Greifarm ausgefahren und die Mikrotiterplatte wird in der aktiven Plattenhalterung (rot) aufgenommen. In der Mitte wird der Greifarm mit der Mikrotiterplatte aus dem Roboter gebracht. Rechts steht der Greifarm kurz vor der Fahrposition, sodass die Mikrotiterplatte mit dem Wagen entlang der Roboter bewegt werden kann.

Zur Abschätzung der nötigen Drehzahl des Motors für den Bewegungsmechanismus wurde angenommen, dass die Platte langsam in den Würfel gefahren werden soll. Eine Gesamtdauer des Fahrprozesses von drei Sekunden wird als angemessen angesehen. Da für das Einschwenken

der Mikrotiterplatte nur eine halbe Umdrehung nötig ist, entspricht das ca. einer Drehzahl von 10 U/min. Das nötige Drehmoment aus den Gewichten und Hebelverhältnissen wird mit 1,6 Nm berechnet. Es wird ein Gleichstrommotor mit Getriebestufe gewählt, da er einfach durch Schalten von der Betriebsspannung ein- bzw. auszuschalten ist.

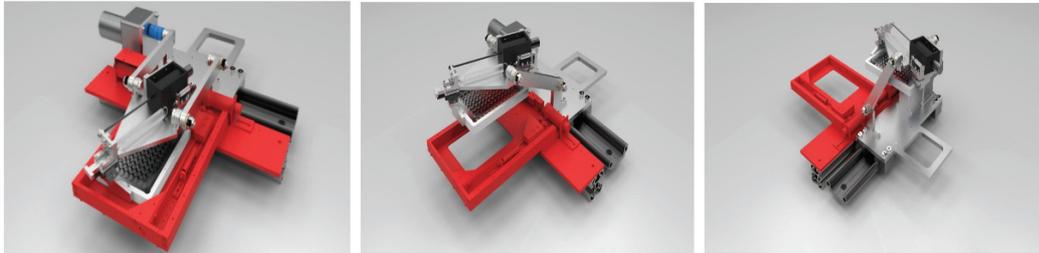


Abb. 5.4.: Bewegung Greifarm (Bilder aus [35])

Greifer für Mikrotiterplatten

Zum Transport der Mikrotiterplatten ist ein sicheres Greifen und Loslassen wichtig. Hierfür wurde in [35] zusammen mit dem Bewegungsmechanismus ein Greifer entwickelt. Wichtig hierbei ist nicht nur die Haltefunktion, sondern auch die Bewegung der Platte um ca. 5 mm während des Aufnehmens. Wie bereits erwähnt, verschiebt die aktive Plattenhalterung im Roboter die Mikrotiterplatte in ihre Endlage. Dadurch muss die Platte an einem anderen Punkt aufgenommen werden, als sie abgesetzt wurde.

Ergreifen und Festhalten geht mit folgenden Möglichkeiten [41]:

- Spannen zwischen Klemmbacken
- Haften und Kraftfelder (Saugluft, Magnetfeld, Adhäsion, kryotechnischer Effekt)
- Verhaken durch Anstechen mit Nadel
- Halten mit Kapillarkräften
- Greifen durch formpaariges Schließen.

Die wichtigsten Greifertypen für Industrieroboter sind mechanisch (Winkelgreifer, Parallelbackengreifer), pneumatisch (Saugpipette, Flächensauggreifer), elektromagnetisch (Magnetgreifer) oder formschlüssig (Nadelgreifer) [41, 42].

Das Greifen der Mikrotiterplatte kann über einen Elektrohaftmagneten erreicht werden. Problem dabei ist jedoch, dass die Kraft schon bei kleinen Luftspalten stark abfällt. Ungenauigkeiten in der Positionierung des Greifers können damit dazu führen, dass die Platte nicht angehoben werden kann. Da die Mikrotiterplatte keine magnetischen Teile hat, muss ein Rahmen um die Platte vorgesehen werden.

Eine weitere Möglichkeit ist es, mit Spannbacken die Mikrotiterplatte zu klemmen. Zwei bewegliche Backen werden in einem Winkel gegenüber der Längsseite der Platte bewegt. Damit kann beim Schließen die Platte entlang der schrägen Achse und somit gleichzeitig in x- und y-Richtung verschoben werden. Hiermit wird erreicht, dass die Platte zuerst aus ihrer Endposition verschoben wird und dann erst aufgenommen wird. Die Klemmlösung mit zwei parallelen Backen wurde daher gewählt. Die Verschiebung soll 9 mm in x-Richtung und 3 mm in y-Richtung sein. Daraus ergibt sich ein Winkel von $18,4^\circ$.

Der in [35] entwickelte Greifer wird mit Federn geschlossen und mit einem Hubmagnet geöffnet. Der Greifer befindet sich also durch die Federkräfte im geschlossenen Zustand in Ruhe. Nur um den Greifer zu öffnen und die Mikrotiterplatte loszulassen, wird Energie aufgewendet. Dadurch wird nur in der kurzen Zeit des Öffnens Strom verbraucht. Auch im Falle eines Stromausfalls wird daher die Mikrotiterplatte weiter gehalten. Die beiden Backen zum reibschlüssigen Halten der Mikrotiterplatte werden auf je einem Gleitschuh, die auf einer Miniaturlinearschiene bewegt werden, angebracht. Die Linearschiene wird im geforderten Winkel von $18,4^\circ$ gegenüber der langen Kante der Mikrotiterplatte an der Trägerplatte befestigt. Eine große Feder verbindet die beiden Greifbacken miteinander. Die große Feder bringt also die Greifkraft auf. Die kleine Feder verbindet die hintere Backe mit einem festen Anschlag auf der Trägerplatte. Durch die kleine Feder wird ein zweiphasiger Öffnungsprozess des Greifers realisiert. Beim Öffnen des Greifers durch die ansteigende Kraft des Hubmagneten wird zuerst die Haltekraft der kleinen Feder überwunden. Dadurch wird die Mikrotiterplatte inklusive der Backen, die sie halten, entlang der Öffnungsachse verschoben. Übersteigt die durch den Hubmagneten wirkende Kraft die Haltekraft der großen Feder beginnt die zweite Phase und die Backen geben die Mikrotiterplatte frei. Beim Aufnehmen einer Mikrotiterplatte laufen die Phasen in umgekehrter Reihenfolge ab. Durch die abnehmende Kraft des Hubmagneten schließen sich zu erst die Backen und klemmen die Mikrotiterplatte. Danach zieht die kleine Feder die Backen samt Mikrotiterplatte aus der Endposition in die Aufnahme position. Der konstruierte Greifer ist in Abbildung 5.5 zu sehen. Links ist die Mikrotiterplatte (rot) von den Greifbacken (grün) gegriffen. Die Greifbacken sind auf Gleitwagen befestigt, die sich auf der schrägen Führungsschiene (schwarz) bewegen. Die Federn (blau) drücken die Greiferbacken an die Mikrotiterplatte. Rechts ist der Greifer von der Seite zu sehen. Die Mikrotiterplatte (grau in weißem Rahmen) wird von den Backen gehalten. Der Hubmagnet (schwarze Box) drückt durch eine Schubstange (schwarz) die Backen auseinander und ermöglicht ein Öffnen des Greifers.

5.2.3. Aktive Plattenhalterung zur Endpositionierung

In [114] wurde eine aktive Plattenhalterung zur Endpositionierung einer Mikrotiterplatte entwickelt.

Durch die wenig präzise Halteposition des Schienensystems und die ungenaue Ablage der

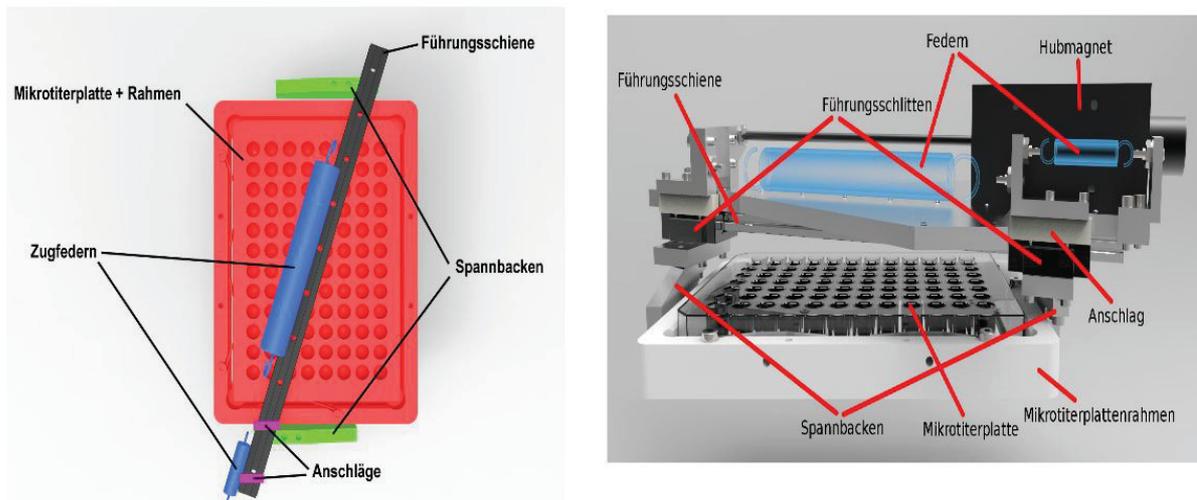


Abb. 5.5.: Übersicht Konzept Mikrotiterplattengreifer; links: Parallelgreifer mit schräger Hauptachse, rechts: Hubmagnet zum Öffnen, Spiralfedern zum Schließen des Greifers (Bilder aus [35])

Mikrotiterplatte durch den Greifarm, ist die Endposition mit einer großen Abweichung behaftet. Außerdem muss beim Ablegen der Mikrotiterplatte ein bestimmter Abstand zu den Endanschlagspunkten gehalten werden, damit beim Ablegen von oben die Platte nicht auf den Endanschlagspunkten zum Liegen kommt und damit verkippt. Der seitliche Abstand muss während der Endpositionierung überwunden werden. Für den Arbeitsprozess im Roboter ist die präzise Position der Mikrotiterplatte enorm wichtig. Hierfür wurde die aktive Plattenhalterung entwickelt. Die Halterung kompensiert die Abweichungen der vorhergehenden Systemteile und richtet die Mikrotiterplatte gegen einen festen Anschlag aus.

Immens wichtig bei der Konstruktion der Halterung ist, dass die Mikrotiterplatte von oben und von unten vollständig zugänglich ist. Der Fischsortierer befüllt die Kammern der Platte von oben und die bildgebenden Roboter benötigen ein freies Sicht- und Bewegungsfeld unter der Platte.

Mikrotiterplatten weisen eine so große Toleranz zwischen den einzelnen Herstellern und in der Fabrikation auf, dass eine zuverlässige Positionierung der Kammern nur auf Grund der Positionierung der Außenkante der Platte nicht die erforderliche Präzision erreicht. Außerdem haben die Platten unterschiedliche Außengeometrien, was eine zuverlässige Positionierung erschwert. Weiter muss auch die Aufnahme durch den Greifer und die mögliche Überprüfung der Endposition möglich sein.

Aus den genannten Gründen wird in [114] ein Mikrotiterplattenrahmen entworfen, in den die Platten eingelegt werden. Im Rahmen befinden sich Federn zum Klemmen von Mikrotiterplatten und zum Ausgleich von Größenunterschieden. Die Außenecken des Rahmens werden so abgerundet, dass sie mit wenig Reibung auf schrägen Flächen abgleiten. Außerdem wird die Außenkante an einer Seite mit einem Leitlack beschichtet, sodass elektrisch die Anlage der

Platte an drei Endlagenpunkten überprüft werden kann.

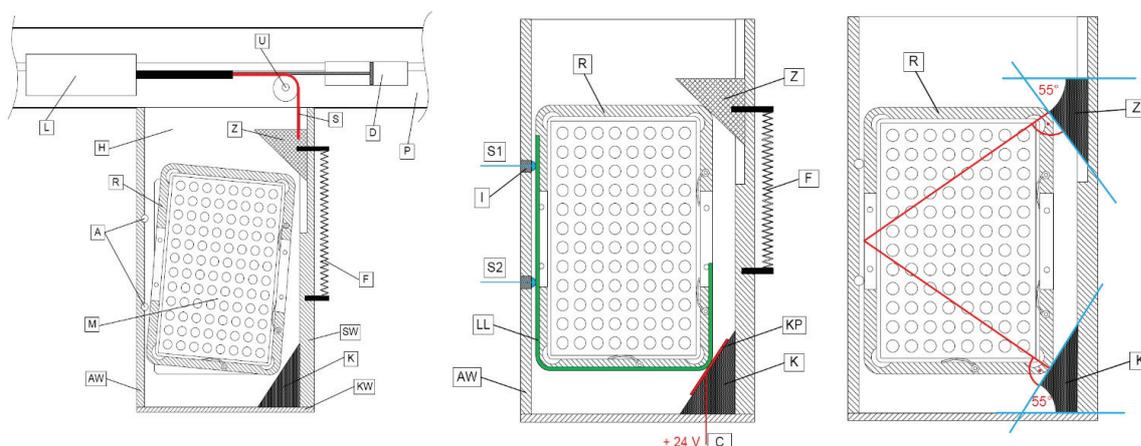


Abb. 5.6.: Konzept aktive Plattenhalterung; links: Mechanik der Halterung; Mitte: Detektion der korrekten Endlage; rechts: grafische Ermittlung des Keilwinkels (aus [114])

Nach dem Ablegen einer Mikrotiterplatte in der aktiven Plattenhalterung wird die Platte mit einem Keil durch eine Federkraft so lange geschoben, bis sie an den Endanschlägen anliegt. Einer der Endanschläge ist ebenfalls in Keilform, sodass die Mikrotiterplatte leicht in die Endposition gleiten kann. Der durch die Federkraft bewegte Keil wird durch einen Hubmagnet bewegt, wenn die Halterung geöffnet werden soll. Die Mechanik der Plattenhalterung ist in Abbildung 5.6 zu sehen. Links ist die geöffnete Halterung mit einer Mikrotiterplatte in beliebiger Ausrichtung gezeigt. Der Hubmagnet (L) zieht über ein Seil und die Umlenkung (U) den Schließkeil (Z) entgegen der Federkraft der Feder (F). Der Dämpfer (D) verhindert eine schnelle Bewegung des Plungers des Hubmagneten, sodass der Keil nicht stoßartig auf die Mikrotiterplatte prallt. In der Mitte ist die Mikrotiterplatte in der Endposition gezeigt. Der Keil (Z) wurde durch die Feder in Richtung des zweiten Keils (K) gezogen. Durch den Keil (K) wird eine Spannung von 24V in die leitende Beschichtung (grün) des Mikrotiterplattenrahmens (R) eingeleitet. Ist die Mikrotiterplatte korrekt positioniert, kann an den Sensoren (S1) und (S2) eine Spannung gemessen werden. Rechts ist der Keilwinkel von 55° gezeigt, der sich für eine Bewegung der Platte als geeignet gezeigt hat.

Der Zentrierkeil wird auf einer Miniaturlinearführung gelagert und durch eine Zugfeder in die geschlossene Position gezogen. Ein Zylinderhubmagnet zieht über ein Seil den Zentrierkeil gegen die Federkraft in die offene Position. Der Stößel des Hubmagneten wird über eine Miniaturlinearführung gelagert. Wird die Mikrotiterplatte beim Positionieren zu ruckartig beschleunigt, so besteht die Gefahr, dass Flüssigkeit aus den Kammern austritt. Das Austreten von Flüssigkeit ist zwingend zu vermeiden und daher wird ein Luftdämpfer ergänzt. Der Dämpfer ist einstellbar und ermöglicht eine ruckfreie Verschiebung der Mikrotiterplatte in die Endposition.

Die Grundplatte für die Halterung muss so dünn wie möglich sein, da der Abstand der Ka-

meras unterhalb der Halterung zu den Kammern der Platte so gering wie möglich sein soll. Für das Herzschlagmikroskop ist eine Gegenstandsweite von nur wenigen Millimetern nötig. Damit die Halterung trotz der geringen Materialstärke stabil ist und eine ebene Auflage bildet, werden auf die Grundplatte Versteifungsstreben geschraubt. Eine davon dient gleichzeitig als Anschlagkante, an der die Mikrotiterplatte ausgerichtet wird .

Herkömmliche Endschalter als Taster mit Federkraft üben immer eine Kraft auf das Objekt aus, das den Schalter drückt. Die Kraft muss zusätzlich vom Schließfaktor aufgebracht werden, während er die Platte gegen die Endschalter drückt. Meist ist außerdem die systembedingte Wiederholgenauigkeit herkömmlicher Schalter zu gering für die Anwendung. Präzisionsendschalter mit der geforderten Genauigkeit von 0,01 mm sind aber teuer. Deshalb wurden in [114] für das vorliegende Konzept metallische Kontaktpins als Endanschläge verwendet. Die Kontaktpins sind hinreichend präzise und gewährleisten eine immer gleiche Endposition. Der Mikrotiterplattenrahmen wird aus Kunststoff gefertigt. Um den Rahmen elektrisch leitend zu machen, um einen Kontakt elektrisch detektieren zu können, wird der Rahmen mit einem Kontaktlack beschichtet. Durch den Kontaktlack kann über die Pins direkt eine Positionsmeldung abgeleitet werden, sobald die Kontakte berührt werden.

Zur Überprüfung der korrekten Position der Mikrotiterplatte wird in den Konterkeil ein elektrisches Kontaktplättchen eingelassen. Durch den aus Kunststoff gefertigten Konterkeil ist das Kontaktplättchen zum Rest der Halterung isoliert. An der Anschlagswand werden zwei Anschlagpins installiert. Mit einer Dreipunktanlage ist die Position der Platte in der Ebene vollständig definiert (siehe Abb. 5.6). Nach dem Prinzip wird die Überprüfung der Position aufgebaut. Über das Kontaktplättchen werden 24 V bereit gestellt. Berührt die Platte das Kontaktplättchen, so entsteht durch den Kontaktlack am Rahmen eine leitende Verbindung. An den beiden Anschlagpins wird nun geprüft, ob 24 V anliegen. Ist das an beiden Pins der Fall, so muss die Platte richtig positioniert sein. Die 24 V werden am Konterkeil in den Mikrotiterplattenrahmen eingeleitet und wenn beide Pins ebenfalls am Rahmen anliegen, dann liegt eine durchgehende Verbindung vor. Die Detektion der 24 V an den Anschlagpins wird über die Eingänge der Schrittmotorsteuergeräte SMCI33 vorgenommen. Fehlt eine der drei Kontaktstellen, so bleiben einer oder beide Eingänge ohne Signal und der Roboter kann erkennen, dass die Platte nicht richtig positioniert ist.

Die Winkel für die Keile der Halterung wurden grafisch bestimmt. Die Länge und Breite der Mikrotiterplatte und die des Rahmens sind vorgegeben. Die beiden Kraftlinien der Berührungspunkte zwischen den beiden Keilen und der jeweiligen Ecke des Rahmens der Mikrotiterplatte sollen sich in der Mitte der Außenkante des Rahmens treffen. Somit ist gewährleistet, dass die Platte von beiden Keilen gleich mit Kraft beaufschlagt wird und die Kraft auf die Anschlagpins gerichtet ist. Unter der weiteren Annahme, dass die Keilfläche senkrecht zu der Kraftlinie stehen soll, ergeben sich die beiden Winkel von je 55° .

Die entwickelte Halterung ist in Abbildung 5.7 zu sehen. Links ist die Mikrotiterplatte (M) durch die beiden Keile in die Endposition gedrückt. Rechts ist die aufgebaute Halterung von der Seite zusehen. Im Hintergrund sind die Kabel zu sehen, die den Hubmagneten, die 24V Einspeisung für den Keil und die beiden Sensoren mit den Steuergeräten verbindet.

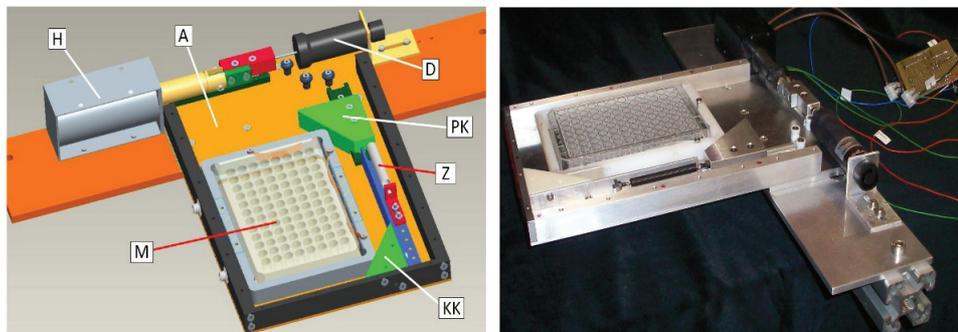


Abb. 5.7.: Hardware Aktive Plattenhalterung (modifiziert nach [114])

5.3. Ereignissteuerung mit einer einfachen, elektrischen Schaltung

Die Steuerung des Transportsystems wird dezentral organisiert. Eine Möglichkeit der Steuerung, bei der auf einen weiteren PC verzichtet werden kann, ergibt sich aus den Funktionen der Schrittmotorsteuergeräte, die in jedem Roboter verbaut sind. Mit den sechs elektrischen Eingängen können mittels Schaltern Informationen aufgenommen werden. Weiter verfügt jedes Steuergerät über drei open collector Ausgänge, die gesteuert zwischen den Zuständen aktiv und inaktiv wechseln können. Mit den genannten Grundfunktionen wird das Transportsystem von allen Robotern je nach Ereignis gesteuert. Das Transportband wird bei Arbeitsbeginn vom Bediener in den Fahrmodus geschaltet und fährt demnach dauerhaft. An jedem Roboter gibt es einen Endschalter, der veranlasst, dass der Wagen anhält und gleichzeitig der Roboter die Information erhält, dass der Transportwagen angekommen ist. Die Aktorik des Greifarms und des Greifers wird dann über die elektrischen Ausgänge der Steuergeräte des Roboters mittels An/-Ausbefehlen angesteuert. Nach Beenden der Roboterfunktion und Herausholen der Mikrotiterplatte mit dem Greifer wird der Transportwagen vom Roboter wieder in Bewegung gesetzt.

Das entwickelte Steuerungskonzept als Ereignissteuerung ist in Abbildung 5.8 gezeigt. Die Bezeichnung Ereignissteuerung wurde gewählt, da die Steuerung nicht durch einen zentralen Algorithmus realisiert ist. Nach dem Start des Transportsystems werden auszuführende Aktionen durch Ereignisse eingeleitet. Das Erreichen eines Endschalters wird vom entsprechenden Roboter als Ereignis detektiert und der Roboter kann das Einbringen der Mikrotiterplatte veranlassen. Nach Ablauf der Einzelaktionen zum Ausrichten der Mikrotiterplatte wird geprüft, ob die Mikrotiterplatte richtig positioniert wurde. Das Ereignis gibt dem Roboter die Bearbeitung der Mikrotiterplatte frei. Nachdem die Platte wieder aus dem Roboter aufgenommen wurde,

überbrückt der Roboter den noch gedrückten Endschalter elektrisch. Das Ereignis führt dazu, dass das Transportsystem den Wagen wieder in Bewegung setzt.

In Abbildung 5.8 sind die für die neue Steuerung nötigen Komponenten gezeigt. Auf der schwarzen Gleitschiene wird der Wagen (W) durch die Rollenkette (gelb) bewegt. Die Platine (PT) ist an das Steuergerät SMCI33 (schwarzes Rechteck) angeschlossen. Durch Betätigen des Fahr Schalters (links oben) bewegt das Steuergerät den Motor (M) und damit die Rollenkette. Von der Platine (PT) wird eine Signalleitung aktiv geschaltet, die mit allen Endschaltern verbunden ist und als Schleife zurück zur Platine kommt. Solange die Leitung aktiv ist, fährt der Motor. Wird sie durch einen Endschalter (ES) unterbrochen, so stoppt der Motor. Mit dem Wahlschalter (AS1) wird entschieden, ob der Wagen an dem Roboter stehen bleiben oder vorbeifahren soll. In jedem Roboter ist eine Platine (P1-Px) vorhanden. Sie ist mit den Steuergeräten der Roboter verbunden und gibt die Informationen des Transportsystems an den Roboter weiter. Gleichzeitig leitet sie die Steuerbefehle zur Bewegung des Greifarms und des Greifers zur Platine des Wagens (PW) weiter. Auf der Platine des Wagens (PW) befinden sich die Leistungstreiber für die Aktoren des Greifarms und des Greifers. Durch die Platinen (P1-Px) steht jeder Roboter mit der Platine (PW) in Kontakt und kann durch Schalten der Signalleitungen die Aktionen auslösen.

Die weiteren Details der Komponenten der neuen Steuerung werden nun beschrieben.

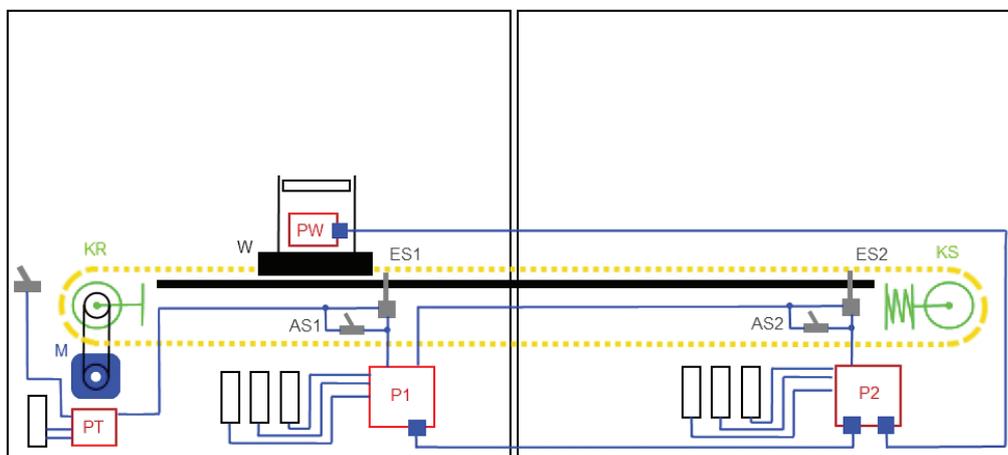


Abb. 5.8.: entwickeltes Konzept zur Steuerung des Transportsystems; KR= Kettenrad, KS= Kettenspanner, M= Motor, ES1= Endschalter Roboter1, ES2= Endschalter Roboter2, AS1= Haltewunschschalter Roboter1, Haltewunschschalter Roboter2 W= Wagen, PT= Platine Transportsystem, P1= Platine Roboter1, P2= Platine Roboter2, PW= Platine Wagen

Ein Schrittmotorsteuergerät für das Transportsystem ist zusätzlich zu denen der einzelnen Roboter nötig. Das Steuergerät bewegt den Wagen auf der Schiene in Vorwärts- sowie Rückwärtsrichtung. Das Stoppen und das wieder Losfahren lassen wird durch mechanische Schalter und die Schrittmotorsteuerungen in den einzelnen Funktionsrobotern gesteuert. Ein PC zur

Steuerung ist nicht nötig, da verschiedene Fahrprofile im Steuergerät zum Antrieb der Kette gespeichert und dann durch elektrische Schalter ausgelöst werden können. Im Drehzahlmodus kann über binäre Eingänge ein Fahrprofil gestartet und gestoppt werden. Solange eine Spannung am Eingang anliegt, ist das Profil aktiv und der Motor dreht sich mit entsprechender Konfiguration. Liegt kein Signal an, stoppt der Motor. Eine Richtungsumkehr kann über ein 24 V Signal am Eingang 2 erreicht werden. Das Schalten der Spannung zur Steuerung des Transportsystems wird über elektrische Schalter realisiert. Nach dem Aufsetzen einer Mikrotiterplatte auf den Wagen wird vom Bediener das Transportsystem per Schalterdruck gestartet. Der Wagen bewegt sich daraufhin solange, bis er am ersten Roboter einen Endschalter erreicht. Beim Drücken des Endschalters wird das anliegende Fahrsignal unterbrochen und der Wagen kommt zum Stehen. Die Endschalter an den Robotern müssen daher alle beim Drücken die selbe Leitung, die zum Steuergerät des Transportsystems geht, unterbrechen. Hierfür wurde ein elektrisches Konzept erarbeitet, bei dem sich in jedem Roboter eine Platine mit einfacher Funktionalität zur Leitung von logischen Signalen befindet. Mit einem Steckerkonzept nach dem Daisy Chain Prinzip¹ werden von jedem Roboter zum nächsten die anliegenden Signale weitergeschleift. So können alle Roboter per Endschalter die Leitung zum Steuergerät des Transportsystems unterbrechen. Da die Endschalter drei Kontakte haben, wird gleichzeitig für den entsprechenden Roboter eine Signalleitung geschlossen. Damit hat der Roboter die Information, dass der Wagen angekommen ist.

Nach dem Halten muss der Handhabungsmechanismus die Mikrotiterplatte in den Würfel schwenken und dort durch Öffnen des Greifers absetzen. Hierfür muss jedoch zuerst die aktive Plattenhalterung im Würfel geöffnet werden, sodass die Mikrotiterplatte auch eingelegt werden kann. Da hierbei Informationen über die verschiedenen Zustände der einzelnen Aktoren verarbeitet werden müssen, sodass die Aktoren nur nacheinander und in der richtigen Reihenfolge aktuiert werden, wird der Schritt des Einlegens der Mikrotiterplatte per Software koordiniert. Das Schalten der Aktoren des Transportsystems und der aktiven Plattenhalterung kann über die Steuerungen von Nanotec realisiert werden. Hierfür ist es nötig, dass der jeweilige Funktionsroboter elektrisch mit den Aktoren des Transportsystems verkabelt wird. Die Verbindung wird auch über das Daisy Chain Kabel erreicht. Das Kabel schleift die logischen Signale der Ausgänge aller Würfel durch und die Aktoren können damit geschaltet werden. Die logischen Signale der Outputs werden über das Buskabel zum Wagen des Transportsystems geleitet. Dort befindet sich eine Treiberplatine mit einem DC Motor-Treiber und Transistorschaltungen zur Umsetzung der logischen Signale und damit zur Aktivierung des Aktors. Der Leistungstreiber dient zum Schalten des DC Motors in zwei Drehrichtungen und des Hubmagneten zum Öffnen des Greifers.

Weiter ist es mit dem Konzept möglich, einzelne Roboter beim seriellen Ablauf der Pro-

¹Als Daisy Chain werden Verschaltungen bezeichnet, bei denen mehrere Geräte hintereinander geschaltet werden, sodass der Ausgang des ersten mit dem Eingang des nächsten verbunden wird

zesskette je nach Anforderung auszulassen. Hierfür wird auf den Platinen an den Robotern ein Schalter vorgesehen, der den Endschalter überbrücken kann. Wird der Haltewunschschalter deaktiviert, so kann der Endschalter nicht mehr die Signalleitung unterbrechen. Das Drücken des Endschalters durch den ankommenden Wagen führt daher nicht zu einem Stopp und der Wagen fährt weiter zum nächsten Roboter. Vor Beginn eines Untersuchungsprozesses kann der Bediener an den Robotern, die nacheinander die Mikrotiterplatte bearbeiten sollen, den Haltewunschschalter auf aktiv setzen und so vorwählen, dass dort gehalten werden soll.

Für die Steuerung des Transportsystems werden drei verschiedene Platinen aufgebaut. Die Platine PT steuert das Fahren und Stoppen des Transportsystems. Sie befindet sich an dem Steuergerät für das Transportsystem. Eine zweite Platine PW befindet sich auf dem Wagen. Sie trägt die Leistungstreiber für den DC-Motor des Greifarms und den Hubmagnet des Greifers. In jedem Roboter befindet sich ein dritter Typ Platine. Die dritte Platine nimmt das Flachbandkabel vom vorhergehenden Roboter auf und leitet über ein weiteres Flachbandkabel die Information an den nächsten Roboter weiter. Außerdem werden elektrische Kontakte zum Anschluss der I/Os der Steuergeräte bereitgestellt. Über die Kontakte werden die Informationen vom Flachbandkabel an die Roboter weitergegeben und die Roboter können Steuersignale aufschalten. Weiter werden auf der Platine zwei Transistoren vorgesehen, mit denen der Hubmagnet der aktiven Plattenhalterung geschaltet werden kann und mit denen die 24V zur Überprüfung der korrekten Position aktiviert werden können.

Zum Durchschleifen der Endschalterinfo zur Steuerung des Rollenkettenantriebes wird in jedem Roboter eine Platine ergänzt. Von ihr geht ein Bus in Form eines Flachbandkabels mit sechs Litzen zum nächsten Roboter. Gleichzeitig gibt es Ein- und Ausgänge für die Kommunikation mit dem Roboter. Hierfür kommt eine Klemmleiste mit vier Aufnahmen zum Einsatz. Der Roboter muss die Ankunft des Wagens erkennen. Weiter muss der Roboter das Einbringen und das Herausholen der Mikrotiterplatte steuern. Hierfür werden drei Kontakte benötigt. Die drei Kontakte sind jeweils verbunden mit einem *open collector* Schaltausgang der Steuergeräte SMCI33 des Roboters. Der erste Kontakt dient zum Starten des DC Motors zum Einbringen der Platte, ein Kontakt ist für das Öffnen des Greifers gedacht und ein weiterer für das Starten des DC Motors zum Herausbringen der Platte. Über einen weiteren Kontakt können 24 V eingespeist werden. Sie dienen zur Überbrückung der durch den Endschalter unterbrochenen Verbindung zum Losfahren lassen des Wagens. Die 24 V werden ebenfalls durch einen *open collector* Ausgang der Steuergeräte im Roboter gesteuert. Mit dem Ausgang wird ein Transistor geschaltet und die anliegenden 24 V des Roboters werden auf die Leitung geschaltet. Durch die Überbrückung erreichen die 24 V den nächsten Roboter und werden dort weitergeschleift bis zurück zum Steuergerät des Kettenantriebes. Damit setzt sich der Wagen wieder in Bewegung, obwohl der Endschalter noch gedrückt ist. Sobald der Endschalter nicht mehr durch den Wagen gedrückt ist, wird die Überbrückung aufgehoben. Der Wagen fährt dann solange weiter,

bis er den nächsten Endschalter trifft.

5.4. Evaluierung des Transportsystems

Die Einzelkomponenten aktive Plattenhalterung, Greifarm mit Greifer und das Lineartransportsystem wurden einzeln auf korrekte Funktion geprüft.

Für die aktive Plattenhalterung wurde die Zuverlässigkeit der Funktion ermittelt, also, ob die Platte in die Endposition bewegt wird und die Kontakte eine richtige Positionierung anzeigen. Weiter wurde überprüft, ob die geforderte Wiederholgenauigkeit erzielt wird. Hierfür wurden in [114] insgesamt 200 Versuche gemacht, in denen die Halterung mit dem Magneten geöffnet wurde, die Platte in undefinierter Ausrichtung in die Halterung eingelegt und dann die Platte in die Endposition gebracht wurde, indem der Hubmagnet ausgeschaltet wurde. Zum Nachweis der Wiederholgenauigkeit wurde optisch die Abweichung zu einer Referenzgeometrie bestimmt. Hierbei kann die Wiederholgenauigkeit nur in x- und y-Richtung sowie die Verdrehung um die z-Achse ermittelt werden. Zur Bestimmung der Wiederholgenauigkeit in z-Richtung wird mit einem Messtisch und einer Messuhr gearbeitet. Die einwandfreie Funktion und die Eignung für die Anwendung konnten nachgewiesen werden.

Beim Greifarm und dem Greifer kommt es weniger auf die Präzision an, da die Endpositionierung die Präzision dort erzeugt, wo sie für den Prozess wichtig ist. Das Prüfkriterium für den Greifarm und den Greifer ist daher die zuverlässige Funktion. Der Greifer muss die Mikrotiterplatte sicher greifen und halten sowie loslassen. Der Greifarm muss die Platte im Roboter erreichen und am anderen Endpunkt so weit aus dem Roboter ausgefahren werden können, dass er mit dem Linearantrieb am Roboter kollisionsfrei entlang gefahren werden kann.

Ebenso steht für das Schienensystem nicht die Präzision im Vordergrund, sondern die zuverlässige Funktion. Nach Aktivieren des Schienensystems muss sich der Wagen in Bewegung setzen, bis er den Endschalter des ersten Roboters erreicht. Dort muss er stehen bleiben. Durch den Freigabebefehl des aktuellen Roboters muss der Endschalter überbrückt werden und der Wagen muss sich wieder in Bewegung setzen. Weiter ist es wichtig, dass die elektrische Steuerung des Greifarms und des Greifers funktioniert. Das Schienensystem wurde zusammen mit dem Greifarm und der Plattenhalterung in einer gemeinsamen Versuchsreihe evaluiert.

Hierfür wurde ein Testaufbau aufgebaut, indem zwei Grundroboter mit Umhausung (Würfel) durch das Transportsystem verbunden werden. In der Testreihe zur Evaluierung des gesamten Transportsystems wird eine Platte in die aktive Plattenhalterung von Würfel 1 eingelegt. Der Transportwagen wird bis zum Endschalter von Würfel 1 gefahren. Das in LabView implementierte Testprogramm wird zum Rausholen der Platte gestartet. Die aktive Halterung wird dabei geöffnet, der Greifer wird geöffnet, der Greifarm wird in den Roboter gefahren, der Greifer wird geschlossen und greift die Platte, der Greifarm samt Platte wird aus dem Roboter gehoben. Dann wird der Endschalter überbrückt und der Wagen fährt los. Der Wagen kommt am

zweiten Würfel am Endschalter zum Stehen. Auf Knopfdruck in der LabViewoberfläche wird die Platte in den Roboter gebracht. Die aktive Halterung wird geöffnet, der Greifarm wird in den Roboter geschwenkt, der Greifer wird geöffnet, der Greifarm wird aus dem Roboter bewegt, die aktive Halterung wird geschlossen. Als letztes werden die Endschalter zur Prüfung der korrekten Position der Mikrotiterplatte aktiviert.

Der beschriebene Testzyklus wurde 50 Mal hintereinander durchlaufen. Das Herausholen einer Platte mit dem Greifer dauert ca. 13 sek. Die Fahrt bis zum Erreichen des Endschalters des nächsten Würfels dauert ca. 11 sek. Die Platte in dem Würfel abzulegen und mit der aktiven Halterung auszurichten dauert ca. 11 sek. Die Platten wurden jedes Mal zuverlässig gegriffen und aus dem ersten Würfel gehoben. Die Endschalter zum Stop des Wagens funktionierten und die Platte wurde auch zuverlässig im zweiten Roboter abgeliefert. Auch die aktiven Halterungen haben ohne Einschränkung sehr gut funktioniert. Die Platten wurden jedes Mal im zweiten Roboter erfolgreich ausgerichtet. Alle Komponenten funktionierten wie gewünscht.

Das Transportsystem funktioniert einwandfrei. Mittels zwei Befehlen „Platte in Würfel aufnehmen“ und „Platte in Würfel ablegen“ kann durch softwaregesteuerte Aktivierung der schaltbaren Ausgänge des Schrittmotorsteuergeräts SMCI33 die Weitergabe einer Mikrotiterplatte von einem Roboter zum anderen durchgeführt werden.

Mechanisch hat das System perfekt funktioniert. Die Platte wurde immer sicher und mittig gegriffen, sodass sie zuverlässig transportiert werden konnte. Auch die rauen Flächen der Greiferbacken haben gut funktioniert. Alle Aktoren haben ihre Aufgaben ohne Probleme erfüllt. Die Elektronik hat ebenfalls sehr gut funktioniert. Alle Steuerbefehle wurden über das Daisy-Chain Netzwerk (Bus) korrekt weitergegeben und alle Aktionen konnten zuverlässig abgerufen werden.

Im Kapitel 5 wurde das entwickelte Transportsystem vorgestellt. Das Transportsystem dient zum Austausch von Mikrotiterplatten zwischen verschiedenen Funktionsrobotern, um einen automatischen Ablauf einer Untersuchungskette zu gewährleisten. Das entwickelte Transportsystem besteht aus den drei Hauptkomponenten Linearschiene, Greifarm mit Greifer und aktive Plattenhalterung. Das neue Konzept für ein Transportsystem ist in der Hardware auf die anderen in vorliegenden Arbeit beschriebenen Roboter abgestimmt. Das Transportsystem ist flexibel, sodass es einfach erweitert werden kann, um die Anzahl der Roboter einer Prozesskette zu variieren. Für das Transportsystem wurde ein Rollenkettenantrieb mit Gleitschiene zur Linearbewegung entwickelt. Ein ebenfalls entwickelter Greifarm mit Parallelgreifer kann Mikrotiterplatten greifen und in einem Roboter aufnehmen oder ablegen. Um eine hinreichende Präzision in der Endlage der Mikrotiterplatte zu erzielen, wurde eine aktive Plattenhalterung entwickelt. Die Halterung schiebt die wenig präzise abgelegte Mikrotiterplatte in eine präzise Endposition und detektiert den Erfolg der Positionierung. Zur Steuerung des Transportsystems wurde eine dezentrale Steuerung über eine einfache, elektrische Schaltung aufgebaut. Durch verschiedene

Ereignisse werden Aktionen ausgelöst und Informationen übergeben. So kann der Weitergabeprozess der Mikrotiterplatten ohne zusätzlichen, übergeordneten PC statt finden. Durch die Ereignissteuerung kann das Transportsystem einfach erweitert werden, da die Steuerung nicht neu konfiguriert werden muss, wenn sich die Anzahl der zu bedienenden Roboter ändert. Abschließend wurde das Konzept in Form eines Teststandes aufgebaut und ausgiebig getestet. Eine einwandfreie Funktion und Eignung für die Erfüllung der Aufgabe konnte nachgewiesen werden.

6. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation bestand darin, ein neues Konzept für ein modulares Robotersystem zur automatischen Hochdurchsatzuntersuchung von Zebrabärblingen zu entwickeln. Dazu wurden die folgenden wissenschaftlichen Teilziele bearbeitet:

- Entwicklung eines Hardware- und Softwarekonzepts für ein modulares Robotersystem mit Einzelfunktionsrobotern für die automatische Untersuchung von Zebrabärblingen im Hochdurchsatz
- Entwicklung und Realisierung der Hard- und Softwarekomponenten des Fischsortierroboters
- Entwicklung und Realisierung der Hard- und Softwarekomponenten von drei Mikroskopen zur Lösung bestimmter Fragestellungen
- Entwicklung und Realisierung der Hard- und Softwarekomponenten eines angepassten Transportsystems
- Evaluierung des Hard- und Softwarekonzepts sowie Nachweis der Funktionsfähigkeit

In Kapitel 2 wurde das neue Konzept vorgestellt. Der gesamtheitliche Ansatz basiert auf einem modularen Grundroboter, der durch Ergänzung von verschiedenen Funktionsmodulen für unterschiedliche Aufgaben eingesetzt wird. Dazu wurde ein Linearachsenroboter als Grundmodul zur Bewegung von Kameras und Manipulatoren im Raum entwickelt. Zur Steuerung des Linearachsenroboters wurde ein Softwaregrundkonzept erarbeitet, mit dem verschiedene Funktionsalgorithmen realisiert werden können. Wichtige, bisher manuell durchgeführte Arbeitsschritte werden durch den Fischsortierer und das Herzschlagmikroskop automatisiert. Mit den beiden Robotern Parallelmikroskop und Fluoreszenzmikroskop wird ein schneller Vorscreen möglich, sodass interessante Proben von Proben ohne Information unterschieden werden können. Kommerziell verfügbare Hochpräzisionsmikroskope sollen nicht ersetzt werden, vielmehr soll deren Einsatz durch schnelle Voruntersuchungen in der Effizienz gesteigert werden. Ein spezielles Transportsystem verbindet die einzelnen Roboter zu einer Gesamtprozesskette und kann Mikrotiterplatten von Roboter zu Roboter weitertransportieren.

In Kapitel 3 wurde der entwickelte Fischsortierer vorgestellt. Der Fischsortierer erkennt wahllos in Petrischalen verteilte Fischeier und -larven und sortiert diese mit einer Pipette in Mikro-

titerplatten. Zur Darstellung des automatischen Sortierprozesses wurden eine lineare Schlauchpumpe, ein Pipettiersensor sowie eine Umrührmechanik entwickelt. Der Steuerungsalgorithmus enthält Bildverarbeitungsteile zum Erkennen der Zebrabärblinge in der Petrischale.

In Kapitel 4 wurden die drei entwickelten Mikroskope Parallelmikroskop, Herzschlagmikroskop und Fluoreszenzmikroskop beschrieben. Das Parallelmikroskop mit vier Kameras ermöglicht ein schnelles Aufnehmen von Bildern von Zebrabärblingen in Mikrotiterplatten. Es werden je vier Kammern einer Mikrotiterplatte gleichzeitig aufgenommen wodurch sich die Aufnahmezeit für eine Platte maßgeblich reduziert. Das Herzschlagmikroskop nimmt automatisch von allen 96 Kammern einer Mikrotiterplatte Videos der Herzen der sich darin befindenden Zebrafische auf. Eine Übersichtskamera und eine Detailkamera werden mit Hilfe von modifizierten Autofokusalgorithmen nacheinander auf das selbe Objekt fokussiert. Mittels eigens entwickelter Bildverarbeitung wird die Position des Herzens anhand der Übersichtsaufnahme ermittelt, um eine Detailaufnahme zu ermöglichen. Mit dem Fluoreszenzmikroskop können die Fluoreszenzmarker GFP und RFP in Zebrafischen nachgewiesen werden. Hierzu wurde ein linearer, optischer Aufbau aus LEDs als Anregungslichtquelle, Anregungs- und Emissionsfiltern sowie einer Digitalkamera entwickelt. Anhand eines Falschfarbenbildes aus der Überlagerung eines Hellfeld-, eines GFP- und eines RFP-Bildes kann die Anwesenheit der beiden Marker geprüft werden.

In Kapitel 5 wurde das entwickelte Transportsystem vorgestellt. Das Transportsystem ermöglicht die automatische Weitergabe von Mikrotiterplatten zwischen den Robotern. Das dreiteilige Konzept besteht aus einer linearen Transportschiene mit Rollenkettenantrieb über einen Schrittmotor, einem Plattengreifer mit magnetisch aktuiertem Parallelgreifer und einer aktiven Plattenhalterung zur Endpositionierung. Das Transportsystem ist mit einer Schienen- sowie Kettenverlängerung leicht zu erweitern und wird über ein einfaches, elektrisches Konzept mit mechanischen Schaltern gesteuert.

Die wesentlichen Ergebnisse der Arbeit sind:

- Entwicklung eines neuen, gesamtheitlichen Konzepts zur automatischen Durchführung von Zebrabärblinguntersuchungen mit einem modularen Robotersystem
- Identifizierung der für automatische Handhabungsaufgaben relevanten mechanischen Eigenschaften des biologischen Modellorganismus Zebrabärbling sowie Durchführung von Versuchen zu deren quantitativen Beurteilung
- Entwicklung eines Fischsortierers zum Sortieren von wahllos in Petrischalen verteilten Fischeiern in Mikrotiterplatten unter Einsatz einer bildgestützten Fischerkennung sowie passender Fluidtechnik und Prozessüberwachung

-
- Umsetzung von pixelbasierten Bildverarbeitungstechniken zur Detektion von Zebrabärblingen in Petrischalen und anschließender Koordinatentransformation zur Ermittlung von deren Positionen zur Aufnahme durch eine von einem Roboter bewegten Saugspitze.
 - Implementierung eines Algorithmus zur Steuerung eines schnellen und zuverlässigen Fischsortierprozesses unter Einbindung einer sensorbasierten Qualitätskontrolle sowie der Reaktion auf Problemsituationen mittels Fallerkennung.
 - Entwicklung eines Parallelmikroskops mit vier Digitalkameras in Kombination mit zur Abbildung einer hinreichenden Detailfülle biologischer Merkmale in Zebrabärblingen geeigneten Objektiven, wobei die mechanische Ausrichtung der Kameras auf die geometrischen Abmessungen der für die Untersuchung benutzten Mikrotiterplatten angepasst ist.
 - Entwicklung eines Herzschlagmikroskops zur Darstellung eines zweistufigen Mikroskopierprozesses, bei dem aufgrund der Informationen einer Übersichtsaufnahme mittels Bildverarbeitung die Herzregion erkannt wird und eine Detailkamera so positioniert wird, dass Zeitreihen der schlagenden Herzen aufgezeichnet werden können.
 - Ableitung modifizierter Bildverarbeitungsalgorithmen für Autofokus und Segmentierung zur automatischen Erkennung von Zebrabärblinglarven und von deren Herzen in digitalen Bildern.
 - Entwicklung einer automatischen Auswertung von aufgenommenem Bildmaterial von Zebrabärblingherzen zur Ermittlung der Herzfrequenz durch Differenzbildanalyse mittels verschiedener Bewertungskriterien für Pixeländerungen.
 - Entwicklung eines Fluoreszenzmikroskops aufgebaut aus einfachen Komponenten, mit welchem ein Nachweis von zwei verschiedenen Fluoreszenzproteinen (GFP, RFP) mittels Falschfarbendarstellung möglich ist, um die Eignung von Zebrabärblingmutanten für Untersuchungen zu ermitteln.
 - Entwicklung eines auf das erarbeitete Roboterkonzept zugeschnittenen Transportsystems zur Weitergabe von Mikrotiterplatten zwischen den einzelnen Funktionsrobotern, umgesetzt als dreiteiliges System mit geführter Linearbewegung für längere Wege, einem Handhabungssystem für Mikrotiterplatten zum Ablegen und Aufnehmen im Roboter, sowie einer aktiven Halterung zur präzisen Endpositionierung der Platten.
 - Nachweis der Funktion der Einzeleinheiten und der Eignung des Konzepts zur Automatisierung von Zebrabärblinguntersuchungen im Hochdurchsatzverfahren.

In der vorliegenden Arbeit konnten erfolgreich einzelne Funktionsroboter entwickelt und aufgebaut werden, die das neue, gesamtheitliche Konzept für automatische Hochdurchsatzuntersuchungen von Zebrabärblingen ermöglichen. Die Evaluierung der Einzeleinheiten hat die Funktion der Einzeleinheiten nachgewiesen. Ausblickend sind verschiedene Dinge umzusetzen oder zu untersuchen. Zum einen weisen die einzelnen Roboter gewisse Verbesserungspotenziale auf, zum anderen ist eine Erweiterung des Funktionsumfangs durch die Entwicklung weiterer Funktionsroboter interessant.

Zur Umsetzung einer vollautomatischen Untersuchung steht noch die Zusammenführung der Einzelroboter zu einer funktionierenden Prozesskette aus. Die aktive Halterung, die als Teil des Transportkonzepts entwickelt wurde, muss in jeden Funktionsroboter integriert werden. Die Funktionsroboter können dann für den automatischen Untersuchungsablauf nebeneinander positioniert und mit dem Transportsystem verbunden werden.

Softwareseitig muss ein einheitliches Softwareinterface umgesetzt werden. Eine übersichtliche Bedienoberfläche muss es dem Nutzer ermöglichen mit möglichst wenigen Arbeitsschritten die Einstellung der für die gewünschte Untersuchung nötigen Parameter der Gesamtprozesskette vorzunehmen. Mit der dann entstandenen automatischen Prozesskette können dann Tests durchgeführt werden, in denen der korrekte, automatische Ablauf der Einzelfunktionen sowie die zu erzielenden biologischen Untersuchungsergebnisse beurteilt werden.

Der Fischsortierer hat in Tests hohe Erfolgsquoten über 95% und kurze Sortierzeiten gezeigt. Durch Optimierung der Fluidtechnik, sowie der Bewegung der Roboterachsen kann eine weitere Zeitersparnis erzielt werden. Eine zusätzliche, nachträgliche Kontrolle der Mikrotiterplatte kann eine Erhöhung der Erfolgsquote ermöglichen.

Mit dem Herzschlagmikroskop konnte die automatische Aufnahme der Herzregion nachgewiesen werden. Schwächen wurden bei der Robustheit der bildbasierten Herzerkennung festgestellt. Durch eine Verbesserung der Herzerkennung kann die Erfolgsquote des Herzschlagmikroskops gesteigert werden.

Der Aufbau des Parallelmikroskops kann mit neuester PC-Technik vereinfacht werden, indem die für die vier Kameras nötigen PCs sowie der Robotersteuerungs-PC durch einen einzigen schnellen PC neuer Generation ersetzt werden.

Beim Fluoreszenzmikroskop ist die präzise Einstellung des Fokusabstandes essentiell, um die schwachen Fluoreszenzsignale sicher detektieren zu können. Hierbei hat die präzise Ausrichtung der Mikrotiterplatte gegenüber der Bewegungsebene der Kameras einen sehr großen Einfluss auf das Untersuchungsergebnis. Eine mechanische Justiereinrichtung für die Mikrotiterplatte könnte die Ergebnisse verbessern.

Das Transportsystem kann durch die Bearbeitung mehrerer Platten zur selben Zeit erweitert werden. Hierzu könnten Mikrotiterplatten in Lagereinheiten gespeichert werden und dann nach Bedarf der Prozesskette zugeführt werden.

A. Anhang

A.1. Versuchsdokumentationen

A.1.1. Vorgehensweise bei der Ermittlung der Größen von Zebrafischen und -larven

Versuchsname: Vermessung von Fischeiern und Larven

Datum: 05.11.2012

Zielsetzung:

Es wird der Mittelwert der Größe der Fischeier und Larven in verschiedenem Alter bestimmt. Diese Daten helfen der Bildverarbeitung zur Detektion der Lage der Zebrafische. Außerdem können damit die geometrischen Randbedingungen für die Handhabung der Fischeier und -larven abgeschätzt werden.

Versuchsbeschreibung:

Es werden einzelne Fotos der Fischeier und Larven in verschiedenen Phasen der Entwicklung gemacht. Die Fotos werden in einer Petrischale gemacht. Auf dem Boden der Petrischale befindet sich eine 2 mm Skala, die für die Auswertung der Längen anhand des Fotos nötig ist. Bei den Eiern wurde nur der Außendurchmesser gemessen. Bei den Larven wurden der Durchmesser des Dotters und des Kopfes, die gesamte Länge und die Breite des Schwanz am Dotter und 2 mm vor dem Ende gemessen. Siehe Abb. A.1

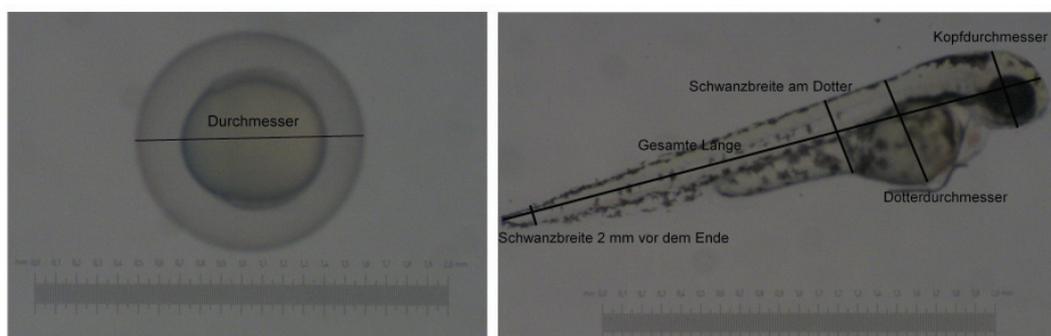


Abb. A.1.: Darstellung der Messpunkte bei der Vermessung von Fischeiern (links) und Fischlarven (Rechts)

Tab. A.1.: Vermessung der Größe der Fischeier

Alter [hpf]	Anzahl der Eier	Durchmesser [mm]
3	50	1,130
5	50	1,115
20	50	1,133
22	50	1,102
25	50	1,105
27	50	1,109

Tab. A.2.: Vermessung der Geometrie von Larven

Alter [hpf]	Anzahl der Larven	Ø Dotter [mm]	Ø Kopf [mm]	Länge gesamt [mm]	Breite Schwanz (Dotter) [mm]	Breite Schwanz (Ende 0,2 mm) [mm]
52	10	0,557	0,447	2,944	0,379	0,104
53	50	0,574	0,449	2,960	0,385	0,112
68	47	0,573	0,482	3,182	0,411	0,117
70	50	0,570	0,480	3,217	0,425	0,117
73	50	0,558	0,495	3,250	0,404	0,116
75	50	0,562	0,507	3,251	0,416	0,119

Versuchsaufbau:

Petrischale: gefüllt mit Wasser

Kamera: Schwarzweiß, Auflösung 2560p Breite x 1920p Höhe.

Lineal: Länge 2 mm mit 0,01mm Stricheinteilung.

Dokumentation aller Messwerte:

Die Mittelwerte der verschiedenen gemessenen Größen sind in den Tabellen A.1 und A.2 dargestellt. Die Messwerte sind sortiert nach dem Alter der Fischeier und Larven.

Ergebnis:

Fischeier: Man kann sehen, dass die Abmaße nicht so viel mit dem Alter variieren. Bei allen gemessenen Eiern wurde ein Mittelwert von 1,116 mm berechnet. Der größte Durchmesser beträgt 1,280 mm und der kleinste 1,033 mm.

Larven: Man kann sehen wie die Larven mit der Zeit wachsen. Die Längen- und Breitenausdehnungen nehmen kontinuierlich zu.

Fazit:

Die Größe der Fischeier bleibt fast immer konstant. Es gibt daher keine zeitabhängigen Bedingungen für die Automatisierung. Die Larven entwickeln sich schnell und verändern ihre

Größe über die Zeit. Für die Handhabung der Larven und die Deutung von Bildmaterial muss das beachtet werden.

A.1.2. Versuche Berstdruck Fischeier

Versuchsname: Untersuchung des Einflusses von Pronase auf die Festigkeit der Chorions

Datum: 17.06.2010

Zielsetzung:

Pronase ist eine Mischung verschiedener Proteinasen, die Proteine verdauen. Pronase wird dazu verwendet Zebrafischlarven vor dem Schlüpfen aus dem Chorion zu holen. Die Pronase verdaut dabei das Chorion teilweise bis es so zerbrechlich ist, dass es mit einer Pinzette manuell entfernt werden kann. In den Versuchen soll der Einfluss von Pronase auf die Festigkeit des Chorions quantitativ untersucht werden.

Versuchsbeschreibung:

In einer Petrischale werden 15 Tropfen Pronase in 11,5 ml Fischpuffer E3 gelöst. In diese Lösung werden die Fischeier für verschieden lange Zeiten gelegt und dann mit Unterdruck an eine Saugspitze gesaugt. Der Druck wird dabei so lange erhöht, bis das Chorion bricht. Es werden 28 hpf Fischeier verwendet und 10 Stk davon verbleiben für 2 min in der Pronase. Weitere 10 Stk werden für 4 min in der Pronase gelassen.

Versuchsaufbau:

Es wird der in der Studienarbeit von Bertram Ziegner in der Fluidgruppe entwickelte Versuchsaufbau verwendet. Die eingesetzte Saugspitze hat einen Innendurchmesser von 0,51 mm. Mit der Labview-Steuerung wird der Druck so lange erhöht und gleichzeitig mitgezeichnet, bis das Chorion bricht. Der Berstdruck wird dabei direkt ausgewertet.

Dokumentation aller Messwerte:

Die gemessenen Drücke nach 2 min in Pronase sind in Tabelle A.3 zu finden, die nach 4 min in Pronase sind in Tabelle A.4 zu finden.

Ergebnis:

Man sieht, dass die Festigkeit des Chorions relativ zwischen der ersten Messgruppe und der zweiten Messgruppe stark abgenommen hat. Die Streuung der Messwerte ist recht groß, sodass der selbe Berstdruckwert sowohl nach 2min als auch nach 4 min aufgetreten ist (Bsp: 0,27 bar).

Fazit:

Die Reduktion der Chorionfestigkeit durch Pronase ist bezogen auf die vorliegenden Messwerte nachgewiesen. Der Mittelwert der Messgruppe mit längerem Aufenthalt in der Pronase ist deutlich geringer als der der anderen Gruppe. Jedoch treten einzelne Werte in beiden Gruppen auf. Sowohl niedrige (0,27 bar) als auch höhere (0,41 bar). Es ist daher

Tab. A.3.: Berstdrücke nach 2 min in Pronase

Lfd. Nr.	Berstdruck [bar]
1	0,53
2	0,275
3	0,496
4	0,464
5	0,513
6	0,514
7	0,539
8	0,379
9	0,532
10	0,413

Mittelwert 0,47 bar

Tab. A.4.: Berstdrücke nach 4 min in Pronase

Lfd. Nr.	Berstdruck [bar]
1	0,318
2	0,311
3	0,266
4	0,412
5	0,314
6	0,215
7	0,387
8	0,222
9	0,320
10	0,410

Mittelwert 0,32 bar

Tab. A.5.: Zerstörungsdrücke aus [88]

Zerstörungsdrücke [bar]			
	Spitze D= 0,84 mm	Spitze D= 0,61 mm	Spitze D= 0,51 mm
4 hpf	0,32 ± 0,03	0,61 ± 0,06	0,64 ± 0,03
24 hpf	0,28 ± 0,03	0,39 ± 0,04	0,48 ± 0,06
31 hpf	0,21 ± 0,05	0,30 ± 0,04	0,33 ± 0,05

sinnvoll dieses Experiment mit einer größeren Zahl an Proben erneut durchzuführen, um die Aussage zu unterstreichen.

Die beschriebene Messreihe wurde mit 28 Stunden alten Fischen durchgeführt. Die Werte sollten also zwischen den Werten für 24 hpf und 31 hpf liegen. Nach 28 hpf und 2 min in Pronase ergibt sich ein Berstdruck von 0,47 bar. Dieser ist nur geringfügig niedriger als der Wert bei 24 hpf (0,48 bar). Eine Anwendung von Pronase in der gewählten Konzentration für nur 2 min scheint daher nur wenig Einfluss zu haben. Ein Mittelwert von 0,32 bar bei den 28 hpf alten Eiern entspricht etwa dem Wert der Fischeier bei 31 hpf (0,33 bar). Eine Anwendung der Pronase für 4 min hat daher einen signifikanten Einfluss auf die Festigkeit des Chorions. Entsprechend der hier beschriebenen Vorgehensweise wurden mit zwei weiteren Spitzendurchmessern (0,84 mm und 0,61 mm) sowie mit Fischeiern verschiedenen Alters (4 hpf, 24 hpf, 31 hpf) ebenfalls die Berstdrücke ermittelt. Die erhaltenen Ergebnisse werden in [88] beschrieben und sind in Tabelle A.5 zu sehen.

A.1.3. Beleuchtungsversuche für den Fischsortierer

Versuchsname: Beleuchtungsversuche Einfallswinkel Unterscheidung koaguliert/lebendig

Datum: 10.06.2010

Zielsetzung:

Es soll ermittelt werden unter welchem Lichteinfallswinkel am besten koagulierte von lebendigen Eiern in einer Petrischale unterschieden werden können. Außerdem soll getestet werden, ob die Wellenlänge einen Einfluss auf die Unterscheidung von koagulierten zu lebendigen Eiern hat. Weiterhin ist es Ziel einen geeigneten Winkel für die Beleuchtung der Fischeier zu ermitteln, bei dem die Fischeier einen guten Kontrast zum Hintergrund zeigen. Dies ist für die Bildauswertung bei der Fischdetektion wichtig.

Versuchsbeschreibung:

Es wird an drei Messpunkten beginnend bei 12 hpf (kurz nach erster Koagulation) mit Abstand von 20 h jeweils der Winkelbereich des Lichteinstrahlwinkels von 25° bis 160° variiert. Die Variation des Lichteinstrahlwinkels erfolgt in 5° Schritten. Bei jedem Winkel werden je ein rotes, ein blaues und ein Bild mit einer weißen LED aufgenommen.

Von den zehn ermittelten Histogrammmittelwerten wird erneut ein Mittelwert gebildet. Dann wird die Differenz des Mittelwertes der koagulierten und der nicht koagulierten berechnet. Weiter wurde die Standardabweichung ermittelt.

Versuchsaufbau:

Der Aufbau des Teststandes mit einem um 180° schwenkbaren Beleuchtungshalter sowie einem Petrischalenhalter und einer Kamera wurde in [16] beschrieben und ist in Abb. A.2 zu sehen.

Dokumentation aller Messwerte:

Die Messwerte sind im Diagramm in Abb. A.3 zu erkennen. Die Grauwertdifferenz (Einzelgrauwerte im Bereich zwischen 0 = schwarz und 255 = weiß) zwischen koagulierten (heller, da erhöhte Streuung) und nicht koagulierten Eiern (dunkler, da transparenter) ist hierbei über dem Lichteinstrahlwinkel in Grad aufgetragen. Für die getesteten Lichtfarben blau, weiß und rot ist jeweils ein Graph dargestellt. In Abb. A.4 sind Beispielbilder für Aufnahmen bei verschiedenen Beleuchtungswinkeln dargestellt. Der Unterschied zwischen koagulierten (hellen) und nicht koagulierten (dunklen) Fischeiern ist bei 85° am deutlichsten zu erkennen. In Abb. A.5 sind Beispielbilder bei unterschiedlichen Lichtfarben dargestellt. Der Kontrast zwischen koagulierten und nicht koagulierten Eiern ist bei weißem Licht am deutlichsten.

Ergebnis:

Ergebnis: Das Maximum der Grauwertdifferenz liegt bei allen Farben bei ca. 90 Grad. Die weiße LED zeigt den größten Unterschied zwischen koagulierten und nicht koagulierten Eiern.

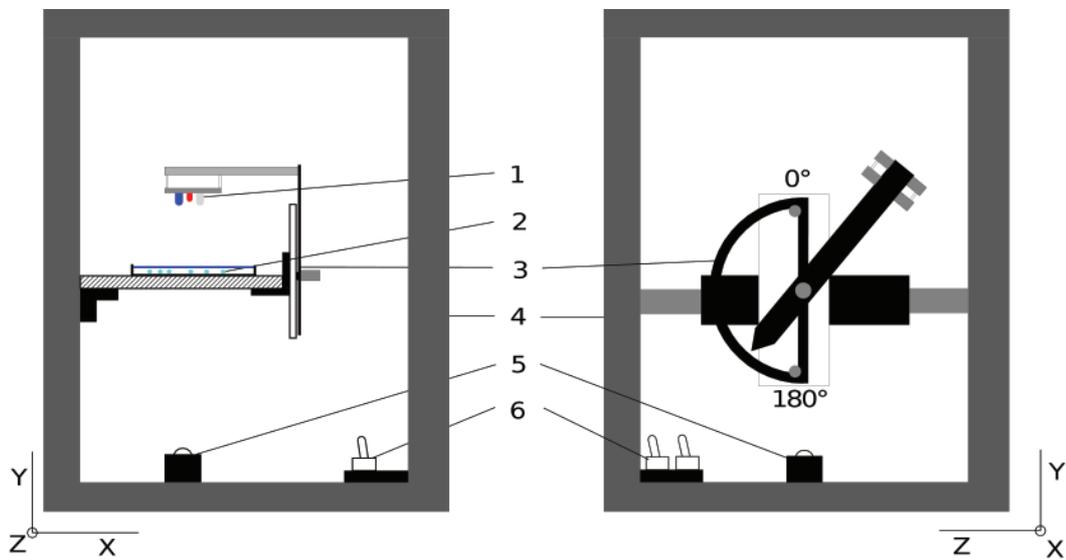


Abb. A.2.: Teststand zur Durchführung der Beleuchtungsversuche aus: 1= LEDs, 2= Fischeier in Petri-
schale, 3= Winkelskala, 4= Teststandgehäuse, 5= Kamera, 6= Schalter zum Aktivieren der
LEDs (aus [16])

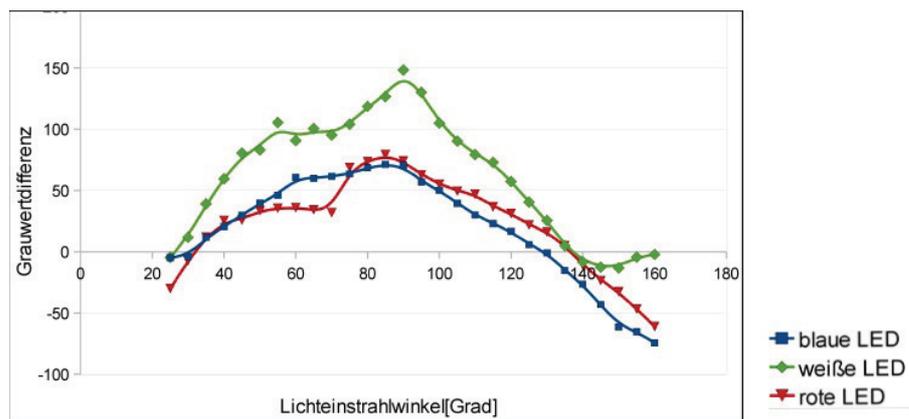


Abb. A.3.: Ergebnisse der Beleuchtungsversuche (aus[16])

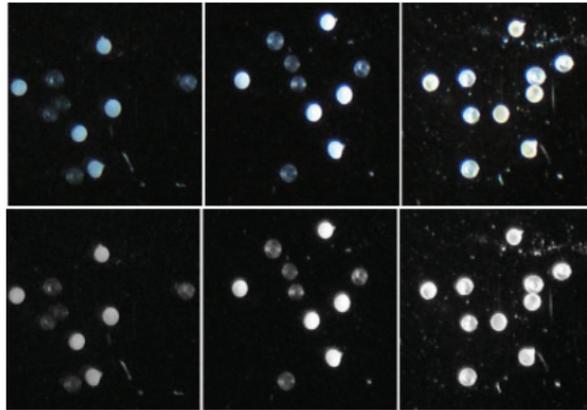


Abb. A.4.: Aufnahmen von Zebraabürblingseiern bei verschiedenen Lichteinstrahlwinkeln unter weißer LED. Oben: links = 60 Grad, mitte = 85 Grad, rechts = 130 Grad. Unten: Die obigen Bilder nach Umrechnung in den Grauwertbereich (aus[16])

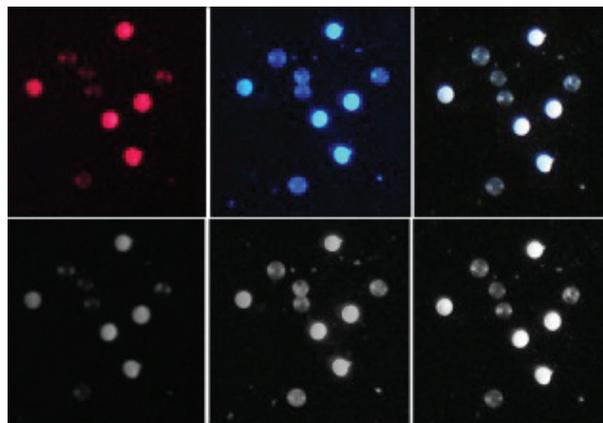


Abb. A.5.: Aufnahmen von Zebrafischeiern bei verschiedenen Lichtfarben. Oben: links rote LED, mitte blaue LED, rechts weiße LED Unten: Die obigen Bilder nach Umrechnung in den Grauwertbereich (aus[16])

Fazit:

Weißes Licht bei einem Einstrahlwinkel von ca. 90° ermöglicht eine gute Unterscheidung von koagulierten und nicht koagulierten Eiern. Gleichzeitig heben sich die hellen Eier mit sehr gutem Kontrast von dem dunklen Bildhintergrund ab, was eine zuverlässige Bildverarbeitung ermöglicht.

A.1.4. Nachweis Unschädlichkeit Fischsortierer

Versuchsname: Nachweis Unschädlichkeit Fischsortierer

Datum: 23.02.2011

Zielsetzung:

Es soll nachgewiesen werden, dass das automatische Pipettieren mit dem Fischsortierer keinen negativen Einfluss auf die Entwicklung von Zebrafischen hat.

Versuchsbeschreibung:

Es werden je zwei 96er Mikrotiterplatten per Hand und automatisch mit dem Fischsortierer mit Fischeiern befüllt. Nach 24 Stunden werden mit dem Parallelmikroskop die einzelnen Fische untersucht. Und es wird verglichen, ob es Abweichungen in der Sterblichkeit gegenüber der Referenz des manuellen Pipettierens gibt.

Versuchsaufbau:

Befüllt werden vier 96er Roundbottom well plates, zwei per Hand, zwei per Roboter. Die Fischeier werden kurz nach dem Ablachen (ca. 3 hpf) eingefüllt. Das Pipettieren findet bei Raumtemperatur statt und dauert pro Platte ca. 30 min. Danach kommen die Platten bei 28°C in den Inkubator, sodass die Entwicklung normal verlaufen sollte. Die einzelnen Kammern werden nach dem Pipettiervorgang per Hand mit E3 Puffer aufgefüllt, damit die Fische genügend Flüssigkeit haben, um sich normal zu entwickeln. Nach 24 Stunden werden die Platten mit dem Parallelmikroskop begutachtet. Es werden pro Well 6 Aufnahmen gemacht, damit in dieser Zeitreihe ein Herzschlag zu erkennen wäre. Das Aufnehmen von 2 Platten parallel dauert ca. 3 min.

Aufgrund einer notwendigen Kalibrierung des Fischsortierers waren die Larven ca. 3 Stunden bei Raumtemperatur.

Dokumentation aller Messwerte:

Die aufgenommenen Bilder aller Kammern der vier Platten wurden manuell gesichtet. Es wurde beurteilt, ob die Fische koaguliert sind oder lebendig und die Anzahl pro Reihe wurde notiert. Die Auflistung der ermittelten Ergebnisse der vier Platten sind in den Tabellen A.6, A.7, A.8 und A.9 zu sehen.

Ergebnis:

Bei den durch den Fischsortierer befüllten Platten wurden 9 koaguliert und 13 koagulierte Eier gefunden. Bei den manuell befüllten Platten wurden ebenfalls 9 und 13 koagulierte Eier gefunden.

Tab. A.6.: Mikrotiterplatte 1,
pipettiert mit Fischsortierer

Platte 1, Fischsortierer		
Reihe	lebendig	koaguliert
1	7	1
2	6	2
3	6	2
4	8	0
5	8	0
6	7	1
7	7	1
8	8	0
9	7	1
10	8	0
11	8	0
12	7	1
Summe	87	9
Prozent	90,6	9,4

Tab. A.7.: Mikrotiterplatte 2,
pipettiert mit Fischsortierer

Platte 2, Fischsortierer		
Reihe	lebendig	koaguliert
1	8	0
2	5	3
3	8	0
4	7	1
5	8	0
6	8	0
7	6	2
8	8	0
9	8	0
10	5	3
11	6	2
12	6	2
Summe	83	13
Prozent	86,5	13,5

Tab. A.8.: Mikrotiterplatte 3, pipettiert manuell

Platte 3, manuell		
Reihe	lebendig	koaguliert
1	7	1
2	7	1
3	7	1
4	7	1
5	7	1
6	7	1
7	8	0
8	8	0
9	5	3
10	8	0
11	8	0
12	8	0
Summe	87	9
Prozent	90,6	9,4

Tab. A.9.: Mikrotiterplatte 4, pipettiert manuell

Platte 4, manuell		
Reihe	lebendig	koaguliert
1	7	1
2	6	2
3	8	0
4	8	0
5	8	0
6	5	3
7	6	2
8	8	0
9	7	1
10	5	3
11	8	0
12	7	1
Summe	87	13
Prozent	86,5	13,5

Fazit:

Die gefundenen Werte zwischen 9 und 14 Prozent entsprechen der natürlichen Quote an koagulierten Eiern. Da durch den Fischeisortierer nicht mehr Eier koaguliert waren, als mit der manuellen Methode, ist davon auszugehen, dass der Fischeisortierer ebenso harmlos für die Zebrabärblinge ist, wie die manuelle Methode.

A.2. Datenblätter

Abb. A.6.: Linearachse Isel LEZ1

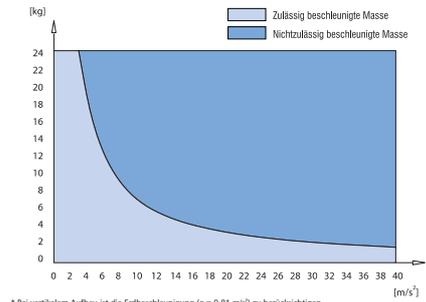
Lineareinheiten																	
mechanik	<h1 style="color: #0056b3;">Lineareinheit</h1> <p>(offener Zahnriemenvorschub)</p>																
	<h1 style="color: #0056b3;">LEZ 1</h1>																
 <p>Antriebsmodul MD 24</p>																	
<h3 style="color: #0056b3;">Merkmale</h3> <ul style="list-style-type: none"> Spielfreier Vorschub mit Zahnriemenantrieb Aluminium-Profil, Miniaturlinearführung LFS-8-2 Zahnriemen mit 3 mm Teilung Breite 9 mm Wiederholgenauigkeit kleiner oder gleich $\pm 0,2$ mm Vorschub max. 1,5 m/s End- bzw. Referenzschaltergenauigkeit $< 0,1$ mm (mit Antriebsmodulen) Schrittmotor-Antrieb <p>Optionen:</p> <ul style="list-style-type: none"> Sonderlängen im Raster 100 mm Servomotor-Antrieb 																	
<h3 style="color: #0056b3;">Technische Daten</h3> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="background-color: #0056b3; color: white;">Riementyp</td> <td>HTD 3M, Breite 9 mm</td> <td style="background-color: #0056b3; color: white;">Spezifisches Führungsgewicht</td> <td>0,200 kg/100 mm</td> </tr> <tr> <td style="background-color: #0056b3; color: white;">Schlittengewicht</td> <td>0,430 kg</td> <td style="background-color: #0056b3; color: white;">Wirkdurchmesser der Synchronscheiben</td> <td>$\varnothing 19,1$ mm</td> </tr> <tr> <td style="background-color: #0056b3; color: white;">Gewicht ohne Antriebsmodul</td> <td>1000 mm $\hat{=}$ 3 kg</td> <td style="background-color: #0056b3; color: white;">Massenträgheitsmoment der Synchronscheiben</td> <td>$5,585 \cdot 10^{-6}$ kgm²</td> </tr> <tr> <td style="background-color: #0056b3; color: white;">Spezifische Masse des Zahnriemens</td> <td>0,0225 kg/m</td> <td style="background-color: #0056b3; color: white;">Theoretischer Vorschub pro Umdrehung</td> <td>60 mm</td> </tr> </table>		Riementyp	HTD 3M, Breite 9 mm	Spezifisches Führungsgewicht	0,200 kg/100 mm	Schlittengewicht	0,430 kg	Wirkdurchmesser der Synchronscheiben	$\varnothing 19,1$ mm	Gewicht ohne Antriebsmodul	1000 mm $\hat{=}$ 3 kg	Massenträgheitsmoment der Synchronscheiben	$5,585 \cdot 10^{-6}$ kgm ²	Spezifische Masse des Zahnriemens	0,0225 kg/m	Theoretischer Vorschub pro Umdrehung	60 mm
Riementyp	HTD 3M, Breite 9 mm	Spezifisches Führungsgewicht	0,200 kg/100 mm														
Schlittengewicht	0,430 kg	Wirkdurchmesser der Synchronscheiben	$\varnothing 19,1$ mm														
Gewicht ohne Antriebsmodul	1000 mm $\hat{=}$ 3 kg	Massenträgheitsmoment der Synchronscheiben	$5,585 \cdot 10^{-6}$ kgm ²														
Spezifische Masse des Zahnriemens	0,0225 kg/m	Theoretischer Vorschub pro Umdrehung	60 mm														
<h3 style="color: #0056b3;">Lastdiagramm</h3> <p>Zulässig beschleunigte Massen auf die Riemenfestigkeit bezogen *</p>  <p>* Bei vertikalem Aufbau ist die Erdbeschleunigung ($g = 9,81$ m/s²) zu berücksichtigen</p>																	
<h3 style="color: #0056b3;">Bestelldaten</h3> <p>Ohne Antrieb:</p> <p>Art.-Nr.: 232005 8100 L = 998 mm Art.-Nr.: 232005 8300 L = 2998 mm</p> <p>Mit Schrittmotor 1 : 1</p> <p>Art.-Nr.: 232005 0100 L = 996 mm Art.-Nr.: 232005 0300 L = 2996 mm</p> <p>Mit Schrittmotor 2 : 1</p> <p>Art.-Nr.: 232005 2100 L = 996 mm Art.-Nr.: 232005 2300 L = 2996 mm</p>																	
Technische Änderungen vorbehalten.																	
C70	MECHANIK Lineareinheiten																
made by isel																	

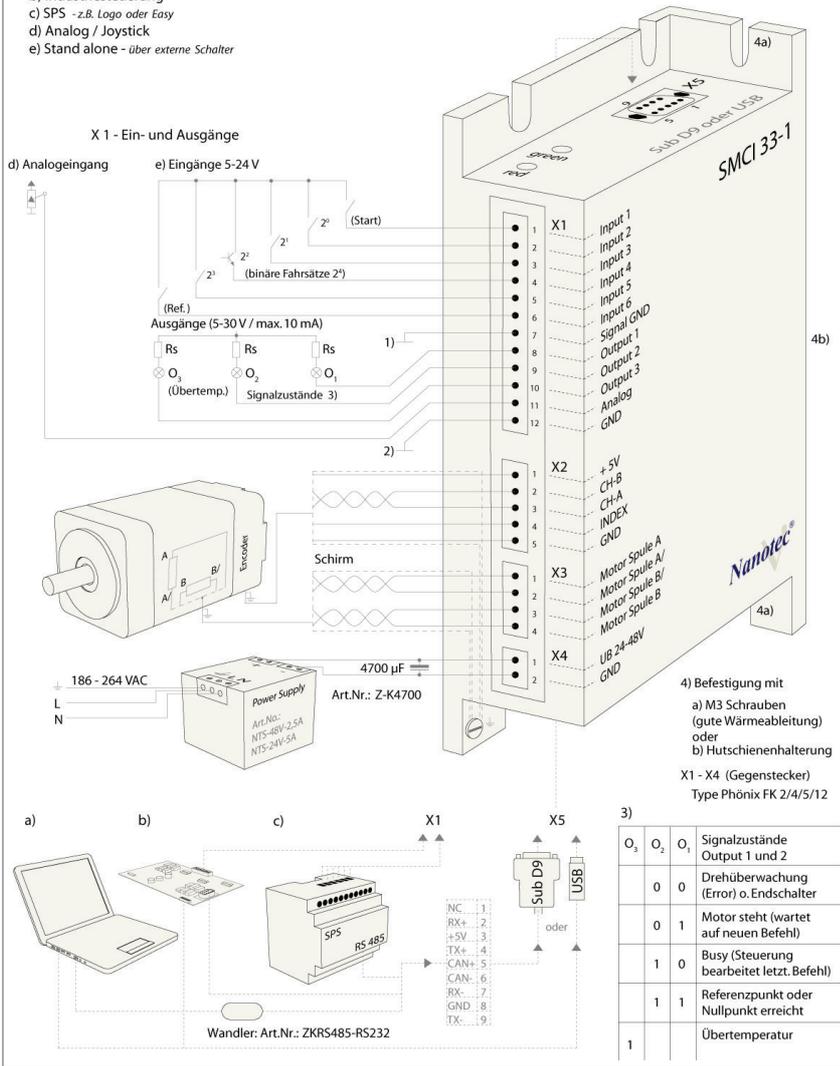
Abb. A.7.: Schrittmotorsteuerung Nanotec SMCI33

Anschlussplan SMCI33

Nanotec /Anschlussplan / SMCI 33-1 (USB) / SMCI 33-2 (RS 485)

Drehzahl- und Positioniersteuerung (Closed Loop) über

- a) PC - zur Steuerung und Parametrierung für c), d) und e)
- b) Industriesteuerung
- c) SPS - z.B. Logo oder Easy
- d) Analog / Joystick
- e) Stand alone - über externe Schalter



9 Technische Daten

9.1 Technische Daten

Elektrische Anschlüsse

Betriebsspannung U_b	DC 24 V bis 48 V $\pm 4\%$
max. Phasenstrom	einstellbar bis max. 3 A/Phase Dauerstrom 2 A/Phase
Stromabsenkung	einstellbar 0 bis 80% vom Phasenstrom
Schnittstellen	<ul style="list-style-type: none"> • SMCI33-1: USB-Standard • SMCI33-2 RS-485 (4-Draht) Totzeit: 2 Sekunden 19200 Baud (einstellbar) 1 Startbit, 8 Datenbits, 1 Stopbit keine Parität

Steuerungsparameter

Schrittauflösung	Vollschritt Halbschritt Viertelschritt Fünftelschritt Achtelschritt Zehntelschritt 16tel-Schritt 32tel-Schritt 64tel-Schritt adaptiver Mikroschritt (1/128)
Schrittwinkel	1,8°
Betriebsmodi	Position Drehzahl Flagposition Taktrichtung Analog Joystick
Schrittfrequenz	0 bis 50 kHz im Takt-Richtungs-Modus 0 bis 25 kHz in allen anderen Modi
Positionsüberwachung	automatische Fehlerkorrektur bis 0,9°

Ein- und Ausgänge

Eingänge	6 Optokoppler 5 – 24 V <ul style="list-style-type: none"> • Sicheres Aussschalten: max. 2 V • Sicheres Einschalten: min. 4,5 V Signalverzögerungszeit: <ul style="list-style-type: none"> • Eingänge 1 bis 5: 120 µs • Eingang 6: 10 µs
Ausgänge	3 MosFET-Ausgänge <ul style="list-style-type: none"> • Open-Drain (0 schaltend, max. 24V/2A) • Signalverzögerungszeit: Ausgang 1/2: ≈ 12 µs (bei 10 kΩ-Pull-Up an 24 V)

Schutzschaltungen

Über- und Unterspannung	Schutzschaltung bei Spannung > 50 V bzw. < 21 V
max. Kühlkörpertemperatur	ca. 67 °C Im Vollschrittbetrieb ist je nach Einschaltdauer, eingestellter Stromabsenkung und externer Kühlfläche gegebenenfalls eine Fremdbelüftung notwendig.
max. Umgebungstemperatur	0 bis 40 °C

Abb. A.8.: Digitalkamera IDS UI5480 GigE



GigE UI-5480SE

Die UI-5480SE ist eine hochkompakte Kamera mit Aptina CMOS-Sensor in 5 Megapixel-Auflösung (2560x1920 Pixel) und GigE-Schnittstelle. Neben dem verschraubbaren RJ45-Stecker für GigE besitzt die UI-5480SE einen 6-poligen Hirose-Anschluss für die Stromversorgung und die digitalen Ein-/Ausgänge (optisch entkoppelt bis 30 V).



Spezifikation

Die Leistungsmerkmale auf einen Blick	
Interface	GigE
Objektivanschluss	C-Mount
Sensor Technologie	CMOS (Aptina)
Modellbezeichnung Farbe	UI-5480SE-C
Modellbezeichnung Mono	UI-5480SE-M
Auflösung (h x v)	2560 x 1920
Farbtiefe	8bit (12bit ADC)
Auflösungskategorie/Pixelklasse	5 Megapixel
optisches Sensorformat	1/2"
Shuttersystem	Rolling
max. fps im Freerun Modus	14 fps
Belichtungszeit im Freerun Modus	75µs-2745ms
Belichtungszeit im Trigger Modus	75µs-2745ms
AOI Modi	horizontal + vertikal
Binning Modi	horizontal + vertikal
Subsampling Modi	horizontal + vertikal
I/O - Strobe	1
I/O - Trigger	1
I/O - RS-232	-
I/O - GPIO	0
I/O - I2C	-
Sensor Bezeichnung (m/c)	MT9P031STM / MT9P031STC
Pixelpitch in µm	2,20
Optische Fläche	5,632 x 4,224 mm
Schutzklassen	IP30
Abmessungen H/B/T	34,00 mm, 44,00 mm, 43,50 mm
Gewicht	108,00 g
Spannungsversorgung	12 V

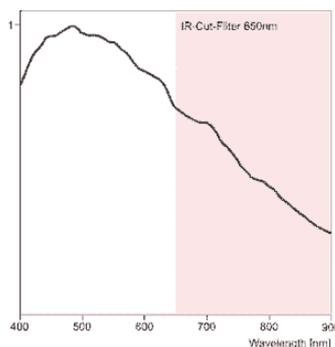
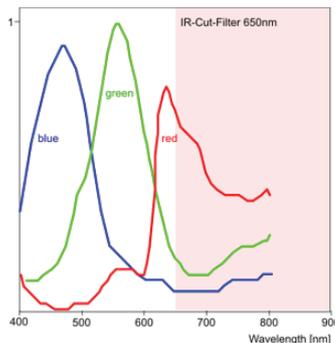


Abb. A.9.: Digitalkamera IDS UI1240SE USB



USB UI-1240SE

Die UI-1240SE ist eine ideale Allround-Kamera mit USB 2.0-Anschluss und e2v CMOS-Sensor in 1.3 Megapixel-Auflösung (1280x1024 Pixel). Mit einer enorm hohen Lichtempfindlichkeit, einer für einen CMOS Sensor bis dato unerreichten Farbtreue und dem Global Shutter vereint der e2v Sensor die Eigenschaften und Vorteile von CCD und CMOS.

Die digitalen Ein-/Ausgänge zur Trigger- und Blitzsteuerung sind optisch entkoppelt und verarbeiten Signale mit bis zu 30 V. Verschiedene Kabelvarianten mit robusten, verschraubbaren Steckern ergänzen die Modellpalette. Zusammen mit dem kompakten Metallgehäuse und M3-Befestigungen ist die UI-1240SE ideal für den Einsatz in Automatisierung und Qualitätssicherung geeignet. Für Gerätebauer bieten wir OEM-Versionen ohne Gehäuse und Frontflansch an.



Spezifikation

Die Leistungsmerkmale auf einen Blick

Interface	USB
Objektivanschluss	C-Mount
Sensor Technologie	CMOS (e2v)
Modellbezeichnung Farbe	UI-1240SE-C
Modellbezeichnung Mono	UI-1240SE-M
Auflösung (h x v)	1280 x 1024
Farbtiefe	8bit (10bit ADC)
Auflösungskategorie/Pixelklasse	1.3 Megapixel
optisches Sensorformat	1/1.8"
Shuttersystem	Global
max. fps im Freerun Modus	25 fps
Belichtungszeit im Freerun Modus	9µs-2000ms
Belichtungszeit im Trigger Modus	9µs-2000ms
AOI Modi	horizontal + vertikal
Binning Modi	horizontal + vertikal
Subsampling Modi	scaler
I/O - Strobe	1
I/O - Trigger	1
I/O - RS-232	-
I/O - GPIO	-
I/O - I2C	-
HDR (High Dynamic Range)	-
Sensor Bezeichnung (m/c)	EV76C560BB / EV76C560BC
Pixelpitch in µm	5.30
Optische Fläche	6.784 x 5.427 mm
Schutzklassen	IP30
Abmessungen H/B/T	34.00 mm, 32.00 mm, 27.40 mm
Gewicht	62.00 g
Spannungsversorgung	USB

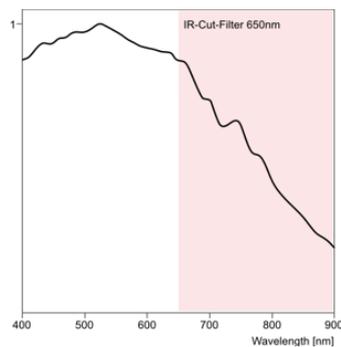
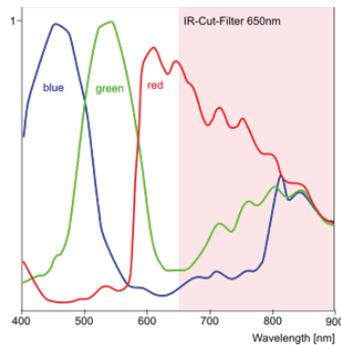


Abb. A.10.: DIGitalkamera IDS UI6240 GigE



GigE UI-6240SE

Die UI-6240SE ist eine hochkompakte Kamera mit Sony CCD-Sensor in 1.3 Megapixel-Auflösung (1280x1024 Pixel) und GigE-Schnittstelle. Neben dem verschraubbaren RJ45-Stecker für GigE besitzt die UI-6240SE einen 6-poligen Hirose-Anschluss für die Stromversorgung und die digitalen Ein-/Ausgänge (optisch entkoppelt bis 30 V).



Spezifikation

Die Leistungsmerkmale auf einen Blick	
Interface	GigE
Objektivanschluss	C-Mount
Sensor Technologie	CCD (Sony)
Modellbezeichnung Farbe	UI-6240SE-C
Modellbezeichnung Mono	UI-6240SE-M
Auflösung (h x v)	1280 x 1024
Farbtiefe	8bit (12bit ADC)
Auflösungskategorie/Pixelklasse	1.3 Megapixel
optisches Sensorformat	1/2"
Shuttersystem	Global
max. fps im Freerun Modus	15 fps
Belichtungszeit im Freerun Modus	83µs - 1,46s
Belichtungszeit im Trigger Modus	83µs - 10Min.
AOI Modi	horizontal + vertikal
Binning Modi	vertikal
Subsampling Modi	vertikal
I/O - Strobe	1
I/O - Trigger	1
I/O - RS-232	-
I/O - GPIO	0
I/O - I2C	-
Sensor Bezeichnung (m/c)	ICX205AL / ICX205AK
Pixelpitch in µm	4,65
Optische Fläche	5,952 x 4,762 mm
Schutzklassen	IP30
Abmessungen H/B/T	34,00 mm, 44,00 mm, 43,50 mm
Gewicht	108,00 g
Spannungsversorgung	12 V

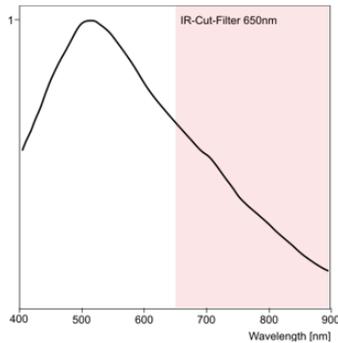
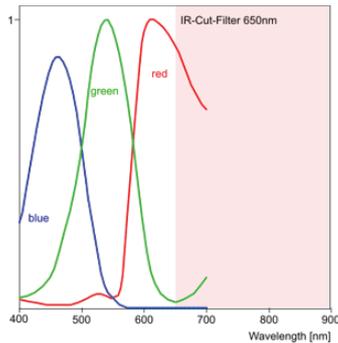


Abb. A.11.: Objektiv Lensation CMFA1022

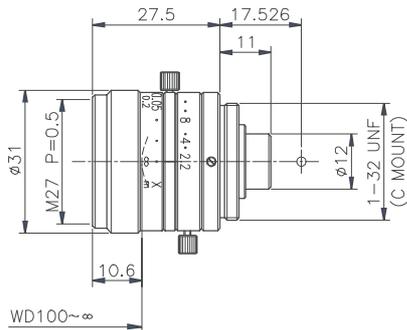


Lensagon CMFA1020ND

10mm F2.0
For 1/2" format cameras
C-mount

Model No.	CMFA1022ND		
Mount	C		
Image Format	1/2"		
Focal Length	10.27mm		
Maximum Aperture	2.0		
Adjustment	Focus	Manual with lock screw	
	Iris	Manual with lock screw	
Working Distance Range	100mm ~∞		
Filter Size	M27mm P=0.5		
Magnification	0.098x	0.04x	0.02x
Working Distance	100mm	250mm	500mm
Effective F No.	2.42	2.29	2.24
Image Side NA	0.21	0.22	0.22
Object side NA	0.021	0.009	0.004
Image Side Resolution Power	4.3μ	5.1μ	5.4μ
Object Side Resolution Power	43.9μ	127μ	270μ
TV Distortion	2/3"	-	-
	1/2"	-0.05%	+0.08%
	1/3"	-0.04%	0.00%
Field of View	2/3"	-	-
	1/2"	49mm x 65mm	120mm x 160mm
	1/3"	37mm x 49mm	90mm x 120mm
Weight	51g		
Operating Temperature Range	-10 °C ~ 50 °C		

Dimension



DESIGN AND SPECIFICATIONS ARE SUBJECT TO CHANGE WITHOUT NOTICE

Abb. A.12.: Objektiv Lensation TC-20-40

Lensagon TC-20-40

Technical Data TL

Magnification	2
Mount Type	C-Mount
Range of WD ^③	40
DOF ^③	0.3
Resolution ^③	4.8
NA ^③	0.05
Image Format	1/2 inch
Megapixel	1
F.O.V. on 1/2" Cam	2.4 x 3.2
F.O.V. on 1/3" Cam	1.8 x .24

[Ask a question about this product](#)

Features

- High quality and economical cost
- Low optical distortion design
- Illumination for coaxial episopic types (C types)
- C-Mount

Abb. A.14.: Lineartisch Owis VT45

Produktinformation
Product Information

Präzision in Perfektion
Precision in Perfection



Verschiebetische
Translation Stages

VT45

- XYZ-Montage ohne Winkel
- selbsthemmend
- kostengünstiger Einsatz
- verzugsarmes Aluminium, schwarz eloxiert
- XYZ mounting without angle
- self-locking
- cost-efficient application
- deformation-resistant aluminium, black anodized



9012.0139 Ausgabe 24.04.2009

Der VT 45 ist ein Verschiebetisch für allgemeine Anwendungen. Nicht auf einen Systembausatz beschränkt, wird er zur Justage in Aufbauten der klassischen Optik mit Säulen und Stiften genauso wie in faseroptischen Applikationen eingesetzt. Darüber hinaus ist er hervorragend zur Positionierung von CCD-Kameras und anderen optoelektronischen Sensoren geeignet.

Der VT 45 ist ohne Montagewinkel beliebig XY-, XZ- und XYZ-montierbar.

Der Verschiebetisch VT 45 ist mit Federn spielfrei vorgespannt. Die Feingewindespindeln mit Skalenknopf ermöglichen feinfühliges Einstellen. Die justierbaren Schwalbenschwanzführungen behalten ihre Genauigkeit über sehr lange Zeit.

The VT 45 is a translation stage for general applications. Not restricted to one system kit, it can be used for adjustment in classical optical setups with columns and pins as well as in fiber-optic applications. In addition, it is excellent for positioning CCD cameras and other opto-electrical sensors.

The VT 45 can be mounted along XY, XZ, and/or XYZ without mounting brackets.

The VT 45 translation stage is preloaded with springs and therefore backlash-free. Fine-thread spindles enable sensitive adjustment. The dovetail guides are adjustable and maintain their accuracy over very long time.

Bestellangaben/Ordering Information

		Typ/type	Bestell-Nr./part no.
Verschiebetisch, X, 25 mm Stellweg, mit Feingewindespindel	X translation stage, 25 mm travel, with fine-thread spindle	VT 45-25-X-SK	31.041.2531
Verschiebetisch, XY, 25 mm Stellweg, mit Feingewindespindel	XY translation stage, 25 mm travel, with fine-thread spindle	VT 45-25-XY-SK	31.041.2532
Verschiebetisch, XYZ, 25 mm Stellweg, mit Feingewindespindel	XYZ translation stage, 25 mm travel, with fine-thread spindle	VT 45-25-XYZ-SK	31.041.2533

OWIS GmbH

Im Gaisgraben 7
79219 Staufen (Germany)

Tel. +49 (0)76 33/95 04-0
Fax +49 (0)76 33/95 04-440

info@owis.eu
www.owis.eu

P35

B. Abbildungsverzeichnis

1.1	Komplexität eines Modellorganismus gegenüber seiner Eignung für Hochdurchsatzuntersuchungen ([95])	6
1.2	Entwicklung eines Zebrafischembryos, Altersangabe in hpf (=Stunden nach Befruchtung), (A,B,C (ohne Chorion) aus [52]) A: 45 min nach Befruchtung, B: 17,5 hpf, C: 24 hpf, D: 36 hpf (im Chorion), E: 48 hpf (im Chorion), F: 60 hpf von links (lateral), G: 60 hpf, Rückenansicht (dorsal)	8
1.3	Prozesskette eines Zebrafischscreens [86](modifiziert nach [2])	11
1.4	Übersicht Laborrobotik allgemein: oben v.l.n.r.: Plattenhandhabungsroboter „plate crane EX“ von Hudson Robotics, Multikanalpipettierroboter „Zephyr“ von Caliper Life Science, Pipettierroboter „FasTrans“ von Analytik Jena; unten v.l.n.r.: Plattenhandhabungsroboter „ACell“ von HighRes Biosolutions, Pipettierroboter „PAL“ von CTC Analytics, automatisches Mikroskop „ScanR“ von Olympus, Bildquelle: Internetseiten der Hersteller (www.olympus-europa.com, www.highresbio.com, www.analytik-jena.de, www.palsystem.com, www.perkinelmer.com, www.hudsonrobotics.com, 20.05.2013)	13
1.5	Festo LabFab, Quelle: www.Festo.de, 18.12.2012	16
1.6	Automatisches Zebrafisch-Untersuchungssystem VAST (aus [78])	17
1.7	Prozesskette aus kommerziellen Laborrobotern der Firma BioBide (aus [58])	18
1.8	Ablauf des Screeningprotokoll mit automatischem Injektionsapparat von Carvalho und Spaink (aus [11])	19
1.9	oben: Mikroinjektionssystem von Wang [116], A = Gesamtaufbau aus Mikroskop, Mikroinjektor und Fluidtechnik, B = Prinzip fixierte Injektion, C = fixierte Fischeier in Halter; unten Mikroinjektionssystem mit Kraftsteuerung von Huang [45], D = Überblick Hardware, E = Schema des Aufbaus	20
1.10	links: Fischverpaarungstank iSpawn [1], A = Einzelelemente, B = Grundgitter für den Laichboden, C = Fischverpaarungstank zusammengesetzt; rechts: Handhabungstechnik Elektrosprühen [13]	21
1.11	Zebrafische im Schlauch (Funfak et al.)([28])	22
1.12	Flow Cytometer COPAS von Union Biometrica [87], A = Hardware bei geöffneter Gehäuseabdeckung, B = COPAS mit PC und Zubehör, C = Funktionsprinzip	23
1.13	Fischsortierer Zebrafactor des CSEM [36]	24

1.14	Fischsortierer von Mandrell (Oregon State University)[62]	24
1.15	Befüllung von Mikrotiterplatten mit Zebrafischen von Zhang [121]	25
2.1	Neues Konzept für eine automatische Prozesskette; FS: Fischsortierer, PM: Parallelmikroskop, HM: Herzschlagmikroskop, FM: Fluoreszenzmikroskop, TS: Transportsystem	32
2.2	Robotergrundtypen und ihre Bewegungsräume nach [43]; A: kartesischer Roboter, B: zylindrischer Roboter, C: kugelförmig, D: SCARA, E: Gelenkarmkonfiguration	36
2.3	Überblick neues Roboterkonzept 1: PC, 2: Netzteil, 3: Aktoren, 4: Motorsteuergeräte, 5: 24V Netzteil, 6: zusätzliche Aktoren, 7: weitere Funktionsmodule . .	40
2.4	Überblick neuer Grundroboter: R: Roboter, GR: Grundrahmen, S: Steuerung, X: X-Achse, Y: Y-Achse, SMx: Schrittmotor x, SMy: Schrittmotor y	41
2.5	Komponenten von einfachen Lichtmikroskopen nach Gerlach [30], 1=Triebkasten, 2= grobe Scharfstellung, 3= feine Scharfstellung, 4= Tubusträger, 5= Objektisch, 6= Präparateklemmen, 7= Scharnier zum Umlegen des Tubusträgers, 8= Mikroskopfuß, 9= Beleuchtungsspiegel, 10= Kondensator, 11= Objektiv, 12= Objektivrevolver, 13= Tubus, 14= Okular	42
2.6	Komponenten von modernen Lichtmikroskopen nach Romeis [90]	43
2.7	Bildfehler Verzeichnung im Randbereich, links: abzubildendes Gitter, Mitte: kissenförmige Verzeichnung, rechts: tonnenförmige Verzeichnung (aus [80]) . .	45
2.8	Strahlengang durch eine dünne Linse (aus [17])	47
2.9	Beleuchtungsarten (aus [22])	48
2.10	Effekte von morphologischen Operatoren: A= Erosion, B= Dilatation (aus [105]), C= opening and closing (aus [10])	50
2.11	Beispiel Grauwertspreizung, links: Originalbild mit Histogramm, rechts: Bild nach Grauwertspreizung mit zugehörigem Histogramm (aus [100])	51
2.12	Softwarekonzept und Kommunikation. A= Grundbefehle als ASCII String erstellen, B= Senden und Empfangen von ASCII Befehlen zwischen PC und Steuergeräten	53
3.1	Neues Konzept für den automatischen Ablauf der Fischaufnahme [82]	57
3.2	Hardware des entwickelten Fischsortierers, PT = Pipettierspitze, C = Kamera, CU = Steuerungseinheit, LP = lineare Pumpe, WP = well plate, X-,Y-,Z-Achse, PD = Petrischale, S= Sensor (modifiziert nach [82, 83])	60
3.3	Beleuchtungsversuche mit verschiedenen Einstrahlwinkeln, von links nach rechts aufsteigend 15°, 45°, 60° und 90° (modifiziert nach [16])	61
3.4	Erklärung Pulsation Schlauchpumpe	63

3.5	Neue lineare Schlauchpumpe: M= Motor, V=Schließventil, L= Linearachse, W= Wagen, R= Rollenkörper, S= Schlauch, A= Ausgleichsbehälter	65
3.6	Signalcharakteristik Schlauchsensor: A= Aufbau der Messstrecke, B= Sensor-signal mit Pegeln für Luft, Wasser, lebendiges und koaguliertes Fischei (modifiziert nach [123])	68
3.7	Hardware des entwickelten Schlauchsenors: links: Position im Sortierer S= Sensor, E= Elektronik; rechts oben: P= Pipettierspitze, S= Sensor; rechts unten: Sensorgehäuse und Platine: L= LED, PD= Photodiode, ES= Endschalter, SP= Sensorplatine	70
3.8	Erklärung Clusterproblematik anhand eines mit dem Fischsortierer aufgenommenen Bildes, grüne Kreise: Einzelfische mit genügendem Abstand zu ihren Nachbarn, rote Rechtecke: Fischcluster	71
3.9	Strömungen einer kreisförmigen Bewegung (links), einer linearen Bewegung (Mitte) und deren Überlagerung (rechts) (aus [15])	73
3.10	Umrührerergebnisse nach Kreisbewegung (links), nach Linearbewegung (Mitte) sowie nach Überlagerung von Linear- und Kreisbewegung (rechts)	73
3.11	Mechanismus zur Clustervereinzelung nach [15]; oben: mechanische Grundkonzepte für Kreisbewegung (links) und Linearbewegung aus Kreisbewegung (rechts); unten: Prinzipskizze der kombinierten Mechanik	76
3.12	Hardware zur Clustervereinzelung nach [15]; oben links: Sperrmechanismus, oben rechts: Petrischalen Halter mit Gleitkörper und Feder, unten links: kompletter Mechanismus, unten rechts: Verdeutlichung der Bewegungsbahnen . . .	77
3.13	Entwickelter Programmablaufplan für die Software des Fischsortierers (einzelne Teilfunktionen rot umrandet)	81
3.14	Ablauf der Bilverarbeitung zur Fischerkennung; oben: links: Originalbild Fischlarven in Petrischale, Mitte: Trennung von Fischen und Hintergrund mittels Schwellwert, rechts: Entfernen kleiner und großer Objekte nach Flächeninhalt (Kreise); unten: links: Dilatation zum Zusammenwachsen naher Nachbarn und Identifikation von Clustern (Kreise), Mitte: Entfernung der Cluster, rechts: Erkannte Einzelfische (rot) hervorgehoben im Originalbild	84
3.15	Darstellung der entwickelten Umrechnung der Koordinaten von Pixel in mm . .	87
3.16	links: Erfolgsquote und Sortierdauer über Versuchsanzahl. Nach Einbau Sensor (Versuch15) Erfolgsquote 100%. Nach Verbesserung der Hardware (Versuch 33) Sortierdauer reduziert. rechts: theoretische Einflussfaktoren auf die Dauer des Sortierprozesses für 96er Well Plates	92
4.1	Anordnung der Kameras des Parallelmikroskops (Verfahrweg in grün) (modifiziert nach [122])	98

4.2	Hardware des neuen Parallelmikroskops, C = Kamera, R = Roboter, W = well plate, RPC = Roboter-Steuerungs-PC, CPC = Camera-Steuerungs-PC, M = Parallelmikroskop (modifiziert nach [86])	99
4.3	Darstellung des Datenflusses der Netzwerksteuerung des Parallelmikroskops (aus [122])	101
4.4	Beispiel der Dateibenennung der Bilder des Parallelmikroskops (nach [122]) . .	103
4.5	Übersicht Zwei-Kamera-Konzept im Herzschlagmikroskop. links: Detailkamera, rechts: Übersichtskamera	107
4.6	Übersicht über das neue Herzschlagmikroskop: WP= Mikrotiterplatte, OC= Übersichtskamera, DC= Detailkamera, VT= Verstelltisch, M=Schrittmotor, x-,y-,z-Achse; rechts unten: Beispielbild Übersicht (links) und Detail (rechts)	109
4.7	Kantenerkennung mittels Ableitung der Intensitätsfunktion, links: zu erkennender Rand des Kreises, rechts oben: Intensitätsverlauf im Bild von links nach rechts, rechts unten: Ableitung des Intensitätsverlaufs (aus [10])	112
4.8	Bildserie bei Autofokus; oben: Bildserie bei Annäherung an Objekt; unten links: Annäherung der Kamera an Objekt; unten rechts: Sobelindex der fünf Bilder. Das Bild in der Mitte hat den höchsten Sobelindex und ist demnach das schärfste. (modifiziert nach [44])	113
4.9	links: Schärfeverlauf der Übersichtskamera, rechts: Schärfeverlauf der Detailkamera (aus [100])	114
4.10	links: Segmentierung zum Finden der Fischkontur, rechts: Herzerkennung mittels Intensitätsgraph anhand der drei Ausrichtungen a,b und c einer Larve (tatsächliche Herzposition markiert durch gelbe, vertikale Linie) (aus [100])	116
4.11	links: Automatisch segmentierte Herzregion (rot), rechts: Ergebnis der Herzschlaganalyse (aus [93])	121
4.12	Neues Konzept für das Fluoreszenzmikroskop, A: Hardwarekomponenten (aus [102]), B: Linearer optischer Aufbau (aus [34])	127
4.13	Übersicht über das neue Fluoreszenzmikroskop: X, Y, Z-Achsen, WP= Mikrotiterplatte, FT= Filterträger, L= Lichtquelle, AF= Anregungsfilter, EF= Emissionsfilter, C= Kamera, M= Motor, VT= Verstelltisch.	129
4.14	links: Fluoreszenzspektren GFP, rechts: Fluoreszenzspektren RFP (aus [34]) . .	130
4.15	Überlagerung Fluoreszenzbilder zu Falschfarbenbild	132
5.1	Dreiteiliges Konzept für das Transportsystem, links: Schienensystem (Antriebskette gelb), Mitte: Greifarm mit Greifer (nach [35]), rechts: Aktive Plattenhalterung (nach [114])	137

5.2	Hardware des neuen Transportsystem, oben links: Transportsystem mit zwei Roboterwürfeln, oben rechts: Linearschiene mit Rollenkettenantrieb, unten links: Greifarm mit Greifer, unten rechts: aktive Plattenhalterung	141
5.3	Übersicht Konzept Greifarm; A: Parallelkurbel(oben), Zwillingskurbel (unten), B: Skizze der ermittelten Geometrie des Greifarms, C: Geometrische Randbedingungen der Endlage der Platte, D: Bewegungsskizze Greifarm (nach [35])	143
5.4	Bewegung Greifarm (Bilder aus [35])	145
5.5	Übersicht Konzept Mikrotiterplattengreifer; links: Parallelgreifer mit schräger Hauptachse, rechts: Hubmagnet zum Öffnen, Spiralfedern zum Schließen des Greifers (Bilder aus [35])	147
5.6	Konzept aktive Plattenhalterung; links: Mechanik der Halterung; Mitte: Detektion der korrekten Endlage; rechts: grafische Ermittlung des Kegelwinkels (aus [114])	148
5.7	Hardware Aktive Plattenhalterung (modifiziert nach [114])	150
5.8	entwickeltes Konzept zur Steuerung des Transportsystems; KR= Kettenrad, KS= Kettenspanner, M= Motor, ES1= Endschalter Roboter1, ES2= Endschalter Roboter2, AS1= Haltewunschschalter Roboter1, Haltewunschschalter Roboter2 W= Wagen, PT= Platine Transportsystem, P1= Platine Roboter1, P2= Platine Roboter2, PW= Platine Wagen	151
A.1	Darstellung der Messpunkte bei der Vermessung von Fischeiern (links) und Fischlarven (Rechts)	161
A.2	Teststand zur Durchführung der Beleuchtungsversuche aus: 1= LEDs, 2= Fischeier in Petrischale, 3= Winkelskala, 4= Teststandgehäuse, 5= Kamera, 6= Schalter zum Aktivieren der LEDs (aus [16])	167
A.3	Ergebnisse der Beleuchtungsversuche (aus[16])	167
A.4	Aufnahmen von Zebrabärblingseiern bei verschiedenen Lichteinstrahlwinkeln unter weißer LED. Oben: links = 60 Grad, mitte = 85 Grad, rechts = 130 Grad. Unten: Die obigen Bilder nach Umrechnung in den Grauwertbereich (aus[16])	168
A.5	Aufnahmen von Zebrafischeiern bei verschiedenen Lichtfarben. Oben: links rote LED, mitte blaue LED, rechts weiße LED Unten: Die obigen Bilder nach Umrechnung in den Grauwertbereich (aus[16])	168
A.6	Linearachse Isel LEZ1	173
A.7	Schrittmotorsteuerung Nanotec SMCI33	174
A.8	Digitalkamera IDS UI5480 GigE	177
A.9	Digitalkamera IDS UI1240SE USB	178
A.10	Digitalkamera IDS UI6240 GigE	179
A.11	Objektiv Lensation CMFA1022	180

A.12 Objektiv Lensation TC-20-40	181
A.13 Objektiv Lensation B5M12028	182
A.14 Lineartisch Owis VT45	183

C. Tabellenverzeichnis

2.1	Ergebnisse der durchgeführten Vermessung von Fischeiern	34
2.2	Ergebnisse der durchgeführten Vermessung von Fischlarven (die angegebenen Werte sind Mittelwerte)	35
2.3	Grundtypen von Robotern nach [53, 70]	37
3.1	Punkteverteilung zur Bewertung der Verteilungstests (nach [15])	74
3.2	Leistungsdaten des Fischsortierers	93
5.1	Typische Eigenschaften von Positionierachsen (nach [43])	140
A.1	Vermessung der Größe der Fischeier	162
A.2	Vermessung der Geometrie von Larven	162
A.3	Berstdrücke nach 2 min in Pronase	165
A.4	Berstdrücke nach 4 min in Pronase	165
A.5	Zerstörungsdrücke aus [88]	165
A.6	Mikrotiterplatte 1, pipettiert mit Fischsortierer	171
A.7	Mikrotiterplatte 2, pipettiert mit Fischsortierer	171
A.8	Mikrotiterplatte 3, pipettiert manuell	171
A.9	Mikrotiterplatte 4, pipettiert manuell	171

D. Literaturverzeichnis

- [1] I. Adatto, C. Lawrence, M. Thompson, and L. I. Zon. A new system for the rapid collection of large numbers of developmentally staged zebrafish embryos. *PLoS ONE*, 6(6):e21715, 06 2011.
- [2] R. Alshut, J. Legradi, U. Liebel, L. Yang, J. van Wezel, U. Strähle, R. Mikut, and M. Reischl. Methods for automated high-throughput toxicity testing using zebrafish embryos. In R. Dillmann, J. Beyerer, U. Hanebeck, and T. Schultz, editors, *KI 2010: Advances in Artificial Intelligence*, volume 6359 of *Lecture Notes in Computer Science*, pages 219–226. Springer Berlin / Heidelberg, 2010. 10.1007/978-3-642-16111-7 25.
- [3] R. Alshut, J. Legradi, L. Yang, U. Strähle, R. Mikut, and M. Reischl. Robust identification of coagulated zebrafish eggs using image processing and classification techniques. *Proceedings. 19. Workshop Computational Intelligence, Dortmund, 2. - 4. Dezember 2009.*, pages 9 –21, 2009.
- [4] R. Alshut, R. Mikut, J. Legradi, U. Liebel, U. Strähle, G. Bretthauer, and M. Reischl. Automatic classification of image time series for toxicological High-Throughput screens. *at - Automatisierungstechnik*, 59(5):259–268, July 2011.
- [5] J. F. Amatruda, J. L. Shepard, H. M. Stern, and L. I. Zon. Zebrafish as a cancer model system. *Cancer Cell*, 1(3):229 – 231, 2002.
- [6] E. Appleton and D. J. Williams. *Industrieroboter : Anwendungen*. Robotik. VCH, Weinheim [u.a.], 1991.
- [7] G. Bending, M. Grimmer, I. Huttner, G. Wessels, T. Dahme, S. Just, N. Trano, H. Katus, M. Fishman, and W. Rottbauer. Integrin-linked kinase, a novel component of the cardiac mechanical stretch sensor, controls contractility in the zebrafish heart. *Genes Dev.*, 20:2361–2372, 2006.
- [8] J. Bilotta, S. Saszik, A. DeLorenzo, and H. Hardesty. Establishing and maintaining a low-cost zebrafish breeding and behavioral research facility. *Behavior Research Methods*, 31:178–184, 1999. 10.3758/BF03207707.
- [9] J. J. Burbaum and N. H. Sigal. New technologies for high-throughput screening. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1(1):72 – 78, 1997.

- [10] W. Burger and M. J. Burge. *Digitale Bildverarbeitung : Eine Einführung mit Java und ImageJ*. X-media-pressX.media.press. Springer, Berlin, 2. auflage edition, 2006.
- [11] R. Carvalho, J. de Sonnevile, O. W. Stockhammer, N. D. L. Savage, W. J. Veneman, T. H. M. Ottenhoff, R. P. Dirks, A. H. Meijer, and H. P. Spink. A high-throughput screen for tuberculosis progression. *PLoS ONE*, 6(2):e16779, 02 2011.
- [12] C. Celik. Konzeptions- und Entwicklungsgrundlagen von Handlingwerkzeugen für biologische Proben zum Einsatz in Hochdurchsatzverfahren in der Bio-Analysetechnik, 2010. Diplomarbeit, Karlsruher Institut für Technologie.
- [13] J. D. W. Clarke and S. N. Jayasinghe. Bio-electrosprayed multicellular zebrafish embryos are viable and develop normally. *Biomedical Materials*, 3(1):011001, 2008.
- [14] C. d'Alencon, O. Pena, C. Wittmann, V. Gallardo, R. Jones, F. Loosli, U. Liebel, C. Grabher, and M. Allende. A high-throughput chemically induced inflammation assay in zebrafish. *BMC Biology*, 8(1):151, 2010.
- [15] R. del Alcazar von Buchwald. Entwicklung und Konstruktion eines Mechanismus zum Erzielen einer homogenen Verteilung von Fischeiern in Petrischalen mittels Fluidströmungen, 2011. Bachelorarbeit, Karlsruher Institut für Technologie.
- [16] U. Delventhal. Untersuchung und Auswahl eines Beleuchtungskonzepts zur bildgestützten Differenzierung von Zebrafischeiern, 2011. Studienarbeit, Karlsruher Institut für Technologie.
- [17] C. Demant, B. Streicher-Abel, and P. Waszkewitz. *Industrielle Bildverarbeitung : wie optische Qualitätskontrolle wirklich funktioniert;*. Springer, Berlin [u.a.], 2. aufl. edition, 2002.
- [18] J. P. Desai, A. Pillarisetti, and A. D. Brooks. Engineering approaches to biomanipulation. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 9(1):35–53, 2007.
- [19] L. J. DeTolla, S. Srinivas, B. R. Whitaker, C. Andrews, B. Hecker, A. S. Kane, and R. Reimschuessel. Guidelines for the care and use of fish in research. *ILAR Institute for Laboratory Animal Research*, 37(4), 1995.
- [20] DIN Norm. DIN EN ISO 15088 Wasserbeschaffenheit. Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (*Danio rerio*) (ISO 15088:2007). Technical report, Deutsches Institut für Normung, June 2009.
- [21] K. Dooley and L. I. Zon. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, 10(3):252 – 256, 2000.

- [22] A. Erhardt. *Einführung in die Digitale Bildverarbeitung : Grundlagen, Systeme und Anwendungen*. Studium. Vieweg + Teubner, Wiesbaden, 2008.
- [23] Europäische Union. VERORDNUNG (EG) Nr. 1907/2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH),. Europäische verordnung, Europäisches Parlament, Dec 2006.
- [24] M. Fink, C. Callol-Massot, A. Chu, P. Ruiz-Lozano, J. C. I. Belmonte, W. Giles, R. Bodmer⁵, and K. Ocorr⁵. A new method for detection and quantification of heartbeat parameters in drosophila, zebrafish, and embryonic mouse hearts. *BioTechniques*, 46(2):101–113, february 2009.
- [25] L. Firestone, K. Cook, K. Culp, N. Talsania, and K. Preston Jr. Comparison of autofocus methods for automated microscopy. *Cytometry*, 12(3):195–206, 1991.
- [26] K. Franzen. Der nächste Schritt in der Laborautomatisierung Der Roboter. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 323:556–559, 1986. 10.1007/BF00504497.
- [27] D. Freudig and P. Berthold. *Faszination Biologie : von Aristoteles bis zum Zebrafisch*. Elsevier, Spektrum Akad. Verl., München, 2005.
- [28] A. Funfak, A. Brösing, M. Brand, and J. Köhler. Micro fluid segment technique for screening and development studies on danio rerio embryos. *Lab Chip*, 7:1132 – 1138, 2007.
- [29] J. Gehrig, M. Reischl, E. Kalmár, M. Ferg, Y. Hadzhiev, A. Zaucker, C. Song, S. Schindler, U. Liebel, and F. Müller. Automated high-throughput mapping of promoter-enhancer interactions in zebrafish embryos. *Nature Methods*, 6:911 – 916, 2009.
- [30] D. Gerlach. *Das Lichtmikroskop : eine Einführung in Funktion, Handhabung und Spezialverfahren für Mediziner und Biologen*. Flexible Taschenbücher. Thieme, Stuttgart, 1976.
- [31] C. Gerthsen. *Gerthsen Physik*. Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin, 23. auflage edition, 2006.
- [32] J. Giacomotto and L. Sägalat. High-throughput screening and small animal models, where are we? *British Journal of Pharmacology*, 160(2):204–216, 2010.
- [33] P. Goldsmith. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Current Opinion in Pharmacology*, 4(5):504 – 512, 2004.

- [34] M. Grabowski. Entwicklung eines Fluoreszenzmoduls zur bildgestützten Erfassung charakteristischer Merkmale in biologischen Proben, 2011. Bachelorarbeit, Karlsruher Institut für Technologie.
- [35] G. Graf. Entwicklung und Konstruktion eines Handhabungsmechanismus zum Positionieren von Mikrotiterplatten, 2012. Bachelorarbeit, Karlsruher Institut für Technologie.
- [36] S. F. Graf, S. Hötzel, U. Liebel, A. Stemmer, and H. F. Knapp. Image-based fluidic sorting system for automated zebrafish egg sorting into multiwell plates. *Journal of Laboratory Automation*, 16(2):105 – 111, 2011.
- [37] F. Groen, I. Young, and G. Ligthart. A comparison of different focus functions for use in autofocus algorithms. *Cytometry*, 6(2):81–91, 1985.
- [38] P. Haffter, M. Granato, M. Brand, M. Mullins, M. Hammerschmidt, D. Kane, J. Odenthal, F. van Eeden, Y. Jiang, C. Heisenberg, R. Kelsh, M. Furutani-Seiki, E. Vogelsang, D. Beuchle, U. Schach, C. Fabian, and C. Nusslein-Volhard. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *danio rerio*. *Development*, 123(1):1–36, 1996.
- [39] T. Hartung and C. Rovida. Chemical regulators have overreached. *Nature*, 460(7259):1080–1081, 2009.
- [40] R. P. Hertzberg and A. J. Pope. High-throughput screening: new technology for the 21st century. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4(4):445 – 451, 2000.
- [41] S. Hesse. *Automatisieren mit Know-how : Handhabung, Robotik, Montage*. Hoppenstedt Zeitschriften, Darmstadt, 2002.
- [42] S. Hesse. *Robotergreifer : Funktion, Gestaltung und Anwendung industrieller Greiftechnik*. Hanser, München, 2004.
- [43] S. Hesse. *Grundlagen der Handhabungstechnik : mit 479 Bildern, 15 Tabellen sowie 17 Übungsaufgaben und 104 Kontrollfragen*. Hanser, München, 2. auflage edition, 2010.
- [44] M. Hirtler. Entwicklung einer Steuerungssoftware für ein robotergestütztes Mikroskop zur Darstellung eines mehrstufigen, automatischen Analyseprozesses, 2011. Studienarbeit, Karlsruher Institut für Technologie.
- [45] H. Huang, D. Sun, J. Mills, and S. H. Cheng. Robotic cell injection system with position and force control: Toward automatic batch biomanipulation. *Robotics, IEEE Transactions on*, 25(3):727 –737, june 2009.

- [46] M. Husty. *Kinematik und Robotik*. Springer, Berlin, 1997.
- [47] J. Inglese, D. S. Auld, A. Jadhav, R. L. Johnson, A. Simeonov, A. Yasgar, W. Zheng, and C. P. Austin. Quantitative high-throughput screening: A titration-based approach that efficiently identifies biological activities in large chemical libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(31):11473–11478, 2006.
- [48] C. K. Kaufman, R. M. White, and L. Zon. Chemical genetic screening in the zebrafish embryo. *Nat. Protocols*, 4(10):1422–1432, Sept. 2009.
- [49] H. Kerle, B. Corves, M. Hüsing, H. Kerle, B. Corves, and M. Hüsing. Getriebesystematik. In *Getriebetechnik*. Vieweg+Teubner Verlag, 2012.
- [50] D.-H. Kim, C. N. Hwang, Y. Sun, S. H. Lee, B. Kim, and B. Nelson. Mechanical analysis of chorion softening in prehatching stages of zebrafish embryos. *NanoBioscience, IEEE Transactions on*, 5(2):89–94, June 2006.
- [51] D.-H. Kim, Y. Sun, S. Yun, B. Kim, C. N. Hwang, S. H. Lee, and B. Nelson. Mechanical property characterization of the zebrafish embryo chorion. In *Engineering in Medicine and Biology Society, 2004. IEMBS '04. 26th Annual International Conference of the IEEE*, volume 2, pages 5061–5064, Sept. 2004.
- [52] C. B. Kimmel, W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann, and T. F. Schilling. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203 Nr 3:253–310, 1995.
- [53] E. Kreuzer. *Industrieroboter : Technik, Berechnung und anwendungsorientierte Auslegung*. Springer, Berlin, 1994.
- [54] O. Lange, J. Hortig, T. Böhme, T. Felsch, and N. Elkmann. Laborautomatisierung jenseits des liquid-handlings. *Biospektrum*, 5:675–677, 2005.
- [55] C. Lawrence. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, 269(1-4):1–20, 2007.
- [56] Z. Lele and P. H. Krone. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotechnology Advances*, 14(1):57–72, 1996.
- [57] C. A. Lessman. The developing zebrafish (*Danio rerio*): A vertebrate model for high-throughput screening of chemical libraries. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 93(3):268–280, 2011.

- [58] A. Letamendia, C. Quevedo, I. Ibarbia, J. M. Virto, O. Holgado, M. Diez, J. C. Izpisua Belmonte, and C. Callol-Massot. Development and validation of an automated high-throughput system for zebrafish in vivo screenings. *PLoS ONE*, 7(5):e36690, 05 2012.
- [59] B. Lippold. Roboter im labor: Laborautomatisierung. *Chemie.de*, 2005.
- [60] L.-j. Liu, Y.-y. Zheng, J.-q. Feng, and L. Yu. A fast auto-focusing technique for multi-objective situation. In *Computer Application and System Modeling (ICCSM), 2010 International Conference on*, volume 1, pages V1–607 –V1–610, oct. 2010.
- [61] N. Malo, J. A. Hanley, S. Cerquozzi, J. Pelletier, and R. Nadon. Statistical practice in high-throughput screening data analysis. *Nat Biotech*, 24(2):167–175, Feb. 2006.
- [62] D. Mandrell, L. Truong, C. Jephson, M. R. Sarker, A. Moore, C. Lang, M. T. Simonich, and R. L. Tanguay. Automated zebrafish chorion removal and single embryo placement: Optimizing throughput of zebrafish developmental toxicity screens. *Journal of Laboratory Automation*, 17(1):66–74, 2012.
- [63] F. Markowetz. How to understand the cell by breaking it: Network analysis of gene perturbation screens. *PLoS Comput Biol*, 6(2):e1000655, 02 2010.
- [64] L. M. Mayr and D. Bojanic. Novel trends in high-throughput screening. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(5):580 – 588, 2009. Anti-infectives/New technologies.
- [65] R. Mikut. *Data Mining in der Medizin und Medizintechnik*, volume 22. Habilitation, KIT Scientific Publishing, 2008.
- [66] R. Mikut, O. Burmeister, S. Braun, and M. Reischl. The open source matlab toolbox gait-cad and its application to bioelectric signal processing. In *Proc., DGBMT-Workshop Biosignalverarbeitung, Potsdam*, pages 109–111, 2008.
- [67] R. Nagel. Dart: The embryo test with the zebrafish danio rerio. a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX - Alternativen zu Tierexperimenten*, 19 Suppl 1:38–48, 2002.
- [68] H. Nasse. Wie liest man mtf- kurven? Technical report, Carl Zeiss, December 2008. Geschäftsbereich Photo-Objektive.
- [69] NatureMethods. Geneticist seeks engineer: must like flies and worms. *Nature Methods*, 4(6):463–463, june 2007.
- [70] M. Naval. *Roboter-Praxis : Aufbau, Funktion und Einsatz von Industrierobotern*. Vogel-Fachbuch : Technik : Automatisierung. Vogel, Würzburg, 1. aufl. edition, 1989.

- [71] N. Ng Kuang Chern and M. H. Ang. Practical issues in pixel-based autofocusing for machine vision. *Proceedings 2001 ICRA IEEE International Conference on Robotics and Automation Cat No01CH37164*, 3:2791–2796, 2001.
- [72] Nickum, Bart, Bowser, Greer, Hubbs, Jenkins, MacMillan, Rose, Sorensen, and Tomasso. *Guidelines for the use of fishes in research*. Use of Fishes in Research Committee UFR, 2004.
- [73] W. Nitsche and A. Brunn. Strömungssichtbarmachung. In *Strömungsmesstechnik*, VDI-Buch, pages 154–176. Springer Berlin Heidelberg, 2006. 10.1007/3-540-32487-9 6.
- [74] K. Ocorr, M. Fink, A. Cammarato, S. I. Bernstein, and R. Bodmer. Semi-automated optical heartbeat analysis of small hearts. *J Vis Exp*, (31):e1435–, Sept. 2009.
- [75] P. K. Odenwälder, S. Irvine, J. R. McEwan, and S. N. Jayasinghe. Bio-electrosprays: A novel electrified jetting methodology for the safe handling and deployment of primary living organisms. *Biotechnology Journal*, 2(5):622–630, 2007.
- [76] OECD. OECD Guideline Fish Embryo Toxicity (FET) Test. Technical report, Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 2006.
- [77] H. Oertel, M. Böhle, and U. Dohrmann. *Strömungsmechanik : Grundlagen, Grundgleichungen, Lösungsmethoden, Softwarebeispiele*. Studium Technik. Vieweg, Wiesbaden, 4., überarb. u. erw. aufl. edition, 2006.
- [78] C. Pardo-Martin, C. Tsung-Yao, B. K. Koo, C. L. Gilleland, S. C. Wasserman, and M. F. Yanik. High-throughput in vivo vertebrate screening. *Nat Meth*, 7(8):634–636, 2010.
- [79] G. Patterson, R. N. Day, and D. Piston. Fluorescent protein spectra. *Journal of Cell Science*, 114(5):837–838, 2001.
- [80] F. L. Pedrotti, editor. *Optik für Ingenieure : Grundlagen*. Springer, Berlin, 3. auflage edition, 2005.
- [81] R. Peravali, J. Gehrig, S. Giselbrecht, D. Lütjohann, Y. Hadzhiev, F. Müller, and U. Liebel. Automated feature detection and imaging for high-resolution screening of zebrafish embryos. *BioTechniques*, 50(50):319–324, May 2011.
- [82] A. Pfriem, C. Pylatiuk, R. Alshut, B. Ziegner, S. Schulz, and G. Bretthauer. A modular, low-cost robot for zebrafish handling. In *Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2012 Annual International Conference of the IEEE*, pages 980–983, 28 2012-sept. 1 2012.

- [83] A. Pfriem, C. Pylatiuk, B. Ziegner, R. Alshut, C. Grabher, U. Liebel, and S. Schulz. The fish sorter - a new lab robot for zebrafish handling. In *7th European Zebrafish Meeting, Edinburgh, GB, July 5-9, 2011*, 7th European Zebrafish Meeting, page 373, Edinburgh, GB, July 2011.
- [84] A. Pfriem, C. Pylatiuk, B. Ziegner, R. Alshut, J. Legradi, S. Hötzel, E. Gursky, U. Liebel, and S. Schulz. New high-throughput automation tools for zebrafish analysis. The Zebrafish Embryo Model in Toxicology and Teratology, Karlsruhe, September 2- 3 2010.
- [85] A. Pfriem, S. Schulz, U. Liebel, E. Gursky, and G. Bretthauer. Maras - mehrachs roboter automatisierungs system. Mechatronik Karlsruhe, Karlsruhe, 19.-20.Mai 2010.
- [86] A. Pfriem, S. Schulz, C. Pylatiuk, R. Alshut, and G. Bretthauer. Robotersysteme für Hochdurchsatzverfahren in der Bioanalysetechnik. *at - Automatisierungstechnik*, 59(2):134–140, Sept. 2011.
- [87] R. Pulak. Techniques for analysis, sorting, and dispensing of *C. elegans* on the copas flow-sorting system. In K. Strange, editor, *C. elegans*, volume 351 of *Methods in Molecular Biology*, pages 275–286. Humana Press, 2006. 10.1385/1-59745-151-7:275.
- [88] C. Pylatiuk, A. Pfriem, U. Liebel, S. Schulz, and G. Bretthauer. Ingenieurtechnische Besonderheiten bei der automatischen Handhabung von biologischen Organismen. *at - Automatisierungstechnik*, 59(11):692–698, 2011.
- [89] C. Pylatiuk, B. Ziegner, A. Pfriem, R. Alshut, S. Hötzel, M. Reischl, U. Liebel, S. Schulz, and G. Bretthauer. Automatisierung des Hochdurchsatz-Screenings von Zebrafischlarven. In R. Riener, editor, *Automatisierungstechnische Verfahren für die Medizin 9. Workshop Tagungsband*, volume 17 of *VDI Fortschrittsberichte: Biotechnik/Medizintechnik*, pages 13–14, Zürich, Okt 2010. VDI Verlag. ISBN 978-3-18-327917-3 ISSN 0178-9600.
- [90] B. Romeis, M. Mulisch, and E. Aescht. *Mikroskopische Technik*. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, 18. auflage edition, 2010.
- [91] A. G. Ruß, editor. *Linearlager und Linearführungssysteme : Einsatzmöglichkeiten - Berechnung - Auslegung*. Kontakt + Studium ; 337. expert-Verl., Renningen, 2. auflage edition, 2000.
- [92] E. Rummich. *Elektrische Schrittmotoren und -antriebe : Funktionsprinzip - Betriebseigenschaften - Messtechnik*. Kontakt + Studium ; 365. expert-Verl., Renningen, 3. auflage. edition, 2005.

- [93] D. Sanchez. Entwicklung einer Methode zur automatisierten Extraktion der Herzfrequenz aus Videosequenzen von Zebrafischlarven, 2012. Bachelorarbeit, Karlsruher Institut für Technologie.
- [94] J. Schredelseker and G. Krumschnabel. Der Zebrafisch als vielseitiges Modellsystem. *Biologie in unserer Zeit*, 39 Issue 6:389 – 397, 2009.
- [95] L. Segalat. Invertebrate animal models of diseases as screening tools in drug discovery. *ACS Chemical Biology*, 2(4):231–236, 2007. PMID: 17455900.
- [96] I. W. Selderslaghs, A. R. V. Rompay, W. D. Coen, and H. E. Witters. Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. *Reproductive Toxicology*, 28(3):308 – 320, 2009.
- [97] B. Siciliano and O. Khatib. *Springer Handbook of Robotics*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2008.
- [98] R. S. Sikes and W. L. Gannon. Guidelines of the american society of mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy*, 92(1):235–253, 2011.
- [99] J. M. Spitsbergen and M. L. Kent. The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research advantages and current limitations. *Toxicologic Pathology*, 31 No 1:62–87, 2003.
- [100] W. Spomer. Entwicklung einer Steuerungssoftware für ein robotergestütztes Mikroskop zur automatischen Erkennung und Aufnahme von Zebrafischherzen, 2011. Diplomarbeit, Karlsruher Institut für Technologie.
- [101] W. Spomer, A. Pfriem, R. Alshut, S. Just, and C. Pylatiuk. High-throughput screening of zebrafish embryos using automated heart detection and imaging. *Journal of Laboratory Automation*, 17(6):435–442, 2012.
- [102] C. Stan. Entwicklung eines roboter-basierten Fluoreszenzscanners zur automatischen, bildgestützten Detektion von Fluoreszenz in Zebrafischen, 2012. Diplomarbeit, Karlsruher Institut für Technologie.
- [103] V. Starkuviene and R. Pepperkok. The potential of high-content high-throughput microscopy in drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 152(1):62–71, 2007.
- [104] Statistisches Bundesamt. <http://www.destatis.de>, Statistik häufigste Todesursachen, 2011. zuletzt aufgerufen am 06.12.2012.
- [105] R. Steinbrecher. *Bildverarbeitung in der Praxis*. Oldenbourg, München, 1993.

- [106] J. Steinmüller, editor. *Bildanalyse: Von der Bildverarbeitung zur räumlichen Interpretation von Bildern*. eXamen.press. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2008.
- [107] M. E. Stevens, P. J. Bouchard, I. Kariv, T. D. Chung, and K. R. Oldenburg. Comparison of automation equipment in high throughput screening. *Journal of Biomolecular Screening*, 3(4):305–311, Winter 1998.
- [108] U. Strähle, S. Scholz, R. Geisler, P. Greiner, H. Hollert, S. Rastegar, A. Schumacher, I. Selderslaghs, C. Weiss, H. Witters, and T. Braunbeck. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments—a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reproductive Toxicology*, In Press, Corrected Proof:–, 2011.
- [109] C. Sullivan and C. H. Kim. Zebrafish as a model for infectious disease and immune function. *Fish & Shellfish Immunology*, 25(4):341 – 350, 2008. NOFFI: Advances in Fish Immunology, The 7th International Symposium on Fish Immunology in Stirling, 2007.
- [110] S. Sumanas and S. Lin. Zebrafish as a model system for drug target screening and validation. *Drug Discovery Today: TARGETS*, 3(3):89 – 96, 2004.
- [111] T. Tirschler. Entwicklung eines Konzeptes für eine Parallele Mikroskopieranlage für Zebrafisch-ToxScreenings, Sept 2009. Praktikumsbericht, TU Dresden.
- [112] K. D. Tönnies. *Grundlagen der Bildverarbeitung*. i - Informatik : Bildverarbeitung. Pearson Studium, München [u.a.], 2005.
- [113] H. Tsutsui, S.-i. Higashijima, A. Miyawaki, and Y. Okamura. Visualizing voltage dynamics in zebrafish heart. *The Journal of Physiology*, 588(12):2017–2021, 2010.
- [114] M. Ungerer. Entwicklung und Konstruktion einer Halterung für Mikrotiterplatten mit automatischer Ausrichtung, 2012. Diplomarbeit, Karlsruher Institut für Technologie.
- [115] VDI. Richtlinie VDI 2861 Montage- und Handhabungstechnik. Kenngrößen für Industrieroboter, June 1988. Verein Deutscher Ingenieure.
- [116] W. Wang, X. Liu, D. Gelinas, B. Ciruna, and Y. Sun. A fully automated robotic system for microinjection of zebrafish embryos. *PLoS ONE*, 2 Issue 9:e862, 2007.
- [117] E. Wienholds, F. van Eeden, M. Kusters, J. Mudde, R. H. Plasterk, and E. Cuppen. Efficient target-selected mutagenesis in zebrafish. *Genome Research*, 13(12):2700–2707, 2003.

- [118] C. H. Williams and C. C. Hong. Multi-step usage of in vivo models during rational drug design and discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(4):2262–2274, 2011.
- [119] L. Yang, N. Y. Ho, R. Alshut, J. Legradi, C. Weiss, M. Reischl, R. Mikut, U. Liebel, F. Müller, and U. Strähle. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reproductive Toxicology*, 28(2):245 – 253, 2009. 37th Annual Conference of the European Teratology Society.
- [120] A. Yasgar, P. Shinn, A. Jadhav, D. Auld, S. Michael, W. Zheng, C. P. Austin, J. Inglese, and A. Simeonov. Compound management for quantitative high-throughput screening. *Journal of the Association for Laboratory Automation*, 13(2):79 – 89, 2008.
- [121] X. Zhang, Z. Lu, D. Gelinas, B. Ciruna, and Y. Sun. Batch transfer of zebrafish embryos into multiwell plates. *Automation Science and Engineering, IEEE Transactions on*, 8(3):625 –632, july 2011.
- [122] B. Ziegner. Entwicklung eines High-Troughput-Parallel-Mikroskop, 2010. Praktikumsbericht, Hochschule Karlsruhe.
- [123] B. Ziegner. Entwicklung eines Sensormoduls zur Bewertung von Zebrafischeiern, als Bestandteil eines robotergestützten Bio-Analyse-Systems, 2010. Diplomarbeit, Hochschule Karlsruhe.
- [124] L. I. Zon and R. T. Peterson. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov*, 4(1):35–44, Jan. 2005.